



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

INSTITUTO DE NEUROBIOLOGIA
Campus UNAM-UAQ. Juriquilla, Qro

**Caracterización de las subpoblaciones de
somatotropos y heterogeneidad molecular de
la hormona de crecimiento (GH) de pollo**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE:
MAESTRO EN CIENCIAS
(NEUROBIOLOGIA)
PRESENTA:
BIOL. SALVADOR XIHUITL SOTO
Tutor: Dr. CARLOS ARAMBURO DE LA HOZ



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

Esta tesis fue realizada en el laboratorio de Bioquímica de Hormonas del Dr. Carlos Arámburo de la Hoz, en el Instituto de Neurobiología de la UNAM (campus Juriquilla, Querétaro) durante el periodo de 2002-2006. La tesis se realizó con apoyo de CONACyT (41218-Q y beca de maestría 176132), PAPIIT (IN226002) y Fondo Dr. Alejandro Bayón Caso.

AGRADECIMIENTOS

A nuestra máxima casa de estudios **Universidad Nacional Autónoma de México** por darme una educación escolar de alto nivel.

Al Dr. Carlos Arámburo de la Hoz por aceptarme en su grupo de investigación, por permitir desarrollar mis estudios bajo su dirección y asesoría, por la confianza que depositó en mí para terminar este proyecto. Pero sobre todo, por su gran amistad que nos brindó a mi familia.

A la Dra. Maricela Luna por sus enseñanzas, sus consejos, su apoyo y su gran amistad. A la Dra. Flor por sus consejos y su gran amistad. A Martha Carranza por sus asesorías técnicas y su gran amistad.

A mi comité tutorial: Dr. Carlos Arámburo de la Hoz, Dra. Teresa Morales Guzmán y Dr. Gonzalo Martínez de la Escalera, por sus valiosos comentarios en los tutorales.

A mi jurado de examen: Dr. Enrique Pedernera Astegiano, Dr. Carlos Arámburo de la Hoz, Dra. Carmen Aceves Velasco, Dr. Víctor Ramírez Amaya y Dr. Gonzalo Martínez de la Escalera, por sus valiosos puntos de vista y comentarios en la revisión de esta tesis.

A mis compañeros de generación (2002-2004): Omar, Ulises, Nancy, Berenice, Ariel, Marcelino, Mónica, Lizzette, Lorena y Jessica. Gracias por hacer mi estancia más agradable.

A las pollas y pollos que alguna vez fueron miembros del laboratorio: Hilda (por sus enseñanzas en la primera fase del proyecto), Bernardo (el cartel de Querétaro) por su amistad y a Laura Berumen (gracias por tu apoyo, consejos y amistad), y actuales miembros del laboratorio: Carlos G., Adriana R., Clara A., Marisela A., Lourdes O. y José Luis L. A mi compadre Gerardo Courtois (laboratorista) por su ayuda y paciencia en la obtención de las hipófisis y por su gran amistad.

A la Dra. Carmen Aceves Velasco y Dra. Brenda Anguiano Serrano por el apoyo que han brindado a mi familia y su amistad. Y a todos los miembros de su laboratorio.

A mi esposa Nuri y a mi hijo Sebastián que cambiaron mi vida por completo y a los cuales, estoy muy agradecido por su paciencia y apoyo en los momentos más difíciles que hemos pasado. Los quiero mucho.

A mi papá Urbano, mamá Emma, mis hermanos Josué y Eduardo, mi cuñada Mónica y mis sobrinos Josué y Santiago. A todos ellos por su gran cariño y apoyo.

A Pilar Galarza, Rafael Silva e Ignacio Caballero por su apoyo técnico en la biblioteca y por su amistad. A los miembros de la unidad de análisis de imágenes: Dr. F. Barrios, Elsa Nydia H., Lourdes Lara y Leopoldo González por su asistencia técnica. Y en general a todo el personal que forma parte del Instituto de Neurobiología, GRACIAS.

INDICE

AGRADECIMIENTOS	I
TABLA DE ABREVIATURAS	II
RESUMEN	III
INDICE	IV
1 INTRODUCCION	1
1.1 Estructura de la hormona de crecimiento (GH)	3
1.2 Heterogeneidad molecular de la GH	4
1.3 Actividad biológica de las variantes de GH	7
1.4 Los somatotropos	8
1.5 Estudios en otras especies	10
1.6 Características de separación de los gradientes de densidad	10
2 JUSTIFICACION E HIPOTESIS	13
3 OBJETIVO GENERAL Y OBJETIVOS PARTICULARES	13
4 DISEÑO EXPERIMENTAL	14
5 MATERIAL Y METODOS	15
5.1 Obtención y dispersión de células hipofisarias	15
5.2 Prueba de exclusión de azul de tripán	16
5.3 Efecto dosis-respuesta con GHRH en cultivos primarios	16
5.4 Separación de subpoblaciones celulares	17
5.5 Frotis y fijación de las fracciones celulares	18
5.6 Tinción con hematoxilina y eosina	19
5.7 Inmunocitoquímica	20
5.8 Cultivo celular y tratamiento con GHRH	20
5.9 Extracción de proteínas de las células en cultivo	21
5.10 Cuantificación de proteína por el método de Bradford	21
5.11 Cuantificación de cGH por la técnica de ELISA	22
5.12 Análisis electroforéticos (SDS-PAGE y Western blot)	22
5.13 Análisis de las variantes de cGH por densitometría	24
6 RESULTADOS	25
6.1 Gradiente hiperbólico de percoll 25-80%	25
6.2 Tinción con hematoxilina y eosina de las células aisladas en fracciones del gradiente hiperbólico de percoll 25-80%	28
6.3 Tinción por inmunocitoquímica de las células aisladas en fracciones del gradiente hiperbólico de percoll 25-80%	32
6.4 Gradiente hiperbólico de percoll 10-70% (A) con frotis manuales	35
6.5 Tinción con hematoxilina y eosina de las células aisladas en fracciones del gradiente hiperbólico de percoll 10-70%	38

6.6	Tinción por inmunocitoquímica de las células aisladas en las fracciones del gradiente hiperbólico de percoll 10-70%	41
6.7	Gradiente hiperbólico de percoll 10-70% (B) frotis con citocentrífuga	44
6.8	Tinción con hematoxilina y eosina de las células aisladas en las fracciones del gradiente hiperbólico de percoll 10-70%	46
6.9	Tinción por inmunocitoquímica de las células aisladas en las fracciones del gradiente hiperbólico de percoll 10-70%	49
6.10	Inmunoanálisis enzimático (ELISA)	52
6.11	Efecto del GHRH sobre el contenido y liberación de GH en las subpoblaciones aisladas de somatotropos	52
6.12	Análisis electroforético de las variantes moleculares de masa de la cGH	57
7	DISCUSION	74
8	CONCLUSIONES	91
9	BIBLIOGRAFIA	92

RESUMEN

La adenohipófisis de las aves está dividida en dos lóbulos: caudal y céfalico. Los somatotropos se localizan mayoritariamente en el lóbulo caudal, en donde constituyen entre el 35-40% de sus células. En las aves, los somatotropos del lóbulo caudal tienen una inmunorreactividad contra hormona de crecimiento de pollo (cGH) mayor que los del lóbulo céfalico y parecen ser más sensibles a secretagogos como la hormona liberadora de hormona de crecimiento (GHRH). Estos hallazgos pueden reflejar diferencia en la síntesis y secreción de la cGH o bien en el tipo de variante molecular de cGH que se encuentre almacenada. En este trabajo se planteó el objetivo de aislar y caracterizar morfológica y funcionalmente a las subpoblaciones de somatotropos hipofisarios de pollo. Para ello se utilizaron gradientes hiperbólicos de percoll (10-70%) centrifugados durante 1 hr a 5,500 rpm a 4°C, para separar las diferentes células hipofisarias que fueron obtenidas en 15 fracciones (fracs). Mediante azul de tripano se cuantificó el número total de células hipofisarias en cada fracción, observándose que el mayor número de células hipofisarias se concentra entre las fracciones 3 y 6 ($10.1 \times 10^6 \pm 1.6 \times 10^6$ y $28.3 \times 10^6 \pm 3.2 \times 10^6$ cel/ml). Por otra parte, para poder identificar a los somatotropos del resto de los tipos celulares, se emplearon dos técnicas: A) Con la tinción de hematoxilina-eosina se cuantificó la concentración de células acidófilas (somatotropos y lactotropos) en cada fracción, observándose dos zonas con mayor concentración de células acidófilas y con diferente tamaño; la primera se concentró entre las fracciones 5 y 6 ($52 \pm 4.0\%$ y $59 \pm 4.0\%$); y la segunda se concentró entre las fracciones 9 y 10 ($46 \pm 2.0\%$ y $47.5 \pm 1.5\%$). B) Con inmunocitoquímica utilizando un anticuerpo contra cGH se cuantificó la concentración de somatotropos en cada fracción, observándose dos zonas con mayor concentración de somatotropos y diferente tamaño; la primera se concentró entre las fracciones 4 y 6 ($26 \pm 1.6\%$ y $33 \pm 3.1\%$), en un intervalo de densidad entre 1.049 a 1.068 g/ml; la segunda se concentró entre las fracciones 10 y 11 ($24 \pm 2.1\%$ y $27 \pm 2.2\%$) en un intervalo de densidad de 1.087 a 1.091 g/ml. Estos resultados indicaron la existencia de 2 subpoblaciones de somatotropos con diferente tamaño: una de baja (BD) y otra de alta densidad (AD). Por otra parte, los somatotropos de AD presentaron un área (tamaño) significativamente mayor $220.3 \pm 2.64 \mu\text{m}^2$ que los de BD $184.2 \pm 2.1 \mu\text{m}^2$ ($P < 0.05$). En células hipofisarias en cultivo se realizó una curva dosis respuesta a GHRH (1, 2, 5, 10 y 20 nM) y se encontró que la concentración de 10 nM de GHRH presentó un factor de respuesta relativa de 1.6. Con base en estos resultados, se comparó el efecto de este secretagogo sobre las subpoblaciones de BD y AD, observándose una mayor liberación de cGH hacia el medio de cultivo de la subpoblación AD vs BD. Contrariamente, las células correspondientes a estas subpoblaciones no mostraron cambios en el contenido de cGH en respuesta al secretagogo. Empleando técnicas como SDS-PAGE y Western blot, pudimos ver en las subpoblaciones de somatotropos BD y AD un perfil semejante de variantes moleculares de cGH, aunque se observó un efecto diferencial en respuesta a GHRH.

1 Introducción

Los organismos multicelulares crecen, se desarrollan y se reproducen debido a la gran capacidad que tienen sus tejidos y órganos para integrar e interpretar la información proveniente de su medio interno y externo, asegurando así su adaptación al ambiente y su supervivencia. La comunicación intercelular es un proceso básico de la vida, generalmente ocurre a través de mecanismos eléctricos y químicos, ambos característicos del sistema nervioso y endocrino que comparten una propiedad fundamental: la secreción de sustancias que actúan sobre otras células. Las secreciones nerviosas (neurotransmisores) ejercen su efecto de manera inmediata sobre células contiguas mientras que las secreciones endocrinas (hormonas) se vierten al torrente sanguíneo y estimulan diversos sistemas de respuesta en aquellas células que cuentan con receptores que reconocen específicamente a las hormonas. El sistema endocrino está coordinado por el hipotálamo, y la hipófisis a su vez, controla la secreción de hormonas en muchos tejidos periféricos como son las glándulas tiroides, paratiroides y suprarrenales, entre otras, que realizan una función endocrina primaria (Muñoz-Martínez, 1997; Arámburo y Bayón, 1997).

La hipófisis es una glándula endocrina que se ha estudiado ampliamente. Estructuralmente tiene forma oval y varía de tamaño según la especie. La hipófisis está situada en una depresión del hueso esfenoides, llamada la silla turca, en la base del cerebro y está unida al hipotálamo por el tallo hipofisario. Consta de dos lóbulos: el anterior (adenohipófisis) y el posterior (neurohipófisis). La adenohipófisis secreta a la hormona de crecimiento (GH), la prolactina (PRL), la hormona tiroestimulante (TSH), la hormona adrenocorticotropa (ACTH), la hormona estimulante de melanocitos (MSH), la hormona luteinizante (LH) y la hormona foliculoestimulante (FSH), entre otras; y la neurohipófisis secreta a la vasopresina (ADH) y a la oxitocina (OT). Las secreciones de la adenohipófisis son controladas por señales neurohormonales provenientes del hipotálamo. Las hormonas neurohipofisarias son sintetizadas en el cuerpo celular de neuronas especializadas del hipotálamo, y descienden por sus axones para ser almacenadas o secretadas. En contraste, las secreciones de la hipófisis anterior son

controladas por neurohormonas llamadas factores hipotalámicos de liberación y de inhibición, secretados dentro del propio hipotálamo y conducidos luego a la hipófisis anterior por pequeños vasos portales hipotálamohipofisarios. En la hipófisis anterior, estos factores liberadores o inhibidores actúan sobre las células glandulares para controlar, a su vez, la síntesis y/o la secreción de sus productos hormonales (Guyton, 1992).

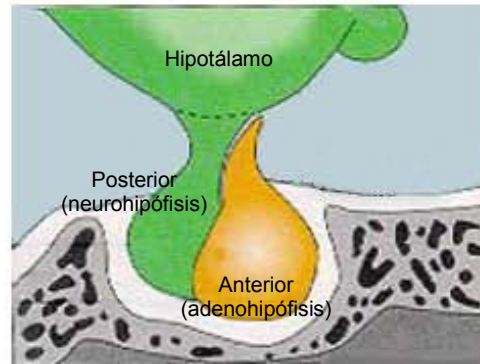


Figura 1. Representación esquemática de la hipófisis.

La hormona de crecimiento (GH) es una proteína hipofisaria que tiene una amplia diversidad funcional en todas las clases de vertebrados. Participa en el metabolismo de proteínas, carbohidratos, ácidos nucleicos y lípidos. Tiene efectos importantes sobre la diferenciación y proliferación celular, así como la estimulación enzimática, el transporte de aminoácidos, estimulación de la eritropoyesis, secreción de otros factores hormonales, entre otros (Isaksson et al., 1985). La hormona de crecimiento (GH), junto con la prolactina (PRL), el lactógeno placentario (PL), la somatotropina coriónica (CS) y la proliferina (PLF) son miembros de una familia de proteínas que se sintetizan fundamentalmente en la hipófisis y en la placenta en mamíferos y que comparten similitudes estructurales (Scanes et al., 1995; Rand-Weaver et al., 1993). Por otra parte, la GH, PRL y PL pertenecen a una familia de hormonas homólogas que están relacionadas tanto estructural como funcionalmente, las cuales se ha postulado que evolucionaron por duplicación de un gen ancestral común (Bewley et al., 1970), seguida por divergencia evolutiva (Niall et al., 1971). Estas hormonas coordinan la distribución de nutrientes en el cuerpo, apoyando el crecimiento selectivo y general de diversos

tejidos. En la mayoría de los vertebrados se expresa un solo gen de GH en la hipófisis. En humanos, sin embargo, se han descrito 2 genes similares situados en el cromosoma 17 (hGH-N, hGH-V). El gen hGH-N se expresa en la hipófisis mientras que el gen hGH-V se expresa en la placenta (Rand-Weaver et al., 1993). También existen evidencias de la expresión de dos genes conocidos como GH-I, GH-II en la hipófisis de trucha y salmón (Kawauchi et al., 1986).

1.1 Estructura de la hormona de crecimiento (GH).

La hormona de crecimiento (GH) hipofisiaria se sintetiza como un precursor (prehormona) de 225 aminoácidos, mientras que la forma madura es una proteína monomérica que tiene un peso molecular aproximado de 22 kDa y está constituida por 191 aminoácidos (dependiendo de la especie). Esta proteína presenta dos puentes disulfuro localizados entre las cisteínas 57-165 y 182-189 que forman un asa central grande, así como un asa pequeña cercana al extremo carboxilo terminal. Tiene un punto isoeléctrico (pI) que varía entre 5.1 - 8.4 dependiendo de la especie (Arámburo 1993; Scanes et al., 1995).

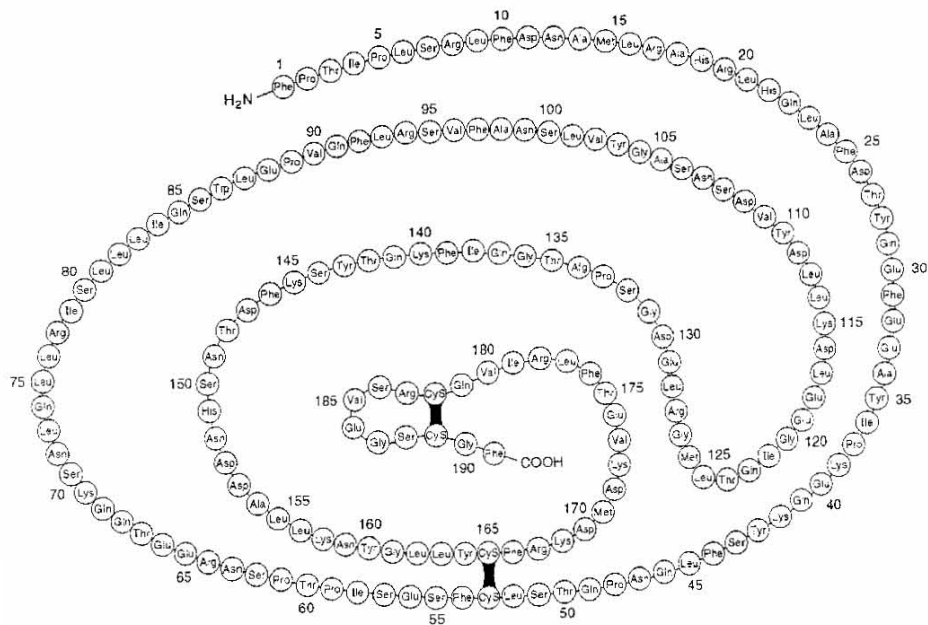


Figura 2. Estructura primaria de la GH.

Su estructura tridimensional se ha determinado por difracción de rayos X empleando como modelo a las GHs de porcino y de humano. El 50% de la molécula presenta un contenido α -helicoidal constituido por 4 α -hélices antiparalelas que se encuentran en los segmentos 7-34, 75-87, 106-127 y 152-183. Además, algunos estudios indican que estas hélices apuntan hacia el exterior de la molécula y son importantes para unirse al receptor (Cunningham et al., 1991; Abdel-Meguid et al; 1987). Datos obtenidos con diferentes métodos (actividad por radioreceptor, estudios con anticuerpos monoclonales, mutagénesis dirigida, y cristalografía de rayos X) han mostrado que la molécula de GH presenta 2 sitios de unión al receptor. El sitio 1 incluye al extremo carboxilo de la hélice 4 y parte del asa 54-74, con la participación de Lys-41, Gln-46, Pro-61, Arg-167, Lys-168, Asp-171, Thr-175 y Arg-178. El sitio 2, por otra parte, incluye al extremo amino de la hélice 1 y 3, y los residuos Asn-12, Arg-16 y Arg-19 (de Vos et al., 1992).

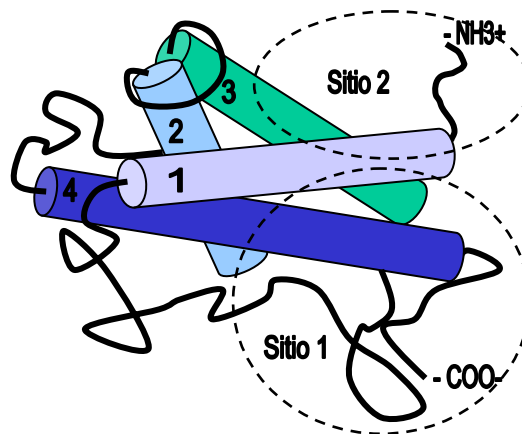


Figura 3. Sitios de unión al receptor de GH.

1.2 Heterogeneidad molecular de la GH.

Como se mencionó, la hormona de crecimiento exhibe una compleja diversidad funcional, ejerciendo diferentes bioactividades que pueden ser explicadas, al menos parcialmente, por la heterogeneidad molecular que presenta esta hormona. Se sabe que la GH hipofisaria está constituida por una familia de proteínas homólogas, pero no idénticas que se originan a través de diferentes mecanismos, como son: a) duplicación

génica; b) procesamiento alternativo del ARNm; c) modificaciones postraduccionales tales como fosforilación, glicosilación, proteólisis, desamidación, acilación y agregación, entre otras. Estas variantes se han encontrado tanto en la hipófisis como en el plasma (Arámburo et al., 1989; Baumann, 1991).

A) Mecanismos por duplicación génica. En la mayoría de los vertebrados se conoce sólo un gen que codifica para la GH. Sin embargo, en humanos se conocen dos genes (hGH-N y hGH-V) que codifican para dos formas de GH muy similares cuya estructura difiere entre sí por 13 aminoácidos y presentan 92% de homología. En algunos peces como la trucha y el salmón se han identificado dos genes que codifican para la GH, y sus productos se conocen como GH-I y GH-II (Scanes et al., 1995).

B) Procesamiento alternativo de ARNm. En humanos, el gen hGH-N produce tres ARNm, cuyos resultantes son la forma mayoritaria de la hGH de 22 kDa que contiene 191 aminoácidos; la de 20 kDa que presenta una delección de 45 nucleótidos en el exón 3 y por ende de 15 aminoácidos correspondientes al segmento 32-46 de la secuencia, esta forma representa alrededor del 10% de la GH hipofisiaria; y una de 17.5 kDa, cuyo producto proteínico no se ha caracterizado aún. También se ha identificado otra proteína de GH de 22 kDa producto del gen hGH-V (Lewis, 1992).

C) Modificaciones postraduccionales. Se han descrito varios tipos de modificaciones químicas sobre la estructura de la GH. Las principales son las siguientes: Se ha visto que la GH puede estar fosforilada. Esta fosforilación confiere características más ácidas a la molécula (Arámburo et al., 1993). Se ha encontrado que en su forma nativa la GH de ratas, ovinos y pollos contiene fosfato esterificado. En humanos la GH es fosforilada por una cinasa de tirosina, mientras que en el pollo la GH es fosforilada por las cinasas de proteínas A y C (Arámburo et al., 1990a).

Hasta ahora todas las formas moleculares de la GH en aves parecen derivar de modificaciones postraduccionales y hay evidencias suficientes de que existe una serie de variantes de masa y de carga, tanto en la adenohipófisis (Arámburo 1990; Houston et al., 1988) como en el plasma (Montiel et al., 1992).

La GH también puede estar glicosilada. Se ha identificado este tipo de variante en la hipófisis y en el plasma de varias especies de mamíferos, en algunos peces óseos, en tiburón y en pollo (Sinha, 1987; Berghman et al., 1987; Arámburo et al., 1991, Berumen et al., 2004). En el pollo se identificó una forma glicosilada de la GH (G-cGH) con una movilidad relativa de 25 kDa analizado en SDS-PAGE bajo condiciones no reductoras seguido por Western blot, y de 29 kDa cuando se analizó bajo condiciones reductoras. La G-cGH también es heterogénea y presenta por lo menos 3 variantes de carga importantes con pI de 6.5, 6.7 y 7.17 (Arámburo et al., 1991). Los residuos de carbohidratos están unidos a la proteína por un enlace N-glucosídico (Berumen et al., 2002, 2004).

También se han descrito formas producidas por procesamiento proteolítico. Se conoce una forma cortada con peso molecular aparente de 25 kDa observada en condiciones no reductoras, que puede dar origen a un fragmento de 15 kDa observado en condiciones reductoras en el pollo. Se ha visto que la forma cortada de 25 kDa desaparece en condiciones reductoras, al tiempo que se incrementa la proporción del fragmento de 15 kDa (Arámburo et al., 1993). Se han obtenido evidencias que sugieren que la forma de 15 kDa presenta efectos sobre la angiogénesis que no tiene la hormona de 22 kDa (Arámburo et al., 2001).

También se han descrito diferentes oligómeros de GH en hipófisis de mamíferos y aves. Estos agregados pueden ser dímeros, trímeros, tetrámeros o pentámeros, los cuales pueden formarse por agregación no-covalente del monómero de 22 kDa o bien a través de enlaces covalentes por puentes disulfuro. El análisis de extractos de hipófisis de pollo de diferentes edades por SDS-PAGE en condiciones no reductoras y por Western blot, mostró la existencia de variantes de tamaño inmunorreactivas a cGH correspondientes a 15, 22, 25, 44, 50, 66, 80, 105 y > 110 kDa. Sus proporciones relativas cambiaron con respecto al estado de desarrollo y la edad de los animales (Arámburo et al., 2000).

1.3 Actividad biológica de las variantes moleculares de GH.

La investigación sobre las actividades biológicas de las variantes moleculares de la cGH de pollo, ha revelado evidencias que sugieren que dichas isoformas pueden expresar distintas bioactividades. En estudios realizados con dos variantes de carga del monómero de 22 kDa (con una movilidad electroforética diferente, correspondiente a $R_f=0.23$ y 0.3 , respectivamente) se demostró que ambas tienen actividad somatotrópica (promotora de crecimiento) en ratones enanos (Scanes et al., 1990), pero difieren en sus efectos sobre el tejido adiposo de pollo, siendo una preferentemente lipolítica ($R_f=0.23$, mientras que la otra muestra efectos antilipolíticos ($R_f=0.3$) (Arámburo et al., 1989). Los estudios realizados empleando tejido adiposo de pollo 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 lipolíticas y del efecto insulinoide de una serie de preparaciones de GH (proveniente de diferentes especies) muestra que la respuesta lipolítica tiene un requerimiento estructural más estricto que el efecto antilipolítico. Así, las preparaciones de GH de los vertebrados inferiores (reptiles, anfibios y peces) tienen muy baja actividad lipolítica. Por el contrario, todas esas hormonas tienen una potencia elevada de actividad insulinoide (antilipolítica) (Arámburo et al., 1989; Campbell & Scanes, 1985). Por otra parte, también se ha descrito una nueva actividad angiogénica para la GH, al demostrar que esta hormona estimula la proliferación de capilares en la membrana corioalantoidea en el embrión de pollo, al parecer sin mediación de IGF-I (Gould et al., 1995).

También se ha mostrado que el fragmento de 15 kDa de la cGH tiene efecto lipolítico temprano en ensayos sobre explantes de tejido adiposo de pollos jóvenes. La actividad lipolítica del fragmento de 15 kDa fue mayor que la de la rcGH (Arámburo et al., 2001). También se ha visto que tiene un efecto sobre la proliferación de células endoteliales de cerebro bovino, estimulando la incorporación de timidina tritiada en los cultivos como índice de proliferación celular, a diferencia de la cGH completa que no mostró ningún efecto en dicho ensayo. También se ha reportado que este fragmento de 15 kDa es capaz de inhibir la actividad de la desyodasa tipo III en hepatocitos de embrión de pollo (Arámburo et al., 2001).

También se ha mostrado la bioactividad de la G-cGH en ensayos de proliferación de células de linfoma de rata Nb2; en donde se observó claramente que el efecto de promoción de proliferación de G-cGH es dependiente de su concentración, mientras que la rcGH prácticamente no tuvo influencia en la proliferación de las células Nb2 (Berumen et al., 2004).

La GH se sintetiza y almacena en los somatotropos de la adenohipófisis y sus niveles pueden ser modificados por situaciones fisiológicas como el crecimiento, desarrollo, privación de alimento, exposición al frío, ejercicio y durante el sueño de ondas lentas, entre otros factores. Se conoce que la regulación de la secreción de GH depende, en buena medida, de la actividad de dos péptidos hipotalámicos que son: la hormona liberadora de la hormona de crecimiento (GHRH) que la estimula y la somatostatina (SRIF) que la inhibe. Estos son liberados a la vía portal hipotálamohipofisiaria a través de la cual llegan a controlar a las células somatotropas. En las aves además, la tiroliberina (TRH) estimula la secreción de GH (Devesa et al., 1992).

En nuestro laboratorio se ha estudiado el efecto de GHRH (2 nM) sobre la liberación de las variantes moleculares de cGH en dos sistemas *in vitro*: a) en cultivos de hipófisis completas se observó que la proporción relativa de la variante glicosilada de cGH (G-cGH) se incrementó 35% mientras que la forma monomérica de 22 kDa disminuyó 31% después del tratamiento con GHRH 2 nM; b) en cultivos primarios de células hipofisiarias la proporción relativa de la variante glicosilada se incrementó 43% mientras que el monómero y el dímero disminuyeron 22 y 29%, respectivamente, después del tratamiento con 2 nM GHRH (Martínez-Coria et al., 2002).

1.4 Los somatotropos.

La adenohipófisis de las aves está dividida en dos lóbulos: caudal y cefálico. Estos lóbulos están estructuralmente compuestos por distintos tipos celulares: los lactotropos, corticotropos y tirotropos se encuentran en el lóbulo cefálico, mientras que los gonadotropos se distribuyen en ambos lóbulos. Los somatotropos se localizan principalmente en el lóbulo caudal, en donde constituyen entre el 35 y 40% de sus células. Las principales características histoquímicas e inmunohistoquímicas muestran

que estas células son acidófilas, presentan una forma alargada, ovalada o triangular, tienen un diámetro aproximado de 16 μm , y presentan un núcleo con heterocromatina, nucléolo prominente y numerosos poros nucleares; el aparato de Golgi está bien desarrollado, especialmente en la región yuxtaglomerular, el retículo endoplásmico presenta un gran número de ribosomas libres y los gránulos de secreción son electrodensos, ovoides y grandes (100 a 300 nm de diámetro) dependiendo de la especie animal (Hull et al., 2000).

Recientemente se ha descrito que los somatotropos muestran características morfológicas y funcionales diferentes, dependiendo de su localización en la adenohipófisis. Por ejemplo, en las aves los somatotropos del lóbulo cefálico son muy escasos y se organizan en islotes o bien de forma individual, mas que en cordones, y muestran menor (pavo, Ramesh et al., 1995) o mayor (pollo, Hull et al., 2000) inmunorreactividad al anticuerpo contra cGH que los somatotropos del lóbulo caudal. Los somatotropos del lóbulo cefálico también aparecen tardíamente en la ontogenia (después de los 45 días post-eclosión, Ramesh et al., 1995); y se ha reportado que difieren en su sensibilidad a diversos factores endócrinos con respecto a los del lóbulo caudal. Por ejemplo, la expresión del ARNm de GH y la secreción de la hormona se incrementan en respuesta a GHRH y a forskolina en el lóbulo caudal, pero no en el cefálico (Kansaku et al., 1995). Asimismo, los niveles de ARNm de GH permanecen bajos en el lóbulo cefálico durante el ciclo reproductor, mientras que en el lóbulo caudal se incrementan desde la etapa prepostura hasta la etapa de postura, incubación y pelecha (Kansaku et al., 1995). También se han encontrado distintas subpoblaciones de somatotropos en la región periférica y en la región central de la hipófisis. Los periféricos se tiñen más intensamente con un anticuerpo contra cGH que los que se ubicaron en el centro. Este hallazgo podría reflejar diferencias en la síntesis de cGH o bien en su almacenamiento (Hull et al., 2000).

En estudios preliminares de microscopía electrónica, se ha observado la presencia de somatotropos que presentan gránulos con reactividad positiva a concanavalina A (que reconoce presumiblemente a la G-cGH) y a un anticuerpo contra cGH (reconoce cGH) y otros sólo son inmunorreactivos al anticuerpo contra cGH, lo que sugiere una

distribución diferencial de las células que sintetizan a estas variantes (Berumen et al., 2004.).

1.5 Estudios en otras especies.

En cerdos se han aislado dos subpoblaciones de somatotropos empleando gradientes de percoll. Estas subpoblaciones celulares se identifican como de alta (AD) y baja densidad (BD); presentan diferencias ultraestructurales y funcionales ante el estímulo con GHRH y análogos de segundos mensajeros como el AMPc. Los somatotropos de AD parecen contener un reservorio de hormona, mientras que los de baja densidad liberan la GH en forma continua (Castaño et al., 1996).

También se ha mostrado que la somatostatina (SRIF) no afecta la liberación basal de GH en los somatotropos de BD, pero sí bloquea parcialmente el efecto estimulador inducido por la hormona liberadora de GH (GHRH). Inversamente se vio que SRIF estimula paradójicamente la actividad secretora de los somatotropos de AD, sugiriendo que SRIF no es simplemente un inhibidor de la liberación de GH en cerdos, sino que puede jugar un papel modulador doble (Ramírez et al., 1997).

Se han hecho estudios morfométricos en los que se determinó que los somatotropos de BD son de menor tamaño que los de AD y que además tienen un contenido menor de gránulos de secreción. Estudios realizados a diferentes edades mostraron que sus secreciones disminuyen con respecto a la edad (Castaño et al., 1997).

En ratas también se han detectado dos subpoblaciones de somatotropos, al igual que en el cerdo, y se han separado subpoblaciones de AD y BD. Estudios realizados sobre la secreción de GH en estas subpoblaciones, mostraron un comportamiento similar al determinado en cerdo (Dobado-Berrios et al., 1996a).

1.6 Características de separación de los gradientes de densidad.

La centrifugación en gradientes de densidad para el aislamiento de células y partículas subcelulares se utiliza comúnmente en la actualidad, pues esta técnica puede ser

relevante para una amplia gama de aplicaciones, ya que permite la obtención de poblaciones homogéneas de células y partículas subcelulares sin dañarlas durante el procedimiento de separación, manteniendo su viabilidad y evitando la introducción de sustancias que interfieran con su función biológica. Dependiendo del tipo de separación que se requiera se pueden variar las condiciones empleadas, tales como la fuerza centrífuga, el tiempo de centrifugación, el tipo de rotor utilizado o el material para el gradiente de densidad (Pertoft, H., 2000). Se han desarrollado varios medios para formar los gradientes, de acuerdo a las necesidades de cada aplicación específica. Los gradientes de sacarosa han sido empleados ampliamente, aunque una de sus principales desventajas se deriva de sus características fisicoquímicas pues a las concentraciones que se utiliza presenta una alta osmolaridad y viscosidad, lo cual puede afectar negativamente a las células. De manera similar, otros compuestos de bajo peso molecular que se emplean para la formación de gradientes de densidad como el CsCl, el NaBr y el tartrato de potasio, generan altas presiones osmóticas y pueden pasar al interior de las células, lo que las hace menos idóneas para aplicaciones generales. Otros compuestos como el Ficoll (un polímero sintético de la sacarosa) resolvieron el problema de las presiones osmóticas elevadas aunque también pueden generar gradientes osmóticos al aumentar su concentración y ello tiene que ser compensado con un gradiente de sal para mantener las condiciones iso-osmóticas en los tubos de centrifugación. Otro polímero natural de la glucosa, el dextrans, con pesos moleculares que oscilan entre 10^5 - 10^6 han sido utilizados, pero desafortunadamente estas soluciones son demasiado viscosas lo que dificulta su manejo. También se desarrollaron compuestos yodados como medios de centrifugación (inicialmente utilizados como medios de contraste para rayos X), tales como el Hypaque, el Nycodenz o la Metrizamida, que permiten que las células puedan ser separadas de manera isopícnica sin ser sometidas al estrés osmótico que provocan los gradientes de sacarosa. Más tarde se desarrollaron mezclas de medios conteniendo Ficoll y un compuesto yodado, para aislar células, tales como el Ficoll-Paque, el Histopaque y el Lymphoprep, sin embargo, debido al bajo peso molecular de los componentes yodados, y aún cuando no son compuestos iónicos, éstos pueden difundir a las células y provocar

que sus densidades sean no fisiológicas. La sílica coloidal se empezó a usar como un medio para formar gradientes de densidad desde 1959 (Mateyko et al., 1959), encontrándose que sus características (efectos de presión osmótica, su habilidad para separar células, su nivel de permeación en las partículas subcelulares y su solubilidad en soluciones acuosas) eran mejores que cualquier otra. Sin embargo, la solución de sílica pura era tóxica para las células y podía provocar hemólisis de los eritrocitos (Stadler et al., 1965). La adición de polisacáridos para estabilizar a los gradientes de sílica coloidal eliminó sus efectos tóxicos (Pertoft 1966). De esta manera se desarrollaron polímeros adsorbidos a las partículas de sílica para obtener soluciones iso-osmóticas, de pH neutro y alta densidad que condujeron a la introducción del Percoll en 1977 (Pertoft et al., 1977). El Percoll es un coloide de sílica estabilizado con sodio cuyas partículas (diámetro de 10-30 nm) están cubiertas con polivinilpirrolidona (PVP), tienen un Mr de 6×10^6 y una osmolaridad < 20 mOsm a una densidad de 1.13 g/ml. Se pueden agregar sales fisiológicas para mantener una osmolaridad constante en los intervalos de densidad utilizados para separar células. Su viscosidad está en función de la fuerza iónica y es menor en soluciones salinas que en agua (Pertoft et al., 1978), lo que tiene un efecto sobre la velocidad a la que se autogeneran los gradientes, siendo más rápida en una solución de NaCl 0.15 M que en una de sacarosa iso-osmótica (0.25 M). Todas estas características hacen al Percoll un medio idóneo para la separación exitosa de distintos tipos celulares y por ello se optó por su utilización en este trabajo para aislar a las células hipofisarias de pollo que secretan hormona de crecimiento.

Con base en los estudios anteriores, en donde se ha mostrado la existencia de subpoblaciones de somatotropos en mamíferos, es interesante saber si en el pollo existen varias subpoblaciones de somatotropos y si éstas muestran diferencias morfofuncionales. Por otra parte, también sería importante determinar si las subpoblaciones de somatotropos están involucradas en la regulación diferencial de la síntesis y/o secreción de las variantes moleculares de la cGH.

2 Justificación

La heterogeneidad molecular de la cGH se ha relacionado con la diversidad funcional de esta hormona hipofisiaria. También se ha mostrado que la síntesis y/o la secreción de algunas variantes moleculares de la cGH pueden estar reguladas de manera diferencial, pues son secretadas diferentemente ante una variedad de secretagogos. Estos resultados podrían explicarse por la existencia de subpoblaciones de somatotropos con características funcionales diferentes capaces de responder de manera específica a diversos estímulos.

Hipótesis

Las variantes moleculares de la cGH, provienen de la síntesis y secreción diferencial de subpoblaciones de somatotropos con características morfológicas y funcionales diferentes en la hipófisis del pollo.

3 Objetivo general

Aislar subpoblaciones de somatotropos hipofisarios de pollo y estudiar su respuesta a un secretagogo específico como el GHRH, así como el patrón de heterogeneidad molecular de la hormona de crecimiento contenida en ellas.

Objetivos particulares

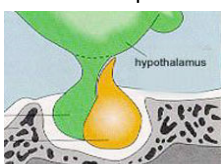
- Aislamiento de subpoblaciones de somatotropos hipofisarios de pollo mediante gradientes de percoll.
- Análisis inmunocitoquímico y citoquímico de las subpoblaciones de somatotropos hipofisarios de pollo
- Cuantificación de la cGH presente en células de las distintas subpoblaciones de somatotropos hipofisarios de pollo, así como la liberada al medio de cultivo, mediante la técnica de Inmunoanálisis enzimático (ELISA), en condiciones basales y después del tratamiento con secretagogos (GHRH).
- Análisis del patrón de variantes de masa y de carga de la cGH en las subpoblaciones de células cultivadas y en el medio de cultivo correspondiente, utilizando la técnica de electroforesis (SDS-PAGE), Western blot y densitometría.

4 Diseño Experimental



Pollos de 4 semanas

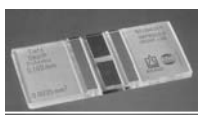
Extrae la hipófisis



Dispersión del tejido



Separación celular con Gradientes de percoll



Cuantificación de Num. de células por fracción hemocitómetro Neubauer

Análisis Citoquímico e Inmunocitoquímico de las fracciones aisladas.



Evaluación por microscopía óptica.



Cultivo primario de las subpoblaciones aisladas.

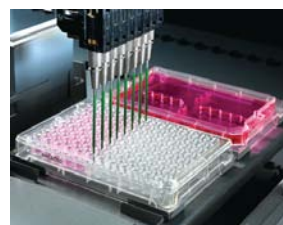


Tratamiento sin (control) y con GHRH.

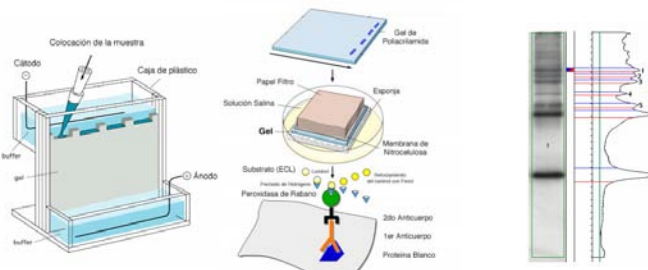
Cuantificación de proteína (Bradford).



Cuantificación de cGH liberada al medio y remanente en las células por: **ELISA**.



Análisis de variantes moleculares de cGH por: **SDS-PAGE, Western blot y Densitometría.**



5 Material y Métodos

Como material biológico se emplearon pollos de engorda (machos) de 4 semanas de edad, raza Broiler Ross obtenidos de las granjas de producción de Pilgrim's Pride de México en el estado de Querétaro. Los pollos fueron mantenidos en las instalaciones del Instituto de Neurobiología durante 1 día, con agua y alimento *ad libitum*, antes de su sacrificio.

5.1 Obtención y dispersión de células hipofisarias.

Las hipófisis de los pollos se obtuvieron inmediatamente después de la decapitación y fueron colocadas en un tubo cónico de 15 ml [Corning] con 8 ml de medio (Medio de Eagle modificado por Dulbecco (DMEM) [GIBCO BRL] suplementado con 0.3% de albumina sérica bovina (BSA) [SIGMA] y penicilina/estreptomicina 100 UI/ml [GIBCO BRL]). Las glándulas se lavaron 3 veces con medio estéril y después se colocaron en una caja de Petri con 1 ml de medio y se cortaron con dos bisturís hasta obtener fragmentos muy pequeños ($<1 \text{ mm}^3$). Los pedazos de tejido fueron transferidos a un tubo cónico de 15 ml [Corning] y se agregaron 5 ml de medio con tripsina 2 mg/ml [SIGMA], y se dejaron incubar por 30 min a 37°C con agitación constante. Después se añadieron 100 μl de colagenasa Tipo II 1 mg/ml [Worthington] y se dejó incubar por 30 min a 37°C con agitación constante. Posteriormente se realizó la dispersión con ayuda de pipetas Pasteur siliconizadas estériles de diferentes diámetros. Luego se centrifugó (centrífuga marca Beckman modelo TJ-6 en un rotor Beckman TH-4) a 2500 rpm por 5 min a 4°C y se desechó el sobrenadante. Se resuspendió el precipitado en 10 ml de medio con 2 mM ácido etilendiaminotetracético (EDTA) [SIGMA], y se centrifugó nuevamente a 2500 rpm por 5 min a 4°C; se desechó el sobrenadante y se resuspendió el precipitado en 10 ml de medio con 1 mM EDTA. A continuación se centrifugó a 2500 rpm por 5 min a 4°C; se desechó el sobrenadante, el precipitado se resuspendió en 10 ml de medio y se filtró la suspensión celular empleando una jeringa de 10 ml y un filtro de malla metálica de 100 μm de poro sobre un tubo cónico de 15 ml [Corning]. Finalmente, se centrifugó a 2500 rpm por 5 min a 4°C; se desechó el sobrenadante y se

resuspendió la pastilla en 1 ml de medio. Se calculó el rendimiento y la viabilidad celular mediante la prueba de exclusión de azul de tripán en una cámara de Neubauer.

5.2 Prueba de exclusión de azul de tripán.

Se tomaron 20 μl de la suspensión celular y se colocaron en un microtubo al cual se le agregaron 180 μl de medio (dilución 1:10). De esta mezcla se tomaron 20 μl , se colocaron en otro microtubo y se mezclaron con 20 μl de azul de tripán [Gibco BRL] (dilución final 1:20). Finalmente se tomaron 10 μl y se depositaron entre las cámaras de un hemocitómetro Neubauer [Bright-Line], se contó el número total de células (vivas y muertas) en los campos correspondientes. Para obtener el número total de células, se promedió el número de células contadas y se multiplicó por el factor de dilución 20. Posteriormente este valor se multiplicó por el factor de conversión del hemocitómetro $1.0 \times 10^4 \text{ mm}^3$ para obtener el número total de células por mililitro (cel/ml). En el caso de la viabilidad celular, se restó el número de células muertas al número total de células. El resultado se multiplicó por 100 y se dividió entre el número total de células, obteniéndose así el porcentaje de viabilidad por experimento.

5.3 Efecto dosis-respuesta con GHRH en cultivos primarios.

Para evaluar el efecto de la hormona liberadora de hormona de crecimiento (GHRH) sobre la liberación de la cGH se hicieron curvas dosis-respuesta en cultivos primarios de células hipofisarias de pollo de 4 semanas de edad. Para ello se colocaron 3.0×10^5 células/pozo en cajas de cultivo de 24 pozos (Costar) y se les adicionó 300 μl de medio MEM suplementado con 10% de suero fetal bovino (FBS), penicilina/estreptomicina (100 UI/ml) y se incubaron durante 48 hrs a 37°C , 5% CO_2 y 95% de aire en una incubadora humificada (Nuair, USA). Posteriormente el medio de cultivo de 48 hrs fue colectado en tubos Eppendorff (para análisis posteriores) y se cambió el medio de cultivo con medio M199 (GIBCO BRL) fresco que se empleó como control y medio M199 adicionado con diferentes concentraciones de GHRH (0.0, 0.25, 0.5, 1.0, 2.0, 5.0, 10.0 y 20.0 nM). Se dejaron incubar 2 hrs a 37°C , 5% CO_2 y 95% de aire en una incubadora humificada. Al término de este tiempo se colectaron los medios y las células

(control y tratamiento) por separado y se almacenaron a -70°C . La concentración de cGH contenida en los medios se determinó por el método de ELISA. El ajuste dosis respuesta se realizó con la ecuación de Hill.

5.4 Separación de subpoblaciones celulares.

Se probaron dos condiciones de separación de las células en gradientes de Percoll:

A) Para la separación de las células se empleó inicialmente un gradiente hiperbólico de densidad de Percoll del 25 al 80%. Para su formación se preparó un volumen de 20 ml de Percoll al 80% [2 ml de Medio Eagle modificado (MEM) <GIBCO BRL> suplementado con 0.3% BSA (medio concentrado 10 veces); 16 ml de Percoll <GIBCO BRL>; y 2 ml de H_2O]. Este volumen se mezcló a un flujo de 5 ml/10 minutos con un volumen de 10 ml de Percoll al 25% (1 ml MEM, 2.5 ml de Percoll, y 6.5 ml de H_2O). Simultáneamente esta mezcla se añadió a un flujo de 5 ml/10 minutos en un tubo Corex donde se formó el gradiente respectivo. En un tubo se colocaron 500 μl de una mezcla de marcadores de densidad conocida (perlas de Sephadex coloreadas, densidad entre 1.018 y 1.142 g/ml) [Amersham Biosciences] para evaluar la distribución de la densidad del gradiente, y éste se empleó como control para cada experimento. En otro tubo similar se colocaron 500 μl del medio de cultivo que contenía la suspensión celular hipofisiaria. Estos gradientes se centrifugaron (centrífuga marca Beckman Coulter modelo *Avanti J-25* en un rotor Beckman JS-13.1) a 5500 rpm por 60 minutos a 4°C . Después de centrifugar, los tubos que contenían los gradientes se mantuvieron a 4°C . Posteriormente se colectó la primera fracción de 2.5 ml, y el resto de las fracciones de 2 ml. A todas las fracciones se les agregaron 30 ml de medio para diluir y eliminar el Percoll y se centrifugó (centrífuga marca Beckman modelo TJ-6 en un rotor Beckman TH-4) a 2000 rpm por 15 minutos a 4°C . Se desecharon los sobrenadantes y después de resuspender cada fracción en 200 μl de medio, se calculó la concentración y la viabilidad celular mediante la prueba de exclusión de azul de tripán en una cámara de Neubauer.

B) En otros experimentos, para la separación de las células se empleó un gradiente hiperbólico de densidad de Percoll del 10 al 70%. Para su formación se preparó un volumen de 20 ml de Percoll al 70% (2 ml de medio MEM, 14 ml de Percoll, y 4 ml de H₂O). Este volumen se mezcló a una velocidad de 5 ml/10 minutos en un volumen de 10 ml de Percoll al 10% (1 ml de medio MEM, 1 ml de Percoll, y 8 ml de H₂O). Simultáneamente esta mezcla se añadió a una velocidad de 5 ml/10 minutos en un tubo Corex donde se formó el gradiente respectivo. Se colocaron 500 µl de una mezcla de marcadores de densidad conocida (perlas de Sephadex coloreadas, densidad entre 1.018 y 1.142 g/ml) [Amersham Biosciences] para evaluar la distribución de la densidad del gradiente, y éste se empleó como control para cada experimento. En otro tubo similar se colocaron 500 µl del medio de cultivo que contenía la suspensión celular hipofisiaria. Estos gradientes se centrifugaron (centrifuga marca Beckman Coulter modelo *Avanti J-25* en un rotor Beckman JS-13.1) a 5500 rpm por 60 minutos a 4°C. Después de centrifugar los tubos que contenían los gradientes se mantuvieron a 4°C. Posteriormente se colectó la primera fracción de 2.5 ml, y el resto de las fracciones de 2 ml. A todas las fracciones se les agregaron 30 ml de medio para diluir y eliminar el Percoll y se centrifugó (centrifuga marca Beckman modelo TJ-6 en un rotor Beckman TH-4) a 2000 rpm por 15 minutos a 4°C. Se desecharon los sobrenadantes, se resuspendió cada fracción en 200 µl de medio y se calculó la concentración y la viabilidad celular mediante la prueba de exclusión de azul de tripán en una cámara de Neubauer.

5.5 Frotis y fijación de las fracciones celulares.

Se probaron dos técnicas para hacer los frotis celulares de las fracciones obtenidas del gradiente de percoll:

A) Se hicieron frotis de 10,000 células en portaobjetos de forma manual, para poder evaluar la proporción de cada tipo celular. Se secaron a temperatura ambiente por 24 horas y se fijaron con Bouin-Hollande Sublimate (BHS) por 24 horas. Después de lavar varias veces con agua destilada, se colocaron en amortiguador de fosfato de sodio

(PBS) 0.5 M pH 7.8 y se realizaron las técnicas citoquímicas e inmunocitoquímicas correspondientes.

B) Se hicieron frotis de 50,000 células en una citocentrífuga, para poder evaluar la proporción de cada tipo celular. Para ello se agregaron 200 μ l en una citocámara previamente armada con un papel filtro y un portaobjeto. Posteriormente se centrifugó (citocentrífuga marca Thermo modelo Shandon 4) a 750 g por 10 minutos a temperatura ambiente. Finalmente se sacaron los portaobjetos que contenían los frotis de las citocámaras y se fijaron con Bouin Hollande Sublimate (BHS) por 24 horas. Después de lavar varias veces con agua destilada, se colocaron en amortiguador de fosfato de sodio (PBS) 0.5 M pH 7.8 y se realizaron las técnicas citoquímicas e inmunocitoquímicas correspondientes.

5.6 Tinción con Hematoxilina y Eosina.

Los frotis celulares se lavaron con agua destilada por 3 minutos, posteriormente se colocaron en hematoxilina (hematoxilina 1 g, alcohol absoluto 10 ml, alumbre de potasio y amonio 20 g, óxido rojo de mercurio 0.5 g, aforado en 200 ml de agua destilada) por 4 minutos, se lavaron con agua destilada, se diferenciaron en alcohol ácido rápidamente y se volvieron a lavar en agua destilada por 5 minutos. Se viró en agua amoniacal al 1% por 20 segundos y se lavaron en agua destilada por 5 minutos. Posteriormente se colocaron en eosina (eosina al 1%, 100 ml de alcohol al 80% y 0.5 ml de ácido acético glacial) por 15 segundos y se lavó en agua destilada por 5 minutos. Se colocaron en alcohol al 70% por 3 minutos, después en alcohol del 96%, alcohol absoluto, y xilol. Finalmente se montaron con resina Entellan [MERCK]. Para evaluar a los diversos tipos celulares de la hipófisis se analizaron las tinciones de las diferentes fracciones con un objetivo 40X en un microscopio [OLYMPUS BX51] acoplado a una cámara digital [CoolSNAP-Pro_{cf}] y se contaron 300 células de 5 campos de las distintas fracciones obtenidas de los gradientes de Percoll (los datos se expresaron en porcentaje para su análisis).

5.7 Inmunocitoquímica.

Los frotis celulares se lavaron con TPBS (amortiguador de fosfato de sodio 0.5 M pH 7.8 con 0.5% de tritón X-100) tres veces por 5 minutos. Se colocaron en una solución TPBS con 1% de H₂O₂ durante 1 hora para inhibir peroxidasas endógenas y se lavaron con TPBS tres veces por 5 minutos. Se pusieron a bloquear por 2 horas con leche descremada [*Bio Rad*] al 10% en TPBS y se lavaron con TPBS tres veces por 5 minutos. Posteriormente se incubaron con el primer anticuerpo (producido en conejos en el laboratorio) anti-GH 1:500 en leche descremada al 1% y TPBS toda la noche. Se lavaron con TPBS tres veces por 5 minutos y se incubaron con un segundo anticuerpo anti-IgG de conejo conjugado con peroxidasa [*Bio-Rad*] 1:200 en leche descremada al 1% y TPBS por dos horas. Se lavaron con PBS 0.5 M pH 7.8 tres veces por 5 minutos y posteriormente se reveló con diaminobencidina (DAB) 0.05% y H₂O₂ 0.01% en PBS 0.5 M pH 7.8 durante 15 minutos. Se lavaron con PBS 0.5 M pH 7.8 para detener la reacción. Se colocaron en alcohol al 70% por 3 minutos, después en alcohol del 96%, alcohol absoluto, y xilol. Finalmente se montaron con resina Entellan [*MERCK*]. Para evaluar la proporción de los somatotropos de las diferentes fracciones se empleó un microscopio [*OLYMPUS BX51*] acoplado a una cámara digital [*CoolSNAP-Pro_{cf}*] y un programa para análisis de imágenes (*Image-Pro Plus*. Versión 4.1 para Windows 95/98) [*Media Cybernetics*] y se contaron 1000 células de 15 campos por fracción (los datos se expresaron en porcentaje para su análisis).

5.8 Cultivo celular y tratamiento con GHRH.

Para cultivar las subpoblaciones de células hipofisarias se tomaron 3.0×10^5 células de cada fracción del gradiente y se colocaron en cajas de cultivo de 24 pozos [*Costar*], se les añadieron 300 μ l de medio MEM suplementado con 10% de FBS, penicilina/estreptomicina (100 UI/ml) y se incubaron durante 48 hrs a 37°C, 5% CO₂ y 95% de aire en una incubadora humificada [*Nuaire, USA*]. Después de 48 hrs, se colectó el medio de cultivo en microtubos (para análisis posteriores). Se cambió el medio de cultivo con medio M199 [*GIBCO BRL*] que se empleó como control y medio M199 adicionado con GHRH 2 nM. Se incubó por 2 hrs a 37°C, 5% CO₂ y 95% de aire

en una incubadora humificada. Al término de este tiempo se colectaron los medios y las células, se colocaron en microtubos que se almacenaron a -70°C para análisis posteriores.

5.9 Extracción de proteína de las células en cultivo.

Se obtuvieron alícuotas de las diferentes fracciones de células y se sonicaron en 200 μl de agua destilada y desionizada ajustada a pH 9.0 en presencia de un cóctel de inhibidores de proteasas (3.7 mg/tableta de leupeptina, pefabloc, pepstatina, fosforamidon y PMSF). El extracto se agitó durante 1 h a 4°C para extraer la proteína y posteriormente se centrifugó a 12,000 rpm durante 15 min a 4°C (centrifuga marca Sorvall RMC 14). Se colectó el sobrenadante y se almacenó a -70°C para análisis posteriores.

5.10 Cuantificación de proteína por el método de Bradford.

Para la cuantificación total de proteína de los medios de cultivo y de las células, se montó el método de Bradford en placas de 96 pozos (Dynatech-Immulon). Para ello se hizo una curva estándar con diferentes concentraciones de BSA (0.0, 0.15, 0.31, 0.62, 1.25, 2.5 y 5.0 μg), las cuales se aforaron a 160 μl de H_2O destilada y desionizada. En el caso de las muestras problema se tomaron 20 μl de cada una y también se aforaron a 160 μl de H_2O . Posteriormente, tanto a la curva estándar como a las muestras problema se les agregaron 40 μl de colorante [*Bio Rad*], y finalmente se leyeron en un lector de microplacas (*Bio Rad*, Microplate Reader modelo 3550-UV) a una longitud de onda de 595 nm. Para normalizar los experimentos de cuantificación de cGH liberada de las células y del medio de cultivo correspondiente, se empleó la técnica de ELISA indirecto por competencia utilizando alícuotas de 1 μg de proteína total (Martinez-Coria et al., 2002). Por otra parte, para detectar las variantes moleculares de la cGH liberada de las células y del medio de cultivo correspondiente, se emplearon las técnicas de electroforesis y Western blot, utilizando alícuotas de 0.5 μg de proteína total. Éstas fueron concentradas en un concentrador centrífugo al vacío (Savant) a sequedad y se resuspendieron con 15 μl de amortiguador de la muestra (ver mas adelante).

5.11 Cuantificación de la cGH por la técnica de ELISA.

La cuantificación de la cGH total en las diferentes subpoblaciones de células hipofisarias y de los medios de cultivo se hizo mediante el método de ensayo inmunoenzimático (ELISA). Las placas para inmunoanálisis (Dynatech-Immulon de 96 pozos) se forraron con 12 ng de rcGH (100 μ l) en amortiguador de carbonatos 0.1 M pH 10.3. Se incubó a una temperatura de 4°C durante 16 horas para que la hormona se adhiriera a las paredes del pozo. Simultáneamente las muestras y las diluciones del estándar para la curva patrón se incubaron en un volumen de 100 μ l con un anticuerpo policlonal contra cGH (1:50,000) en amortiguador TPBS 0.01 M suplementado con NaCl 0.15 M pH 7.6, Tween 20 al 0.05% y 1% de leche descremada durante 16 horas a 4°C. Posteriormente las placas se lavaron con TPBS 5 veces con un lavador automático [*Bio Rad*, modelo 1250] y se bloqueó con amortiguador TPBS suplementado con 3% de leche descremada durante 1 hora a temperatura ambiente. Las placas se lavaron con TPBS y se agregaron 100 μ l de la mezcla incubada previamente con el primer anticuerpo. Se lavaron nuevamente las placas con TPBS y se les agregaron 100 μ l de la solución de anticuerpo secundario unido a peroxidasa a una dilución de 1:3000 (*Bio Rad*) en TPBS suplementado con 1% de leche descremada, se incubó durante 2 horas a temperatura ambiente y se volvió a lavar con TPBS. Finalmente se añadieron 100 μ l de la solución de revelado ABTS (solución Roche) y se incubó durante 30 min a temperatura ambiente. Posteriormente se leyó a una longitud de onda de 405 nm (*Bio Rad*, Microplate Reader modelo 3550-UV). El análisis estadístico se realizó por ANOVA de una vía mas una prueba post hoc (Tukey) que comparó la media de todos los tratamientos; y como alternativa una prueba t de Student.

5.12 Análisis electroforéticos (SDS-PAGE y Western blot).

SDS-PAGE. La separación de las diferentes proteínas y la determinación de su peso molecular aparente se analizó mediante electroforesis unidimensional en geles verticales de poliacrilamida en presencia de dodecil sulfato de sodio, empleando el sistema de Laemmli (1970). Con la ayuda de un equipo para electroforesis Mini-Protean II (*Bio Rad*) se realizaron geles al 12.5% para el gel resolvidor y al 4% para el gel

concentrador. A las muestras se les agregaron 15 μ l de amortiguador de la muestra (condiciones no reductoras y condiciones reductoras en presencia de β mercaptoetanol) y se incubaron a temperatura de ebullición durante 5 min. Durante la electroforesis se aplicó un voltaje constante de 150 V empleando una fuente de poder para electroforesis (modelo 500/200 *Bio Rad*). Después de la electroforesis los geles se colocaron en un amortiguador para transferencia (ver más adelante).

Western blot. Para la electrotransferencia los geles se equilibraron en un amortiguador con 25 mM Tris, 192 mM glicina, 20% metanol, pH 8.3 y las bandas de proteína separadas electroforéticamente se transfirieron a membranas de nitrocelulosa [*Bio Rad*] a 200 mA por 60 min. 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 temperatura ambiente. Después de lavarlas con TTBS, las membranas se incubaron con el primer anticuerpo anti-cGH (1/10000 en 1% de leche descremada en 0.05% Tween-20 en TBS) a temperatura ambiente durante la noche. Posteriormente las membranas se incubaron con el segundo anticuerpo (anti-IgG de conejo) conjugado con peroxidasa de rábano (*Bio Rad*) (1/3000 en 1% de leche descremada en TTBS) durante 2 horas y finalmente se lavaron con TBS. Los sitios del complejo antígeno-anticuerpo se detectaron utilizando un sistema de quimioluminiscencia ECL [Amersham/Pharmacia] que contiene peróxido de hidrógeno, luminol y fenol. Este método se basa en la oxidación del luminol catalizada por la peroxidasa de rábano y peróxido de hidrógeno en condiciones alcalinas. La oxidación del luminol causa que éste se encuentre en un estado excitado el cual decae al estado basal mediante la emisión de luz. Esta se ve aumentada por la presencia de un reforzador como el fenol y decae lentamente con una vida media de aproximadamente 60 min. La máxima emisión de la luz alcanza una longitud de onda de 428 nm la cual es detectada por una corta exposición a una placa de autoradiografía. Para revelar las proteínas que reaccionaron con los anticuerpos específicos, las membranas de nitrocelulosa se incubaron por 5 min en una mezcla 1:1 de las soluciones 1 y 2 del sistema de quimioluminiscencia ECL. Las membranas se colocaron en una bolsa ziploc de plástico para exponerlo a una placa de autoradiografía [Kodak

Biomax] por 1 min, colocadas en un cassette [X-Omatic Kodak]. Las películas se colocaron en una solución de revelado [Kodak] por 1 min, se lavó con agua corriente por 1 min y en una solución fijadora [Kodak] por 1 min y se lavó con agua. Finalmente las películas de revelado se dejaron secar y se analizaron por densitometría.

5.13 Análisis de las variantes moleculares de cGH por densitometría.

La cuantificación de la cGH se realizó por medio de densitometría de los luminogramas después de la inmunoelectrotransferencia. Para digitalizar la imagen del luminograma se empleó un Scanner [ScanJet Hewlett Packard]. Con esto se obtiene una imagen con un gradiente de color que va de blanco a negro donde este último representa la mayor densidad. Con ayuda del programa IP-Lab [Scanalytics] se obtiene la densidad óptica del área total de cada banda. Estos datos fueron graficados comparando las diferencias entre las distintas bandas inmunorreactivas entre el grupo control y los tratados de cada experimento. Para normalizar los datos se obtuvo la proporción relativa de cada banda considerando la inmunorreactividad total de cada muestra como el 100% de tal manera que cada variante molecular identificada por los anticuerpos representa un porcentaje del total de cGH secretado al medio. El análisis estadístico se realizó con una prueba de ANOVA de una vía mas una prueba post hoc (Tukey) para comparar la proporción relativa de cada una de las bandas correspondientes entre las muestras controles y las experimentales; y como alternativa una prueba t de Student.

6 Resultados

6.1 Gradiente hiperbólico de percoll 25-80%.

Como primer paso, se montó una técnica que nos permitió separar las células hipofisarias por medio de su peso y tamaño, para ello se empleamos gradientes hiperbólicos de percoll 25-80%. Para verificar la formación adecuada de estos gradientes hiperbólicos de percoll, en cada experimento se empleó un tubo control en el que se colocaron marcadores de densidad conocida con un intervalo comprendido entre 1.018 a 1.142 g/ml. De esta manera, por interpolación, se calculó la densidad a la cual se separaron los diversos tipos de células hipofisarias de pollo (figura 4).

Para llevar a cabo la separación de las células mediante gradientes de densidad, se realizaron dispersiones celulares a partir de 20 hipófisis de pollos de 4 semanas de edad (ver material y métodos). La concentración de células obtenidas fue de $56.0 \times 10^6 \pm 7.8 \times 10^6$ cel/ml ($n=3$) con un 90% de viabilidad. Después de la dispersión, la cantidad total de células obtenidas se dividió en dos partes, y cada una se colocó en un tubo sobre el gradiente hiperbólico de percoll 25-80% formado previamente (ver material y métodos). Después de la centrifugación, se colectaron 15 fracciones de cada tubo y se determinó la concentración de células existentes en cada fracción. En estos experimentos se obtuvo una recuperación de 21% de las células colocadas originalmente ($11.5 \times 10^6 \pm 2.4 \times 10^6$ cel/ml). En la figura 5, se muestra la distribución de las células hipofisarias en las diferentes fracciones colectadas a lo largo del gradiente. Las fracciones 1 a 5 presentaron una mayor concentración de células hipofisarias, oscilando entre $4.4 \times 10^6 \pm 1.2 \times 10^6$ cel/ml y $0.49 \times 10^6 \pm 0.08 \times 10^6$ cel/ml, respectivamente. En contraste, las fracciones 6 a 15 presentaron una baja concentración de células hipofisarias, oscilando entre $0.03 \times 10^6 \pm 0.02 \times 10^6$ y $0.37 \times 10^6 \pm 0.007 \times 10^6$ cel/ml respectivamente.

Fracción	Densidad (g/ml)
1	1.018
	1.033
2	1.049
3	1.062
4	
5	1.075
6	
7	
8	1.087
9	
10	
11	
12	
13	
14	1.098
15	1.121
	1.142

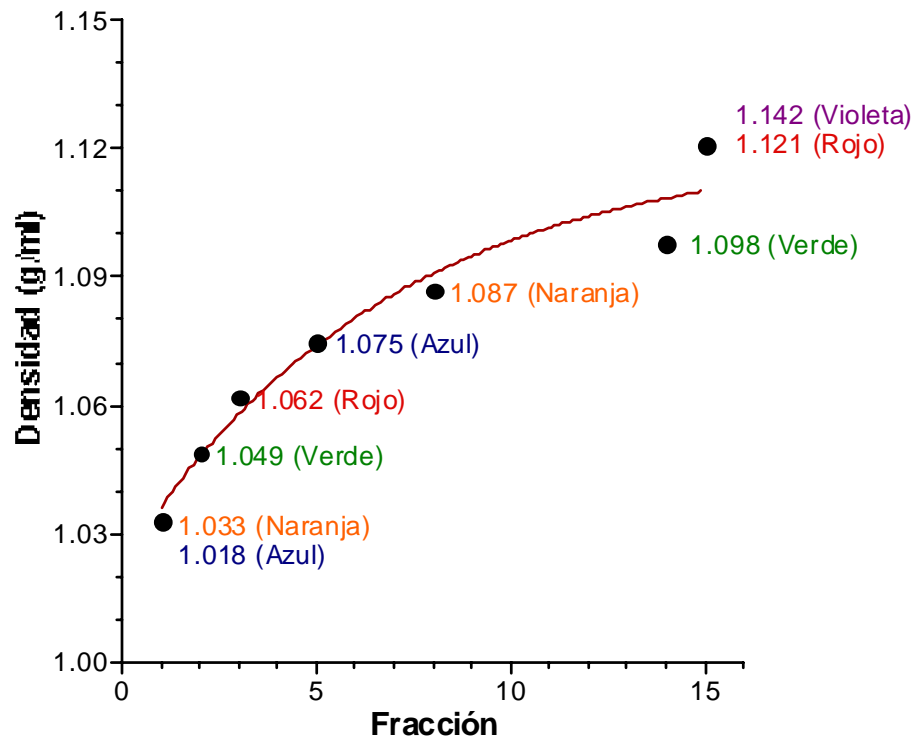


Figura 4. Distribución de los marcadores de densidad separados a través de gradientes hiperbólicos de percoll 25-80% (n= 3).

Fracción	Cantidad de Células (cel/ml)	Densidad (g/ml)
1	4.40X10 ⁶ ±1.20X10 ⁶	1.033
2	2.39X10 ⁶ ±0.85X10 ⁶	1.049
3	1.68X10 ⁶ ±0.52X10 ⁶	1.062
4	0.87X10 ⁶ ±0.21X10 ⁶	
5	0.49X10 ⁶ ±0.08X10 ⁶	1.075
6	0.37X10 ⁶ ±0.007X10 ⁶	
7	0.23X10 ⁶ ±0.05X10 ⁶	
8	0.22X10 ⁶ ±0.08X10 ⁶	1.087
9	0.16X10 ⁶ ±0.01X10 ⁶	
10	0.09X10 ⁶ ±0.008X10 ⁶	
11	0.07X10 ⁶ ±0.02X10 ⁶	
12	0.06X10 ⁶ ±0.03X10 ⁶	
13	0.03X10 ⁶ ±0.02X10 ⁶	
14	0.30X10 ⁶ ±0.06X10 ⁶	1.098
15	0.26X10 ⁶ ±0.00X10 ⁶	1.121
Total	11.56X10 ⁶ ±2.42X10 ⁶	

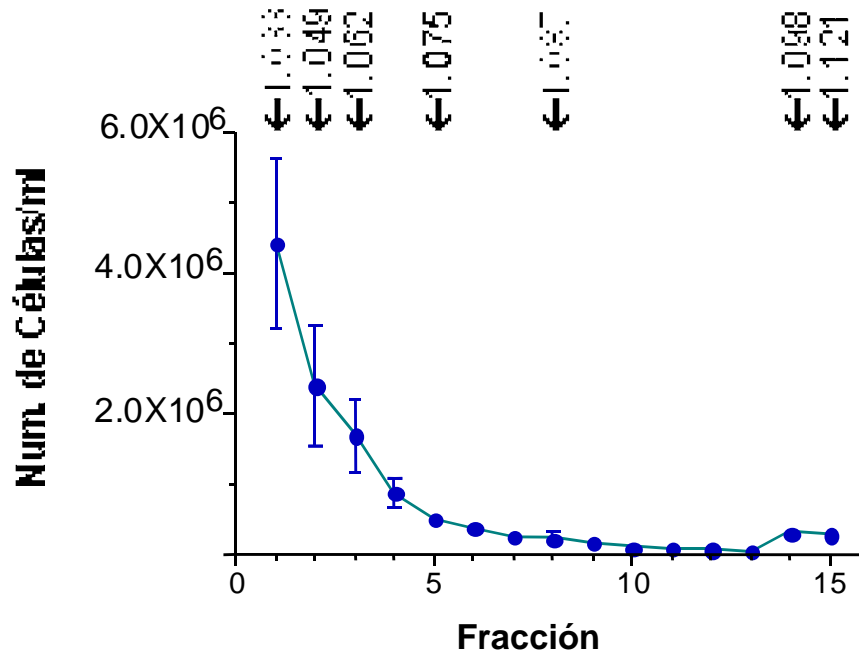


Figura 5. Distribución de las células hipofisarias separadas a través de gradientes hiperbólicos de percoll 25-80%. Las flechas indican la posición de los correspondientes marcadores de densidad ($\bar{X} \pm \text{SEM}$, n= 3).

6.2 Tinción con hematoxilina y eosina de las células aisladas en las fracciones del gradiente de percoll 25-80%.

En cada experimento, los portaobjetos que contenían las células hipofisarias provenientes de las diferentes fracciones obtenidas mediante gradientes de percoll 25-80%; se tiñeron con hematoxilina y eosina (ver material y métodos). De esta manera se observaron tres tipos de células hipofisarias con base a su tinción: acidófilas, basófilas y cromóforas, además de eritrocitos (ver figura 6). En la figura 7 se muestran imágenes representativas de estos tipos celulares, que se distribuyeron en diferentes cantidades en las fracciones obtenidas a través de los gradientes de percoll 25-80%. En la figura 8 se muestran los resultados del análisis de las células contenidas en cada fracción. Se puede observar que las células acidófilas se encontraron principalmente concentradas en dos zonas del gradiente: la primera se encontró entre las fracciones 1 a 6 (alcanzando una proporción que osciló entre 41 y 55% del total de células en cada fracción) y la segunda se encontró distribuida en las fracciones 7 a 12 con una proporción que varió entre 14 y 40%. Las células basófilas, se encontraron concentradas en tres zonas del gradiente: la primera se encontró en las fracciones 1 a 3 (entre un 42 y 51%); la segunda se encontró en las fracciones 8 a 10 (entre un 47 y 60%); y la tercera se encontró en las fracciones 12 a 13 (entre un 54 y 65%). Las células cromóforas, se encontraron prácticamente en todas las fracciones y su proporción se mantuvo entre 1 y 13%. Finalmente, los eritrocitos presentaron un patrón de tinción acidófilo, y se encontraron principalmente concentrados en las fracciones 14 y 15 (entre un 75 y 91%).

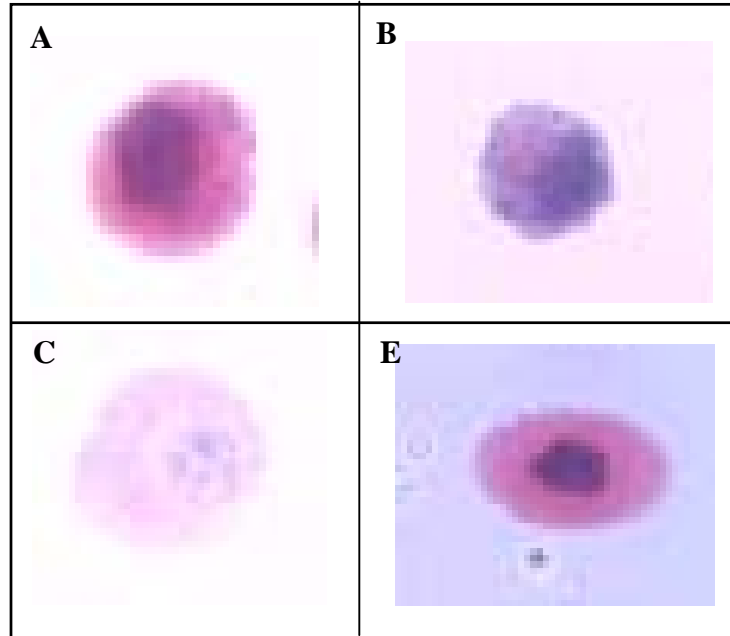


Figura 6. Características tintoriales de las células hipofisarias teñidas con hematoxilina y eosina (A= acidófilas; B= basófilas; C= cromófobas; E= eritrocitos).

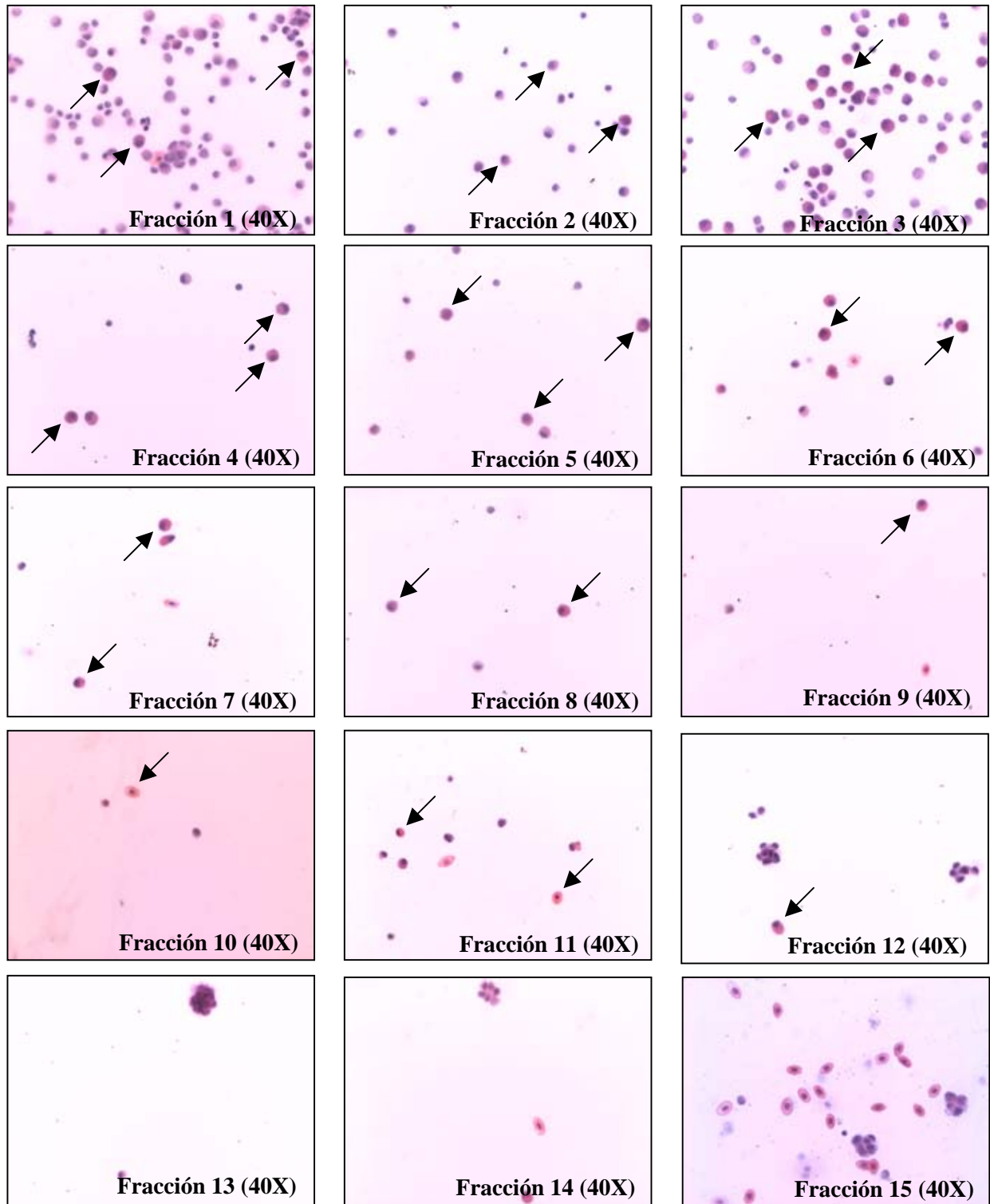


Figura 7. Imágenes representativas de las células hipofisarias separadas en las diversas fracciones obtenidas mediante un gradiente hiperbólico de percoll 25-80% y teñidas con hematoxilina y eosina. Las flechas indican células acidófilas representativas en cada fracción.

Fracción	% de tipo Celular				Densidad (g/ml)
	A	B	C	E	
1	43	51	2	4	1.033
2	41	42	13	4	1.049
3	45	45	4	6	1.062
4	55	34	6	5	
5	45	41	7	7	1.075
6	44	41	11	4	
7	31	42	11	16	
8	40	47	5	8	1.087
9	18	60	7	15	
10	21	52	10	17	
11	14	49	4	33	
12	15	54	5	26	
13	7	65	7	21	
14	1	5	3	91	1.098
15	2	22	1	75	1.121

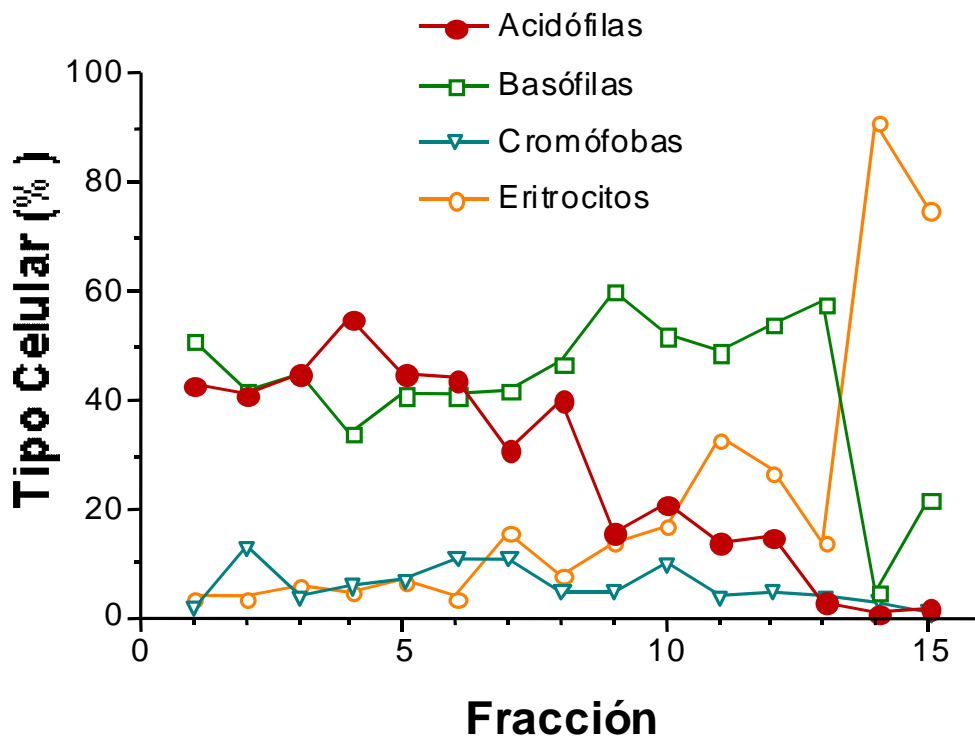


Figura 8. Proporción relativa de los tipos celulares hipofisarios obtenidos en el gradiente hiperbólico de percoll 25-80% y producto de la tinción con hematoxilina y eosina. A= acidófilas; B= basófilas; C= cromóforas; E= eritrocitos. (n= 3).

6.3 Tinción por inmunocitoquímica de las células aisladas en las fracciones del gradiente hiperbólico de percoll 25-80%.

En cada experimento, los portaobjetos que contenían las células hipofisarias provenientes de las diferentes fracciones obtenidas mediante gradientes hiperbólicos de percoll 25-80%; se incubaron con un anticuerpo específico contra cGH para diferenciar a los somatotropos del resto de las células hipofisarias (ver material y métodos). En la figura 9, se muestran las imágenes representativas de las células inmunorreactivas al anticuerpo contra GH distribuidas en diferentes proporciones en cada fracción. Al cuantificar el número de células inmunorreactivas en cada fracción se observó que los somatotropos se concentraron principalmente en dos zonas del gradiente (figura 9): La primera se encontró entre las fracciones 3 a 6, con un porcentaje del 36 al 48%, en un intervalo de densidad entre 1.062 a 1.081 g/ml. La segunda se encontró entre las fracciones 8 a 10, con un porcentaje del 33 al 51%, en un intervalo de densidad de 1.087 a 1.092 g/ml.

Dado a que el mayor número de células hipofisarias se concentraron en las primeras fracciones (figura 5), decidimos ampliar el intervalo de densidad del gradiente hiperbólico, pasando de 25-80% a 10-70% percoll, esperando que así, se obtuviera una mejor separación de las células.

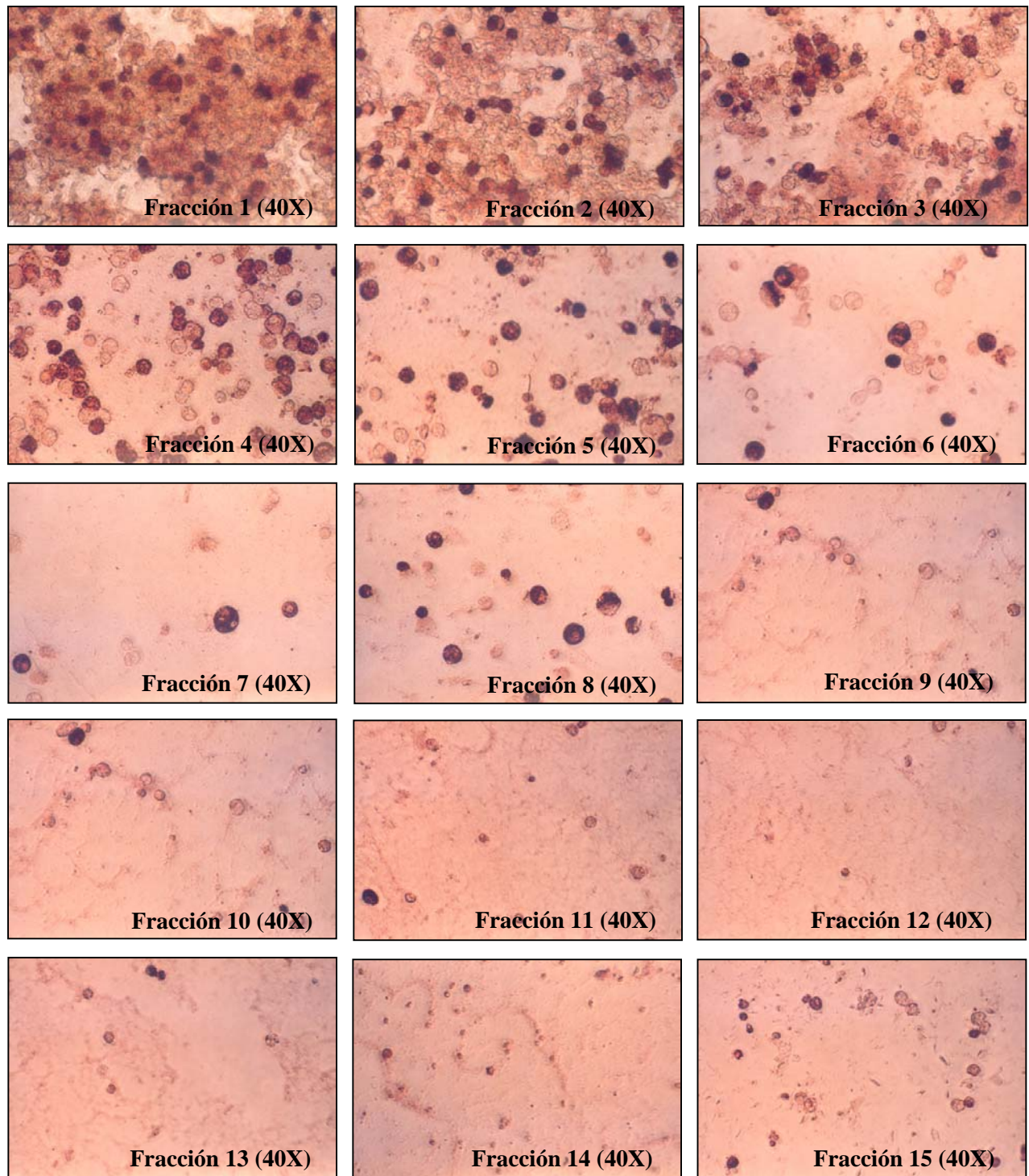


Figura 9. Imágenes representativas de las células inmunorreactivas al anticuerpo contra cGH (somatotropos) separadas en las diversas fracciones obtenidas mediante un gradiente hiperbólico de percoll 25-80%.

Fracción	%	%	Densidad (g/ml)
	Acidófilas	Somatotropos	
1	43	22.3	1.033
2	41	25.9	1.049
3	45	36.5	1.062
4	55	48.2	
5	45	43.6	1.075
6	44	39.9	
7	31	31	
8	40	33.5	1.087
9	18	51.9	
10	21	35.3	
11	14	28.5	
12	15	25.1	
13	7	13.9	
14	1	16.9	1.098
15	2	21.6	1.121

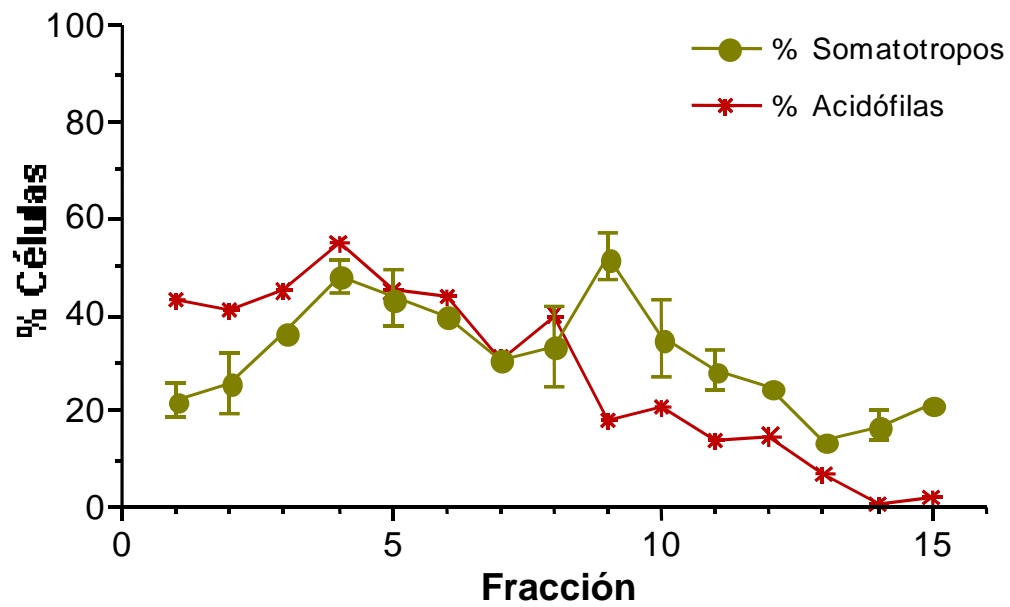


Figura 10. Gráfica y tabla de la proporción relativa de los somatotropos a lo largo de las diversas fracciones obtenidas del gradiente de percoll 25-80% (n= 3).

6.4 Gradiente hiperbólico de percoll 10-70% (A) con frotis manuales.

Una vez que se amplió el intervalo de densidad de los gradientes. Para verificar la formación adecuada de los gradientes hiperbólicos de percoll 10-70%, en cada experimento se empleó un tubo control en el que se colocaron marcadores de densidad conocida con un intervalo comprendido entre 1.018 a 1.142 g/ml. De esta manera por interpolación, se calculó la densidad a la cual se separaron los diversos tipos de células hipofisarias de pollo (figura 11).

Se realizaron dispersiones celulares a partir de 40 hipófisis de pollos de 4 semanas de edad (ver material y métodos). La concentración de células obtenidas por experimento fue de $90.4 \times 10^6 \pm 5.5 \times 10^6$ cel/ml (n=3) con un 92.5% de viabilidad. Después de la dispersión la cantidad total de células obtenidas se dividió en cuatro partes y cada una se colocó en un tubo sobre los gradientes hiperbólicos de percoll 10-70% formados previamente (ver material y métodos). Después de la centrifugación se colectaron 15 fracciones a partir de cada tubo, y se determinó el número de células por fracción. El rendimiento de células obtenidas del total colocado originalmente fue de $81.2 \times 10^6 \pm 13.8 \times 10^6$ cel/ml, lo que significó un 89.8% de recuperación del total colocado originalmente. En la figura 12 se muestra la distribución de las células hipofisarias en las diferentes fracciones colectadas a lo largo de los gradientes. La mayor cantidad de células hipofisarias se distribuyó en las fracciones 3 a 5 (con una concentración que osciló entre $12.15 \times 10^6 \pm 3.66 \times 10^6$ cel/ml y $21.98 \times 10^6 \pm 5.55 \times 10^6$ cel/ml), mientras que el resto de las fracciones las células se distribuyeron en concentraciones menores que oscilaron entre $0.28 \times 10^6 \pm 0.05 \times 10^6$ y $9.03 \times 10^6 \pm 3.45 \times 10^6$ cel/ml.

Fracción	Densidad (g/ml)
1	1.018
2	1.033
3	
4	1.049
5	1.062
6	
7	1.075
8	
9	
10	1.087
11	
12	
13	
14	
15	1.098
	1.121
	1.142

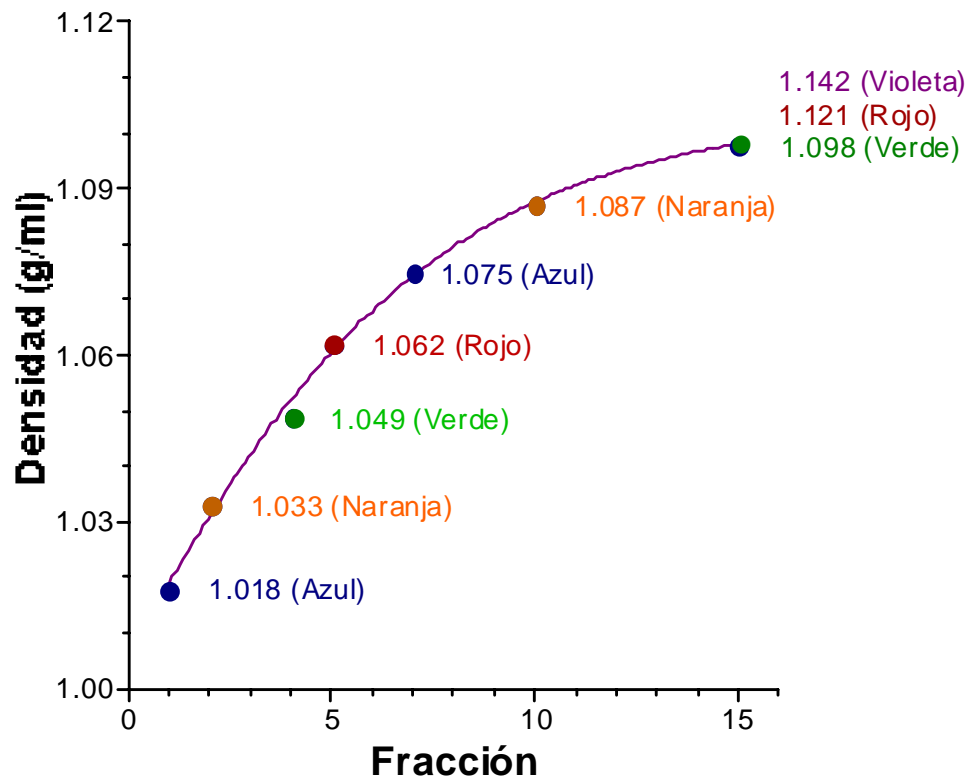


Figura 11. Distribución de los marcadores de densidad separados a través de un gradiente hiperbólico de percoll 10-70% (n= 3).

Fracción	Cantidad de células (cel/ml)	Densidad (g/ml)
1	0.62X10 ⁶ ±0.24X10 ⁶	1.018
2	3.10X10 ⁶ ±1.44X10 ⁶	1.033
3	12.98X10 ⁶ ±0.92X10 ⁶	
4	21.98X10 ⁶ ±5.55X10 ⁶	1.049
5	12.15X10 ⁶ ±3.66X10 ⁶	1.062
6	9.03X10 ⁶ ±3.45X10 ⁶	
7	4.09X10 ⁶ ±1.50X10 ⁶	1.075
8	2.47X10 ⁶ ±0.74X10 ⁶	
9	1.70X10 ⁶ ±0.42X10 ⁶	
10	1.26X10 ⁶ ±0.47X10 ⁶	1.087
11	0.56X10 ⁶ ±0.13X10 ⁶	
12	0.42X10 ⁶ ±0.08X10 ⁶	
13	0.28X10 ⁶ ±0.05X10 ⁶	
14	1.53X10 ⁶ ±0.97X10 ⁶	
15	9.01X10 ⁶ ±1.49X10 ⁶	1.098
Total	81.24X10 ⁶ ±13.81X10 ⁶	

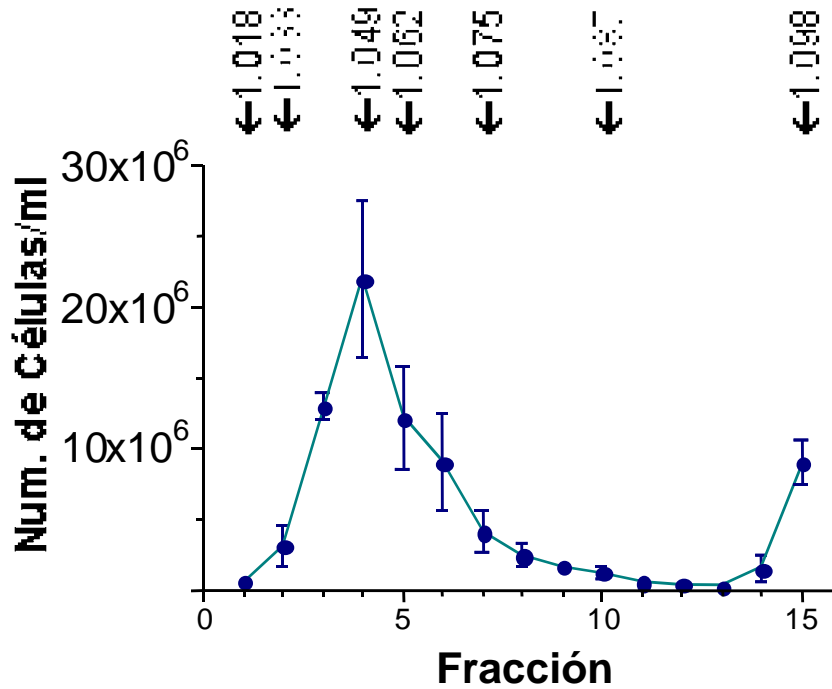


Figura 12. Distribución de las células hipofisarias separadas a través de un gradiente hiperbólico de percoll 10-70%. Las flechas indican la posición de los correspondientes marcadores de densidad ($X \pm SEM, n=3$).

6.5 Tinción con hematoxilina y eosina de las células aisladas en las fracciones del gradiente hiperbólico de percoll 10-70% (A).

En cada experimento, los portaobjetos que contenían las células hipofisarias provenientes de las diferentes fracciones obtenidas mediante gradientes hiperbólicos de percoll 10-70% se tiñeron con hematoxilina y eosina (ver material y métodos). De esta manera se observaron tres tipos de células hipofisarias con base a su tinción: acidófilas, basófilas y cromóforas. En la figura 13 se muestran imágenes representativas de estos tipos celulares, que se distribuyeron en diferentes cantidades en las fracciones obtenidas a través de los gradientes hiperbólicos de percoll 10-70%. En la figura 14 se muestran los resultados del análisis de las células contenidas en cada fracción. Se puede observar que las células acidófilas, se encontraron principalmente concentradas en dos zonas del gradiente: La primera se encontró entre las fracciones 4 a 6 (alcanzando una proporción que osciló entre 14 ± 1.2 y $37 \pm 2.4\%$ del total de células en esas fracciones); y la segunda se encontró en las fracciones 8 a 11 entre un 20 ± 2.0 y $49 \pm 2.0\%$ del total de células en esas fracciones). Las células basófilas se encontraron concentradas en tres zonas del gradiente: la primera se encontró en las fracciones 2 a 4 entre un 80 ± 0.5 y $86 \pm 4.5\%$; la segunda se encontró en las fracciones 6 a 8 entre un 51 ± 6.9 y $63 \pm 4.1\%$; y la tercera se encontró en las fracciones 10 a 12 entre un 39 ± 8.0 y $48 \pm 9.6\%$. Las células cromóforas, se encontraron prácticamente en todas las fracciones y su proporción se mantuvo entre 3 ± 0.8 a $32 \pm 2.2\%$. Finalmente, los eritrocitos presentaron un patrón de tinción acidófilo y se encontraron principalmente en las fracciones 12 y 15 concentrados entre un 32.0 ± 2.6 y $88 \pm 1.0\%$.

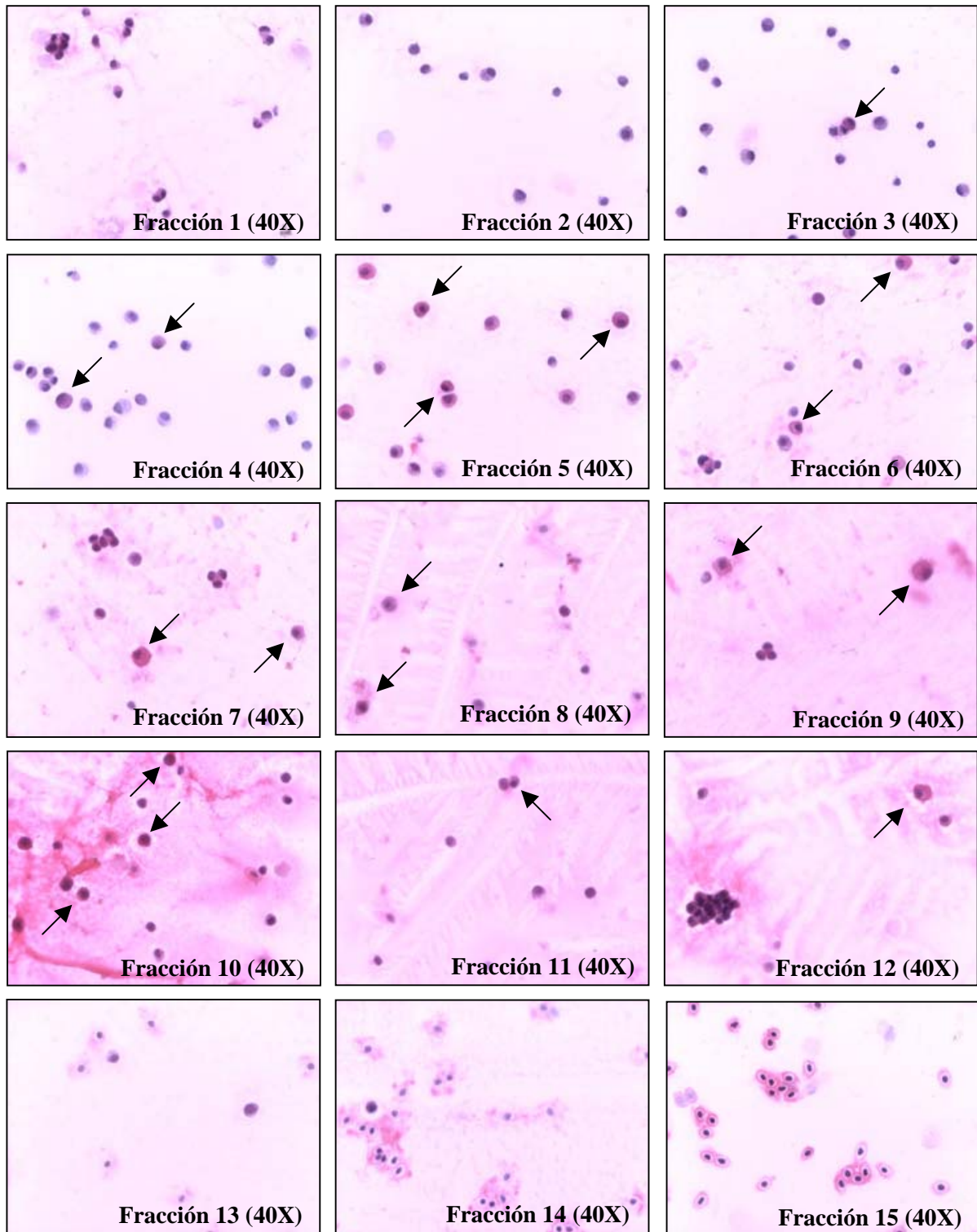


Figura 13. Imágenes representativas de las células hipofisarias separadas en las diversas fracciones obtenidas mediante un gradiente hiperbólico de percoll 10-70% y teñidas con hematoxilina y eosina. Las flechas indican células acidófilas representativas en cada fracción

Fracción	% Tipo Celular				Densidad (g/ml)
	A	B	C	E	
1	4 ±0.7	63 ±0.3	32 ±2.2	1 ±0.3	1.018
2	2 ±0.8	85 ±0.3	12 ±0.2	1 ±0.0	1.033
3	4 ±0.9	86 ±4.5	8 ±0.8	2 ±0.5	
4	14 ±1.2	80 ±0.5	4 ±0.8	2 ±0.5	1.049
5	37 ±2.4	43 ±1.7	12 ±2.1	8 ±0.3	1.062
6	24 ±1.3	55 ±2.6	12 ±2.2	9 ±1.5	
7	16 ±1.6	63 ±4.1	13 ±1.0	8 ±0.6	1.075
8	23 ±1.7	51 ±6.9	14 ±0.3	12 ±0.8	
9	49 ±2.0	24 ±0.8	14 ±1.7	13 ±1.2	
10	38 ±4.5	39 ±8.0	12 ±1.5	11 ±5.5	1.087
11	20 ±2.0	48 ±9.5	12 ±0.8	20 ±8.7	
12	9 ±0.5	47 ±3.3	12 ±1.5	32 ±2.6	
13	11 ±2.1	27 ±0.8	7 ±0.3	55 ±6.0	
14	3 ±0.3	5 ±0.5	6 ±0.8	86 ±1.3	
15	4 ±0.5	4 ±0.5	4 ±0.0	88 ±1.0	1.098

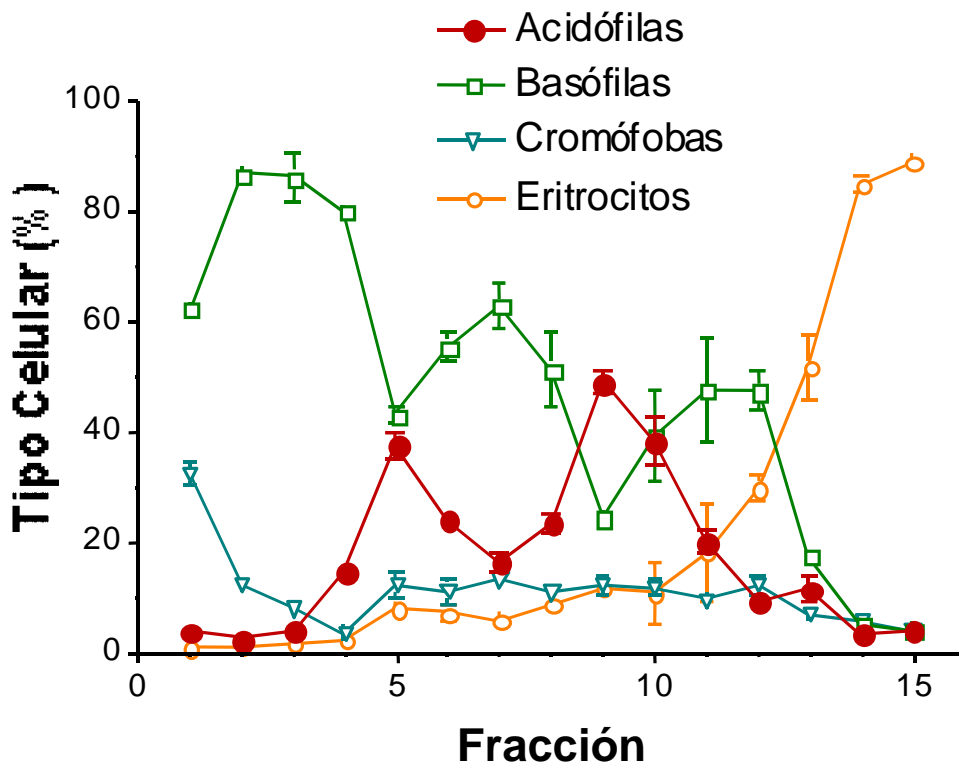


Figura 14. Proporción relativa de los tipos celulares hipofisarios obtenidos en el gradiente hiperbólico de percoll 10-70% y producto de la tinción con hematoxilina y eosina. A= acidófilas; B= basófilas; C= cromóforas; E= eritrocitos. ($X \pm SEM, n=3$).

6.6 Tinción por inmunocitoquímica de las células aisladas en las fracciones del gradiente hiperbólico de percoll 10-70% (A).

En cada experimento, los portaobjetos que contenían las células hipofisarias provenientes de las diferentes fracciones obtenidas mediante gradientes hiperbólicos de percoll 10-70%, se incubaron con un anticuerpo específico contra cGH para diferenciar a los somatotropos del resto de las células hipofisarias (ver material y métodos). En la figura 15, se muestran las imágenes representativas de las células GH-inmunorreactivas distribuidas en diferentes proporciones en cada fracción. Al cuantificar el número de células inmunorreactivas en cada fracción se observó que los somatotropos se encontraron principalmente en dos zonas del gradiente (figura 16). La primera se encontró entre las fracciones 4 a 7, con un porcentaje que osciló entre 33.7 ± 2.9 y $53.9 \pm 3.5\%$, en un intervalo de densidad entre 1.049 a 1.075 g/ml. La segunda se encontró entre las fracciones 10 a 12, con un porcentaje del 16.9 ± 5.1 y $44.7 \pm 2.9\%$, en un intervalo de densidad de 1.087 a 1.093 g/ml. Por otra parte, a fin de evaluar si existían diferencias morfométricas en las dos subpoblaciones de somatotropos aisladas mediante los gradientes hiperbólicos de percoll, se calculó el área de las células inmunorreactivas presentes en las fracciones 4 a 6 (baja densidad, BD) y 10 a 12 (alta densidad, AD). El área promedio de los somatotropos de BD fue de $135.0 \pm 3.4 \mu\text{m}^2$ y el de los somatotropos de AD fue de $148.4 \pm 4.8 \mu\text{m}^2$ respectivamente, siendo significativamente diferentes ($p < 0.05$). En estos experimentos se encontró que los marcadores de densidad se desplazaban por efecto de la temperatura, pues aunque los gradientes se centrifugaban a 4°C , las células hipofisarias de pollo en las diferentes fracciones se colectaban a temperatura ambiente, lo cual incrementaba la posibilidad de difusión a lo largo del tubo y esto podría haber modificado ligeramente la distribución de las células en las diferentes fracciones del gradiente. Además, también se observó que en los frotis celulares hechos manualmente se podían “colapsar” las células, lo que podría distorsionar su tamaño real. Debido a estos problemas técnicos se decidió repetir los experimentos, cuidando el manejo de la temperatura a lo largo de todo el proceso de separación y usando una citocentrífuga para la obtención de los frotis.

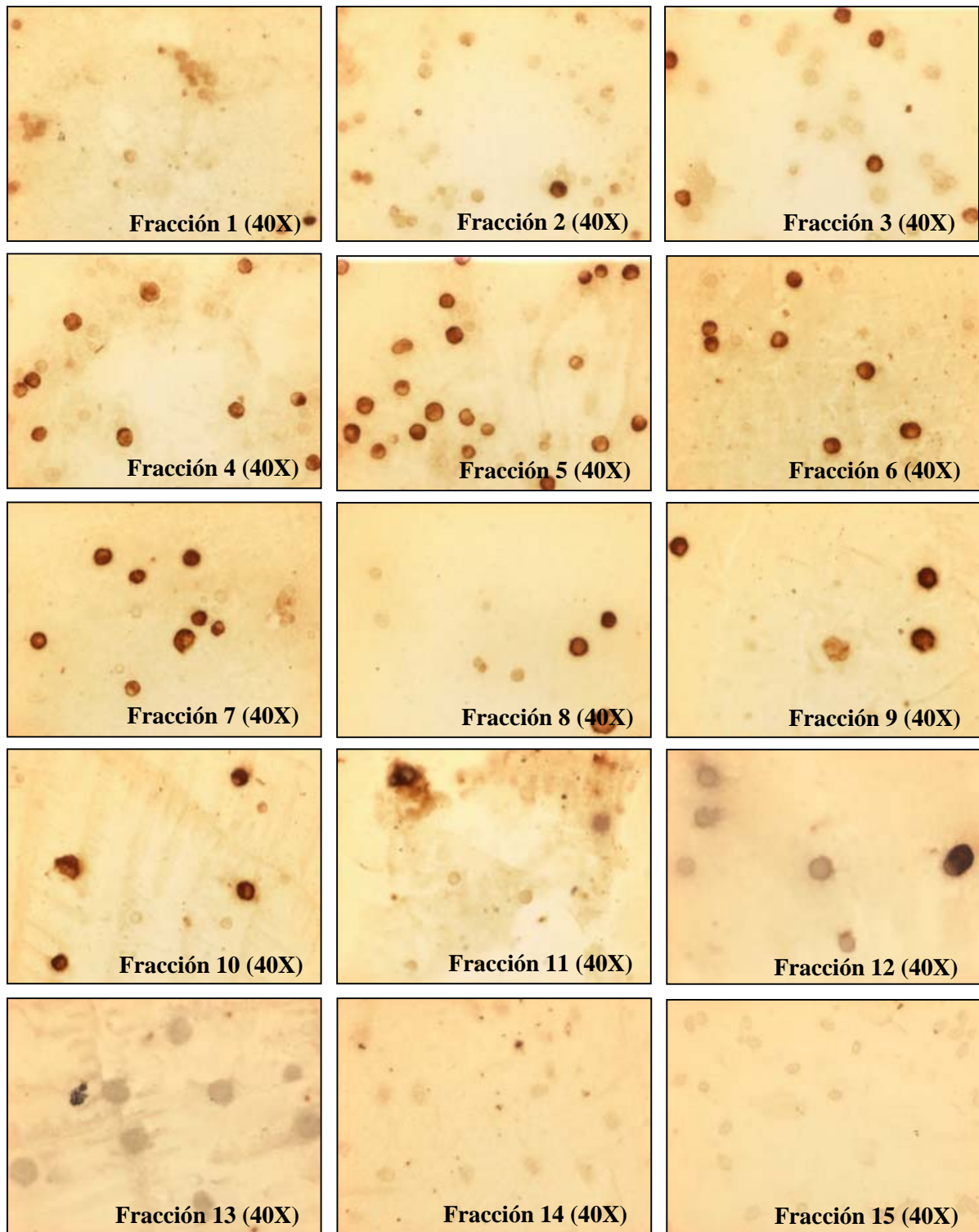


Figura 15. Imágenes representativas de las células inmunorreactivas al anticuerpo contra cGH (somatotropos) separadas en las diversas fracciones obtenidas mediante un gradiente hiperbólico de percoll 10-70%.

Fracción	%		%		Densidad (g/ml)
	Acidófilas	Somatotropos	Acidófilas	Somatotropos	
1	4 ±0.7	26.1 ±3.7			1.018
2	2 ±0.8	18.3 ±5.1			1.033
3	4 ±0.9	28.8 ±6.7			
4	14 ±1.2	33.7 ±2.9			1.049
5	37 ±2.4	53.9 ±3.5			1.062
6	24 ±1.3	50.3 ±4.7			
7	16 ±1.6	31.1 ±4.8			1.075
8	23 ±1.7	18.9 ±4.1			
9	49 ±2.0	12.2 ±5.8			
10	38 ±4.5	44.7 ±2.9			1.087
11	20 ±2.0	16.9 ±5.1			
12	9 ±0.5	19.3 ±1.7			
13	11 ±2.1	3.5 ±0.5			
14	3 ±0.3	6 ±1.0			
15	4 ±0.5	6.5 ±0.5			1.098

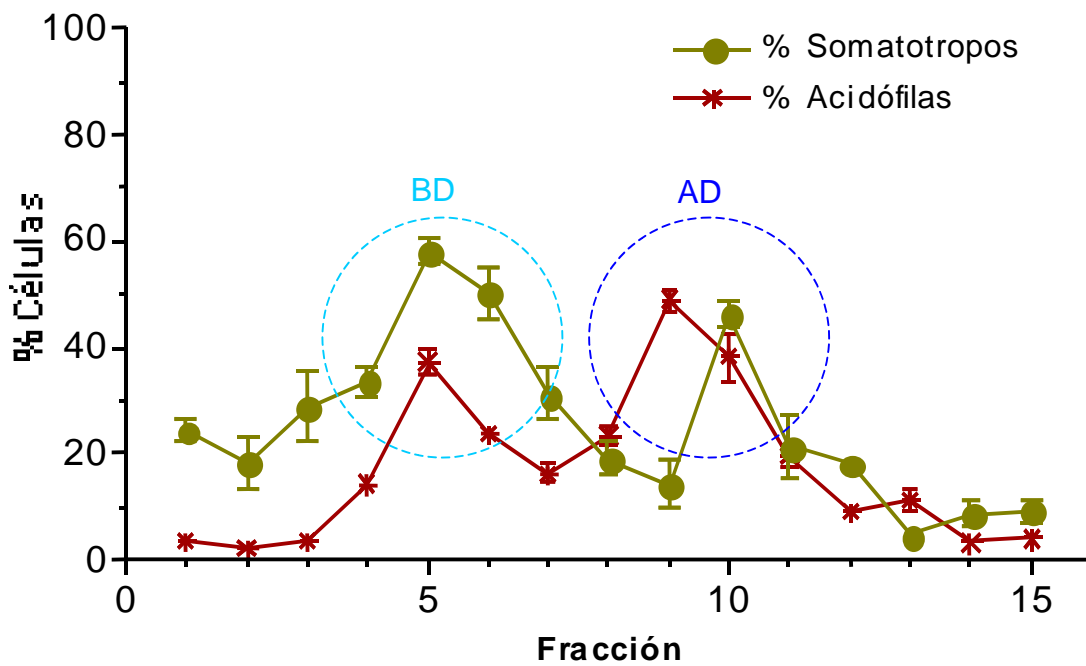


Figura 16. Proporción relativa de los somatotropos en las diversas fracciones obtenidas mediante un gradiente hiperbólico de percoll 10-70% ($X \pm SEM, n=3$). Los círculos señalan a las subpoblaciones de BD= baja densidad y AD= alta densidad.

6.7 Gradiente hiperbólico de percoll 10-70% (B) frotis con citocentrífuga.

Dado que se observó una mejor separación de las subpoblaciones de células hipofisarias con el gradiente de 10-70% en comparación con el gradiente de 20-80%, los siguientes experimentos se hicieron con gradientes hiperbólicos de percoll 10-70% y además se analizaron las fracciones celulares preparando los frotis con una citocentrífuga a fin de obtener resultados más claros con respecto al análisis morfométrico. Se realizaron dispersiones celulares a partir de 40 hipófisis de pollos de 4 semanas de edad (ver material y métodos). La concentración de células obtenidas por experimento fue de $110.0 \times 10^6 \pm 6.2 \times 10^6$ cel/ml (n=4), con un 90% de viabilidad. Después de la dispersión celular, la cantidad total de células obtenidas se dividió en cuatro partes y cada una se colocó en un tubo sobre los gradientes hiperbólicos de percoll 10-70% formados previamente (ver material y métodos). Después de la centrifugación se colectaron 15 fracciones a partir de cada tubo, y se determinó el número de células por fracción. El rendimiento de células obtenidas fue $100.7 \times 10^6 \pm 7.54 \times 10^6$ cel/ml, lo que significó un 90.9% de recuperación del total colocado originalmente. En la figura 17 se muestra la distribución de las células hipofisarias en las diferentes fracciones colectadas a lo largo de los gradientes. La mayor cantidad de células hipofisarias se distribuyó en las fracciones 3 a 6 (con una concentración entre $10.1 \times 10^6 \pm 1.6 \times 10^6$ cel/ml y $28.3 \times 10^6 \pm 3.2 \times 10^6$ cel/ml), mientras que en el resto de las fracciones las células se distribuyeron en concentraciones menores que oscilaron entre $0.25 \times 10^6 \pm 0.09 \times 10^6$ a $8.4 \times 10^6 \pm 2.0 \times 10^6$ cel/ml. En esta ocasión los frotis se prepararon utilizando una citocentrífuga (ver material y métodos), con lo cual se evitó que las células se colapsaran y se apreciaran mejor sus diferencias morfológicas.

Fracción	Cantidad de Células (cel/ml)	Densidad (g/ml)
1	0.25X10 ⁶ ±0.09X10 ⁶	1.018
2	2.65X10 ⁶ ±0.98X10 ⁶	1.033
3	15.02X10 ⁶ ±3.32X10 ⁶	
4	28.37X10 ⁶ ±3.27X10 ⁶	1.049
5	16.50X10 ⁶ ±1.15X10 ⁶	1.062
6	10.16X10 ⁶ ±1.62X10 ⁶	
7	5.49X10 ⁶ ±0.54X10 ⁶	1.075
8	4.46X10 ⁶ ±0.67X10 ⁶	
9	3.36X10 ⁶ ±0.86X10 ⁶	
10	2.42X10 ⁶ ±0.62X10 ⁶	1.087
11	1.44X10 ⁶ ±0.38X10 ⁶	
12	0.77X10 ⁶ ±0.17X10 ⁶	
13	0.68X10 ⁶ ±0.13X10 ⁶	
14	0.73X10 ⁶ ±0.37X10 ⁶	
15	8.44X10 ⁶ ±2.07X10 ⁶	1.098
	100.7X10 ⁶ ±7.54X10 ⁶	

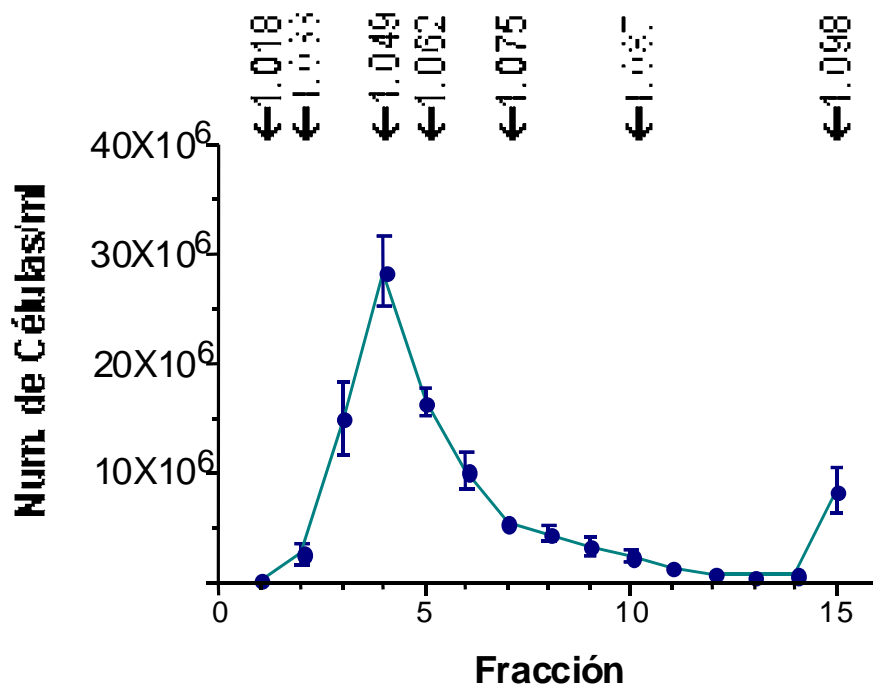


Figura 17. Distribución de las células hipofisarias separadas a través de un gradiente hiperbólico de percoll 10-70%. Las flechas indican la posición de los correspondientes marcadores de densidad ($X \pm SEM, n=4$).

6.8 Tinción con hematoxilina y eosina de las células aisladas en las fracciones del gradiente hiperbólico de percoll 10-70% (B).

En cada experimento, los portaobjetos que contenían las células hipofisarias provenientes de las diferentes fracciones obtenidas mediante gradientes hiperbólicos de percoll 10-70% se tiñeron con hematoxilina y eosina (ver material y métodos). De esta manera se observaron tres tipos de células hipofisarias con base a su tinción: acidófilas, basófilas y cromóforas, además de los eritrocitos. En la figura 18 se muestran imágenes representativas de estos tipos celulares, que se distribuyeron en diferentes cantidades en las fracciones obtenidas a través de los gradientes de percoll 10-70%. En la figura 18 se muestran los resultados del análisis de las células contenidas en cada fracción. Se puede observar que las células acidófilas se encontraron principalmente concentradas en dos zonas del gradiente: la primera se encontró en las fracciones 5 a 6 (alcanzando una proporción que osciló entre 52 ± 4.0 y $59 \pm 4.0\%$ del total de células en esas fracciones); y la segunda se encontró en las fracciones 9 a 10 entre un 46 ± 2.0 y $47.5 \pm 1.5.0\%$. Las células basófilas se encontraron concentradas en tres zonas del gradiente: la primera se encontró en las fracciones 1 a 4 entre un $43.5 \pm 7.5.0$ y $49 \pm 5.0\%$; la segunda se encontró en las fracciones 8 a 9 entre un 43 ± 2.0 y $47.5 \pm 4.5\%$; y la tercera se encontró en la fracción 14 entre un $54 \pm 10.0\%$. Las células cromóforas se encontraron prácticamente en todas las fracciones y su proporción se mantuvo entre 7.5 ± 1.5 a $19.5 \pm 1.5\%$. Finalmente, los eritrocitos presentaron un patrón de tinción acidófilo y se encontraron concentrados en la fracción 15 entre un $69.5 \pm 2.5\%$. Por otra parte, para evaluar si existían diferencias estructurales entre estas fracciones se midió el área correspondiente a las células acidófilas de BD y AD, la cual fue 184.5 ± 3.1 y $220.0 \pm 3.9 \mu\text{m}^2$, respectivamente ($p < 0.05$). Con base a estos experimentos se confirmó que se estaban aislando dos subpoblaciones de células acidófilas con diferente densidad y morfología.

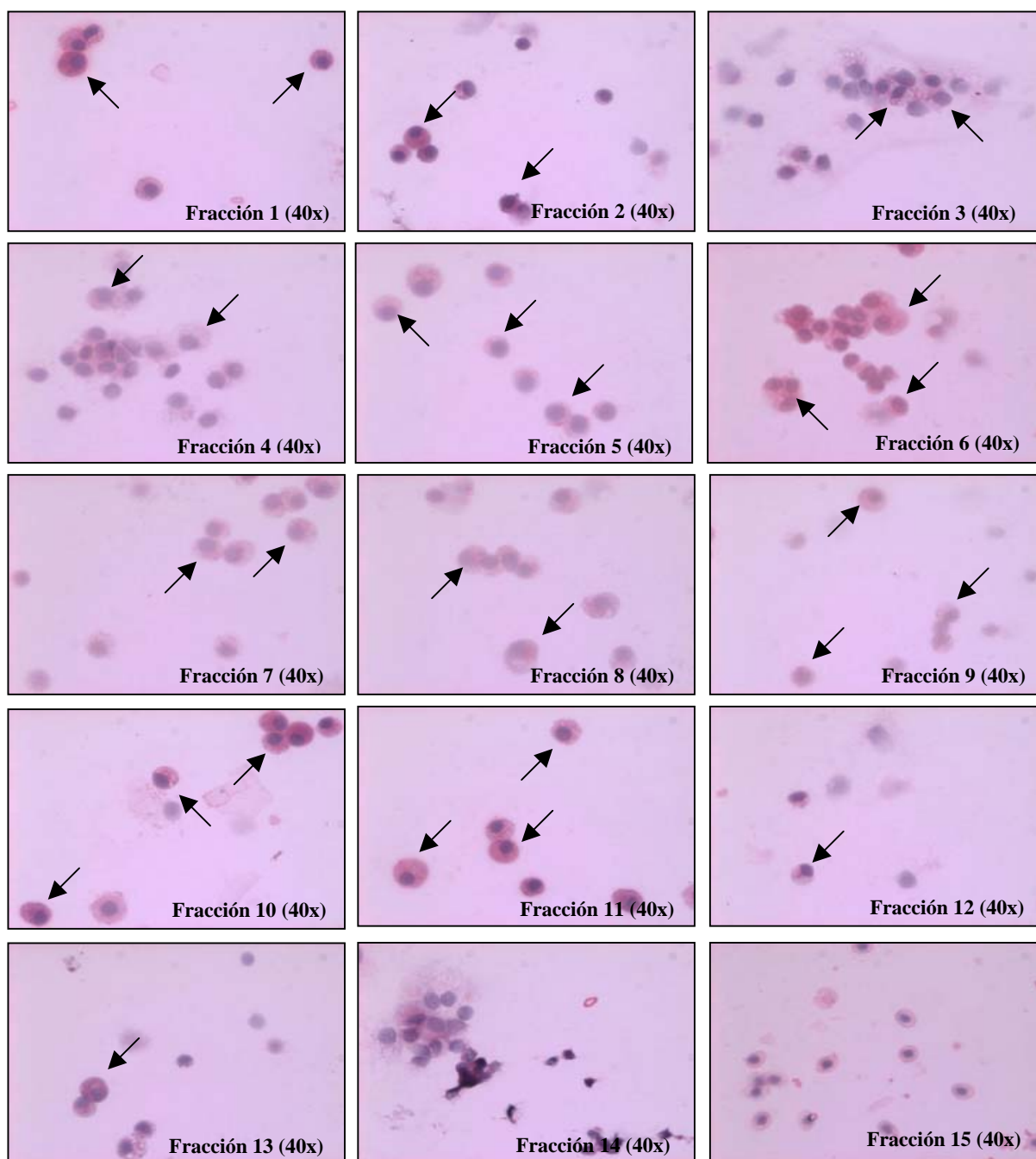


Figura 18. Imágenes representativas de las células hipofisarias separadas en las diversas fracciones obtenidas mediante un gradiente hiperbólico de percoll 10-70% y teñidas con hematoxilina y eosina. Las flechas indican células acidófilas representativas en cada fracción

Fracció	% Tipo Celular				Densidad (g/ml)
	A	B	C	E	
1	32.5 ±2.5	49.0 ±5.0	18.0 ±2.0	0.5 ±0.5	1.018
2	36.5 ±3.5	49.0 ±4.0	14.0 ±1.0	0.5 ±0.5	1.033
3	40.5 ±3.5	43.5 ±4.5	14.0 ±2.0	2.0 ±1.0	
4	45.0 ±3.0	43.5 ±7.5	11.5 ±4.5	0.0 ±0.0	1.049
5	52.0 ±4.0	34.0 ±6.0	13.0 ±2.0	1.0 ±0.0	1.062
6	59.0 ±4.0	26.0 ±2.0	15.0 ±2.0	0.0 ±0.0	
7	44.0 ±0.0	43.0 ±0.0	13.0 ±0.0	0.0 ±0.0	1.075
8	40.5 ±2.5	47.5 ±4.5	12.0 ±2.0	0.0 ±0.0	
9	46.0 ±2.0	43.0 ±2.0	11.0 ±3.0	0.0 ±0.5	
10	47.5 ±1.5	38.5 ±0.5	14.0 ±1.5	0.0 ±0.0	1.087
11	41.0 ±1.0	41.5 ±1.5	17.5 ±2.5	0.0 ±0.0	
12	34.0 ±5.0	46.0 ±6.0	19.5 ±1.5	0.5 ±0.5	
13	20.0 ±0.0	54.0 ±0.0	15.0 ±0.0	11.0 ±0.0	
14	18.0 ±3.0	54.0 ±10	12.0 ±3.0	16.0 ±16	
15	12.0 ±1.0	11.0 ±5.0	7.5 ±1.5	69.5 ±2.5	1.098

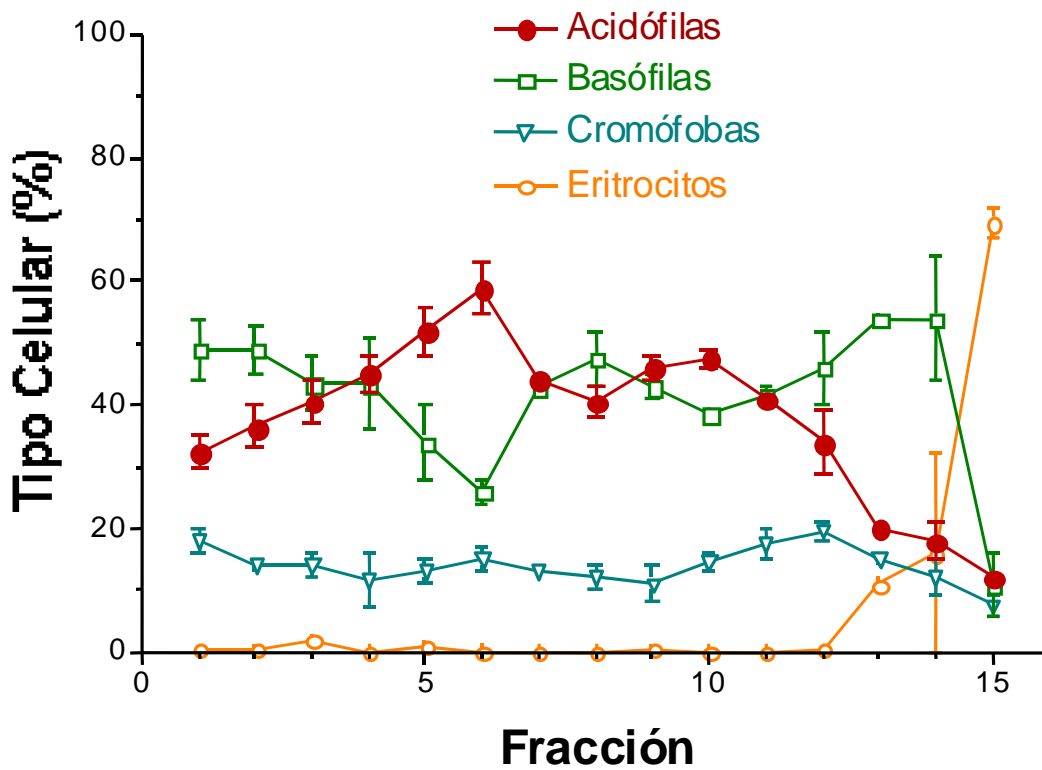


Figura 19. Proporción relativa de los tipos celulares hipofisarios obtenidos en el gradiente hiperbólico de percoll 10-70% y producto de la tinción con hematoxilina y eosina. A= acidófilas; B= basófilas; C= cromóforas; E= eritrocitos. (X±SEM,n=3).

6.9 Tinción por inmunocitoquímica de las células aisladas en las fracciones del gradiente hiperbólico de percoll 10-70% (B).

En cada experimento, los portaobjetos que contenían las células hipofisarias provenientes de las diferentes fracciones obtenidas mediante gradientes hiperbólicos de percoll 10-70%, se incubaron con un anticuerpo específico contra cGH para diferenciar a los somatotropos del resto de las células hipofisarias (ver material y métodos). En la figura 20, se muestran imágenes representativas de las células GH-inmunorreactivas distribuidas en diferentes proporciones en cada fracción de los gradientes hiperbólicos de percoll 10-70%. Al cuantificar el número células inmunorreactivas en cada fracción se observó que los somatotropos se concentraron principalmente en dos zonas del gradiente (figura 20): La primera se encontró entre las fracciones 4 a 6, con un porcentaje del 26 ± 1.6 y $33 \pm 3.1\%$, en un intervalo de densidad entre 1.049 a 1.068 g/ml. La segunda se encontró entre las fracciones 10 a 11, con un porcentaje del 24 ± 2.1 y $27 \pm 2.2\%$, en un intervalo de densidad de 1.087 a 1.091 g/ml. Por otra parte, a fin de evaluar si existían diferencias morfológicas en las dos subpoblaciones de somatotropos aisladas mediante los gradientes hiperbólicos de percoll, se calculó el área de las células inmunorreactivas presentes en las fracciones 4 a 6 (baja densidad, BD) y 10 a 11 (alta densidad, AD). El área promedio de los somatotropos de BD fue de $184.2 \pm 2.1 \mu\text{m}^2$ y el de los somatotropos de AD fue de $220.3 \pm 2.646 \mu\text{m}^2$, respectivamente, siendo significativamente diferentes ($p < 0.05$). Con base a estos experimentos y los reportados con hematoxilina y eosina fue evidente la separación de dos subpoblaciones de somatotropos que presentan diferencias morfológicas (densidad y tamaño).

Para estudiar las posibles diferencias funcionales entre estas subpoblaciones (BD y AD), se procedió a evaluar la respuesta de cada subpoblación a la estimulación con un secretagogo clásico (GHRH), así como su patrón de secreción de las variantes moleculares de la cGH.

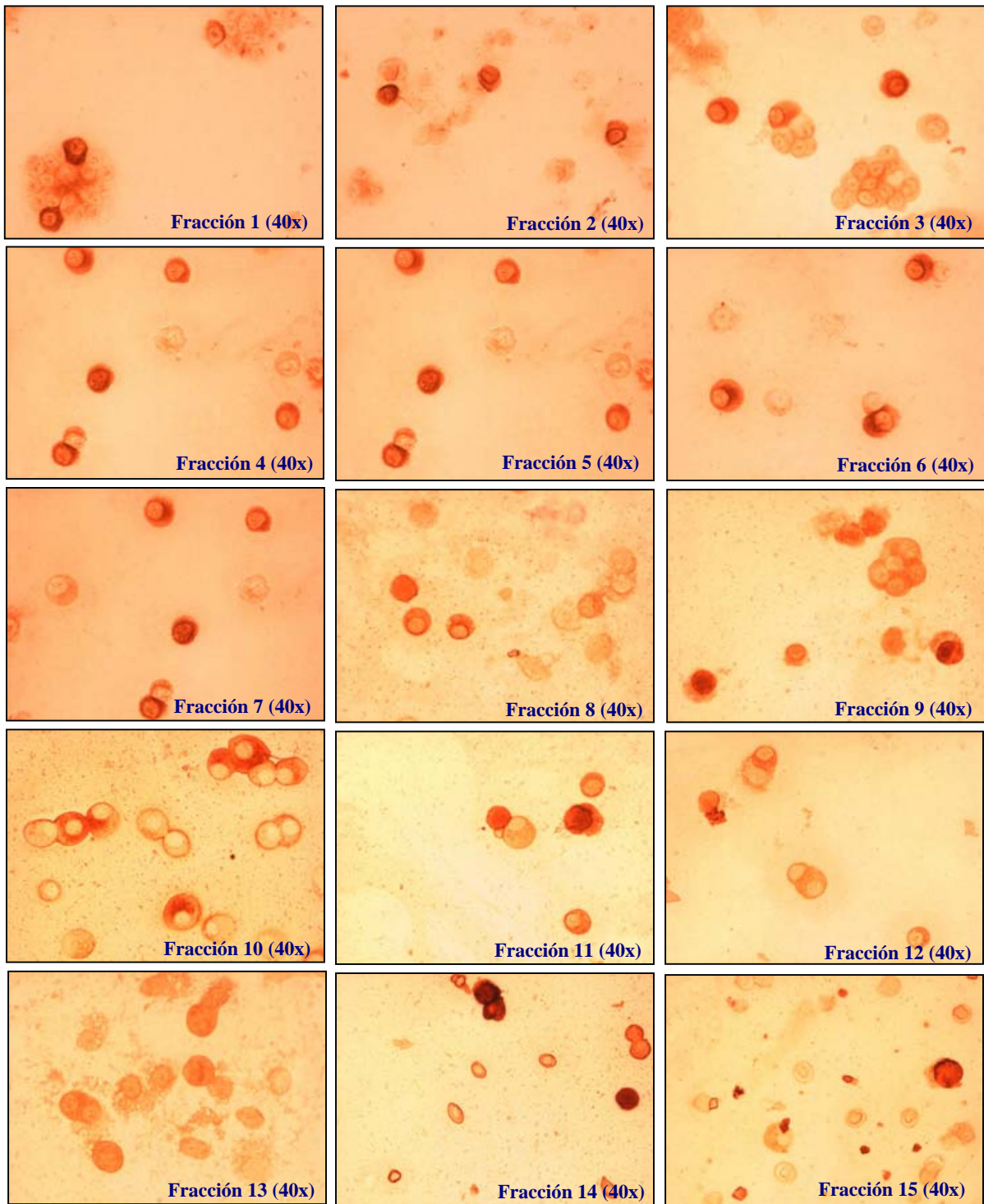


Figura 20. Imágenes representativas de las células inmunorreactivas al anticuerpo contra cGH (somatotropos) separadas en las diversas fracciones obtenidas mediante un gradiente hiperbólico de percoll 10-70%.

Fracció	%		Densidad (g/ml)
	Acidófila	Somatotropos	
1	32.5 ±2.5	14 ±5.8	1.018
2	36.5 ±3.5	6 ±3.0	1.033
3	40.5 ±3.5	11 ±2.3	
4	45.0 ±3.0	26 ±1.6	1.049
5	52.0 ±4.0	33 ±3.1	1.062
6	59.0 ±4.0	31 ±2.2	
7	44.0 ±0.0	25 ±1.0	1.075
8	40.5 ±2.5	20 ±0.8	
9	46.0 ±2.0	18 ±0.9	
10	47.5 ±1.5	27 ±2.2	1.087
11	41.0 ±1.0	24 ±2.1	
12	34.0 ±5.0	18 ±1.2	
13	20.0 ±0.0	10 ±1.5	
14	18.0 ±3.0	14 ±4.0	
15	12.0 ±1.0	11 ±2.7	1.098

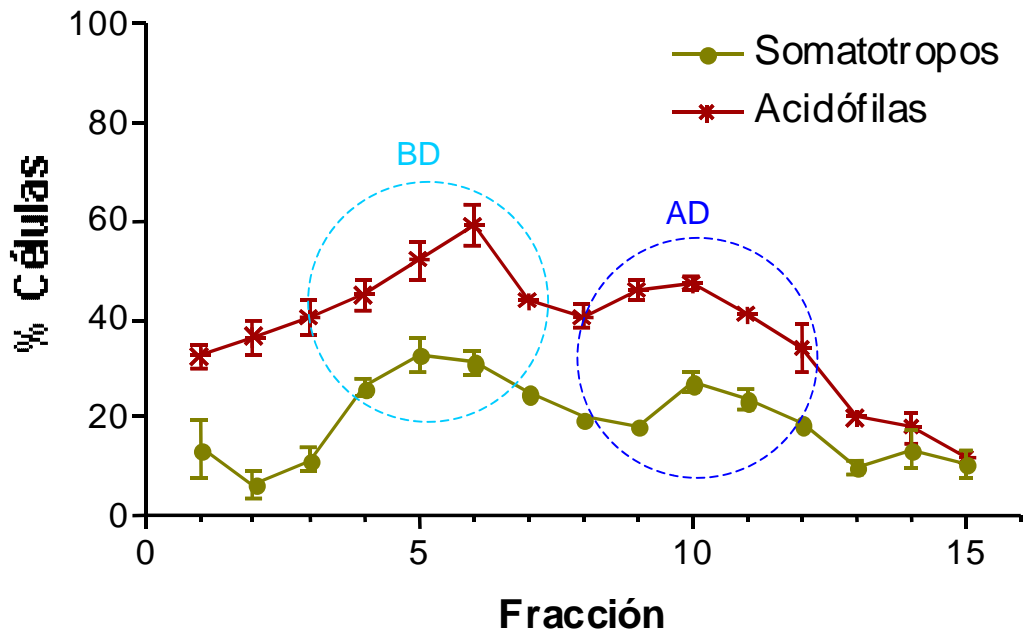


Figura 21. Proporción relativa de los somatotropos en las diversas fracciones obtenidas mediante un gradiente hiperbólico de percoll 10-70% ($X \pm SEM, n=4$). Los círculos señalan a las subpoblaciones de BD= baja densidad y AD= alta densidad.

6.10 Inmunoanálisis enzimático (ELISA)

Se utilizó un ELISA específico de tipo indirecto para determinar la concentración de la cGH secretada al medio de cultivo por las subpoblaciones de somatotropos BD y AD. En este método se empleó un anticuerpo policlonal contra cGH, producido en conejos en nuestro laboratorio. La curva patrón (figura 22A) se realizó con concentraciones de rcGH que cubrían un intervalo de 0.5 a 1024 ng/ml, y un coeficiente de variación inter-e intraensayo de 8.1% (n=13) y 4.86% (n=3), respectivamente. Además, se hicieron estudios comparativos con diluciones de un extracto hipofisiario de pollo de 4 semanas de edad y la curva patrón de rcGH (figura 22B). Ambas curvas mostraron paralelismo y se encontró una correspondencia entre los valores de 0.20 µg de proteína hipofisiaria con el de 10 ng de rcGH.

6.11 Efecto del GHRH sobre el contenido y liberación de GH en las subpoblaciones aisladas de somatotropos.

En experimentos previos habíamos establecido la relación dosis-efecto de GHRH sobre la secreción de cGH en cultivos primarios de células hipofisarias dispersas de pollos de 4 semanas de edad. En dichos experimentos se incubaron las células con concentraciones crecientes de GHRH (0.25-20 nM) durante 2 hrs. Los resultados mostraron que las concentraciones de 5 y 10 nM estimularon la secreción de cGH por un factor de respuesta relativa de 1.6 (figura 23), por lo que se decidió utilizar la dosis de 10 nM de GHRH para estimular a las subpoblaciones de somatotropos obtenidas a partir de los gradientes hiperbólicos de percoll.

Después de la separación de las subpoblaciones de somatotropos BD y AD se cultivaron estas incubándolas por 48 horas (ver material y métodos), y posteriormente se estimularon con 10 nM de GHRH durante 2 horas. Mas tarde se determinó la concentración de cGH contenida en las células (BD y AD) así como la liberada a los medios de cultivo correspondientes, mediante el método de ELISA.

Los resultados mostraron (figura 24A) que el contenido de GH en las células correspondientes a la subpoblación BD fueron diferentes estadísticamente en los controles ($183.8 \pm 13.5 \mu\text{g cGH}/1 \times 10^5$ células) que en los incubados con 10 nM de GHRH ($144.0 \pm 15.0 \mu\text{g cGH}/1 \times 10^5$ células). En contraparte, las células de la subpoblación de AD no mostraron diferencias estadísticamente significativas en el contenido de GH en los controles ($166.1 \pm 11.2 \mu\text{g cGH}/1 \times 10^5$ células) que en el existente en las células incubadas con 10 nM de GHRH ($131.6 \pm 14.1 \mu\text{g cGH}/1 \times 10^5$ células). Por otra parte, se observó un efecto estimulador del GHRH 10 nM sobre la liberación de la hormona de crecimiento hacia los medios de cultivo en ambos tipos de subpoblación, aunque la estimulación fue mayor en la subpoblación de AD (figura 24B). Los resultados mostraron una estimulación de la liberación de GH correspondiente al 7.5% en los somatotropos BD incubados con GHRH en comparación con los controles, mientras que en la subpoblación AD la estimulación fue de 18.9%.

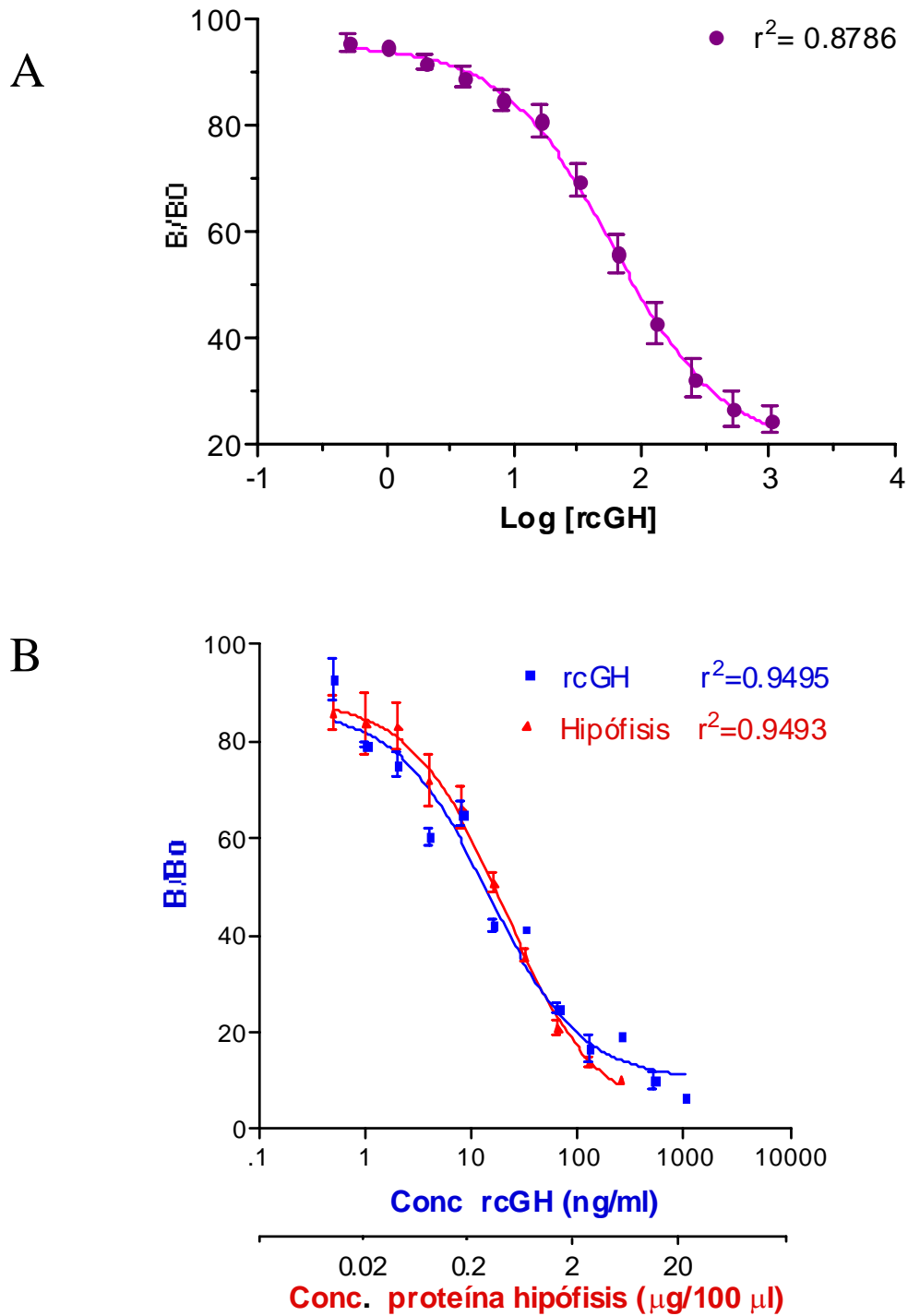


Figura 22. A) Curva patrón para la determinación de cGH (n=13). B) Curvas de paralelismo utilizando extracto de hipófisis de pollos de 4 semanas de edad y rcGH. El intervalo de concentraciones de rcGH fue de 0.5 a 1024 ng/ml.

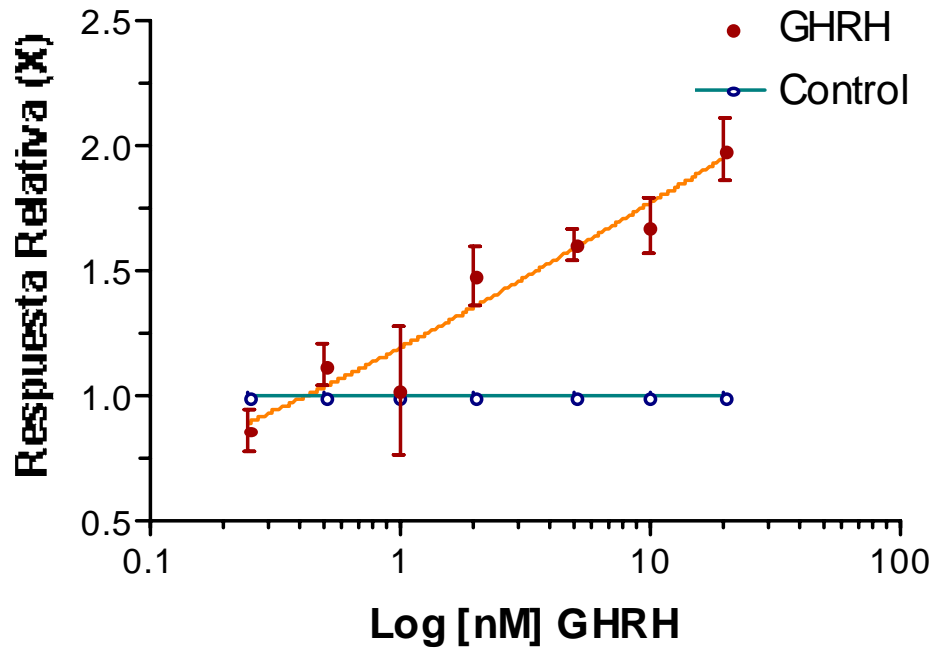
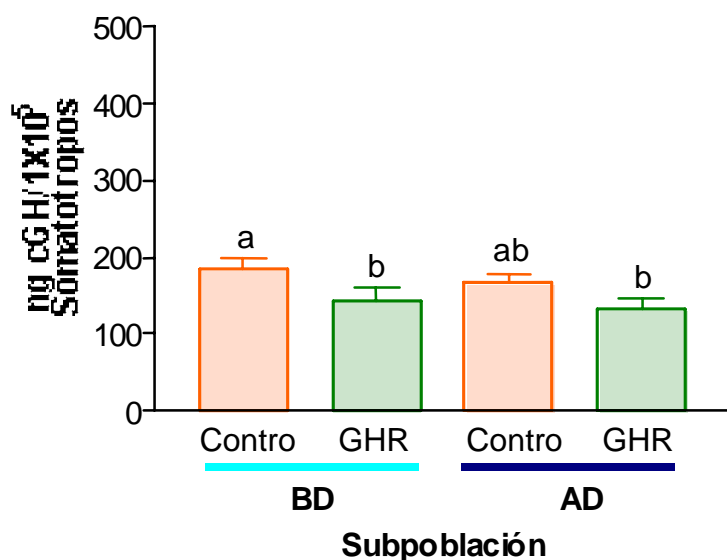


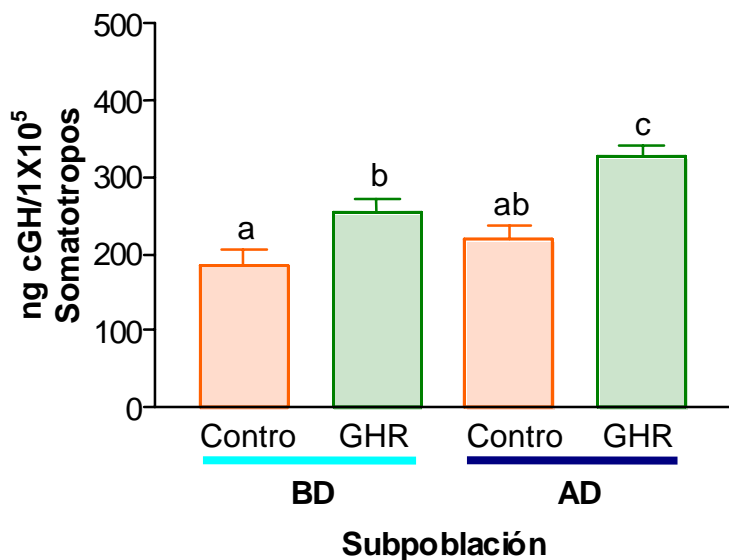
Figura 23. Relación dosis-efecto de GHRH en células hipofisarias.

A



Subpoblación	Control		GHRH	
	ng cGH/1X10 ⁵	Somatotropos	ng cGH/1X10 ⁵	Somatotropos
BD	183.8	±13.5	144.0	±15.0
AD	166.1	±11.2	131.6	±14.1

B



Subpoblación	Control		GHRH	
	ng cGH/1X10 ⁵	Somatotropos	ng cGH/1X10 ⁵	Somatotropos
BD	185.6	±20.0	253.2	±18.6
AD	218.8	±16.1	326.1	±14.5

Figura 24. A) Contenido de cGH en las células correspondientes a las subpoblaciones BD y AD. B) Contenido de cGH liberada a los medios de cultivo correspondientes a las subpoblaciones BD y AD. Letras diferentes representan diferencia significativa $P < 0.05$, obtenido por ANOVA de una vía y una prueba de Tukey ($X \pm SEM, n=4$).

6.12 Análisis electroforético de las variantes moleculares de masa de la cGH.

Después de la separación de las subpoblaciones de somatotropos BD y AD a través de los gradientes hiperbólicos de percoll 10-70%, se sembraron 3.0×10^5 células correspondientes a las subpoblaciones y se dejaron incubar durante 48 horas en cultivos primarios (ver material y métodos). Posteriormente se analizó el patrón de variantes moleculares de masa de la GH presentes tanto en las células como en el medio de cultivo, después de la incubación en condiciones control y con 10 nM de GHRH (ver materiales y métodos).

En la figura 25 se muestran las imágenes representativas de un análisis electroforético (SDS-PAGE [CNR] y Western blot), en donde se observa que el patrón de variantes moleculares de cGH presentes en ambas subpoblaciones BD y AD fue semejante tanto en el citoplasma de las células control como en el citoplasma de las células incubadas con GHRH (22, 26, 44, 50, 60, 66, 76, 80 kDa, respectivamente), aunque el contenido de cada isoforma varió. De igual manera, el patrón de variantes moleculares de cGH presentes en ambas subpoblaciones BD y AD fue semejante tanto en el medio de cultivo de las células control como en los medios de cultivo de las células incubadas con GHRH (22, 44, 50, 60, 66 y 80 kDa, respectivamente), aunque el contenido de cada isoforma varió de acuerdo a los resultados del análisis densitométrico (ver más adelante).

En la figura 26 se muestra el área total de cada una de las bandas inmunorreactivas correspondientes a variantes moleculares de cGH de las células en cada subpoblación de somatotropos de BD y AD. En el caso de la variante molecular de 22 kDa en las células correspondientes a los somatotropos de BD y AD, en presencia de GHRH se obtuvo un decremento del área total del 63.7 y 37.9%, respectivamente (con respecto a su control). En el caso de la variante molecular de 26 kDa en las células correspondientes a los somatotropos de BD y AD, en presencia de GHRH se obtuvo un decremento del área total del 79.6 y 50.2%, respectivamente (con respecto a su control). En el caso de la variante molecular de 44 kDa en las células correspondientes

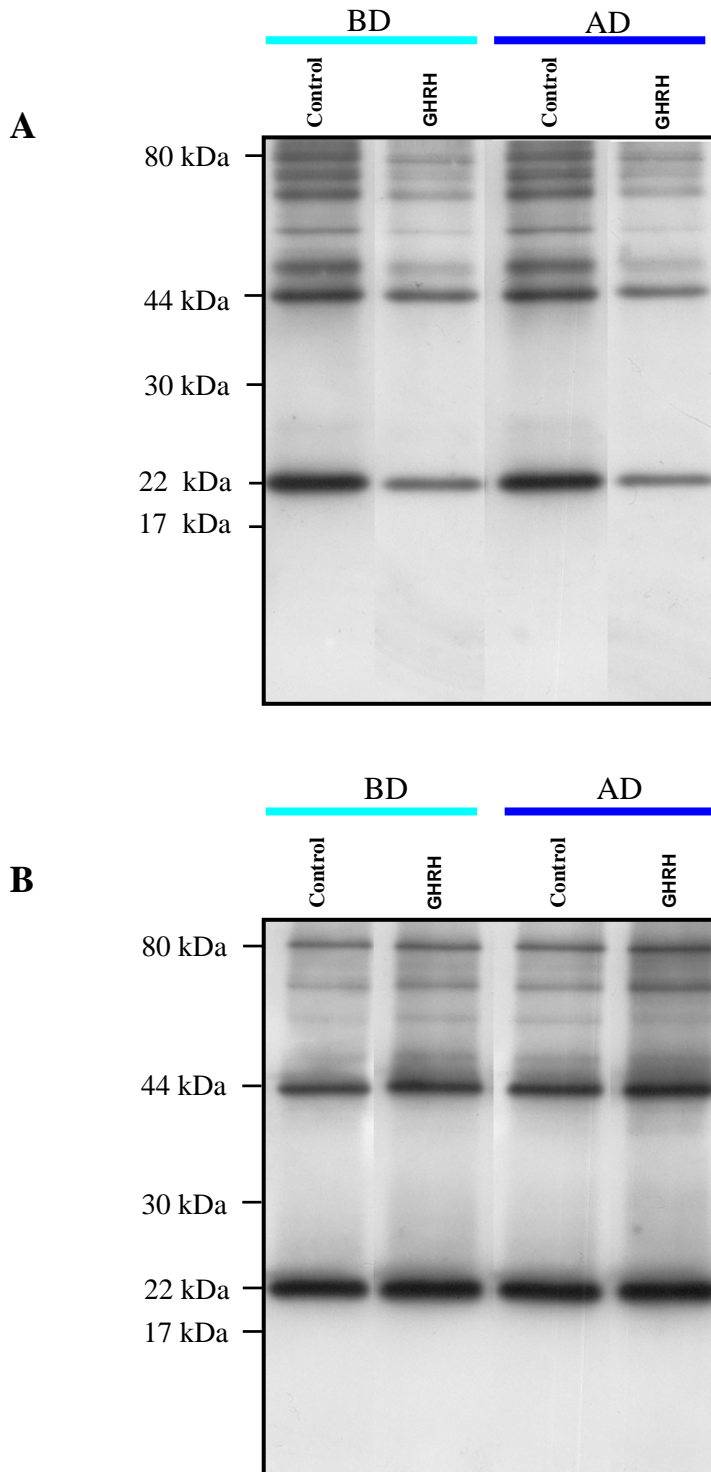
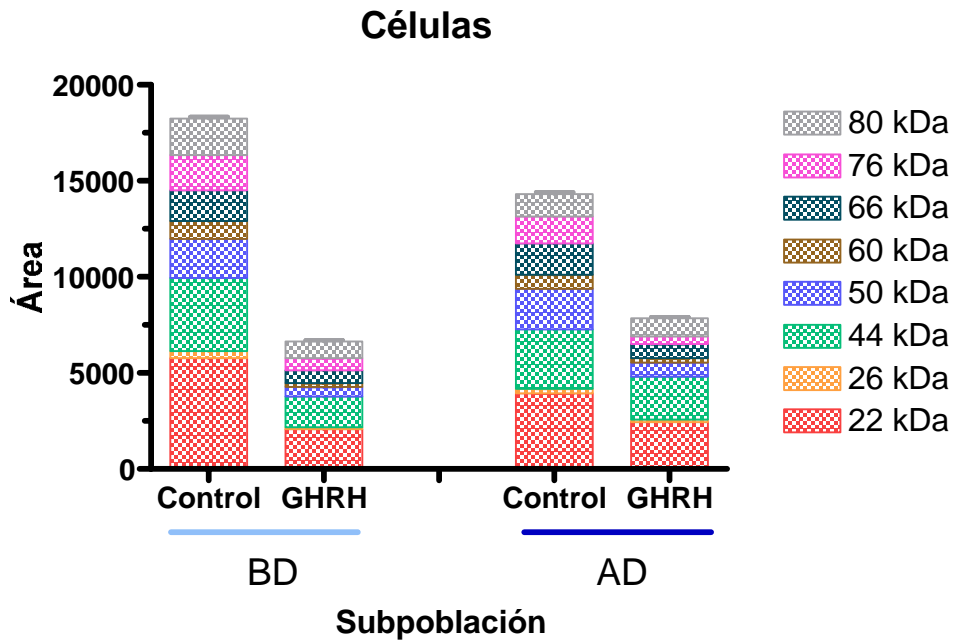


Figura 25. Imágenes representativas de un análisis electroforético (SDS-PAGE [CNR] y Western blot) de las formas inmunorreactivas de cGH detectadas en las células y en el medio de cultivo correspondiente a las subpoblaciones de somatotropos BD y AD CNR. A) Células y B) Medio de cultivo.

a los somatotropos de BD y AD, en presencia de GHRH se obtuvo un decremento del área total del 57.5 y 27.5%, respectivamente (con respecto a su control). En el caso de la variante molecular de 50 kDa en las células correspondientes a los somatotropos de BD y AD, en presencia de GHRH se obtuvo un decremento del área total del 75.8 y 64.6%, respectivamente (con respecto a su control). En el caso de la variante molecular de 60 kDa en las células correspondientes a los somatotropos de BD y AD, en presencia de GHRH se obtuvo un decremento del área total del 77.8 y 69.4%, respectivamente (con respecto a su control). En el caso de la variante molecular de 66 kDa en las células correspondientes a los somatotropos de BD y AD, en presencia de GHRH se obtuvo un decremento del área total del 58.0 y 54.5%, respectivamente (con respecto a su control). En el caso de la variante molecular de 76 kDa en las células correspondientes a los somatotropos de BD y AD, en presencia de GHRH se obtuvo un decremento del área total del 66.2 y 71.8%, respectivamente (con respecto a su control). En el caso de la variante molecular de 80 kDa en las células correspondientes a los somatotropos de BD y AD, en presencia de GHRH se obtuvo un decremento del área total del 53.1 y 19.8%, respectivamente (con respecto a su control).

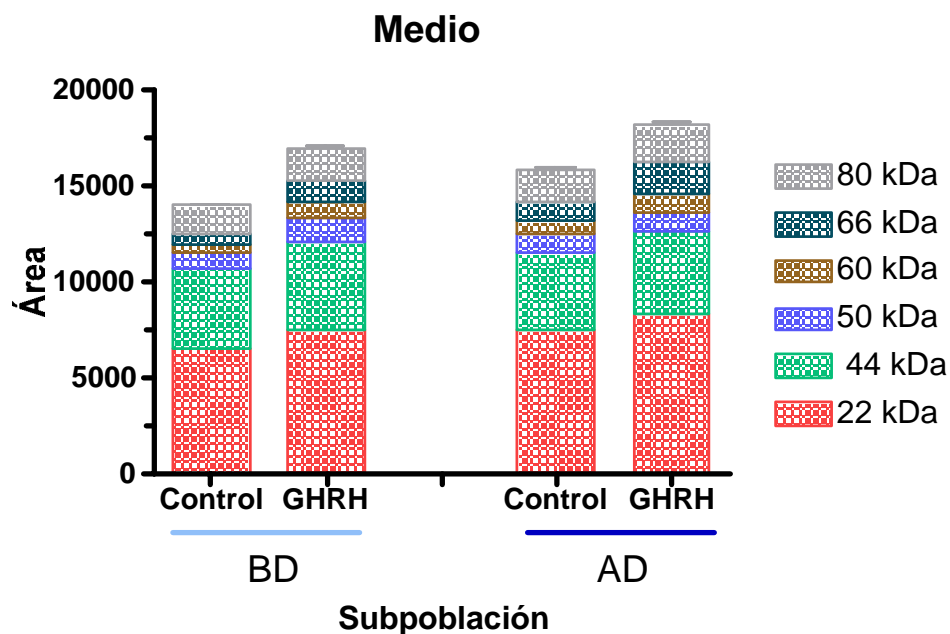
Por otra parte, en la figura 27 se muestra el área total de cada una de las variantes moleculares de cGH de los medios correspondientes a las subpoblaciones de somatotropos de BD y AD:

En el caso de la variante molecular de 22 kDa en los medios correspondientes a los somatotropos de BD y AD, en presencia de GHRH se obtuvo un incremento del área total del 13.7 y 11.3%, respectivamente (con respecto a su control). En el caso de la variante molecular de 44 kDa en los medios correspondientes a los somatotropos de BD



PM	Subpoblación				C vs C	GHRH vs GHRH
	BD		AD			
	Control	GHRH	Control	GHRH		
	Promedio±SEM (P<0.05)		Promedio±SEM (P<0.05)			
22 KDa	5768.0 ±175.7 a	2092.2 ±185.8 b	3953.3 ±44.6 c	2452.5 ±130.7 db	+	
26 kDa	395.6 ±58.9 a	80.4 ±11.6 a	243.2 ±29.9 a	120.9 ±18.5 a		
44 kDa	3781.7 ±210.0 a	1606.7 ±121.0 b	3082 ±171.3 c	2233.4 ±120.5 d	+	+
50 kDa	2023.7 ±129.5 a	489.4 ±56.9 b	2096.3 ±131.3 a	740.1 ±39.5 cb		
60 kDa	942.1 ±98.0 a	208.3 ±29.9 b	731.0 ±38.6 a	223.1 ±23.5 cb		
66 kDa	1590.2 ±82.9 a	667.8 ±65.6 b	1645.3 ±80.3 a	747.0 ±40.6 cb		
76 kDa	1856.0 ±77.4 a	626.9 ±46.8 b	1410.9 ±77.9 c	396.9 ±56.4 db	+	
80 kDa	1893.3 ±101.5 a	886.7 ±71.9 b	1167.8 ±78.2 cb	936.5 ±65.9 db	+	

Figura 26. Análisis representativo de las áreas de las variantes moleculares de cGH detectadas en las células de las subpoblaciones de somatotropos AD y BD (CNR). Letras diferentes representan diferencia significativa $P < 0.05$, obtenido por ANOVA de una vía y una prueba de Tukey ($X \pm SEM, n=3$). Símbolo (+) indica diferencia entre las variantes de las subpoblaciones BD y AD.



PM	Subpoblación				C vs C	GHRH vs GHRH
	BD		AD			
	Control	GHRH	Control	GHRH		
	Prom edb ±SEM (P<0.05)	Prom edb ±SEM (P<0.05)	Prom edb ±SEM (P<0.05)	Prom edb ±SEM (P<0.05)		
22 kDa	6556.3 ±207.2 a	7458.1 ±204.9 b	7456.8 ±227.4 cb	8299.7 ±89.8 d	+	+
44 kDa	4189.4 ±116.7 a	4565.1 ±100.9 b	4041.3 ±108.7 a	4349.5 ±59.4 ab		
50 kDa	769.3 ±37.1 a	1341.1 ±37.5 b	977.2 ±29.9 ab	995.6 ±55.1 ab		
60 kDa	435.3 ±24.8 a	749.3 ±28.5 a	678.7 ±13.3 a	920.4 ±16.4 b		+
66 kDa	603.5 ±11.9 a	1158.7 ±77.7 b	980.7 ±42.7 cb	1688.7 ±49.9 d	+	+
80 kDa	1396.0 ±57.9 a	1666.1 ±74.8 a	1729.3 ±46.8 ab	1900.3 ±87.3 b		+

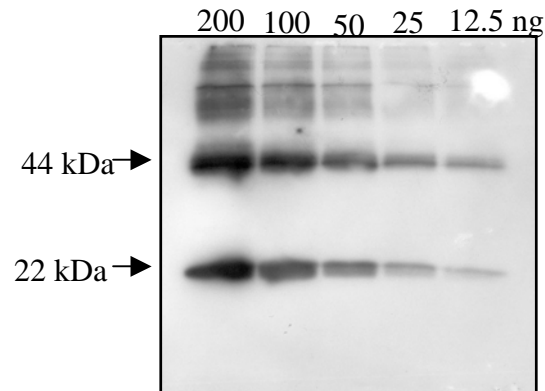
Figura 27. Análisis representativo de las áreas de las variantes moleculares de cGH detectadas en los medios de cultivo correspondientes a las subpoblaciones de somatotropos AD y BD (CNR). Letras diferentes representan diferencia significativa P<0.05, obtenido por ANOVA de una vía y una prueba de Tukey (X±SEM,n=3). Símbolo (+) indica diferencia entre las variantes de las subpoblaciones BD y AD.

y AD, en presencia de GHRH se obtuvo un incremento del área total del 8.9 y 7.6%, respectivamente (con respecto a su control). En el caso de la variante molecular de 50 kDa en los medios correspondientes a los somatotropos de BD y AD, en presencia de GHRH se obtuvo un incremento del área total del 74.3 y 1.8%, respectivamente (con respecto a su control). En el caso de la variante molecular de 60 kDa en los medios correspondientes a los somatotropos de BD y AD, en presencia de GHRH se obtuvo un incremento del área total del 72.1 y 35.6%, respectivamente (con respecto a su control). En el caso de la variante molecular de 66 kDa en los medios correspondientes a los somatotropos de BD y AD, en presencia de GHRH se obtuvo un incremento del área total del 91.9 y 17.7%, respectivamente (con respecto a su control). En el caso de la variante molecular de 80 kDa en los medios correspondientes a los somatotropos de BD y AD, en presencia de GHRH se obtuvo un incremento del área total del 19.3 y 9.8%, respectivamente (con respecto a su control).

Con el objetivo de intentar hacer cuantitativo los resultados obtenidos por SDS-PAGE y Western Blot (CNR), se interpolaron los valores obtenidos en la densitometría de las variantes moleculares de 22 y 44 kDa de GH en las células y en el medio de cultivo correspondiente a las subpoblaciones BD y AD de pollo.

Para ello, se hicieron curvas patrón utilizando diferentes concentraciones de rcGH (200 a 12.5 ng). Los datos obtenidos por densitometría se analizaron mediante una regresión lineal, [ver figura 28, condiciones no reductoras (CNR)]. Estos resultados mostraron que el sistema es semicuantitativo y que permite observar cambios claros en la concentración de las bandas de cGH en las muestras analizadas.

Para la variante molecular de 22 kDa de cGH (CNR) en las células correspondientes a la subpoblación BD, se observaron diferencias estadísticamente significativas en el contenido de esta variante en las células control vs aquellas obtenidas después de la estimulación con GHRH (51.2 ± 1.9 ng vs 10.2 ± 2.1 ng, respectivamente), de igual manera en las células correspondientes a la subpoblación AD, se observaron



B

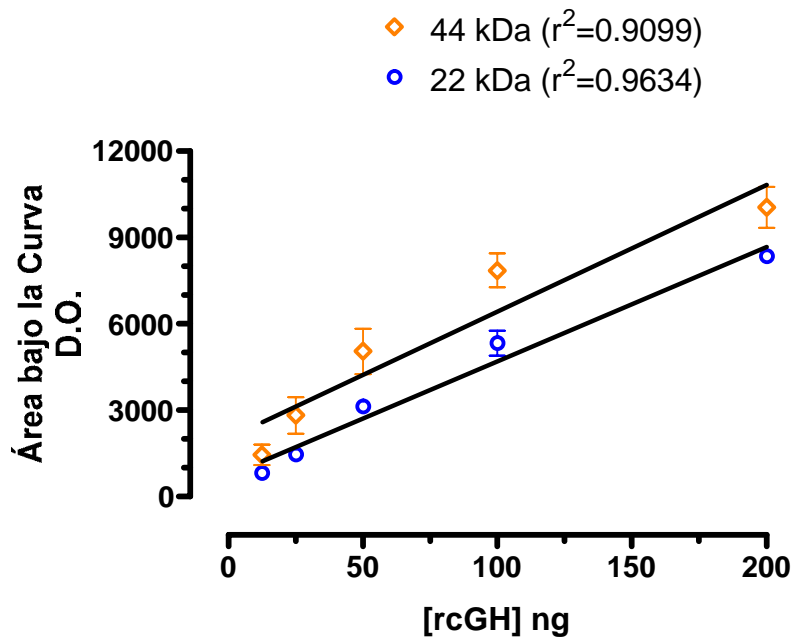


Figura 28. A) Imagen representativa de un análisis electroforético (SDS-PAGE y Western blot) de distintas concentraciones de rcGH de pollo bajo condiciones no reductoras. B) Gráfica de los datos obtenidos por densitometría a partir del luminograma correspondiente ($X \pm SEM, n=3$).

diferencias estadísticamente significativas en el contenido de esta variante en las células control vs aquellas obtenidas después de la estimulación con GHRH (30.9 ± 0.5 ng vs 14.3 ± 1.4 ng, respectivamente) (ver figura 29). Esta misma variante molecular de 22 kDa de cGH (CNR) en los medios de cultivo correspondientes a la subpoblación BD, se observaron diferencias estadísticamente significativas en el contenido de esta variante en los medios control vs aquellos obtenidos después de la estimulación con GHRH (59.9 ± 2.3 ng vs 69.9 ± 2.3 ng, respectivamente), de igual manera en los medios de cultivo correspondientes a la subpoblación AD, se observaron diferencias estadísticamente significativas en el contenido de esta variante en los medios control vs aquellos obtenidos después de la estimulación con GHRH (69.9 ± 2.5 ng vs 79.4 ± 1.0 ng, respectivamente) (ver figura 29).

Para la variante molecular de 44 kDa de cGH (CNR); en las células correspondientes a la subpoblación BD, se observaron diferencias estadísticamente significativas en el contenido de esta variante en los medios control vs aquellos obtenidos después de la estimulación con GHRH (26.9 ± 2.6 ng vs 2.3 ± 0.4 ng, respectivamente), de igual manera en las células correspondientes a la subpoblación AD, se observaron diferencias estadísticamente significativas en el contenido de esta variante en los medios control vs aquellos obtenidos después de la estimulación con GHRH (18.1 ± 2.2 ng vs 7.3 ± 1.5 ng, respectivamente) (ver figura 29). Esta misma variante molecular de 44 kDa de cGH (CNR) en los medios de cultivo correspondientes a la subpoblación BD, no se observaron diferencias estadísticamente significativas en el contenido de esta variante en los medios control vs aquellos obtenidos después de la estimulación con GHRH (32.1 ± 1.5 ng vs 36.8 ± 1.3 ng, respectivamente), de igual manera en los medios de cultivo correspondientes a la subpoblación AD, de igual manera, no se observaron diferencias estadísticamente significativas en el contenido de esta variante en los medios control vs aquellos obtenidos después de la estimulación con GHRH (30.2 ± 1.4 ng vs 34.1 ± 0.7 ng, respectivamente) (ver figura 29).

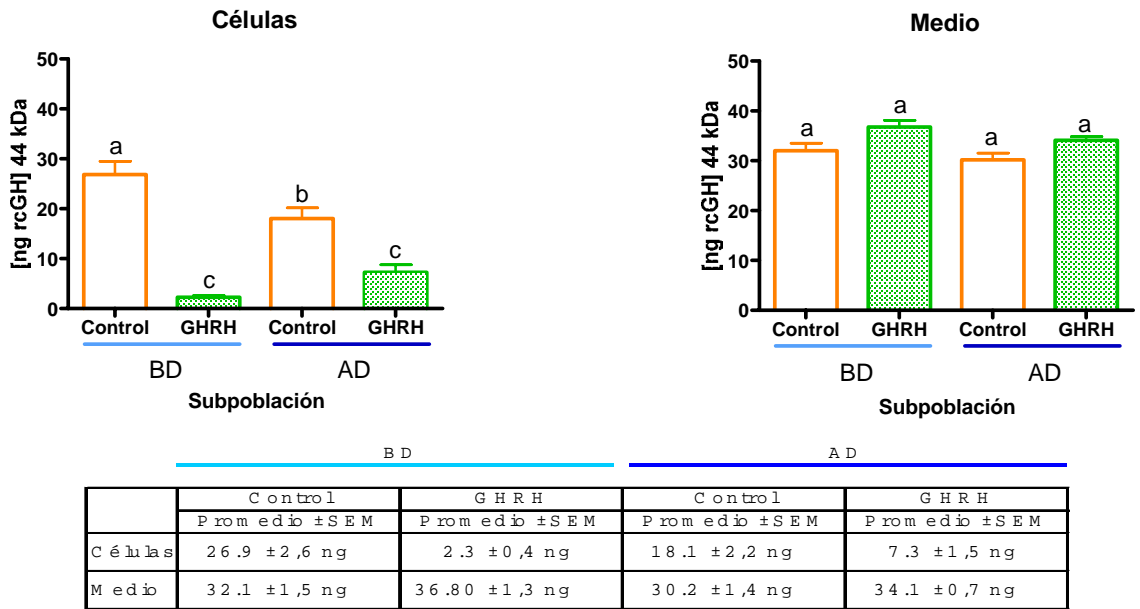
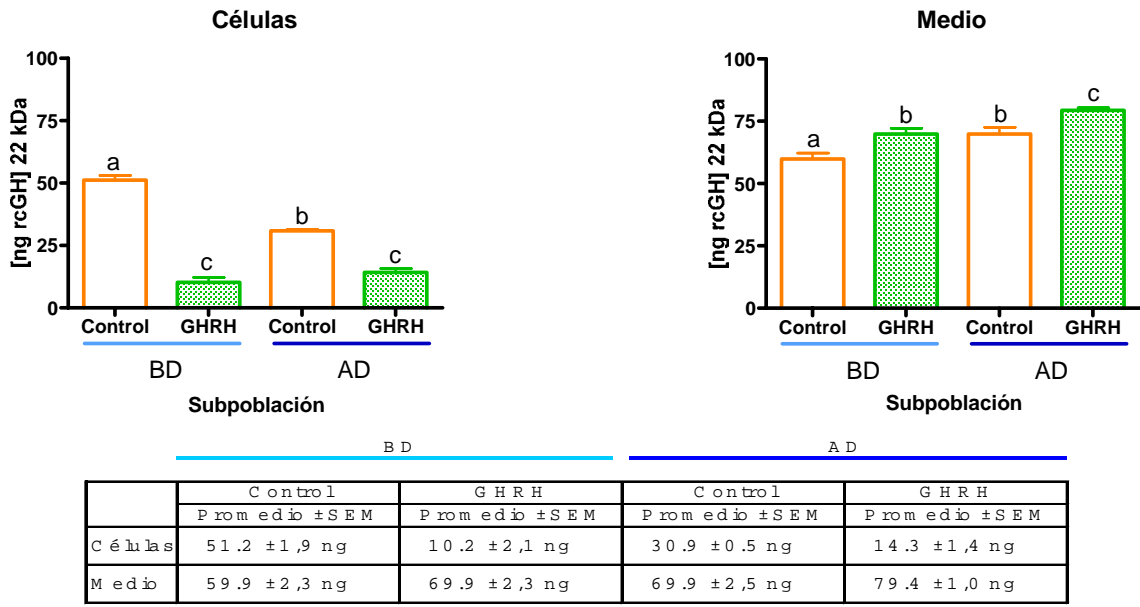


Figura 29. Concentración relativa de las dos variantes moleculares más representativas de GH: 22 y 44 kDa separadas por SDS-PAGE en CNR, contenidas en 3.0×10^5 células y en sus medios de cultivo de las subpoblaciones de somatotropos de pollo. Letras diferentes representan diferencia significativa $P < 0.05$, obtenido por ANOVA de una vía y una prueba de Tukey ($X \pm SEM, n=3$)

Debido a que se pueden estar confundiendo algunas de las variantes moleculares por su peso molecular y para reducir algunas de las formas oligoméricas fue necesario emplear condiciones reductoras (ver material y métodos). En la figura 30 se muestran las imágenes representativas de un análisis electroforético bajo condiciones reductoras (SDS-PAGE [CR] y Western blot), en donde se observa que el patrón de variantes moleculares de GH presentes en ambas subpoblaciones BD y AD fue semejante tanto en el citoplasma de las células control como en el citoplasma de las células incubadas con GHRH (18, 26 y 46 kDa, respectivamente), aunque el contenido de cada isoforma varió. Además, el patrón de variantes moleculares de GH presentes en ambas subpoblaciones BD y AD fue semejante tanto en el medio de cultivo de las células control como en el medio de las células incubadas con GHRH (18, 26 y 46 kDa, respectivamente), aunque el contenido de cada isoforma varió de acuerdo a los resultados del análisis densitométrico (ver más adelante).

En la figura 31 se muestra el área total de cada una de las variantes moleculares de cGH de las células correspondientes a las subpoblaciones de somatotropos de BD y AD. En el caso de la variante molecular de 18 kDa en las células correspondientes a los somatotropos de BD y AD, en presencia de GHRH se obtuvo un decremento del área total del 12.4 y 21.0%, respectivamente (con respecto a su control). En el caso de la variante molecular de 26 kDa en las células correspondientes a los somatotropos de BD y AD, en presencia de GHRH se obtuvo un decremento del área total del 11.9 y 40.3%, respectivamente (con respecto a su control). En el caso de la variante molecular de 46 kDa en las células correspondientes a los somatotropos de BD y AD, en presencia de GHRH se obtuvo un decremento del área total del 6.7 y 13.7%, respectivamente (con respecto a su control).

Por otra parte, en la figura 32 se muestra el área total de cada una de las variantes moleculares de cGH de los medios correspondientes a las subpoblaciones de somatotropos de BD y AD:

En el caso de la variante molecular de 18 kDa en los medios correspondientes a los somatotropos de BD y AD, en presencia de GHRH se obtuvo un incremento del área

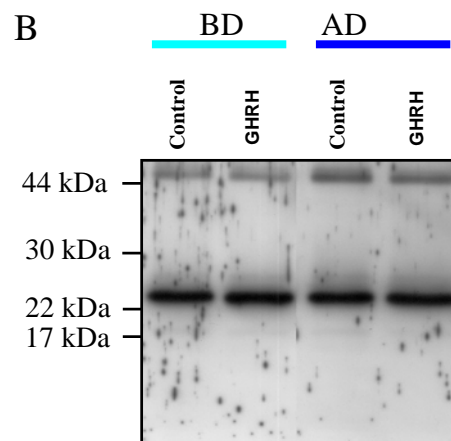
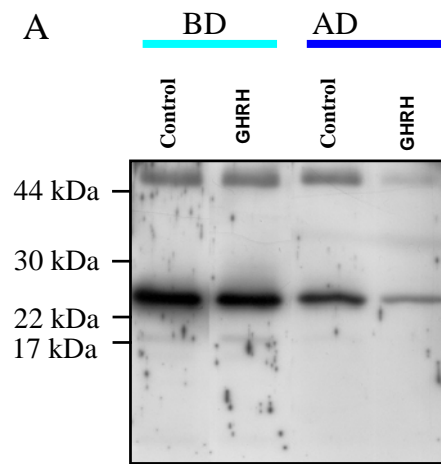
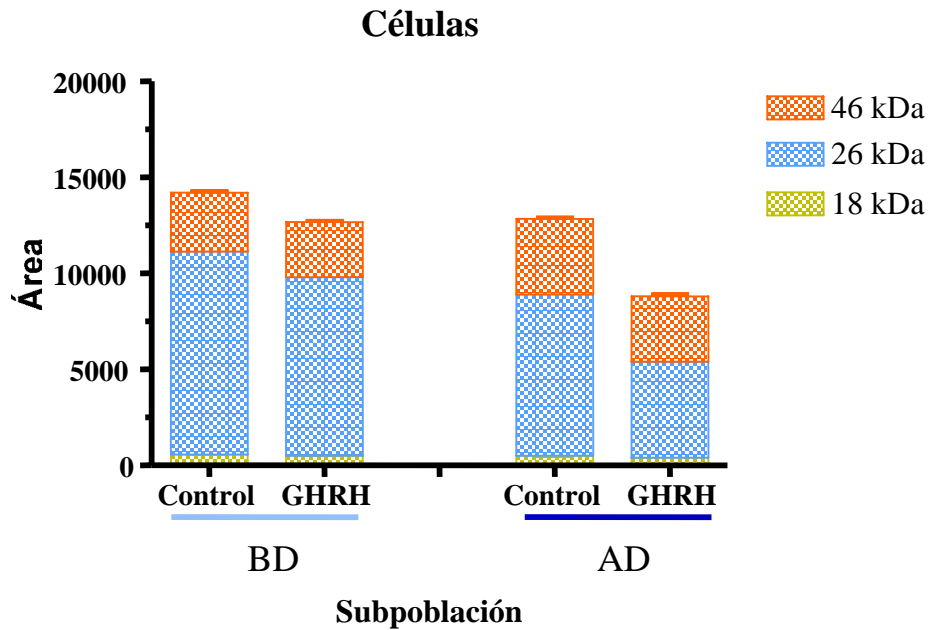
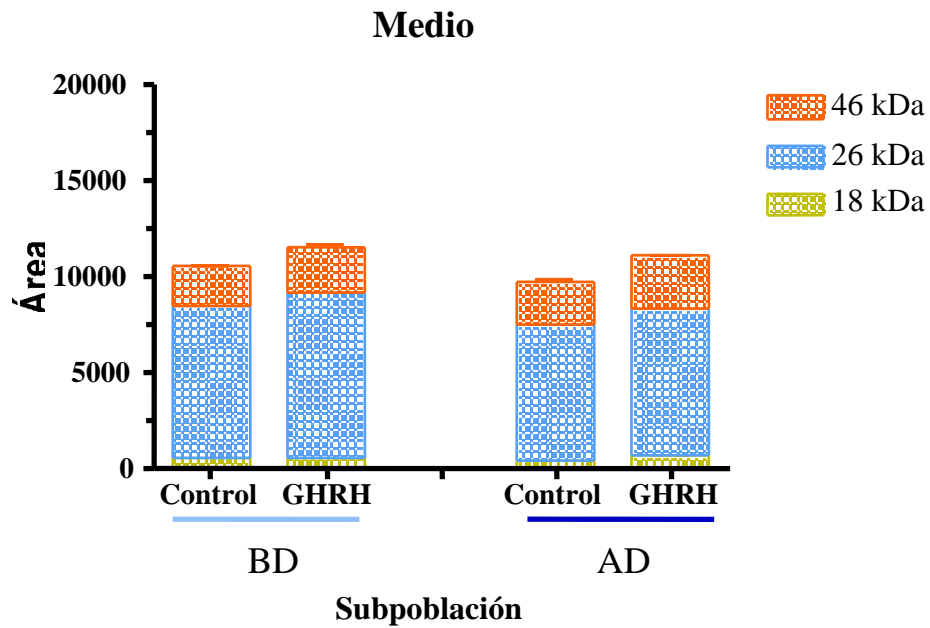


Figura 30. Imágenes representativas de los análisis electroforéticos (SDS-PAGE [CR] y Western blot) de las formas inmunorreactivas de cGH detectadas en las células y en el medio de cultivo correspondiente a las subpoblaciones de somatotropos BD y AD. A) Células y B) Medio de cultivo.



		Subpoblación					
		BD		AD			
PM	Control	GHRH	Control	GHRH	C vs C	GHRH vs GHRH	
	Prom edib ±SEM (P<0.05)	Prom edib ±SEM	Prom edib ±SEM	Prom edib ±SEM			
18	597.1 ±13.9 a	522.9 ±12.2 a	516.6 ±8.3 a	408.1 ±6.3 a			
26	10561.8 ±211.7 a	9301.2 ±197.8 b	8394.4 ±137.5 c	5009.5 ±129.5 d	+	+	
46	3068.5 ±66.8 a	2861.6 ±65.8 a	3933.9 ±157.1 b	3393.7 ±99.9 a	+		

Figura 31. Análisis representativo de las variantes moleculares de cGH detectadas en las células correspondientes a las subpoblaciones de somatotropos AD y BD (CR). Letras diferentes representan diferencia significativa $P < 0.05$ obtenido por ANOVA de una vía y una prueba de Tukey ($X \pm SEM, n=3$). Símbolo (+) indica diferencia entre las variantes de las subpoblaciones BD y AD



	Subpoblación				C vs C	GHRH vs GHRH
	BD		AD			
PM	Control	GHRH	Control	GHRH		
	Prom edib ±SEM	Prom edib ±SEM	Prom edib ±SEM	Prom edib ±SEM		
18	524.8 ±19.7 a	599.9 ±14.8 a	418.7 ±17.5 a	607.8 ±10.7 a		
26	7878.4 ±100.8 a	8543.5 ±62.1 b	7000.8 ±29.8 c	7651.2 ±124.9 d	+	+
46	2097.3 ±20.1 a	2416.1 ±48.3 b	2258.2 ±38.1 ab	2771.1 ±67.4 c		+

Figura 32. Análisis representativo de las variantes moleculares de cGH detectadas en los medios de cultivo correspondientes a las subpoblaciones de somatotropos AD y BD (CR). Letras diferentes representan diferencia significativa $P < 0.05$, obtenido por ANOVA de una vía y una prueba de Tukey ($X \pm SEM, n=3$). Símbolo (+) indica diferencia entre las variantes de las subpoblaciones BD y AD.

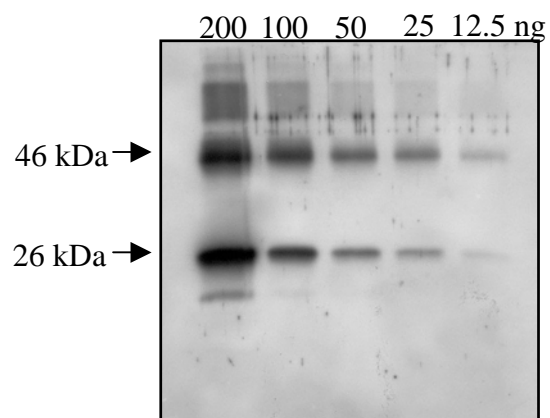
total del 14.3 y 45.1%, respectivamente (con respecto a su control). En el caso de la variante molecular de 26 kDa en los medios correspondientes a los somatotropos de BD y AD, en presencia de GHRH se obtuvo un incremento del área total del 8.4 y 9.2%, respectivamente (con respecto a su control). En el caso de la variante molecular de 46 kDa en los medios correspondientes a los somatotropos de BD y AD, en presencia de GHRH se obtuvo un incremento del área total del 15.2 y 22.7%, respectivamente (con respecto a su control).

Con el objetivo de intentar hacer cuantitativo los resultados obtenidos por SDS-PAGE y Western Blot (CR), se interpolaron los valores obtenidos en la densitometría de la variante molecular de 26 kDa de GH en las células y en el medio de cultivo correspondiente a las subpoblaciones BD y AD de pollo.

Para ello, se hicieron curvas patrón utilizando diferentes concentraciones de rcGH (200 a 12.5 ng). Los datos obtenidos por densitometría se analizaron mediante una regresión lineal, [ver figura 33 condiciones reductoras (CR)]. Estos resultados mostraron que el sistema es semicuantitativo y que permite observar cambios claros en la concentración de las bandas de cGH en las muestras analizadas.

Para la variante molecular de 26 kDa de cGH (CR) en las células correspondientes a la subpoblación BD, se observaron diferencias estadísticamente significativas en el contenido de esta variante en las células control y aquellas obtenidas después de la estimulación con GHRH (113.1 ± 2.3 ng vs 99.3 ± 2.2 ng, respectivamente), mientras que en las células correspondientes a la subpoblación AD, se observaron diferencias estadísticamente significativas en el contenido de esta variante en las células control y aquellas obtenidas después de la estimulación con GHRH (89.3 ± 1.5 ng vs 52.2 ± 1.4 ng, respectivamente) (ver figura 34). Esta misma variante molecular de 26 kDa de cGH (CR); en los medios de cultivo correspondientes a la subpoblación BD, se observaron diferencias estadísticamente significativas en el contenido de esta variante en los medios control y aquellos obtenidos después de la estimulación con GHRH (83.7 ± 1.1 ng vs 90.9 ± 0.7 ng, respectivamente), mientras que en los medios de cultivo correspondientes a la subpoblación AD, se observó que en presencia de 10 nM de

A



B

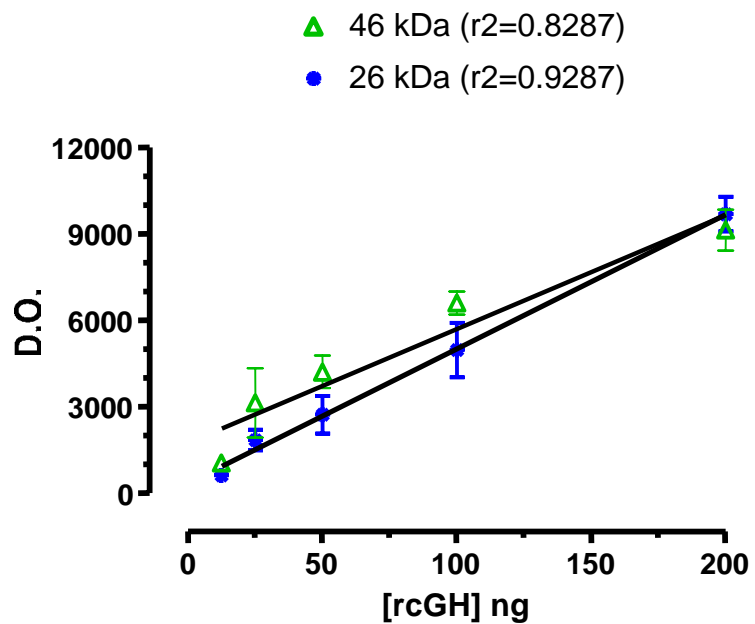


Figura 33. A) Imagen representativa de un análisis electroforético (SDS-PAGE y Western blot) de distintas concentraciones de rcGH de pollo bajo condiciones reductoras. B) Gráfica de los datos obtenidos por densitometría a partir del luminograma correspondiente ($X \pm SEM, n=3$).

GHRH hubo un contenido significativamente mayor de esta variante que en ausencia del secretagogo (74.1 ± 0.3 ng vs 81.2 ± 1.4 ng, respectivamente) (ver figura 34).

Para la variante molecular de 46 kDa de cGH (CR) en las células correspondientes a la subpoblación BD, no se observaron diferencias estadísticamente significativas en el contenido de esta variante en las células control y aquellas obtenidas después de la estimulación con GHRH (14.6 ± 0.8 ng vs 12.1 ± 0.8 ng, respectivamente), mientras que en las células correspondientes a la subpoblación AD, se observaron diferencias estadísticamente significativas en el contenido de esta variante en las células control y aquellas obtenidas después de la estimulación con GHRH (25.4 ± 0.7 ng vs 18.7 ± 1.2 ng, respectivamente) (ver figura 34). Esta misma variante molecular de 46 kDa de cGH (CR) en los medios de cultivo correspondientes a la subpoblación BD, se observaron diferencias estadísticamente significativas en el contenido de esta variante en los medios control y aquellos obtenidos después de la estimulación con GHRH (2.6 ± 0.2 ng vs 6.5 ± 0.6 ng, respectivamente), mientras que en los medios de cultivo correspondientes a la subpoblación AD, se observaron diferencias estadísticamente significativas en el contenido de esta variante en los medios control y aquellos obtenidos después de la estimulación con GHRH (4.6 ± 0.5 ng vs 10.9 ± 0.8 ng, respectivamente) (ver figura 34).

Hasta aquí, los resultados obtenidos en este trabajo apoyan la caracterización de dos subpoblaciones de somatotropos siendo una de baja densidad y otra de alta densidad, las cuales fueron separadas por gradientes hiperbólicos de percoll 10-70%. Además, estas subpoblaciones mostraron un tamaño (área) significativamente diferente siendo más grandes las de AD que las de BD. Por otra parte, al comparar la funcionalidad se observó que la subpoblación de AD presentó mayor liberación de cGH en presencia de 10nM de GHRH vs la de BD. Cuando se analizó el patrón de las variantes moleculares de cGH en ambas subpoblaciones (BD y AD) no se encontró una diferencia entre éstas, pero sí en el contenido.

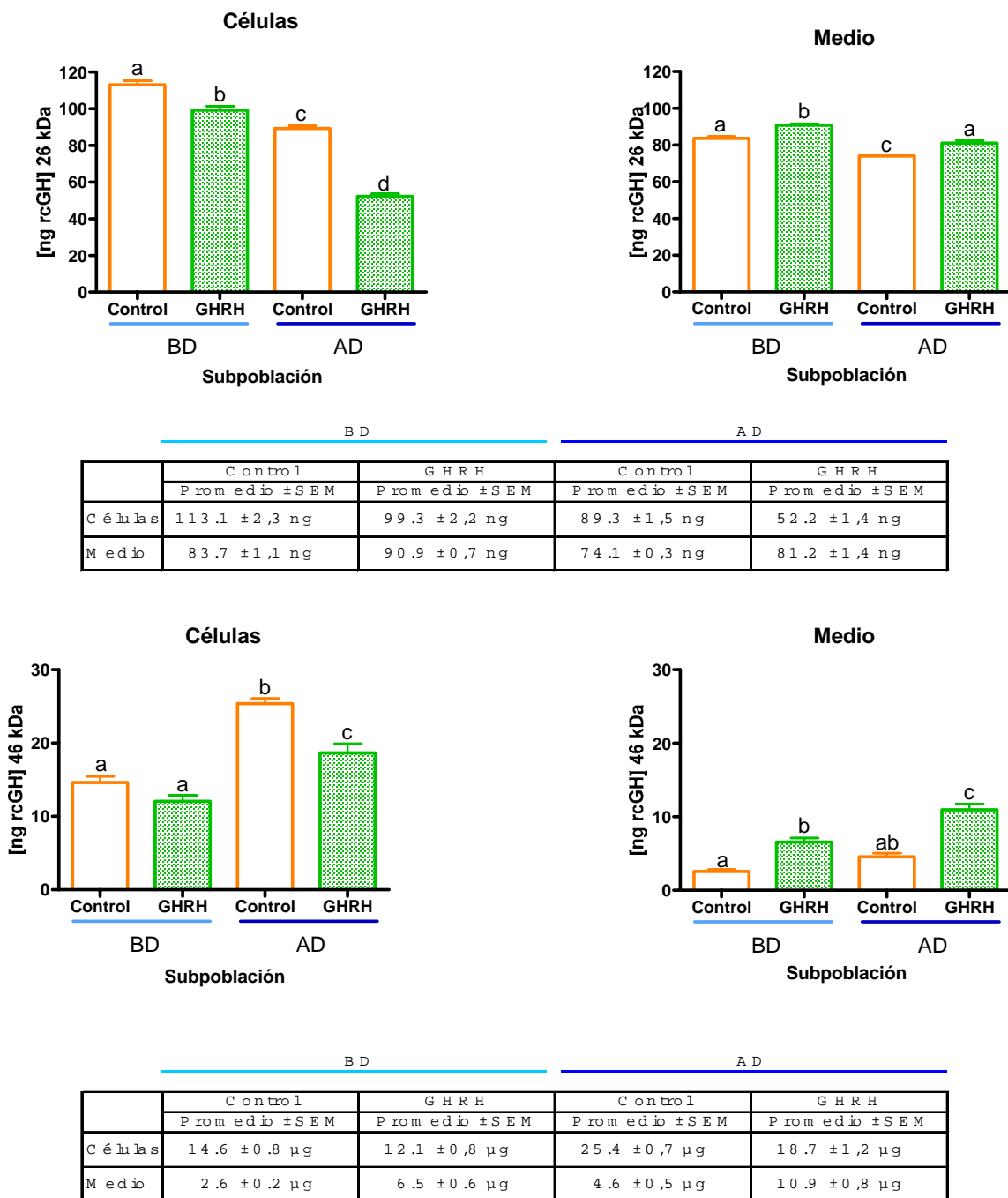


Figura 34. Concentración relativa de la variante molecular más representativas de GH: 26 kDa separada por SDS-PAGE en CR, contenidas en las células y en sus medios de cultivo de las subpoblaciones de somatotropes de pollo. Letras diferentes representan diferencia significativa $P < 0.05$, obtenido por ANOVA de una vía y una prueba de Tukey ($X \pm SEM, n=3$).

7 Discusión

En la hipófisis se han identificado algunas células plurihormonales que son capaces de secretar tanto GH como PRL, por lo que se han denominado mamomasomatotropos. Estas células poseen receptores, sistemas de segundos mensajeros y características secretoras tanto de los somatotropos como de los lactotropos. Además, en adenomas hipofisarios se han identificado células que producen tanto GH como TSH, llamados tirosomatotropos (Harvey, 1995). Para explicar este fenómeno se ha propuesto un mecanismo de transdiferenciación a través del cual, con base en la demanda, las células de un tipo hormonal pueden cambiar a otro, a menudo con las alteraciones morfológicas correspondientes. Los mamomasomatotropos tienden a ser multinucleados, por lo que pueden ser tipos celulares distintos o resultar de la fusión de lactotropos y somatotropos. La plasticidad de estas células también sugiere que pueden servir como tipos celulares transicionales, o representar a una célula madre capaz de la transformación de un tipo celular en otro (Harvey, 1995). Por otra parte, también se ha reportado que las células hipofisarias pueden presentar “plasticidad” secretora, definida como la habilidad que poseen para adaptar su actividad a los requerimientos fisiológicos cambiantes, lo que genera subpoblaciones discretas dentro de cada linaje celular que responden diferencialmente a los diversos mecanismos que las regulan (mamotropos [Hofland et al. 1990], somatotropos [Hoeffler et al. 1987], melanotropos [Vázquez-Martínez et al., 2001]).

Como se mencionó en la Introducción, anteriormente hemos descrito que en la hipófisis del pollo, los somatotropos son capaces de sintetizar y liberar a una gama amplia de isoformas o variantes de la hormona de crecimiento, y que esta heterogeneidad molecular está involucrada en la expresión de la compleja diversidad funcional característica de esta hormona. Nos hemos preguntado si dicha heterogeneidad podría estar asociada a la existencia de subpoblaciones de somatotropos que manifestaran respuestas diferenciales en su capacidad para sintetizar y liberar GH ante diferentes estímulos fisiológicos, contribuyendo así a la “plasticidad” secretora de estas células.

Para llevar a cabo estudios dinámicos sobre la actividad de tipos celulares específicos en la hipófisis, ha sido necesario desarrollar técnicas que permitan su separación. Se han desarrollado varias técnicas que permiten la separación y el aislamiento de diferentes tipos celulares a partir de una suspensión celular mixta. Estas técnicas pueden variar en su grado de complejidad, capacidad resolutoria y sofisticación del equipamiento requerido para realizarlas. Las más comunes empleadas en la actualidad incluyen: la citometría de flujo (Wallberg et al., 2005); las columnas de afinidad (Freshney, 1987); y la centrifugación en gradientes de densidad utilizando sacarosa (Hirst et al., 1976), dextrán (Ishikawa et al., 1969), Ficoll (Pertoft et al., 1978), o Percoll (Hall et al., 1982), entre otros.

Anteriormente se han logrado separar diversas subpoblaciones de células hipofisarias mediante centrifugación con gradientes de densidad de Percoll. Así, se ha reportado el aislamiento de dos subpoblaciones de melanotopos, referidos como de Baja Densidad (BD) y de Alta Densidad (AD), a partir del lóbulo intermedio de la hipófisis de la rana (González de Aguilar et al., 1994; González de Aguilar et al., 1997; Vázquez-Martínez et al., 2001). También se pudieron aislar varias subpoblaciones de gonadotropos a partir de células dispersas de hipófisis del pez africano (de Leeuw et al., 1984), y tres subpoblaciones de gonadotropos (de baja, media y alta densidad) en hipófisis porcinas (Torronteras et al., 1993b). De igual manera ha sido posible obtener dos fracciones enriquecidas con lactotropos a partir de células hipofisarias de bovinos (Ingram et al., 1988), y separar a lactotropos, células folículo-estelares y somatotropos en fracciones con diferente densidad en la rata (Qian et al., 1998). Asimismo, empleando gradientes de densidad de Percoll fue posible separar, de hipófisis porcinas, fracciones altamente enriquecidas (>60%) con gonadotropos, lactotropos y somatotropos, y en menor medida fracciones conteniendo tiotropos y corticotropos (Torronteras et al., 1993a). Se han logrado aislar dos subpoblaciones de somatotropos de baja (BD) y de alta (AD) densidad a partir de hipófisis de rata (Hall et al., 1982; Bollengier et al., 1989; Hofland et al., 1990; Lindström & Savendahl, 1996; Dobado-Barrios et al., 1996a); de ovinos (Gomm et al., 1987); y de cerdo (Torronteras et al., 1993a; Castaño et al., 1996; Ramírez et al. 1997; Castaño et al., 1997; Ramírez et al., 1998). En este trabajo de tesis

también pudieron aislarse, por primera ocasión, dos subpoblaciones de somatotropos a partir de hipófisis de pollo.

En las aves los somatotropos se localizan principalmente en el lóbulo caudal organizados en forma de cordones, en donde constituyen entre el 35 y 40% de sus células mientras que en el lóbulo cefálico son muy escasos y se organizan en islotes o bien en forma individual; y muestran mayor inmunorreactividad que los somatotropos del lóbulo caudal (Hull et al., 2000). Para determinar si existían diferentes subpoblaciones de somatotropos en el pollo, en este trabajo inicialmente se separaron células hipofisarias por medio de un gradiente hiperbólico de percoll 25-80%; siguiendo las condiciones que han permitido la separación de células hipofisarias en ratas (Hall et al., 1982; Dobado-Berrios et al., 1996a) y en cerdos (Torronteras et al., 1993a; Castaño et al., 1996). En dichos trabajos se reportó una recuperación de entre el 80 y el 95% de las células hipofisarias colocadas originalmente en el gradiente. Sin embargo, bajo las condiciones empleadas por nosotros en el pollo obtuvimos una baja recuperación, que fue sólo del 21% de las células colocadas originalmente en el gradiente. Además, la separación de los distintos tipos celulares bajo estas condiciones no pareció muy adecuada, pues la mayor parte de las células recuperadas (alrededor del 73%) se distribuía en las tres primeras fracciones del gradiente (ver figura 5). Por otra parte, la distribución de los marcadores de densidad (rango comprendido entre 1.018 a 1.142 g/ml) que empleamos como control si se distribuía correctamente de manera hiperbólica (ver figura 4), de manera semejante a lo reportado por otros autores (Hall et al., 1982; Torronteras et al., 1993a). Dado que la mayor parte de las células hipofisarias de pollo se concentraron en las primeras fracciones, decidimos cambiar y ampliar el intervalo de densidad del gradiente hiperbólico, pasando de 25-80% a 10-70% de percoll, esperando que así se obtuviera una mejor separación de las células. Para la elaboración de estos gradientes se probaron dos procedimientos diferentes para resolver algunos problemas técnicos que se presentaron, por lo cual hablaremos de dos gradientes hiperbólicos de percoll 10-70%: A y B. Bajo las condiciones del gradiente A, la distribución de los marcadores de densidad fue más amplia entre las densidades de 1.018 y 1.098, y se observaron mejores resultados en comparación con el gradiente

hiperbólico de percoll 25-80%, pues se obtuvo un 89.8% de recuperación de las células hipofisarias de pollo colocadas originalmente, lo cual se asemeja a los resultados obtenidos en ratas (Hall et al., 1982; Dobado-Berrios et al., 1996a) y en cerdos (Torronteras et al., 1993a; Castaño et al., 1996). Además con el gradiente hiperbólico de percoll 10-70%, se obtuvo una mejor y más amplia distribución de las células a lo largo del gradiente (ver figura 12), lo que permitió una mejor separación de las poblaciones celulares. Uno de los problemas técnicos que encontramos fue que los marcadores de densidad se desplazaban por efecto de la temperatura, pues aunque los gradientes se centrifugaban a 4°C, las células hipofisarias de pollo en las diferentes fracciones se colectaban a temperatura ambiente, lo cual incrementaba la posibilidad de difusión a lo largo del tubo y esto podría haber modificado ligeramente la distribución de las células en las diferentes fracciones del gradiente. Bajo las condiciones del gradiente B se corrigió este aspecto técnico y se obtuvo un 90.9% de recuperación de las células hipofisarias colocadas originalmente, en concordancia con los resultados reportados para el gradiente (A) y para los descritos en ratas (Hall et al., 1982; Dobado-Berrios et al., 1996) y en cerdos (Torronteras et al., 1993a; Castaño et al., 1996). Además se obtuvo una mejor distribución de las células hipofisarias de pollo a lo largo del gradiente (ver figura 17) encontrándose un pico entre las fracciones 2-10, con un máximo en la fracción 4.

Una vez que se logró separar a las células mediante el uso de gradientes hiperbólicos de percoll, se procedió a caracterizar morfológica y tintorialmente a los tipos celulares aislados en cada fracción. Como se sabe, dependiendo de sus características de tinción con la técnica de hematoxilina-eosina, histológicamente la hipófisis está constituida por tres tipos de células (acidófilas, basófilas, y cromóforas). Los resultados obtenidos cuando se analizaron las fracciones celulares después de cada separación en los gradientes de percoll (25-80%, 10-70% A, y 10-70% B) mostraron ciertas similitudes generales, en cuanto a la distribución de los diversos tipos celulares, aunque en los dos últimos casos la resolución fue mejor. Las células acidófilas se distribuyeron principalmente en dos zonas muy claras, mientras que las células basófilas se ubicaron mayormente en tres zonas. Por su parte, las células cromóforas se distribuyeron de

manera uniforme a lo largo de todo el gradiente, y los eritrocitos se concentraron en las fracciones más densas (ver figura 35).

En el gradiente de 25-80% de percoll, que tuvo una recuperación celular pobre de sólo el 21%, las células acidófilas constituyeron alrededor de 40% del total y se distribuyeron en dos zonas (fracciones 1-7 y fracciones 8-11) principalmente, abarcando intervalos de densidad de 1.033-1.080 y 1.087-1.094, respectivamente. Así pues, 4.49×10^6 células se ubicaron en la fracción de baja densidad y 0.148×10^6 células estuvieron en la fracción de alta densidad, por lo que la relación BD/AD para estas células acidófilas fue de 30.38 veces. Por su parte, en los gradientes de 10-70% de percoll, en donde se tuvo una recuperación cercana al 90% de las células colocadas, las células acidófilas constituyeron alrededor de 43% del total y se ubicaron en dos picos conspicuos, entre las fracciones 4-6 y 8-11 ($\bar{\delta}$ = 1.049-1.070 y 1.077-1.090) en el gradiente A y entre las fracciones 3-6 y 9-11 ($\bar{\delta}$ = 1.062-1.070 y 1.083-1.091) en el gradiente B. En este último alrededor del 90% de todas las células acidófilas se concentraron en las fracciones de BD y AD, mientras que el restante 10% se ubicó en otras fracciones. De esta manera, 33.43×10^6 células acidófilas se localizaron en la fracción de baja densidad y 5.36×10^6 células estuvieron en la fracción de alta densidad. La relación BD/AD para las células acidófilas en este caso fue de 6.23 veces. Al comparar los resultados obtenidos en pollos con los descritos en rata, se observaron semejanzas en cuanto a la distribución de dos zonas de células acidófilas (BD: $\bar{\delta}$ = 1.055-1.068 y AD: $\bar{\delta}$ = 1.075-1.082), si bien en el último caso se utilizó el azul de Mallory con alizarina como agente de tinción. Con esa técnica se pudieron diferenciar a los somatotropos (los gránulos se tiñen de amarillo) de los lactotropos (los gránulos se tiñen de rojo), encontrando que alrededor del 70% de las células acidófilas contenidas en la fracción de BD podrían corresponder a somatotropos mientras que en el caso de la región de AD éstos podrían alcanzar hasta el 90% (Hall et al., 1982). Los resultados del análisis realizado con la tinción de hematoxilina-eosina indicaron que se obtuvieron mejores separaciones de las células acidófilas con los gradientes de 10-70% en comparación con los de 25-80% de percoll.

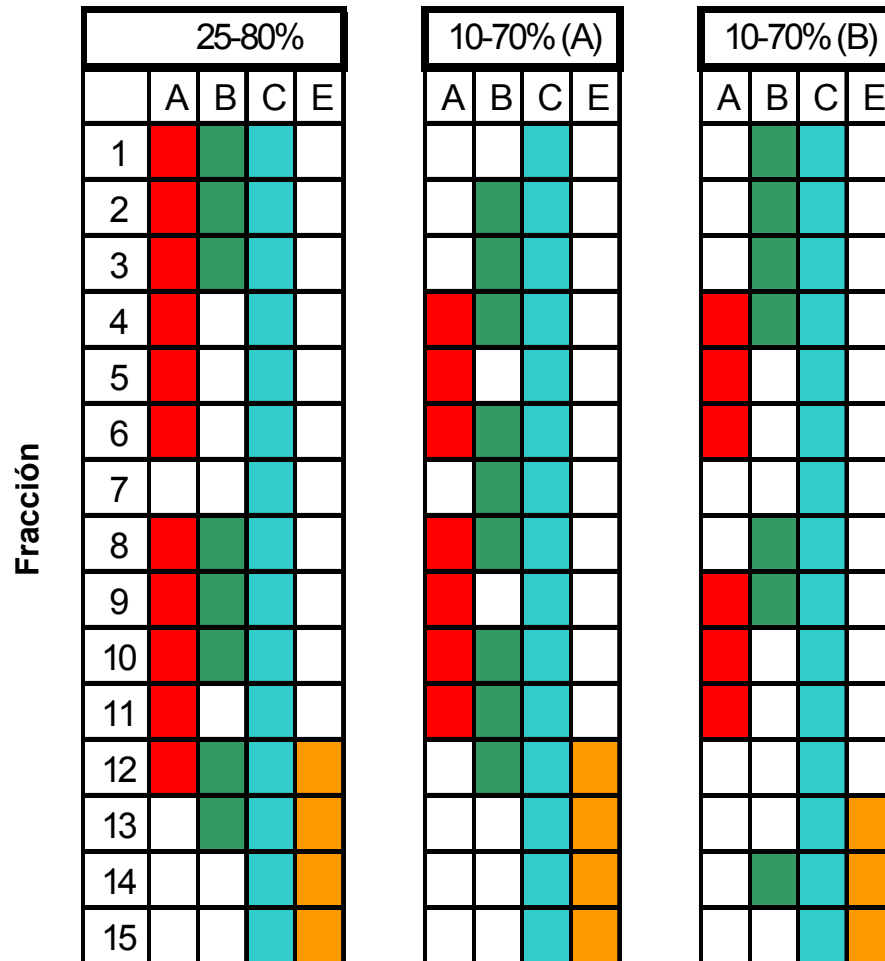


Figura 35. Esquema comparativo de la distribución de los tipos celulares aislados de hipófisis de pollo de acuerdo a sus características tintoriales: A= acidófilas (■), B= basófilas (■), C= cromóforas (■) y E= eritrocitos (■), mediante gradientes de percoll.

Para poder caracterizar mejor a las fracciones separadas mediante los gradientes de densidad de percoll se utilizó la técnica de inmunocitoquímica empleando un anticuerpo específico contra la hormona de crecimiento, lo que nos permitió diferenciar a los somatotropos del resto de las células hipofisarias. Los resultados obtenidos mostraron que cerca de una tercera parte del total de las células distribuidas en las diferentes fracciones correspondieron a somatotropos ($28.26 \pm 2.8\%$), lo que correlaciona razonablemente con la descripción de que en las hipófisis de aves las células productoras de GH pueden alcanzar hasta un 35% (Hull et al. 2000). De forma similar, la separación de células hipofisarias de cerdos de distintas edades en gradientes de percoll mostró que las células GH-inmunoactivas correspondieron al 23, 30 y 35% del total de la población en animales neonatales, prepúberes y maduros, respectivamente (Torrónteras et al., 1993a). También se observó en este trabajo que los somatotropos de pollo se distribuyeron en dos zonas conspicuas a través de los gradientes de percoll, que coincidieron con la ubicación de las células acidófilas descritas con la tinción de hematoxilina y eosina. Estos resultados fueron semejantes a los obtenidos en rata (Hall et al., 1982; Dobado-Berrios et al., 1996a) y en cerdo (Torrónteras et al., 1993a; Castaño et al., 1996) en donde se reportaron también dos zonas con mayor contenido de somatotropos separados por gradientes de percoll, los cuales denominaron de baja (BD) y alta densidad (AD), (ver figura 38). En el caso del pollo se observó una diferencia en el intervalo de densidad en que se distribuyeron los somatotropos BD de pollo entre los gradientes de 25-80% y de 10-70% de percoll (1.062-1.081 vs. 1.049-1.068); mientras que los somatotropos de AD de pollo se distribuyeron de forma semejante en ambos tipos de gradiente (ver figura 38). Estos datos sugieren que la ampliación del gradiente de concentración favoreció la distribución de los somatotropos en la región de menor densidad. Al comparar los resultados obtenidos en este trabajo con los reportados para cerdo (Torrónteras et al., 1993a; Castaño et al., 1996) se observa que las subpoblaciones de BD y AD presentaron características similares en cuanto al intervalo de densidad en que se ubicaron (1.051-1.064 vs. 1.049-1.068 y 1.087-1.098 vs. 1.087-1.091, respectivamente). En los gradientes de 10-70% alrededor del 83.2% de las células GH-inmunoactivas se separaron en estas dos subpoblaciones de

diferente densidad, correspondiendo a la fracción BD un 75.6% y a la de AD cerca del 7.6% de los somatotropos totales. Ambas subpoblaciones se enriquecieron con respecto al porcentaje de somatotropos (28.2%) en la población inicial de células hipofisarias. Específicamente, el 42.8% de las células presentes en la fracción BD y el 44.7% de las células de la fracción AD se tiñeron con el anticuerpo anti-GH, dando por consecuencia un enriquecimiento de 1.3 y 1.4 veces, respectivamente. En términos absolutos, en el gradiente de 10-70% la cantidad de somatotropos de pollo presentes en la subpoblación de BD fue alrededor de 10 veces mayor que la cantidad de somatotropos en la subpoblación de alta densidad (17.346 ± 1.875 vs. $1.746 \pm 0.448 \times 10^6$ células, respectivamente). En comparación, en el cerdo se reportó que un 23.7% de las células hipofisarias separadas correspondió a somatotropos y que alrededor del 90% de estos se concentraron en las dos subpoblaciones, correspondiendo alrededor del 48.9% a los de BD y un 40% a los de AD, dando por resultado un enriquecimiento de 2 y 1.7 veces, respectivamente (Castaño et al., 1996).

Se ha reportado que las subpoblaciones de somatotropos aisladas a partir de hipófisis de cerdo presentan características morfofuncionales diferentes. Analizados por inmunocitoquímica y microscopía fotónica, los somatotropos de BD mostraron un área menor ($71 \pm 2.5 \mu\text{m}^2$) que los de AD ($88.6 \pm 2.1 \mu\text{m}^2$). El estudio ultraestructural mostró que la subpoblación de BD se caracterizó por una escasa apariencia de gránulos de secreción en el citoplasma y por un retículo endoplásmico muy bien desarrollado. En contraste, la morfología de la subpoblación de AD mostró un citoplasma con una cantidad abundante de gránulos de secreción y un retículo endoplásmico poco desarrollado (Castaño et al., 1996). Estas características morfológicas se mantuvieron en ambas subpoblaciones independientemente de la edad de los animales (neonatos, prepúberes o maduros) (Castaño et al., 1997). En el caso de las subpoblaciones de somatotropos aisladas a partir de hipófisis de rata, las células de BD (tipo I, $\delta = 1.055-1.065$) tuvieron un área de $40 \mu\text{m}^2$, estaban escasamente granuladas y mostraron un abundante retículo endoplásmico rugoso y aparato de Golgi; sin embargo, los somatotropos de AD (tipo II, $\delta = 1.065-1.087$) tuvieron un área mayor ($57 \mu\text{m}^2$),

estuvieron densamente granulados, mostraron un núcleo grande y muy escaso retículo endoplásmico (Lindström y Savendahl, 1996; Dobado-Berrios et al., 1996a). En nuestro trabajo, encontramos que las subpoblaciones de somatotropos aisladas a partir de hipófisis de pollo tuvieron, como se ha descrito, una forma redonda y ovalada, y también mostraron diferencias en sus áreas, siendo siempre menor la correspondiente a las células de BD. Los valores encontrados variaron de acuerdo al método utilizado para fabricar los frotis, es decir si fueron realizados de forma manual o bien mediante el uso de una citocentrífuga. Así, las subpoblaciones de somatotropos de BD presentaron un área de $135 \pm 3.4 \mu\text{m}^2$ en los frotis manuales y de $184.2 \pm 2.1 \mu\text{m}^2$ en los frotis realizados con la citocentrífuga. Por su parte, los somatotropos de AD tuvieron un área de $148.4 \pm 4.8 \mu\text{m}^2$ vs. $220.3 \pm 2.6 \mu\text{m}^2$, respectivamente. Las diferencias entre ambas subpoblaciones fueron estadísticamente significativas ($p < 0.05$) en ambos tipos de procedimiento. Es probable que las diferencias encontradas entre las técnicas usadas se deba a que en el caso de la citocentrífuga las condiciones para realizar los frotis son más suaves y homogéneas y se pueden controlar mejor y las células están menos “encogidas”. Por otra parte, parece ser que la subpoblación de los somatotropos de AD, además de tener un área mayor, fueron más inmunorreactivos que los de BD. A fin de profundizar en la caracterización de estas subpoblaciones de células GH-inmunorreactivas será conveniente, en un futuro, analizarlas más detalladamente a nivel ultraestructural de tal manera que se pueda cuantificar el número, tamaño y condensación de gránulos que presentan, así como su nivel de desarrollo del retículo endoplásmico y el aparato de Golgi.

Desde el punto de vista funcional, se ha reportado que las subpoblaciones de somatotropos de BD y AD, en mamíferos, también presentan características diferentes. En ratas se describió que la liberación basal de GH en somatotropos del tipo I (BD) fue menor que la de los somatotropos del tipo II (AD) (0.116 ± 0.024 vs. 0.223 ± 0.034 ng GH/ μg proteína x min, respectivamente). Además, el GHRH fue capaz de estimular la liberación de GH a concentraciones menores (0.01-10 nM) en las células de AD, mientras que las células de BD únicamente respondieron a dosis mayores del

secretagogo (1-10 nM). Por su parte, un análogo de la somatostatina (octreótido) redujo la liberación basal de GH hasta en un 63% en las células de BD mientras que únicamente disminuyó dicha liberación en un 17% en las células de AD. Esos resultados mostraron que las subpoblaciones de somatotropos pueden tener una diferente sensibilidad en su respuesta a los diversos secretagogos (Lindström y Savendhal; 1996). Asimismo, se mostró que la expresión del ARNm de GH fue mayor en las células de BD (Dobado-Berrios et al., 1996a). También se reportó que las diferencias cuantitativas en su actividad secretora esencialmente se mantienen a lo largo de la ontogenia, fundamentalmente a nivel de la liberación basal de GH (Dobado-Berrios et al., 1996b). Hofland y colaboradores (1990) por su parte describieron que los somatotropos de AD de la rata fueron más responsivos al GHRH que sus contrapartes de BD, pero no encontraron diferencias con respecto a su sensibilidad a somatostatina. En estudios realizados en cerdos se ha descrito también que las subpoblaciones de somatotropos de BD y AD presentan características funcionales distintas: la liberación basal de GH fue menor en cultivos de células de BD que en los de células de AD (153 ± 29 vs. 345 ± 19 ng/ml, respectivamente). Asimismo, los somatotropos de BD tuvieron un contenido menor de GH que los somatotropos de AD (8.3 ± 1.9 vs. 33.6 ± 2 μ g/300,000 células, respectivamente) (Castaño et al., 1996) y estas características se mantuvieron a lo largo del desarrollo del animal (Castaño et al., 1997). Al ser incubadas con secretagogos, las células de BD mostraron una respuesta clásica a la estimulación con GHRH, incrementando la liberación de GH 1.7 veces sobre los valores control, mientras que el tratamiento con SRIF no afectó la liberación basal de la hormona pero bloqueó parcialmente la liberación de GH inducida por GHRH. En contraste, los somatotropos de AD respondieron de forma paradójica a la SRIF pues cuando esta se administró a dosis bajas, ya sea sola o en combinación con el GHRH, se obtuvo un incremento mayor en la liberación de GH (2.15 y 2.12 veces sobre los controles, respectivamente). En cambio, estos somatotropos de AD mantuvieron su respuesta convencional al tratamiento con GHRH (1.7 veces sobre el control) (Castaño et al., 1996; Ramírez et al., 1997). Otros estudios, enfocados a analizar los efectos del GHRH sobre la concentración de calcio libre citosólico $[Ca^{2+}]_i$ en ambas subpoblaciones de células,

indicaron que la respuesta de los somatotropos de BD al GHRH dependen de la movilización de calcio de origen tanto extra- como intracelular, mientras que la de los somatotropos de AD parece ser dependiente exclusivamente de la entrada de calcio extracelular a través de canales sensibles a voltaje del tipo L. Este efecto diferencial del neuropéptido sobre la movilización de calcio sugiere la existencia de diferencias en los receptores a GHRH expresados en cada subpoblación o bien en las vías de señalización intracelular que se activan con la unión del secretagogo (Ramírez et al., 1998). Por otra parte, se reportó que el GHRH aumenta las concentraciones intracelulares de AMPc en ambas subpoblaciones, pero únicamente incrementó el recambio de fosfato de inositol (IP) en los somatotropos de BD, lo que reforzó la noción de que el GHRH puede activar diferencialmente a varias vías de señalización en estas células (Ramírez et al., 1999). También se ha descrito, como se mencionó arriba, que SRIF tiene un efecto paradójico sobre la liberación de GH en los somatotropos. Específicamente, a dosis de 10^{-7} y 10^{-15} M SRIF estimuló la liberación de GH en somatotropos de AD, mientras que en los de BD únicamente mostró ese efecto a la dosis de 10^{-15} M. El tratamiento con SRIF a las dosis de 10^{-7} y 10^{-15} M aumentó la concentración de AMPc, el recambio de IP y la $[Ca^{2+}]_i$ en las células de AD. En contraste, en las células de BD el tratamiento con SRIF 10^{-7} M redujo la $[Ca^{2+}]_i$ pero no alteró las concentraciones de AMPc ni de IP, y la dosis de 10^{-15} M no tuvo ningún efecto (Ramírez et al., 2002). Estudios recientes sugieren que la somatostatina ejerce una regulación distinta y dependiente de la dosis sobre la expresión diferencial de los subtipos de receptores a SRIF (sst1, sst2 y sst5) en los somatotropos, y que ello podría estar involucrado en los efectos diferentes que se han descrito (Castaño et al., 2005).

A fin de analizar si las subpoblaciones de somatotropos aisladas de hipófisis de pollo mostraban alguna respuesta funcional diferencial se decidió caracterizar su desempeño con respecto al contenido celular y a la liberación de cGH tanto en condiciones basales como después de ser estimuladas con GHRH. Para ello, inicialmente se realizó una curva dosis-respuesta con diferentes concentraciones del secretagogo (0.25-20 nM) en cultivos primarios de células hipofisarias (ver figura 23 de resultados) y se encontró una buena respuesta de liberación (1.6 veces sobre el control) con la dosis de 10 nM. Esta

respuesta fue similar a la reportada previamente (1.7 veces) por otros autores (Castaño et al., 1996; Ramírez et al., 1998; 1999;), por lo que se escogió la dosis de 10 nM de GHRH para estos estudios.

De forma análoga a lo reportado para ratas y cerdos, los resultados obtenidos en este trabajo en cultivos primarios de las correspondientes subpoblaciones de somatotropos de pollo, indicaron que la liberación basal de cGH al medio de cultivo también mostró una tendencia a ser menor en los somatotropos de BD en comparación con los de AD (185.6 ± 20.0 vs. 218.8 ± 16.1 ng/ 1.0×10^5 células, respectivamente). Asimismo, los somatotropos de BD respondieron con una menor liberación de cGH (1.3 veces) que los de AD (1.5 veces) al ser estimulados con GHRH 10 nM (253.2 ± 18.6 vs 326.1 ± 14.5 ng/ 1.0×10^5 células, respectivamente). Sin embargo, a diferencia de lo observado en cerdos, el contenido celular de cGH en ambas subpoblaciones no mostró diferencias significativas ni en condiciones basales ni después de ser incubadas con GHRH 10 nM durante dos horas. Por otra parte, cuando estos mismos datos se analizaron con otra prueba estadística (prueba t de Student), tanto el contenido celular de cGH como la cantidad de cGH liberada al medio de cultivo en ambas subpoblaciones fueron significativamente diferentes en condiciones basales y de estimulación con GHRH.

El análisis electroforético y por Western blot mostró que ambos tipos de somatotropos presentaron un perfil similar de variantes de masa de la cGH bajo condiciones no reductoras (CNR: 22, 26, 44, 50, 60, 66, 76, 80 kDa). Este patrón de bandas inmunorreactivas mostró semejanzas con el descrito para extractos hipofisarios de pollos de 4 semanas en CNR (15, 22, 25, 44, 50, 60, 66, 80, 98, 105, y 110 kDa (Arámburo et al., 2000). En el caso de los medios de cultivo, el perfil de variantes moleculares de GH bajo CNR consistió en bandas de 22, 44, 50, 60, 66 y 80 kDa (similar a lo descrito previamente, Martínez-Coria et al., 2002), en ambas subpoblaciones.

Si bien el patrón de isoformas no fue diferente, sí se encontró que la suma total de inmunoreactividad de las variantes de masa de cGH liberadas al medio de cultivo

(SDS-PAGE/WB/densitometría) fue 13.7% mayor en los somatotropos de AD que en su contraparte de BD en condiciones basales, lo que correlaciona razonablemente con el resultado obtenido por ELISA para la medición de cGH total (17.9%). Bajo estimulación con GHRH 10 nM, las células de AD secretaron 7.2% más que las de BD. En cuanto al contenido intracelular, la suma de inmunorreactividad total de las variantes de masa fue 21.5% menor en los somatotropos de AD que en los de BD en condiciones basales, mientras que después de la incubación con GHRH los somatotropos de AD contuvieron un 17.9% más inmunorreactividad que los de BD.

Se exploró también si era posible observar cambios en las variantes de masa individuales, para lo cual se desarrolló un método semi-cuantitativo mediante Western blot y densitometría. Se pudieron obtener relaciones lineales razonables ($r^2 = 0.9634$ y 0.9099) entre los valores de densidad óptica y la concentración de cGH (ver figura 28) para las variantes de 22 kDa y 44 kDa, por lo que sólo estas se cuantificaron en el análisis correspondiente, asumiendo que fueron reconocidas de manera similar por el anticuerpo utilizado.

En el análisis bajo condiciones no reductoras, se observó que el contenido celular de la variante de 22 kDa fue 39.6% menor en la subpoblación de AD que en la correspondiente de BD, bajo condiciones basales de incubación. Después de la exposición al GHRH 10 nM, las células de BD mostraron un decremento de 79.9% en el contenido de 22 kDa, mientras que en su contraparte de AD disminuyó sólo un 53.9%. Por su parte, el contenido celular de la variante de 44 kDa fue 32.7% menor en las células de AD con respecto a las de BD, bajo condiciones basales. Después de la incubación con GHRH, el contenido intracelular de 44 kDa disminuyó dramáticamente un 91.4% en relación con el control en la subpoblación de BD, mientras que el decremento de esta variante de masa fue del 59.6% en las células de AD cuando se incubaron con el secretagogo. El contenido de las variantes 22 kDa y 44 kDa fue 5.0 y 11.7 veces mayor, respectivamente, en las células de BD bajo condiciones basales en comparación con las incubadas con GHRH. En contraste, el contenido de las variantes

de 22 y 44 kDa fue únicamente 2.2 y 2.5 veces mayor, respectivamente, en las células de AD en condiciones control, que en las estimuladas con el secretagogo. Estas diferencias notables podrían indicar, entre otras alternativas, que las células de AD responden al efecto del GHRH con un incremento en la síntesis de estas variantes, o bien que la liberación de estas isoformas disminuye relativamente en dichas células, pudiéndose dar también su transformación a otras variantes (p.ej. formas oligoméricas). En la subpoblación BD incubada bajo condiciones basales, la suma de inmunorreactividad debida a las variantes de 22 y 44 kDa correspondió al 42.4% mientras que el remanente 57.6% se repartió entre el resto de las isoformas presentes. Cuando estas células se estimularon con GHRH, la inmunorreactividad debida a 22 y 44 kDa fue únicamente del 8.7% correspondiendo el restante 91.3% a las otras variantes. En contraste, en la subpoblación AD las variantes 22 y 44 kDa contribuyeron al 29.5% de la inmunorreactividad total bajo condiciones basales, mientras que después de la incubación con el secretagogo dicha contribución bajó al 16.3%, correspondiendo a las otras variantes de masa el 83.7% restante. Por otra parte, cuando estos mismos datos se analizaron con otra prueba estadística (prueba t de Student), se observaron diferencias significativas en la liberación celular de las variantes de 22 y 44 kDa en los medios control y aquellos obtenidos después de la estimulación con GHRH en ambas subpoblaciones.

Por otra parte, el análisis electroforético y por Western blot mostró que ambos tipos de somatotropos presentaron un perfil similar de variantes de masa de la cGH bajo condiciones reductoras (CR: 18, 26 y 46 kDa). Este patrón de bandas inmunorreactivas mostró semejanzas con el descrito para extractos hipofisarios de pollos de 4 semanas en CR (13, 15, 18, 23, 26, 36, 39, 44, 48, 59, y 72 kDa (Arámburo et al., 2000). En el caso de los medios de cultivo, el perfil de variantes moleculares de GH bajo CR consistió en bandas de 18, 26 y 46 kDa (similar a lo descrito previamente, Martínez-Coria et al., 2002), en ambas subpoblaciones.

Si bien el patrón de isoformas no fue diferente, sí se encontró que la suma total de inmunorreactividad de las variantes de masa de cGH liberadas al medio de cultivo

(SDS-PAGE/WB/densitometría) fue 7.8% mayor en los somatotropos de BD que en su contraparte de AD en condiciones basales. Bajo estimulación con GHRH 10 nM, las células de BD secretaron 4.6% más que las de AD. En cuanto al contenido intracelular, la suma de inmunorreactividad total de las variantes de masa fue 9.7% menor en los somatotropos de AD que en los de BD en condiciones basales, mientras que después de la incubación con GHRH los somatotropos de BD contuvieron un 30.5% más inmunorreactividad que los de AD.

Se exploró también si era posible observar cambios en las variantes de masa individuales, para lo cual se desarrolló un método semi-cuantitativo mediante Western blot y densitometría. Se pudieron obtener relaciones lineales razonables ($r^2 = 0.9287$ y 0.8287) entre los valores de densidad óptica y la concentración de cGH (ver figura 33) para las variantes de 26 kDa y 46 kDa, por lo que sólo estas se cuantificaron en el análisis correspondiente, asumiendo que fueron reconocidas de manera similar por el anticuerpo utilizado.

En el análisis bajo condiciones reductoras, se observó que el contenido celular de la variante de 26 kDa fue 21.0% menor en la subpoblación de AD que en la correspondiente de BD, bajo condiciones basales de incubación. Después de la exposición al GHRH 10 nM, las células de AD mostraron un decremento de 41.5% en el contenido de 26 kDa, mientras que en su contraparte de BD disminuyó sólo un 12.2%. Por su parte, el contenido celular de la variante de 46 kDa fue 42.5% mayor en las células de AD con respecto a las de BD, bajo condiciones basales. Después de la incubación con GHRH, el contenido intracelular de 46 kDa disminuyó un 17.5% en relación con el control en la subpoblación de BD, mientras que el decremento de esta variante de masa fue del 26.4% en las células de AD cuando se incubaron con el secretagogo. El contenido de las variantes 26 kDa y 46 kDa fue 1.1 y 1.2 veces mayor, respectivamente, en las células de BD bajo condiciones basales en comparación con las incubadas con GHRH. En contraste, el contenido de las variantes de 26 y 46 kDa fue únicamente 1.7 y 1.4 veces mayor, respectivamente, en las células de AD en

condiciones control, que en las estimuladas con el secretagogo. En la subpoblación BD incubada bajo condiciones basales, la suma de inmunorreactividad debida a las variantes de 26 y 46 kDa correspondió al 69.5% mientras que el remanente 30.5% se repartió entre el resto de las isoformas presentes. Cuando estas células se estimularon con GHRH, la inmunorreactividad debida a 26 y 46 kDa fue del 77.3% correspondiendo el restante 22.7% a las otras variantes. En contraste, en la subpoblación AD las variantes 26 y 46 kDa contribuyeron al 69.0% de la inmunorreactividad total bajo condiciones basales, mientras que después de la incubación con el secretagogo dicha contribución bajó al 53.9%, correspondiendo a las otras variantes de masa el 46.1% restante. Por otra parte, cuando estos mismos datos se analizaron con otra prueba estadística (prueba t de Student), se observaron diferencias significativas en la liberación celular de las variantes de 26 y 46 kDa en los medios control y aquellos obtenidos después de la estimulación con GHRH en ambas subpoblaciones. En resumen, se observaron en CNR y CR diferencias en el contenido individual de algunas de las variantes de masa de la cGH entre ambas subpoblaciones de somatotropos, tanto en condiciones basales como después de incubarlas con GHRH.

Los resultados obtenidos en este trabajo, mostraron la separación de dos subpoblaciones de somatotropos de pollo (BD y AD) por gradientes hiperbólicos de percoll (10-70%), las cuales presentaron diferencias morfológicas (siendo más grandes las de AD que las de BD) y funcionales (siendo más responsivas en presencia de GHRH las de AD que las de BD). Con base a estos resultados, surge una pregunta: ¿Cómo se originan estas subpoblaciones? De forma especulativa una de las formas en que se podría explicar estos resultados es que en la hipófisis existen algunas células plurihormonales que son capaces de secretar tanto GH como PRL (mamosomatotropos). Estas células poseen receptores, sistemas de segundos mensajeros y características secretoras tanto de los somatotropos como de los lactotropos. Además, en adenomas hipofisarios se han identificado células que producen tanto GH como TSH, llamados tiosomatotropos. Para explicar este fenómeno se ha propuesto un mecanismo de transdiferenciación a través del cual, con base en la

demanda, las células de un tipo hormonal pueden cambiar a otro, a menudo con las alteraciones morfológicas correspondientes. Los mamomasomatotropos tienden a ser multinucleados, por lo que pueden ser tipos celulares distintos o resultar de la fusión de lactotropos y somatotropos. La plasticidad de estas células también sugiere que pueden servir como tipos celulares transicionales, o representar a una célula madre capaz de la transformación de un tipo celular en otro. Por otra parte, también se ha reportado que las células hipofisarias pueden presentar “plasticidad” secretora, definida como la habilidad que poseen para adaptar su actividad a los requerimientos fisiológicos cambiantes, lo que genera subpoblaciones discretas dentro de cada linaje celular que responden diferencialmente a los diversos mecanismos que las regulan. Además, se conoce una gran diversidad de receptores específicos a secretagogos que pudieran estar expresados diferencialmente en estas células.

Con base a los resultados realizados en este trabajo, es necesario realizar más experimentos para estudiar si las diferencias “aparentes” en las dos subpoblaciones se debe a etapas de desarrollo diferente de las mismas células (diferentes estadios de diferenciación) o bien si se debe a diferencias más establecidas (distintos receptores, cadenas de señalización intracelular, respuesta a otros secretagogos, etc.). Por otra parte, será importante analizar la expresión del ARNm, evaluar la tasa de síntesis y de liberación de cGH con otros secretagogos y mensajeros secundarios.

8 Conclusiones

Se implementó un método para aislar diversas poblaciones de células hipofisarias de pollo mediante gradientes de densidad. Las condiciones de mejor separación se obtuvieron con un gradiente hiperbólico de percoll 10-70%, obteniéndose una recuperación mayor al 90 % de las células totales y con una viabilidad del 90%.

Se aislaron dos subpoblaciones de células productoras de hormona de crecimiento que presentaron una tinción acidófila con hematoxilina-eosina y se tiñeron positivamente con un anticuerpo específico para cGH

Los somatotropos de baja densidad (distribuidos en las fracciones correspondientes a una densidad entre 1.049-1.068 g/ml) fueron los más abundantes (75.6% del total de somatotropos hipofisarios) con un área promedio de $184.2 \pm 2.1 \mu\text{m}^2$.

Los somatotropos de alta densidad (distribuidos en las fracciones correspondientes a una densidad entre 1.087-1.091 g/ml) fueron los menos abundantes (7.6% del total de somatotropos) con un área promedio de $220.3 \pm 2.6 \mu\text{m}^2$.

Se observó un efecto diferencial de GHRH 10 nM sobre la secreción de cGH al medio de cultivo en las subpoblaciones de BD y AD. El secretagogo incrementó la liberación total de cGH en un 36.4% en las células de BD mientras que el incremento de cGH total fue del 49.04% en las células de AD.

Las subpoblaciones de somatotropos aisladas mostraron un patrón de variantes moleculares de cGH semejante; sin embargo se observó un efecto diferencial en el contenido de variantes tanto en condiciones basales como en respuesta a la estimulación con GHRH.

9 Bibliografía

- **Abdel-Meguid S.S.**, Shieh H.S., Smith W.W., Dayringer H.E., Violand B.N. and Bentle L.A. (1987). Three-dimensional structure of a genetically engineered variant of porcine growth hormone. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 84, 6434-6437.
- **Arámburo C.**, Carranza M., Sánchez R. and Perera G. (1989). Partial biochemical and biological characterization of purified chicken growth hormone (cGH). Isolation of cGH charge variants and evidence that cGH is phosphorylated. *Gen. Comp. Endocrinol.* 76, 330-339.
- **Arámburo C.**, Donoghue D., Montiel J.L., Berghman L.R. and Scanes C.G. (1990a). Phosphorylation of growth hormone. *Life Sci.* 47, 945-952.
- **Arámburo C.**, Montiel J.L., Perera G., Navarrete S. y Sánchez R. (1990b). 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. and 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.**, Montiel J.L., Sánchez R., Perera G., Navarrete S., Carranza M., García-Moreno J. y Fenton B. (1993). La hormona del crecimiento de pollo: Una familia de proteínas con diversidad molecular y funcional. *Memorias del Congreso conmemorativo del Jubileo del Instituto de Investigaciones Biomédicas de la UNAM, t I. México, UNAM*, pp. 483-499.
- **Arámburo C.** y Bayón A. (1997). Fisiología: Células, órganos y sistemas. Tomo IV: Sistema digestivo, Sistema neuroendocrino y Reproducción. *Ediciones científicas universitarias*. pp. 131-142.
- **Arámburo C.**, Carranza M., Martínez-Coria H., Reyes M., Berúmen L., López J. Pascacio H., Huerta L., and Luna M. (2000). Molecular and functional heterogeneity of growth hormone. In: *Avian endocrinology. A. Dawson & CM Chaturvedi Eds., Delhi, India.* 273-286.

- **Arámburo C.** Carranza M., Reyes M., Luna M., Martínez-Coria H., Berumen L. and Scanes G.C. (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., Kühn E.R. and Vandersande F. (1987) Glycosylated chicken growth hormone. *Gen. Comp. Endocrinol.* 68, 408-414.
- **Berumen L.C.**, Aguilar M., Cárabez A., Carranza M., Luna M., Martínez Coria H. and Arámburo C. (2002). Partial characterization of glycosylated chicken growth hormone (GcGH). In: *Proceedings of the 21st conference of European comparative endocrinologists*. Editors Keller R., Dirksen H., Sedlmeier D. and Vaudry H. *Monduzzi Editore. Bonn (Germany) August, 26-30.*
- **Berumen L.C.**, Luna M., Carranza M., Martínez-Coria H., Reyes M., Cárabez A., and Arámburo C. (2004). Chicken growth hormone: further characterization and ontogenic changes of an N-glycosylated isoform in the anterior pituitary gland. *Gen. Comp. Endocrinol.* 139, 113-123.
- **Bewley T.A.** and Li C.H. (1970). Primary structures of human pituitary growth hormone and sheep pituitary lactogenic hormone compared. *Science*. 168, 1361-1362.
- **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.
- **Campbell R.M.** and Scanes C.G. (1985). Lipolytic activity of purified pituitary and bacterially derived growth hormone on chicken adipose tissue *in vitro*. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 180, 513-517.
- **Castaño J.P.**, Torronteras R., Ramírez J.L., 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.

- **Castaño J.P.**, Ruiz-Navarro A., Malagón M.M., Hidalgo-Díaz C., and Gracia-Navarro F. (1997). Secretory and morphological heterogeneity of porcine somatotropes during postnatal development. *J. Neuroendocrinol.* 9, 769-775.
- **Castaño J.P.**, Delgado-Niebla E., Duran-Prado M., Luque R.M., Sánchez-Hormigo A., Gracia-Navarro F., Gracia-Navarro S., Kineman R.D. and Malagon M.M. (2005). New insights in the mechanism by which SRIF influences GH secretion. *J. Endocrinol. Invest.* 28, 10-13.
- **Cunningham B.C.**, Ultsch M., De Vos A.M., Mulkerrin M.G., Clauser K.P. and Wells J.A. (1991). Dimerization of the extracellular domain of the human growth hormone receptor by single hormone molecule. *Science*. 254, 821-825.
- **De Leeuw R.**, Goss H.J., Peute J., van Pelt A.M., Burzawa-Gerard E. and van Oordt P.G. (1984). Isolation of gonadotrops from the pituitary of the African catfish, *Clarias Lazera*. Morphological and physiological characterization of the purified cells. *Cell Tissue Res*. 236, 669-675.
- **De Vos A.A.**, Ultsch M. and Kossiakoff A.A. (1992). Human growth hormone and extracellular domain of its receptor: crystal structure of the complex. *Science* 255, 306-312.
- **Devesa J.**, Lima L. and Tresguerres J.A.F. (1992). Neuroendocrine control of growth hormone secretion in humans. *Trends Endocrinol. Metab.* 3, 175-183.
- **Dobado-Berrios P.M.**, Ruiz-Navarro A., López-Pedreira R., González de Aguilar J.L., Torronteras R., Hidalgo-Díaz C. and Gracia-Navarro F. (1996a). Heterogeneity of growth hormone (GH)-producing cells in aging male rats: *in vitro* GH releasing activity of somatotrope subpopulations. *Mol. Cell. Endocrinol.* 123, 127-137.
- **Dobado-Berrios P.M.**, Ruiz-Navarro A., Almadén Y., Malagón M.M., Garrido J.C., Ramírez-Gutiérrez J.L. and Gracia-Navarro F. (1996b). Heterogeneity of growth hormone (GH)-producing cells in aging male rats: ultrastructure and GH gene expression in somatotrope subpopulations. *Mol. Cell. Endocrinol.* 118, 181-191.

- **Freshney R.** (1987) *Culture of animal cells, a manual of basic technique*. 2^a ed. Wiley-Liss.
- **Gomm J.J.**, Ray K.P. and Wallis M. (1987). Purification of ovine somatotrophs using a combination of density gradient centrifugation and short –term culture. *J. Endocrinol.* 115, 395-403.
- **González de Aguilar J.L.**, Tonon M.C., Ruiz-Navarro A., Vaudry H. and Navarro F. (1994). Morphological and functional heterogeneity of frog melanotrope cells. *Neuroendocrinology.* 59, 176-182.
- **González de Aguilar J.L.**, Malagón M.M., Vázquez-Martínez R.M., Lihrmann I., Tonon M.C., Vaudry H. and Gracia-Navarro F. (1997). Two frog melanotrope cell subpopulations exhibiting distinct biochemical and physiological patterns in basal conditions and under thyrotropin-releasing hormone stimulation. *Endocrinology.* 138, 970-977.
- **Gould J.**, Arámburo C., Capdevielle M. and Scanes C.G. (1995). Angiogenic activity of anterior pituitary tissue and growth hormone on the chick embryo chorio-allantoic membrane: a novel action of GH. *Life Sci.* 8, 587-594.
- **Guyton C. Arthur.** Tratado de Fisiología Médica. Octava edición, *Ed. Interamericana McGraw-Hill* (1992); pp 855-866.
- **Hall M.**, Howell S.L., Schulster D., Wallis M. (1982). A procedure for the purification of somatotrophs isolated from rat anterior pituitary glands using Percoll density gradients. *J. Endocrinol.* 94, 257-266.
- **Harvey S.**, Scanes CG and Daughaday WH (1995). *Growth Hormone*. 1^a. Ed. Boca Raton, CRC Press.
- **Hirst W. and Cox R.A.** (1976). The construction and analysis of sucrose gradients for use with zonal rotors. *Biochem. J.* 159, 259-265.
- **Hoeffler J.P.**, and Frawley L.S. (1987). Hypothalamic factors differentially affect the proportions of cells that secrete growth hormone or prolactin. *Endocrinology.* 120, 791-795.

- **Hofland L.J.**, van Koetsvald P.M., Verleun T.M., and Lamberts S.W (1990). Long-term culture of rat mammatrope and somatotrope subpopulations separated on continuous Percoll density gradients: effects of dopamine, TRH, GHRH and somatostatin. *Acta Endocrinol. (Copenh)*. 122, 127-136.
- **Houston B.** and Goddard C. (1988). Molecular isoforms of growth hormone in the chicken pituitary gland. *J. Endocrinol.* 116, 35-41.
- **Hull K.L.**, Murphy A. and Harvey S. (2000). Avian somatotrophs: differentiation, morphology, distribution, and regulation. *Can. J. Physiol. Pharmacol.* 78, 994-1002.
- **Ingram C.D.**, Keefe P.D., Wooding F.B. and Bicknell R.J. (1988). Morphological characterisation of lactotrophs separated from the bovine pituitary by a rapid enrichment technique. *Cell Tissue Res.* 252, 655-659.
- **Isaksson O. G.**, Eden S. and Jansson J. O. (1985) Mode of action of pituitary growth hormone on target cells. *Ann. Rev. Physiol.* 47, 483-499.
- **Ishikawa H.** (1969). Isolation of different types of anterior pituitary cells in rats. *Endocrinologia Japonica.* 16, 517-529.
- **Kansaku N.**, Shimada K. and Saito N. (1995). Regionalized gene expression of prolactin and growth hormone in the chicken anterior pituitary gland. *Gen. Comp. Endocrinol.* 99, 60-68.
- **Kawauchi H.**, Maruyama S., Yasuda A., Yamaguchi K., Shirabata K., Kubota J. and Hirano T. (1986). Isolation and characterization of chum salmon growth hormone. *Arch. Biochem. Biophys.* 244, 542-552.
- **Lewis U.J.** (1992). Growth hormone: what is it, what does it do? *Trends Endocrinol. and Metab.* 3, 117-121.
- **Lindstrom P.** and Savendahl L. (1996). Enrichment of type I and type II rat somatotrophs: characterization of growth hormone secretion in vitro. *Endocrinology.* 137, 4174-4180.
- **Martínez-Coria H.**, López-Rosales L.J., 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, 1-12.

- **Mateyko G.M.** and Kopac M.J. (1959). Isopyknotic cushioning for density gradient centrifugation. *Exp. Cell. Res.* 17, 524-526.
- **Montiel J.L.**, Berghman L.R., and Arámburo C. (1992). Identification of growth hormone molecular variants in chicken serum. *Gen. Comp. Endocrinol.* 88, 298-306.
- **Muñoz-Martínez E.J.** (1997). Fisiología: Células, órganos y sistemas. Tomo IV: Sistema digestivo, Sistema neuroendocrino y Reproducción. *Ediciones científicas universitarias*. pp. 127-130.
- **Niall H.D.**, Hogan M.L., Saber P., Rosenblum I.Y. And Greenwood F.C. (1971). Sequences of pituitary and placental lactogenic and growth hormones: evolution from a primordial peptide by gene duplication. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 68, 866-870.
- **Perez F.M.**, Malamed S. and Scanes C.G. (1987). Growth hormone secretion from chicken adenohypophyseal cells in primary culture: Effects of human pancreatic growth hormone-releasing factor, thyrotropin-releasing hormone, and somatostatin on growth hormone release. *Gen. Comp. Endocrinol.* 65, 408-414.
- **Pertoft H.** (1966). Gradient centrifugation in colloidal silica-polysaccharide media. *Biochim. Biophys. Acta.* 126, 564-596.
- **Pertoft H.**, Rubin K., Kjellen L., Laurent T.C. and Klingeborn B. (1977). The viability of cells grown or centrifuged in new density gradient medium, Percoll [™]. *Exp. Cell. Res.* 110, 449-457.
- **Pertoft H.**, Laurent T. C., Laas T. and Kagedal L. (1978). Density gradients prepared from colloidal silica particles coated by polyvinylpyrrolidone (Percoll). *Anal. Biochem.* 88, 271-282.
- **Pertoft H.** (2000). Fractionation of cells and subcellular particles with Percoll. *J Biochem. Biophys. Methods.* 10, 1-30.
- **Qian X.**, Jin L. and Lloyd R.V. (1998). Percoll density gradient-enriched populations of rat pituitary cells: Inteleukin 6 secretion, proliferative activity, and nitric oxide synthase expression. *Endocr. Pathol.* 9, 339-346.

- **Ramesh R.**, Proudman JA. and Kuenzel WJ. (1995). Changes in pituitary somatotrophs and lactotrophs associated with ovarian regression in the turkey hen. *Comp. Biochem. Physiol.* 136, 1850-1856.
- **Ramírez J.L.**, Torronteras R., Castaño J.P., Sánchez-Hormigo A., Garrido J.C., Gracia-Navarro S. and Gracia-Navarro F. (1997). Somatostatin plays a dual, stimulatory/inhibitor role in the control of growth hormone secretion by somatotrope subpopulations from porcine pituitary. *J. Neuroendocrinol.* 9, 841-848.
- **Ramírez J.L.**, Torronteras R., Malagón M.M., Castaño J.P., Gracia-Navarro S., González de Aguilar J.L., Martínez-Fuentes A.J. and Gracia-Navarro F. (1998). Growth hormone-releasing factor mobilizes cytosolic free calcium through different mechanisms in two somatotrope subpopulations from porcine pituitary. *Cell Calcium.* 23, 207-217.
- **Ramírez J.L.**, Castaño J.P., Torronteras R., Martínez-Fuentes A.J., Frawley L.S., Gracia-Navarro S. and Gracia-Navarro F. (1999). Growth hormone (GH)-releasing factor differentially activates cyclic adenosine 3',5'-monophosphate- and inositol phosphate-dependent pathways to stimulate GH release in two porcine somatotrope subpopulations. *Endocrinology.* 140, 1752-1759.
- **Ramírez J.L.**, Gracia-Navarro F., Gracia-Navarro S., Torronteras R., Malagón M.M. and Castaño J.P. (2002). Somatostatin stimulates GH secretion in two porcine somatotrope subpopulations through a cAMP- dependent pathway. *Endocrinology.* 143, 889-897.
- **Rand-Weaver M.**, Kawauchi H. and Ono M. (1993). Evolution of structure of the growth hormone and prolactin family. In: The endocrinology of growth, development, and metabolism in vertebrates. (MP Schreibman, CG Scanes, PK Pang, Eds), San Diego, *Academic Press. Inc.*, pp 13-35.
- **Scanes C.G.**, Arámburo C. and Campbell R.M. (1990). Hormonal involvement in avian growth and development: growth hormone and insulin-like growth factor I. In: Endocrinology of Birds, (Eds M Wada et al). Berlin: Springer-Verlag. pp93-110.

- **Scanes C.G.** and Campbell, R.M. (1995). Growth hormone: Chemistry. In: growth hormone (S Harvey, CG Scanes, WH Daughaday, Eds). Florida, *CRC Press Inc.*, pp. 1-20.
- **Sinha Y.N.** and Jacobsen B.P. (1987). Glycosylated growth hormone: detection in murine pituitary gland and evidence of physiological fluctuations. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 145, 1368-1375.
- **Stalder K.** and Stöber W. (1965). Haemolytic activity of suspensions of different silica modifications and inert dusts. *Nature.* 207, 874-875.
- **Torronteras R.**, Castaño JP, Ruiz-Navarro A and Gracia-Navarro F. (1993a) Application of a percoll density gradient to separate and enrich porcine pituitary cells. *J. Neuroendocrinol.* 5, 257-266.
- **Torronteras R.**, Castaño J.P., Almaden Y., Ruiz-Navarro A. and Gracia-Navarro F. (1993b). Hormonal storage patterns and morphological heterogeneity of porcine gonadotrope cells during postnatal development. *Mol. Cell. Endocrinol.* 97, 51-59.
- **Vazquez-Martínez R.**, Malagón M.M., Castaño J.P., Tono M.C., Vaudry H. and Gracia-Navarro F. (2001). Amphibian melanotrope subpopulations respond differentially to hypothalamic secreto-inhibitors. *Neuroendocrinology.* 73, 426-434.
- **Wallberg F.**, Sundstrom H., Ledung E., Hewitt C.J. and Enfors S.O. (2005). Monitoring and quantification of inclusion body formation in *Escherichia coli* by multi-parameter flow cytometry. *Biotechnol Lett.* 27, 919-926.

TABLA DE ABREVIATURAS

α	Alfa
$^{\circ}\text{C}$	Grados Celsius
g	Gramos
GH	Hormona del crecimiento
cGH	Hormona del crecimiento de pollo
G-cGH	Hormona del crecimiento de pollo glicosilada
rcGH	Hormona del crecimiento de pollo de origen recombinante
GHRH	Hormona liberadora de la hormona del crecimiento
TRH	Hormona liberadora de tirotopina
ELISA	Inmunoanálisis enzimático
kDa	Kilodaltones
BD	Baja densidad
AD	Alta densidad
ml	Mililitros
mM	Milimolar
min	Minutos
μl	Microlitros
μm	Micrómetros
μM	Micromolar
nm	Nanómetros
nM	Nanomolar
pI	Punto isoeléctrico
Secretagogo	Agente estimulante de secreción
SRIF	Somatostatina
ATP	Trifosfato de adenosina