



**UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE MÉXICO**



INSTITUTO DE NEUROBIOLOGÍA

CAMPUS JURIQUILLA

**“LA HORMONA DE CRECIMIENTO (cGH)
EN EL APARATO REPRODUCTOR DE
POLLOS HEMBRAS”**

T E S I S

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

P R E S E N T A

Q.F.B. SANTIAGA MARISELA AHUMADA SOLÓRZANO

**T U T O R
DR. CARLOS ARÁMBURO DE LA HOZ**

Juriquilla, Querétaro, 2007.



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 período de 2004-2006.

Para la realización de este trabajo se contó con apoyo de becas de CONACYT (No. de registro 184983), DGEP (No. de cuenta 5010952) y Fondo Dr. Alejandro Bayón Caso. Así mismo, se pudo llevar a cabo esta tesis gracias a los donativos de CONACYT (41218-Q) y de PAPIIT-DGAPA, UNAM (IN205406).

AGRADECIMIENTOS

A mi Tutor: Dr. Carlos Arámburo de la Hoz

A mi Co-Tutora: Dra. Maricela Luna Muñoz

Al Comité Académico: Dra. Carmen Clapp, Dr. Rogelio Arellano y Dr. Carlos Arámburo de la Hoz

A los miembros del Jurado: Dra. Ma. Carmen Méndez, Dr. Rogelio Arellano, Dr. Gonzalo Martínez de la Escalera, Dr. Manuel Aguilar, Dr. Carlos Arámburo

A la M en C. Martha Carranza

Al Aux. de Lab. Gerardo Courtois

A mis compañeros y amigos: Clara, Ale, José Luis, Carlos y Adri

A mis padres y mis hermanos

A mi esposo y mi hijo

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología, Becario No: 184983

A la Dirección General de Estudios de Posgrado de la UNAM, Becario No: 504010952

Al Fondo Dr. Alejandro Bayón Caso.

Análisis de Imágenes Digitales
M. en C. Leopoldo González Santos
Ing. Elsa Nydia Hernández Ríos

Biblioteca
Bib. Pilar Galarza Barrios
Bib. Rafael Silva Cruz
Bib Ignacio Caballero
Crisanta Reséndiz
Elsa Ruíz
Tere Palafox

Proteogenómica
Dra. Anaid Antaramián Salas

Bioterio
M.V.Z. Martín García Servín

Enseñanza
Quím. Leonor Casanova Rico
Secretaria Yolanda Orduña
Secretaria Magda Reyes

ÍNDICE GENERAL

	Página
AGRADECIMIENTOS	i
RESUMEN	ii
SUMMARY	iii
ABREVIATURAS	iv
ÍNDICE GENERAL	v
ÍNDICE DE FIGURAS	vii
ÍNDICE DE TABLAS	ix
1 INTRODUCCIÓN	1
1.1 Hormona de crecimiento hipofisiaria	1
1.2 Efectos de la hormona de crecimiento	4
1.3 Heterogeneidad molecular de la hormona de crecimiento	6
1.4 Hormona de crecimiento extrahipofisiaria	9
1.5 Hormona de crecimiento en el aparato reproductor	11
1.6 Algunos aspectos morfológicos y anatómicos de folículos (ovocitos y capas foliculares) y oviducto	14
1.6.1 Desarrollo folicular	14
1.6.2 Anatomía del oviducto	15
2 JUSTIFICACIÓN E HIPÓTESIS	17
3 OBJETIVO GENERAL Y OBJETIVOS PARTICULARES	18
4 DISEÑO EXPERIMENTAL	19
5 MATERIAL Y MÉTODOS	20
5.1 Extracción de hormona de crecimiento	21
5.2 Cuantificación de la hormona de crecimiento	21
5.3 Identificación del patrón de variantes de masa de cGH por electroforesis SDS-PAGE y "Western blot"	22
5.4 Análisis de las variantes de cGH por densitometría	23
5.5 Determinación de la presencia y expresión del ARNm en los tejidos del aparato reproductor de pollas adultas	24
5.5.1 Purificación del ARN total de oviducto y capas foliculares	24

5.5.2 Análisis de la pureza e integridad del ARN total de hipófisis, oviducto y capas foliculares	25
5.5.3 Obtención del ADNc de hipófisis, oviducto y capas foliculares	25
5.5.4 Amplificación del ADNc de hipófisis, oviducto y capas foliculares	26
5.6 Secuenciación del gen de cGH en oviducto y capas foliculares	27
5.6.1 Purificación de la banda de 690 pb	27
5.6.2 Ligación de un fragmento de ADN dentro de un vector y transformación de células competentes (<i>E. coli</i>)	27
5.6.3 Purificación de ADN plasmídico	28
5.6.4 Digestión de la construcción del vector con el inserto de 690 pb	28
5.6.5 Secuenciación del ADN plasmídico puro	29
6 RESULTADOS	30
6.1 Cuantificación de proteínas por el método de Bradford	30
6.2 Cuantificación de cGH por ELISA	33
6.2.1 Concentración de cGH en oviducto	33
6.2.2 Concentración de cGH en ovocitos	35
6.2.3 Concentración de cGH en capas foliculares	35
6.2.4 Contenido de cGH en oviductos	37
6.2.5 Contenido de cGH en ovocitos y capas foliculares	38
6.3 Análisis electroforético de las variantes moleculares de masa de cGH presente en tejidos del aparato reproductor de pollos hembras	40
6.3.1 Patrón electroforético y "western blot" de ovocitos	40
6.3.2 Patrón electroforético y "western blot" para capas foliculares	44
6.4 Extracción de ARN total y RT-PCR de oviducto, capas foliculares e hipófisis	48
6.5 Purificación, clonación y secuenciación del ADNc del gen que codifica cGH en oviducto, capas foliculares e hipófisis	50
7 DISCUSIÓN	58
8 CONCLUSIONES	66
9 GLOSARIO	68
10 REFERENCIAS	69

ABREVIATURAS

°C	Grados celsius	pb	Pares de bases
MgCl ₂	Cloruro de magnesio	PBS	Amortiguador salino de fosfatos
cm	Centímetros	pI	Punto isoeléctrico
DE	Desviación estándar	pM	Picomolar
DEPC	Dietilpirocarbonato	RT	Trancripción reversa
dT	Desoxitimina	s	Segundos
dNTP	Desoxinucleotidin fosfato	SDS	Dodecilsulfato de sodio
EDTA	Etilendiamina	SDS-PAGE	Electroforesis en gel de poliacrilamida en condiciones desnaturalizantes con dodecilsulfato de sodio
h	Horas	TBS	Amortiguador salino de Tris
HRP	Peroxidasa de rábano	TPBS	Amortiguador salino de fosfato con Tween
IgG	Inmunoglobulina G	TTBS	Amortiguador salino de Tris con Tween
KCl	Cloruro de potasio	U	Unidades
kDa	Kilodaltones	µl	Microlitros
M	Molaridad	µg	Microgramos
mA	Miliamperes	µM	Micromolar
min	Minutos	V	Voltaje
ml	Mililitros	v/v	Volumen/Volumen
mm	Milímetros	x g	Gravedades
n	Número de organismos utilizados		
NaCl	Cloruro de sodio		
ND-PAGE	Electroforesis en gel de poliacrilamida en condiciones nativas (no desnaturalizantes)		
ng	Nanogramos		

RESUMEN

Una proteína semejante a la hormona de crecimiento (GH) y su ARN mensajero han sido descritos en tejidos extrahipofisarios (sistema neural, inmune y aparato reproductor) en vertebrados. La GH interviene en procesos de diferenciación gonadal, modulación de la esteroidogénesis y ovogénesis. Sin embargo, no se sabe si es sintetizada y expresada localmente en el aparato reproductor femenino de aves ni cual es su participación en la diferenciación y maduración de los folículos de pollos hembra, además de que no se conoce si esta hormona presenta un patrón de heterogeneidad molecular similar al observado en la hipófisis. En este trabajo se determinó la presencia de cGH y de sus variantes moleculares, en oviducto, ovocitos y células foliculares de diferente estadio de maduración (F1-F5 diferenciados, Fsfy-Fwhite indiferenciados). Al comparar la concentración de GH del tejido reproductor con la concentración de la hormona en hipófisis se encontró que el oviducto y los ovocitos tienen una concentración 40 veces menor y las capas foliculares 200 veces menor. Además, los valores de la concentración de GH en ovocitos y capas foliculares mostraron una disminución con respecto a la etapa de maduración. Con SDS-PAGE y “Western blot” se observaron bandas inmunorreactivas de peso molecular de 14, 17, 26, 29, 35, 40, 45, 48, 50 y 52 kDa. La mayor proporción relativa (40-50%) fue para la banda de 17 kDa. Este patrón es distinto al determinado para la hipófisis. Por RT-PCR se generó un ADNc (banda de 690 pb) en oviducto y capas foliculares, además de hipófisis como control. Este ADNc coincidió con el tamaño del ARNm de GH en hipófisis. Este fragmento fue clonado y secuenciado, se obtuvo una homología del 99.85 y del 100 % con el gen de cGH expresado en hipófisis. Esta homología también ha sido reportada para el gen de cGH en testículo. La expresión del gen de la GH en tejidos del aparato reproductor de pollos hembra y el patrón de heterogeneidad molecular que se presenta en la etapa reproductiva permiten suponer que la GH de origen local participa en los mecanismos de proliferación, diferenciación y maduración de estos tejidos.

SUMMARY

A growth hormone (GH)-like protein and its messenger RNA have been described in extrapituitaries tissues (e.g. neural system, immune system and reproductive apparatus) in vertebrates. It has been described that GH exerts effects on gonadal differentiation, modulation of the esteroidogenesis and oogenesis. Nevertheless, it is not known if it is synthesized and expressed locally in the feminine reproductive apparatus of birds and what is its role on the differentiation and maturation of the follicles of females chicken. Additionally it is not known if this hormone displays a pattern of molecular heterogeneity similar to the observed in the pituitary. In this work the presence of cGH and its molecular variants was determined, in oviduct, oocytes and follicular cells at different stages of maturation (F1-F5 differentiated, Fsfy-Fwhite unmatute). GH concentration was 40 and 200 times smaller in oviduct/oocytes and follicular cells, respectively, than that found in the pituitary. Furthermore, GH concentration decreased in oocytes and follicular cells according to maturation. Immunoreactive GH bands of 14, 17, 26, 29, 35, 40, 45, 48, 50 and 52 kDa were observed after SDS-PAGE and “Western blot”, with the 17 kDa showing the highest proportion (40-50 %). This pattern was different from the determined for the pituitary. A cDNA was generated by RT-PCR (band of 690 pb) in oviduct and follicular cells, as well as in pituitary (control). This cDNA showed a similar size as the GH mRNA in the pituitary. This fragment was cloned and sequenced and had a sequence identity of 99,85 and 100 % when compared to cGH cDNA pituitary. This sequence identity was similar to that reported in the testi. The expression of the GH gene obtained from tissues of the female reproductive apparatus in chickens as well as the differential pattern of molecular variants during maturation stages allow us to propose that locally expressed GH participates in the mechanisms of proliferation, differentiation and maturation of these tissues.

1. INTRODUCCIÓN

La hipófisis es una glándula endocrina con forma oval y cuyo tamaño varía según la especie, que se encuentra situada en la silla turca en la base del cerebro y está unida al hipotálamo por el tallo hipofisario. Consta de dos lóbulos: el anterior o adenohipófisis en donde se ubican las células que secretan a la hormona de crecimiento (GH), a la prolactina (PRL), a la hormona tiroestimulante (TSH), a la hormona adrenocorticotrópica (ACTH), a la hormona estimulante de melanocitos (MSH), a la hormona luteinizante (LH) y a la hormona folículoestimulante (FSH); y el posterior o neurohipófisis en donde se secreta a la hormona vasopresina (ADH) y a la oxitocina (OT) [Figura 1]. En algunos vertebrados existe el lóbulo intermedio, representado por el área situada entre el lóbulo anterior y posterior; esta zona casi no está desarrollada en el humano y no aparece en aves. Desde el punto de vista embriológico, las dos porciones de la hipófisis tienen orígenes diferentes: el lóbulo anterior en la bolsa de Rathke que es una invaginación embrionaria del epitelio faríngeo, mientras que el lóbulo posterior en una proyección del hipotálamo, conocida como infundíbulo (Guyton, 2001).

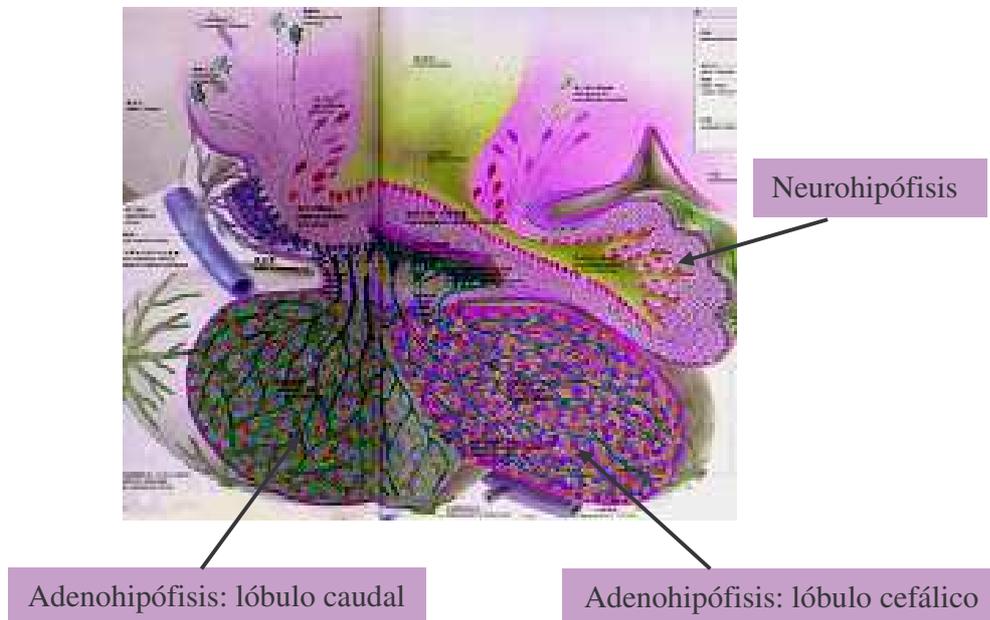


Figura 1. Esquema de los lóbulos de la hipófisis de pollo (Mikami SI, 1992).

Las secreciones de la hipófisis 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 adenohipófisis son controladas por neurohormonas llamadas factores hipotalámicos de liberación y de inhibición, secretados dentro del propio hipotálamo y conducidos luego a la adenohipófisis por pequeños vasos portales hipotálamo-hipofisarios. En la adenohipófisis estos factores liberadores o inhibidores actúan sobre diversos tipos de células glandulares para controlar, a su vez, la síntesis y/o la secreción de sus productos hormonales (Guyton, 2001). La GH se sintetiza y almacena en los somatotropos de la adenohipófisis y sus niveles pueden ser modificados por diversas situaciones fisiológicas, como por ejemplo, el crecimiento, el desarrollo, la privación de alimento, la exposición al frío, el ejercicio y el sueño de ondas lentas, entre otras. Se conoce que, en términos generales, la regulación de la secreción de GH depende principalmente de la actividad de dos péptidos hipotalámicos, 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 hipotálamohipofisaria a través de la cual llegan a controlar a los somatotropos. En las aves además, la tiro liberina (TRH) estimula la secreción de GH (Devesa et al., 1992). Recientemente, se ha descrito que otros péptidos como la Ghrelina y el péptido activador de la adenilato ciclasa hipofisaria (PACAP, por sus siglas en inglés *Pituitary Adenylate Cyclase-Activating Polypeptide*) son capaces de estimular la secreción de GH en los somatotropos (Moretti et al., 2002).

La hormona de crecimiento (GH), la prolactina (PRL), el lactógeno placentario (PL), la somatotropina coriónica (CS) y la proliferina (PLF) son miembros de una familia de proteínas homólogas que se sintetizan en la hipófisis y en la placenta de mamíferos que comparten similitudes estructurales (Scanes y Campbell, 1995; Rand-Weaver et al., 1993). La GH, PRL y PL se cree que evolucionaron por duplicación de un gen ancestral común (Bewley et al., 1970), seguida por divergencia evolutiva (Niall et al., 1971). En humanos, se han descrito 2 genes situados en el cromosoma 17 (hGH-N, hGH-V), que codifican la GH. El gen hGH-N se expresa en la hipófisis mientras que el gen hGH-V lo hace en la placenta (Rand-Weaver et al., 1993). También existen evidencias de la expresión de dos genes de GH en la hipófisis de trucha (rtGH-I, rtGH-II), salmón y esturión (Kawauchi et al., 1986). La hormona de

crecimiento (GH) hipofisiaria se sintetiza como un precursor, una prehormona de 225 aa, mientras que la forma madura es una proteína monomérica con alrededor 191 aa (dependiendo de la especie) y tiene una masa molecular de aproximadamente 22 kDa. Esta proteína presenta dos puentes disulfuro localizados entre las cisteínas 53-165 y 182-189 en el caso del pollo, que forman un asa central grande, así como un asa pequeña cercana al extremo carboxilo [Figura 2]. Tiene un punto isoeléctrico (pI) que varía entre 5.1 - 8.4 dependiendo de la especie (Arámburo, 1989a; Scanes y Campbell, 1995).

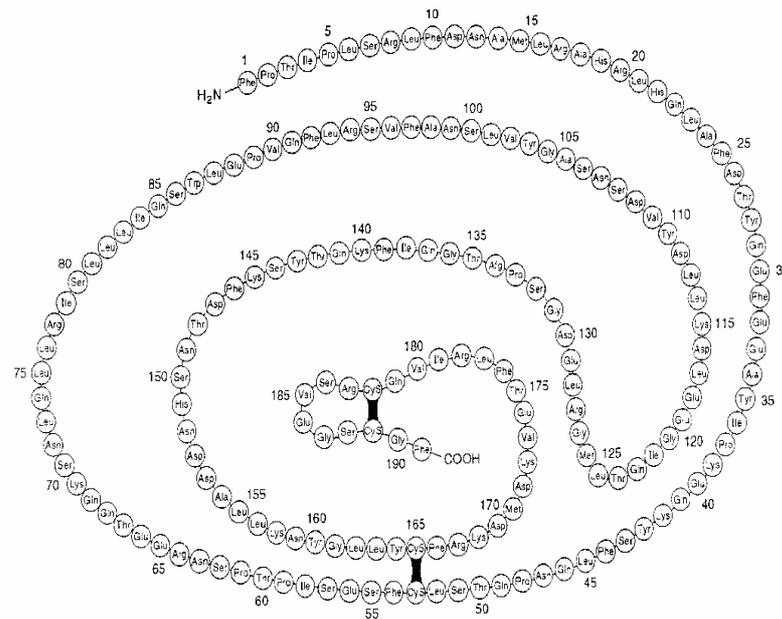


Figura 2. Estructura primaria de la GH de pollo (Devesa y col, 1992).

Actualmente se reconoce que la GH hipofisiaria está constituida por una familia de proteínas homólogas, pero no idénticas que se originan a través de diferentes mecanismos como, a) duplicación génica; b) procesamiento alternativo del ARNm; c) modificaciones postraduccionales, como fosforilación, glicosilación, proteólisis, desamidación, acilación y agregación, entre otras. Lo anterior puede explicar, al menos parcialmente la diversidad de funciones y bioactividades que presenta esta hormona.

1.2 Efectos de la hormona de crecimiento

La GH no sólo estimula el crecimiento de tejidos blandos y esqueléticos sino que está involucrada en la regulación del metabolismo de proteínas, lípidos, carbohidratos y ácidos nucleicos. Además, tiene efectos importantes sobre la diferenciación y proliferación celular, la estimulación enzimática, el transporte de aminoácidos, la regulación hidromineral, la estimulación de la eritropoyesis y la secreción de algunos factores hormonales (Isaksson et al., 1985). Asimismo, se han descrito efectos sobre la regulación de la respuesta inmune (Malarkey et al., 2002; Jeay et al., 2002) y sobre la angiogénesis (Aramburo et al., 2001; Corbacho et al., 2002; Dunn, 2002; Gould et al., 1995; Struman et al., 1999) entre otros. Se ha determinado que la GH puede actuar de manera directa sobre su órgano blanco o bien, de manera indirecta, a través de mediadores como el factor de crecimiento insulinoide tipo I (IGF-I), [Figura 3].

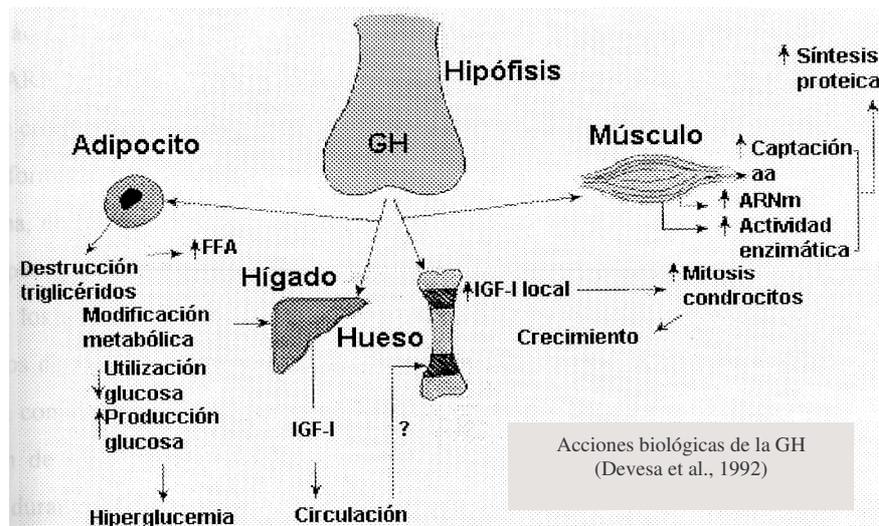


Figura 3. Esquema de los efectos de la GH sobre órganos blanco.

Los eventos celulares y moleculares que subyacen a los efectos de la GH se describen a continuación: El receptor de GH (GHR) pertenece a la superfamilia de receptores hematopoyetina/citocinas, en la que también están los receptores de PRL, interferón e interleucinas, citocinas, entre otros. Está conformado por tres dominios: extracelular, membranal e intracelular. La heterogeneidad que muestran los GHR contribuye a la diversidad funcional de la GH (Harvey, 1995). Por corte y empalme alternativo del ARNm se producen transcritos y proteínas de diferente tamaño, por lo que el GHR presenta modificaciones postraduccionales tejido-específicas, como la glicosilación y ubiquitinación (Harvey, 1995). La GH se une a dos moléculas de su receptor ocasionando una dimerización y cambios estructurales importantes, lo que genera la unión del GHR a una tirosina cinasa de la familia Janus (JAK2), promoviendo la fosforilación en los residuos de tirosina por la misma JAK2. Esto produce la asociación y activación de una cascada de proteínas, en la que participan SHC, Grb2, posiblemente Ras, Raf, Sos y posteriormente las cinasas de proteínas asociadas a microtúbulos, activadoras de la mitosis o reguladas por una señal extracelular (cinasas MAP/ERK). Las proteínas Ras y Raf son codificadas por proto-oncogenes que han sido relacionados con la proliferación celular. La fosforilación de estas cinasas provoca la fosforilación de fosfolipasa A2, proteínas del citoesqueleto y factores de transcripción de respuesta temprana Fos y Jun, factores de crecimiento involucrados en el crecimiento y la diferenciación, relacionados con genes de respuesta tardía. Para la expresión de c-Fos intervienen factores que se unen al ADN, como el factor de respuesta sérica (SRF) y el complejo de factores ternarios (TCF). La GH también induce la expresión de genes como c-myc que codifica factores de transcripción involucrados en la proliferación celular. En los adipocitos la GH participa en la expresión de enzimas lipogénicas a través de Fos, además interfiere en la expresión de algunos de los transportadores de glucosa como GLUT1 y en el hígado, en la manifestación del gen que codifica IGF-1 (Carter Su et al., 2000). Por una vía directa dependiente del tipo celular, en la que participa JAK2, la GH activa proteínas de la familia Stat, transductoras y activadoras de la transcripción. Éstas se unen a otras proteínas formando homodímeros y heterodímeros que se translocan al núcleo y se unen con el ADN, activando la transcripción de genes blanco, por ejemplo, la estimulación de la expresión del gen Spi 2.1 (en el hígado codifica para un inhibidor de serin proteasa) por la GH con la intervención de un complejo proteínico que contiene Stat 5 (Carter Su et al., 2000). Por otra

vía, la GH interviene en el efecto insulina por reclutamiento de GLUT1-4, compitiendo con ésta por su receptor (IRS), de manera que se fosforilan IRS-1 e IRS-2, a través de JAK2. En consecuencia, se activa la cinasa de fosfatidilinositol, que aumenta el transporte de glucosa, la síntesis de ADN, la actividad de p70, además interviene en la síntesis de lípidos dependiente de GH y en la lipólisis inducida por noradrenalina (Carter Su et al., 2000). Una última vía de activación es la de la cinasa de proteína C (PKC) que es requerida en lipogénesis, expresión de c-Fos, unión de proteínas nucleares a oligonucleótidos, incremento de Ca^{2+} intracelular y activación de otras cinasas. Lo anterior ocurre cuando se une el GHR a una proteína G, que a su vez se une a una fosfolipasa C para producir diacilglicerol (DAG), el cual es un activador de la PKC. Mientras que el incremento de Ca^{2+} intracelular se produce por apertura de canales tipo L activados por voltaje además por la acción de IP3 (inositol trifosfato). La activación de PKC por GH también está implicada en la regulación de la actividad de P450, importante para el metabolismo de esteroides en ambos sexos, influido por la diferencia de secreción de GH (Harvey, 1995; Carter Su et al., 2000).

1.3 Heterogeneidad molecular de la hormona de crecimiento

Después de la síntesis, la GH puede sufrir modificaciones postraduccionales que dan lugar a diferentes variantes estructurales de la molécula. Para esta hormona se han descrito variantes de agregación que forman dímeros y diversos oligómeros (trímeros, tetrámeros y hasta pentámeros). Estas formas parecen representar aproximadamente 40% de la GH inmunorreactiva que es secretada al plasma en humanos (Baumann y col, 1990). El dímero, generalmente está formado por dos monómeros de 22 kDa, ligados covalentemente por puentes disulfuro. En el pollo, una proporción menor del dímero permanece incluso después del tratamiento con dodecilsulfato de sodio (SDS) y con 2-β-mercaptoetanol (Arámburo et al., 1989a). Se han caracterizado formas desamidadas para GH humana, hGH (Asp-152 y Glu-137) y para la GH bovina (Lewis et al., 1979). Además se han observado distintas formas de GH cortada proteolíticamente así como fragmentos de la misma. En la hGH hay sitios de corte sensibles a tripsina en los residuos 133 y 146 que podrían abrir el asa grande de la molécula, confiriéndole un peso aparente mayor a 24 kDa; después de la reducción de los puentes disulfuro se originarían dos fragmentos de 14 y 8 kDa, aproximadamente. Se han descrito formas fosforiladas de GH en rata, oveja y pollo (Arámburo et al., 1989a); la hGH puede

fosforilarse por una tirosina cinasa y la de pollo por una proteína cinasa A o C (Arámburo et al., 1992). Se han identificado formas glicosiladas de la GH (G-GH), con algunas bioactividades diferentes al monómero no glicosilado (22 kDa), por ejemplo, en humano la hGH-V N-glicosilada se une a receptores de prolactina y GH (Sinha y Lewis, 1986), con efecto mitogénico (Nickel et al., 1990) y estimula el aumento de peso en ratas hipofisectomizadas (Macleod et al., 1991). Además se ha descrito la presencia de una variante glicosilada de la cGH (26 kDa en condiciones no reductoras, 29 kDa en condiciones reductoras (Arámburo et al., 1991). Las variantes de 26 kDa (G-cGH) y 22 kDa responden de manera diferencial a la estimulación con el secretagogo hipotalámico GHRH (hormona liberadora de GH) (Martínez-Coria et al., 2002). La G-cGH de pollo, pura, estimula la 5'-monodesyodación de T4 en el embrión de pollo (Berghman et al., 1989) así como la proliferación de la línea celular Nb2 (Berumen et al., 2004). En cerdo se han visto diferencias en la proporción que tiene la G-GH en plasma y en hipófisis durante el embarazo y desarrollo fetal (Sinha et al., 1990). En el pollo, se han descrito diversas variantes de carga 0.23 y 0.33, mediante electroforesis en condiciones nativas (ND- PAGE). Además, se observaron por isoelectroenfoque ocho componentes inmunorreactivos con puntos isoeléctricos de 5.9, 6.8, 7.11, 7.3, 7.5, 7.9, 8.05 y 8.18 (Arámburo et al., 1990a), datos que correlacionan con las variantes obtenidas de cGH en extractos hipofisarios por Houston y Goddard en 1988. Por electroforesis en geles de poliacrilamida bajo condiciones desnaturizantes y utilizando dodecil sulfato de sodio (SDS-PAGE) seguido por "Western blot" e inmunotinción, se obtienen diferentes variantes de masa, siendo la más abundante en hipófisis, en condiciones no reductoras, la forma monomérica de 22 kDa. También se ha demostrado que en hipófisis y plasma están presentes formas de mayor peso molecular, que dan lugar a dímeros (44 kDa), trímeros (66 kDa), tetrameros (88 kDa), entre otros. Bajo condiciones reductoras, la mayor parte de las bandas de alto peso molecular desaparecen, incrementándose la forma monomérica de la hormona y manteniéndose una fracción de la forma dimérica, aparentemente resistente a la reducción (Arámburo et al., 1990a). También existe un fragmento bajo condiciones reductoras, con inmunoreactividad intensa, de aproximadamente 15 kDa, que se origina a partir del procesamiento proteolítico de la forma monomérica. La proporción relativa de las variantes moleculares de la GH cambia a lo largo del desarrollo ontogénico: el fragmento de 15 kDa es más abundante en la etapa embrionaria mientras que

las formas de alto peso molecular se encuentran en mayor proporción en los estadios de mayor edad (Arámburo et al., 2000).

La información recabada en los últimos años, apoya la noción de que las variantes moleculares de la GH desempeñan un papel relevante en la expresión de la amplia bioactividad característica de esta hormona y que, por ende, esta noción debe incorporarse en los esquemas para entender la compleja fisiología de esta proteína. Empleando como modelo experimental al pollo, se ha descrito que las variantes moleculares de esta hormona existen en la hipófisis (Arámburo et al., 1989a), principalmente originadas por modificaciones postraduccionales como la glicosilación (Berghman et al., 1987; Arámburo et al., 1991; Berumen et al., 2004), la fosforilación (Arámburo et al., 1990b; 1992), la formación de oligómeros y el procesamiento proteolítico (Arámburo et al., 2001). Asimismo, se reportó que las variantes moleculares sintetizadas en la adenohipófisis son liberadas a la circulación (Montiel et al., 1992) y que existe una regulación diferencial para la secreción de dichas variantes por parte de secretagogos como el GHRH (Martínez-Coria et al., 2002). También, se mostró que la proporción relativa de las variantes de masa de la GH se modifica a lo largo de la ontogenia en la hipófisis del pollo (Arámburo et al., 2000). Por otra parte, existen evidencias de que algunas variantes moleculares de esta hormona presentan bioactividades discretas y específicas, que no son compartidas por otros miembros de la familia, como ocurre con los efectos lipolítico y antilipolítico de la GH (Arámburo et al., 1989b; 1990a), así como su efecto sobre la angiogénesis (Gould et al., 1995; Arámburo et al., 2001), si bien otros efectos, como el somatotrópico, parece ser compartido por varias isoformas de la hormona (Scanes et al., 1990). En el pollo se han realizado estudios con dos variantes de carga del monómero (22 kDa) donde se ha demostrado que tienen actividad somatotrópica, ya que promueven el crecimiento en ratones enanos (Scanes et al., 1990), pero esas variantes de cGH 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 ($R_f=0.30$) (Arámburo et al., 1989b). También se ha mostrado que el fragmento de 15 kDa de la GH tiene efecto lipolítico en ensayos *in vitro* utilizando 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 de proliferación en células endoteliales de cerebro bovino en donde se observó que esta variante estimuló 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 este ensayo. También se ha reportado que la variante de 15 kDa es capaz de inhibir la actividad de la desyodasa tipo III en hepatocitos de embrión de pollo (Arámburo et al., 2001).

1.4 Hormona de crecimiento extrahipofisiaria

Como se mencionó anteriormente, es bien conocido que la GH se produce primordialmente en los somatotropos hipofisarios, sin embargo en años recientes se ha descrito su presencia y la del ARNm que la codifica en muchos tejidos extrahipofisarios como en el tejido neural (Yoshizato et al., 1998; Harvey et al., 2001), en el sistema inmune (Hull et al., 1996; Recher et al., 2001), en el tejido integumentario (Palmetshofer et al., 1995; Slominski et al., 2000), en el sistema esquelético (Harvey et al., 2000), en el sistema respiratorio (Allen et al., 2000), en el sistema alimentario (Tresguerres et al., 1999; Kyle et al., 1981), en el sistema cardiovascular (Costa et al., 1993; Wu et al., 1996; Recher et al., 2001) y en tejidos ortodónticos (Zhang et al., 1997). También, se ha identificado el ARNm de GH de pollo en el cerebro (Render et al., 1995a), el bazo, el timo y la bursa (Render et al., 1995b), en el corazón y en el ojo (Takeuchi et al., 2001). Asimismo, se ha reportado la presencia de entidades semejantes a GH y al ARNm de GH en algunos tejidos del aparato reproductor. Ahora se sabe que el gen de GH se expresa en la placenta (Hu et al., 1999) y que en ésta se transcriben al menos dos genes, el gen hGH-N característico de la hipófisis y una variedad placentaria (hGH-V), que puede ser procesada alternativamente para producir tres proteínas (hGH-V₁, hGH-V₂ y hGH-V₃) (Boguszewski et al., 1998). Los transcritos de los genes hGH-N y hGH-V también se han encontrado presentes en el ovario (Schwarzler et al., 1997) y en los testículos humanos, en los cuales se transcribe preferencialmente el gen hGH-V (Untergasser et al., 1997; 1998; Berger et al., 1999). Sin embargo, se desconoce si estos genes son traducidos en los tejidos reproductores, aunque se ha descrito la presencia de inmunorreactividad semejante a GH, por inmunocitoquímica, en las células del conducto Wolffiano en ratones fetales (Nguyen et al., 1996) y en embriones de pollo (Wang, 1989; Harvey et al., 2000).

En el laboratorio se han obtenido datos que muestran la presencia de inmunorreactividad semejante a GH en diversos tejidos extrahipofisarios en el pollo, así como

la existencia del ARNm que codifica esta proteína. Se determinó la concentración total de GH, mediante ELISA homólogo y específico, en tejidos del sistema inmune, bazo, bolsa de Fabricio y timo (Luna y cols., 2005); del tracto reproductor masculino, testículo y conductos deferentes (Luna y cols., 2004); en el ojo (Carranza M, 2006) y en el sistema nervioso (Alba C, 2006) de pollo. En todos estos tejidos la concentración de GH fue alrededor de 1000 veces menor que la determinada en la hipófisis. Sin embargo en el tracto reproductor femenino, oviducto, ovocitos desnudos o desprovistos de su envoltura folicular, capas foliculares aún no se ha explorado. Por otra parte se ha estudiado el patrón de variantes moleculares de la GH inmunorreactiva (GH-IR) en estos tejidos extrahipofisarios y se comparó con el observado en la hipófisis. Los resultados mostraron un patrón de heterogeneidad molecular con variantes de masa reconocidas por el anticuerpo específico dirigido contra la cGH, en donde un buen número de ellas coinciden con las que se observan en los extractos hipofisarios (Luna y cols., 2000; 2004). Mediante análisis por RT-PCR del ARNm obtenido de algunos de estos tejidos (bolsa de Fabricio, timo, bazo, testículo y conductos deferentes) se generó un ADNc de 689 pb semejante al obtenido a partir de hipófisis y que correspondió al ARNm que codifica GH; como control negativo se utilizó hígado y músculo y el ADNc no pudo ser amplificado con ARNm de dichos tejidos (Luna et al., 2000). Además se clonó y secuenció el ADNc de GH obtenido de testículos de pollo y se encontró una similitud >99.5% con la secuencia consenso publicada para el ADNc de GH hipofisaria de pollo, difiriendo únicamente en tres sustituciones de pares de bases en las posiciones 102, 460 y 587 y generando únicamente un cambio en la secuencia de aminoácidos (Gly por Asp) en la posición 129 de la hormona madura (Harvey et al., 2004^a). Por otra parte se mostró que en el testículo de pollo, la inmunorreactividad semejante a cGH se asocia a varias bandas además de la forma monomérica, dentro de las cuales destaca por su abundancia una forma de 17 kDa (Luna et al., 2002; 2004). Sin embargo con respecto a los tejidos del aparato reproductor de hembra en pollo no se tienen datos por lo que es de interés en este proyecto explorar si la GH se expresa en dichos tejidos.

1.5 Hormona de crecimiento en el aparato reproductor

La GH tiene efectos importantes en la diferenciación y desarrollo testicular, que pueden estar mediados por el IGF-1 gonadal. Su carencia en ratas adultas provoca una deficiencia en la diferenciación de las células germinales (Arsenijevic et al., 1989). También está implicada en la maduración final de los espermatozoides así como en la movilidad espermática (Kuroda, 1989). Posiblemente al aumentar la diferenciación de células de Leydig y de Sertoli, la GH induce la espermatogénesis en machos infértiles (Shoham et al., 1992). Los testículos están fuertemente vascularizados y muchas de las acciones testiculares que se han observado, por administración de GH exógena, es posible que sean debido a acciones endócrinas de la GH hipofisiaria, sin embargo, la barrera hemato-testicular sugiere que muchas de las acciones esteroideogénicas en células de Sertoli y su papel en la gametogénesis puedan reflejar acciones de GH producida localmente. Lo anterior tiene base en la distribución del receptor a GH (GHR) en el tracto reproductivo masculino, la inmunorreactividad de GHR en los ductos de Wolff y de Müller, uretra, epidídimo, vasos deferentes, vesícula seminal y gónadas en la rata (Hull y Harvey, 2000). La expresión del gen de GH ha sido identificada en testículo humano y corresponde al gen expresado también en placenta (hGH-V), (Untergasser et al., 1998). La GH placentaria no existe en pollo, sin embargo se ha encontrado una proteína parecida a GH en el testículo, por lo que se piensa que el gen que se expresa es la variante hipofisiaria (Harvey et al., 2002). La secuencia del ARNm de GH que se expresa en testículo, como ya se mencionó, muestra 99.5 % de similitud al compararlo con la secuencia de la hipófisis además de que existen en el testículo variantes moleculares que se observan también en la hipófisis, tal es el caso del monómero de 22 kDa, aunque mayoritariamente en el testículo existe una variante de 17 kDa. Existen evidencias de que la proporción relativa de estas variantes se modifica con respecto a la ontogenia (Luna et al., 2004). Por otra parte, se ha demostrado la presencia del receptor para GHRH en células de Leydig y el ARNm para GHRH en células germinales y de Sertoli (Li y Arimura, 2003), lo que podría establecer una correlación con la presencia de GH.

El tracto reproductor femenino también es un sitio blanco para la acción de la GH. Se ha descrito que las mujeres deficientes en GH comúnmente requieren apoyo de tecnologías de reproducción asistida para concebir, lo que indica un papel fisiológico de la GH para promover la fertilidad; este también es el caso de mujeres con síndrome de ovario poliquístico

(PCOS). Muchas pacientes con PCOS tienen a su vez una disfunción de la respuesta a GH, por la estimulación con Levo-Dopa y GHRH (Spiliotis, 2003). El hiperandrogenismo observado en PCOS puede contribuir a la reducción de la secreción de GH porque la testosterona estimula directamente la síntesis de somatostatina, además de que la presencia de altos niveles de andrógenos facilita el control dopaminérgico de GH. Estudios clínicos han mostrado que la GH puede ser terapéuticamente útil en algunas mujeres infértiles. La administración de GH a mujeres hipogonadotrópicas anovulatorias reduce significativamente la dosis y duración del tratamiento con hMG (gonadotropina humana menopáusica) requeridas para la inducción de la ovulación e incrementa el porcentaje de pacientes tratadas con éxito (Homburgh y Farhi, 1995). La terapia con GH también mejora el éxito de las técnicas de fertilización *in vitro* aumentando la respuesta hiperovulatoria a la hMG. También se conoce que las acciones de la GH en la función ovárica están mediadas parcialmente por cambios en los niveles de estrógenos, como sucede en la activación del eje de la hormona observado durante la pubertad en respuesta al incremento en los estrógenos (Spiliotis, 2003) así como también en la deficiencia parcial de progesterona en bovinos que no presentan el receptor de la hormona de crecimiento, GHR (Chase et al., 1998). Numerosos estudios han demostrado un aumento en la producción ovárica de esteroides después de la administración de GH *in vivo* (Bryan et al., 1992) o *in vitro* (Wathes et al., 1995). La GH puede inducir la esteroidogénesis directamente o bien a través de potenciar la acción de las gonadotropinas (Hull y Harvey, 2000). La GH también tiene efectos sobre la foliculogénesis (Spiliotis, 2003). El desarrollo folicular normal requiere la administración de gonadotropinas y de GH (Eckery et al., 1997). En vacas la GH estimula el desarrollo tanto de los folículos en fase de reclutamiento como el de los que han entrado a la fase de atresia (Lucy et al., 1994). El aumento en el número de folículos se ha relacionado con una acción indirecta de la GH mediada por los niveles periféricos de IGF-I (Gong et al., 1997). Durante el desarrollo del folículo se requieren cambios nucleares y citoplásmicos dentro del ovocito para que pueda ser fertilizado exitosamente. Varios estudios han mostrado que los ovocitos bovinos tratados con GH completan la fase I de la meiosis más rápidamente y llegan a la formación de blastocisto más frecuentemente que los no tratados (Izadyar et al., 1998). Se ha observado la presencia del receptor a GH (GHR) (Carlsson et al., 1992) y la existencia del ARNm que codifica éste en el tejido ovárico bovino y en los folículos recién reclutados (Kolle et al., 1998). Además, la distribución de la inmunorreactividad a GHR

se ha observado en células de la granulosa, células de la teca y células lúteas bovinas (Kolle et al., 1998). Puesto que las gónadas están altamente vascularizadas, es posible que muchas de las acciones gonadales de la GH exógena que se han observado estén reflejando los efectos endocrinos de la GH hipofisiaria. Sin embargo, dado que algunas células gonadales (células germinales, células de la granulosa y los compartimentos adluminales de las células de Sertoli) en el ovario y en los testículos son avasculares o bien están físicamente separadas de la circulación sistémica por una barrera, algunos de los efectos esteroideogénicos y gametogénicos de la GH pueden reflejar la actividad de la GH producida localmente [Figura 4] ya sea directamente o induciendo la producción de IGF-I. Se ha sugerido que la expresión del gen de GH en la hipófisis es dependiente del factor de transcripción Pit-1 (Harvey et al., 2000) y se ha encontrado Pit-1 en tejido placentario pero en este caso no se ha podido establecer una función directa sobre la expresión de la variante placentaria de GH. De hecho, no se conocen con certeza los factores que pudieran estar regulando la expresión de la GH en tejidos extrahipofisarios.

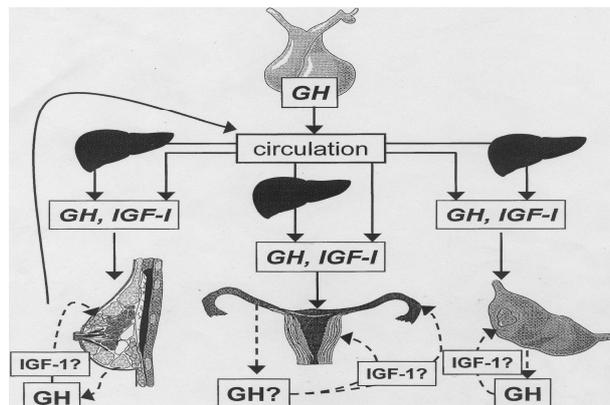


Figura 4. Acciones propuestas para la GH hipofisiaria y la GH sintetizada localmente en los tejidos del aparato reproductor femenino (Hull y Harvey, 2001).

Si bien se ha descrito la presencia de la hormona liberadora de GH, la GHRH (Matsubara et al., 1995; Olchovsky et al., 1996), de la hormona liberadora de tirotropina, TRH (Wilber y Xu, 1998; Li et al., 2002), de una de las sustancias secretagogas de GH, la Ghrelina (Tanaka et al., 2001; Tena-Sempere et al., 2002), de el inhibidor de GH, la somatostatina (Pekary et al., 1984; Zhu et al., 1998) y del factor de crecimiento insulinoide tipo I, IGF-I (Morera et al., 1987; Baker et al., 1996) en tejido reproductor femenino, hasta el momento no se ha demostrado que estén relacionados con la regulación de la GH o bien sobre la secreción local de esta hormona en ovocitos, capas foliculares y oviducto.

1.6 Algunos aspectos morfológicos y anatómicos de los folículos (ovocitos y capas foliculares) y el oviducto.

1.6.1 Desarrollo folicular.

En el comienzo de la madurez sexual el ovario de los pollos hembras aumenta de peso. En estos animales dicho incremento va de 0.5 a 40-60 g. La mayor parte del aumento proviene de los 4 a 6 folículos en desarrollo, de los cuales el mayor pesa unos 20 g con un diámetro de 40 mm, en promedio (Hafez y col. 1984). De los miles de ovocitos presentes, por lo regular uno comienza a desarrollarse en un momento dado en respuesta al pico de hormona folículo estimulante (FSH), 11-14 h antes de la ovulación, que al igual que en mamíferos es asincrónico, con el de hormona luteinizante (LH) y sucede 4-6 h antes de la ovulación (Bahr et al., 1983). La jerarquía de un folículo (F1) promueve a su vez la del que le sigue en desarrollo, el lapso entre el comienzo del desarrollo de folículos sucesivos al parecer es de unas 24-26 h. Por lo anterior, se ha clasificado a los ovocitos por el tamaño de su diámetro en función de la madurez de su desarrollo [Figura 5], de tal manera que un folículo maduro, listo para ovular es F1, los estados preovulatorios son F2, F3, F4 y F5 mientras que los estados previos al reclutamiento o jerarquización son Fsyf (Folículo amarillo pequeño, por sus siglas en inglés *small yellow follicle*) y Fw (Folículo blanco, indiferenciado, por la sigla de la palabra en inglés *white*) (Hernández et al., 2001).

Un folículo a su vez está formado por el ovocito (gameto) inmerso en una masa de yema (85% lípidos, 15% agua), además se encuentra rodeado de una serie de capas celulares que llevan a cabo en su mayoría, funciones esteroidogénicas [Figura 5]. Principalmente son de nuestro interés las capas celulares integradas por la monocapa de células de la granulosa, encargada de convertir los andrógenos a estrógenos y las dos capas de la teca cuya función es sintetizar andrógenos (Hafez et al., 1984).

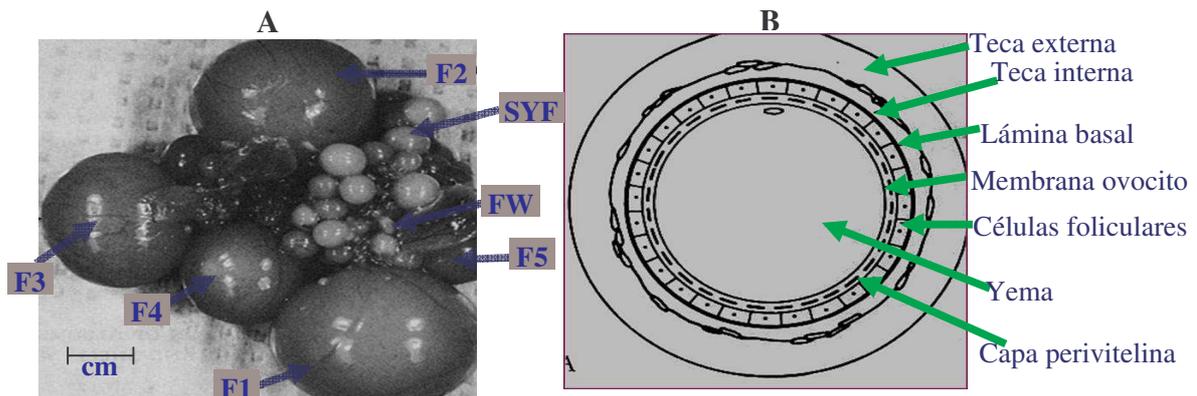


Figura 5. A) Fotografía donde se muestra la clasificación de folículos de un pollo hembra (Hernández et al., 2001). B) Esquema de las células que rodean al ovocito (Hernández et al., 2001).

1.6.2 Anatomía del oviducto.

El oviducto [Figura 6] es una parte anatómica que aunque es propia de las aves de cierta manera es equivalente al útero en mamíferos. Generalmente mide 700 mm de largo en un pollo hembra maduro sexualmente (25 semanas); está suspendido por el ligamento dorsal peritoneal que se continúa alrededor de él para formar el ligamento ventral. Está muy vascularizado y las capas musculares tienen un buen aporte nervioso del sistema autónomo. Las funciones del oviducto son producir el resto de los elementos formadores del huevo, en este caso la clara y el cascarón, mediante movimientos del folículo ovulado (F1) a través de él. Éste consiste en una mucosa plegada granular y de músculo dispuesto en una capa longitudinal externa y una capa circular interna. El oviducto consta de 5 regiones principales, cada una de las cuales tiene una distribución característica de mucosa y músculo. En esta tesis se analizó la región del oviducto conocida como infundíbulo, la cual engloba activamente al óvulo liberado. El infundíbulo presenta una región inicial en forma de embudo por donde atraviesa el folículo

ovulado, luego éste continúa su trayecto hacia abajo en la región angosta glandular donde comienza la adición de la albúmina y la formación de una estructura conocida como membrana perivitelina.

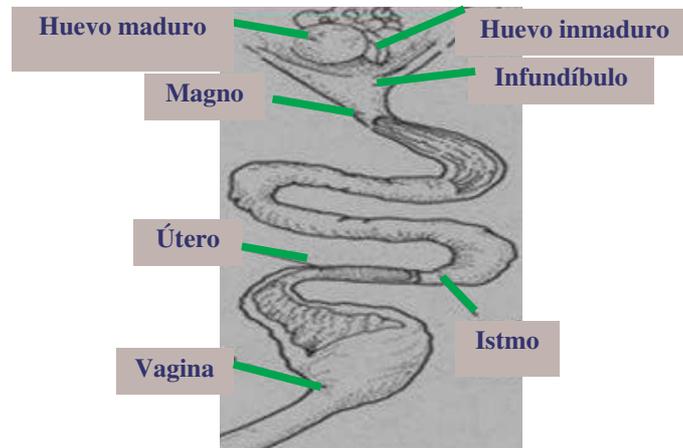


Figura 6. Esquema de las regiones de un oviducto de pollos hembras (Hafez et al., 1984).

2. JUSTIFICACIÓN

Es bien conocida la existencia de variantes moleculares de la GH en la hipófisis y se ha sugerido que podrían tener un papel importante para explicar la diversidad funcional de esta hormona. Recientemente se ha encontrado la expresión de esta proteína en diversos tejidos, entre los cuales se encuentran los del sistema reproductor de machos y de hembras. Se sabe que esta hormona tiene efectos somatotrópicos sobre tejidos del sistema reproductor pero no se le ha considerado clásicamente como una hormona reproductora a pesar de tener acciones en esta función. Tal es el caso de sus efectos en la diferenciación sexual, en la madurez puberal, en la esteroidogénesis, en la gametogénesis y en la ovulación. Además también se requiere para la nutrición y crecimiento fetal. Aunque algunos de estos efectos reflejan la actividad de la GH sobre la acción de la LH y la FSH, también pueden indicar efectos directos e indirectos (mediados por la producción local de IGF-I). Puesto que se ha encontrado que la GH puede producirse en tejidos gonadales y mamarios, se pueden sugerir efectos locales, tanto autócrinos como parácrinos, de la GH extrahipofisiaria. En este proyecto se plantea identificar y caracterizar a la hormona de crecimiento y a su ARNm, que podría expresarse localmente en el sistema reproductor de pollos hembra (oviducto, capas foliculares y ovocitos en diferentes estadios de maduración); en caso de ser así determinar si también presenta una heterogeneidad molecular como la que existe en la hipófisis y si ésta se modifica con respecto a la maduración folicular.

HIPÓTESIS

El aparato reproductor femenino del pollo expresa a la hormona de crecimiento y además presenta un patrón de variantes moleculares de esta hormona que se modifican durante el desarrollo folicular.

3. OBJETIVO GENERAL

Identificar y caracterizar la producción de hormona de crecimiento en el aparato reproductor de pollos hembras.

OBJETIVOS PARTICULARES

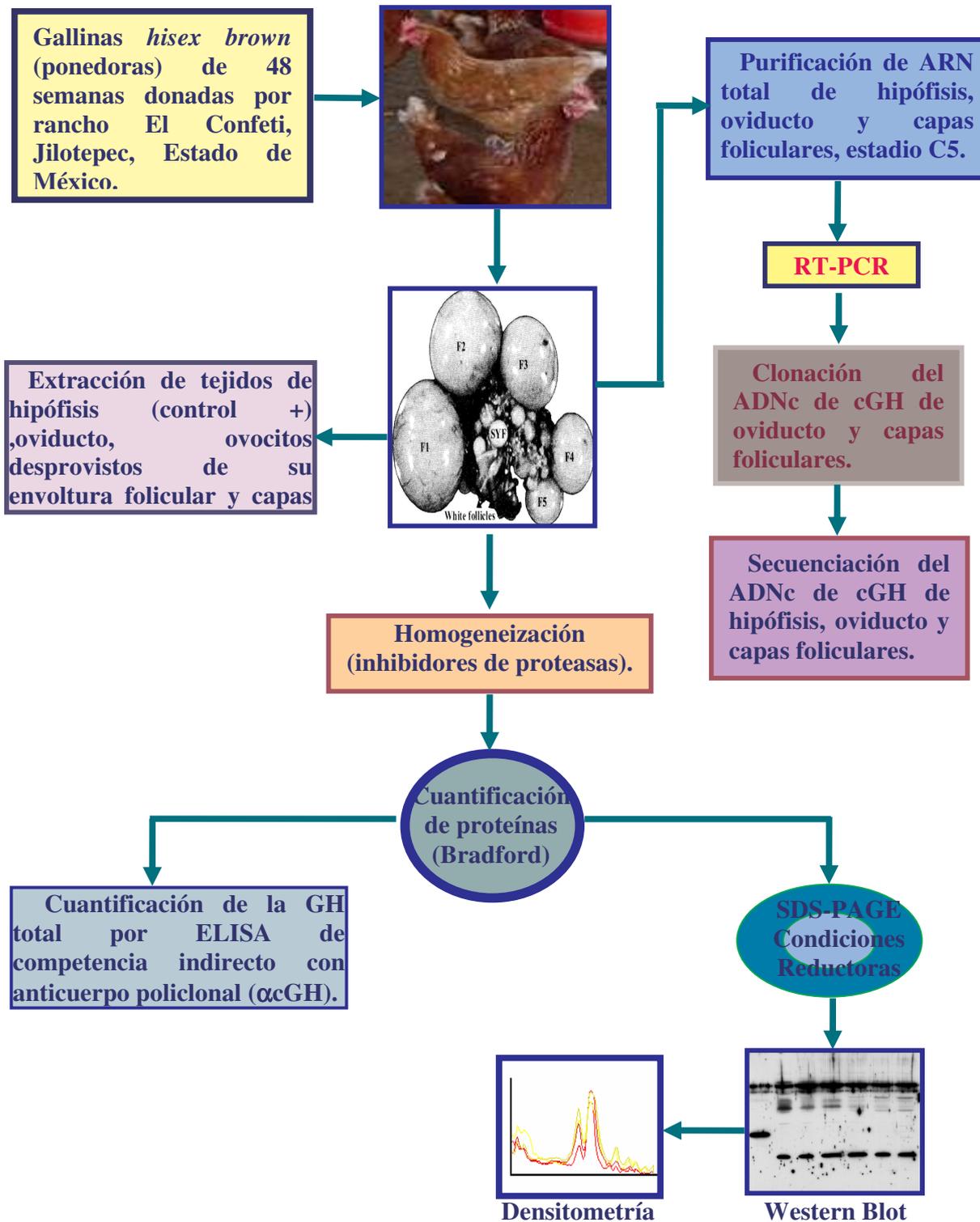
Cuantificación del contenido total de cGH por ELISA en extractos de tejidos del aparato reproductor de pollos hembras.

Caracterización del patrón de heterogeneidad molecular de cGH en los tejidos del aparato reproductor de pollos hembras por “Western blot” y análisis densitométrico.

Determinación de la presencia del ARNm de cGH en tejidos del aparato reproductor de pollos hembras por RT-PCR.

Clonación y secuenciación del ADNc de cGH en oviducto y capas foliculares.

4. DISEÑO EXPERIMENTAL



5. MATERIAL Y MÉTODOS

Como material biológico se utilizaron aves de postura, raza *hisex brown*, 48 semanas de edad para el estudio en ovocitos y capas foliculares y diferentes edades para el estudio del oviducto (13, 15, 18, 21, 22, 25 y 48 semanas). Los animales fueron donados por el Dr. Carlos Romero del rancho “El Confeti”, Jilotepec, Edo. de México. Los animales fueron sacrificados por dislocación cervical en el bioterio del Instituto de Neurobiología bajo condiciones asépticas. Los tejidos colectados fueron hipófisis, oviducto, capas foliculares y ovocitos en diferentes estadios de maduración, que se almacenaron a $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ hasta su utilización. La clasificación de los estadios de maduración para los ovocitos se hizo basándose en el diámetro, que es una correlación con la etapa de maduración folicular (Hernández et al., 2001); las capas foliculares (donde se encuentran las células de la granulosa y de la teca) se obtuvieron por medio de una disección bajo microscopio estereotáxico a partir de los ovocitos en diferentes estadios de maduración. La utilización de este procedimiento mecánico y no el tradicional enzimático para separar las células de la granulosa y teca, del resto del ovocito fue para evitar, en lo más posible, el rompimiento proteolítico que producen algunas enzimas como la tripsina y la colagenasa sobre la hormona de crecimiento (Aramburo y et al., 2001).

Folículos en etapa de reclutamiento	{	Fw ¹	<0.3 cm	Cw de Ow
		SYF ²	0.3-0.7 cm	Csyf de Osyf
		F5	0.7-1.0 cm	C5 de O5
Folículos en etapa de preovulación	{	F4	1.0-2.0 cm	C4 de O4
		F3	2.0-2.5 cm	C3 de O3
		F2	2.5-3.5 cm	C2 de O2
		F1	> 3.5 cm	C1 de O1

C = Capa folicular (células granulosa y teca), O = Ovocito desnudo o desprovisto de su envoltura folicular.

¹ Folículo blanco, indiferenciado, por la sigla de la palabra en inglés *white*.

² Folículo amarillo pequeño, por sus siglas en inglés *small yellow follicle*.

5.1 Extracción de hormona de crecimiento.

Los tejidos se homogeneizaron con un “politron” en amortiguador Tris-HCl 50 mM a pH 9.0 adicionado con un coctel de inhibidores de proteasas leupeptina, pefabloc, pepstatina, fosforamidón (concentración indicada por *Roche*) y PMSF 0.5 mM. El homogeneizado se agitó durante 2 h a 4 °C para extraer a la GH y posteriormente se centrifugó a 9 800 x g durante 15 min a 4°C. El sobrenadante fue recolectado en alícuotas de 300-500 µl y se cuantificó la concentración total de proteínas mediante el método de Bradford (Bradford, 1976).

5.2 Cuantificación de la hormona de crecimiento.

La cuantificación de cGH en los tejidos del aparato reproductor femenino de pollos se realizó mediante el método de ELISA indirecto (Martínez-Coria et al., 2002). Se utilizaron microplacas de poliestireno (Immulon 2 HD de Dynex Tech, con 96 pozos) que fueron recubiertas con 12 ng de rcGH en 100 µl/pozo de amortiguador de carbonatos, 0.1 M pH 10.3. La hormona se adhirió a las paredes de la placa mediante una incubación de 16 h a 4 °C. Simultáneamente se preparó la curva patrón con dilución doble seriada desde una concentración de 1024 ng de rcGH hasta 0.25 ng de rcGH; se utilizó un Ab policlonal contra cGH, diluido 1:100,000 v/v en amortiguador salino de fosfatos con Tween (TPBS: 0.01 M de fosfatos, 0.15 M de NaCl + 0.05 % de Tween-20) + 1 % de leche descremada; se incubó durante 16 h a 4 °C. Las muestras fueron preparadas de igual manera que las diluciones para la curva. Posteriormente se lavaron las placas con TPBS 5 veces (lavador automático de *Bio-Rad*, modelo 1250) y se bloquearon con leche descremada al 3% en PBS (0.01 M de fosfatos, 0.15 M de NaCl), durante 1 h. Se lavaron las placas con TPBS 5 veces y se adicionó a los pozos las diluciones para la curva patrón y las muestras preparadas anteriormente. Se incubaron a temperatura ambiente durante 2 h. Después de otro lavado con TPBS 5 veces, se adicionó un segundo anticuerpo, anti IgG de conejo producido en cabra y conjugado a peroxidasa de rábano (goat anti-rabbit α -IgG-HRP *Bio-Rad*) 1:3,000 v/v en TPBS + 1% de leche durante 2 h a temperatura ambiente. Al término de la incubación se enjuagaron las placas con TPBS 5 veces y se les adicionó la solución de ABTS (amortiguador 1:10; sustrato para HRP 2.19 mg/ml) (*Roche*), por 1 h a temperatura ambiente controlada. Al término del

tiempo de incubación se midió la absorbencia a 405 nm en un lector de microplacas (*Bio-Rad*), Microplate Reader modelo 3550-UV. Este ensayo tiene una sensibilidad de 2 ng/pozo (20 ng/ml) y un coeficiente intraensayo e interensayo menor al 5 % (Martínez-Coria et al., 2002). El análisis estadístico se realizó por ANOVA de una vía y pruebas post hoc de Tukey y de Dunnett que compararon la medias de todas las muestras experimentales entre ellas y con respecto al control de hipófisis de 48 semanas. Como alternativa se usó una prueba t de Student.

5.3 Identificación del patrón de variantes de masa de cGH por electroforesis SDS-PAGE y “Western blot”.

Se realizó electroforesis de una dimensión SDS-PAGE en condiciones reductoras (en presencia de β -mercaptoetanol), utilizando el equipo Mini Protean II (*Bio-Rad*), para separar las proteínas por su peso molecular. El gel concentrador fue preparado al 4 % de poliacrilamida mientras que el separador al 15%. El amortiguador de corrida fue Tris 25 mM, glicina 190 mM, SDS 0.1%, pH 8.6. El amortiguador de muestra fue 0.05 % azul brillante de Coomassie (*Bio-Rad*) y β -mercaptoetanol. Las muestras provenientes de los tejidos reproductivos se prepararon con 30 μ g de proteína, mientras que se utilizó como control positivo hipófisis (0.5 μ g de proteína), más el volumen necesario para completar 20 μ l con amortiguador de muestra; luego se incubaron durante 5 min a ebullición para desnaturalizarlos. Una vez colocadas las muestras y el control, en los pozos del gel, se aplicó voltaje de 100 V con una fuente de poder para electroforesis (modelo 500/200, *Bio-Rad*) durante el paso de las muestras en el gel concentrador, mientras que se aplicó voltaje constante de 150 V en el gel separador. Para la electrotransferencia (Towbin et al., 1979) los geles se equilibraron en un amortiguador con 25 mM Tris, 192 mM glicina, 20% metanol, pH 8.3 y las bandas de proteína fueron transferidas a membranas de nitrocelulosa a 200 mA por 1 h (kit de *Bio-Rad*), para ser posteriormente inmunoteñidas y analizadas por quimioluminiscencia. Después de la transferencia, las membranas se bloquearon con 5% de leche descremada (*Bio-Rad*) en TBS por 2 h a 37° C. Después de lavarlas con TTBS (0.05% Tween-20 en TBS), las membranas se incubaron con el primer anticuerpo anti-cGH policlonal, CAP-1 (Arámuro et al., 1989c) 1:10,000 v/v en 1% de leche descremada en TTBS a temperatura ambiente y con agitación, preferentemente, toda la noche. Posteriormente, fueron lavadas con TTBS por 10

min, 3 veces. Después las membranas fueron incubadas con un segundo anticuerpo, anti IgG de conejo producido en cabra y conjugado a peroxidasa de rábano (*Bio-Rad*) 1:3,000 v/v en 1% de leche descremada en TTBS durante 2 h. Después se lavaron 3 veces con TTBS y 2 veces con TBS, cada ocasión por 10 min. Posteriormente, los sitios del complejo antígeno-anticuerpo se detectaron utilizando un sistema de quimioluminiscencia ECL (*Amersham/Pharmacia*), el cual fue preparado con 5 ml de la solución A y 5 ml de la solución B. Después de incubar por 5 min las membranas en la solución del sustrato quimioluminiscente, se colocaron dentro de una bolsa de plástico. La bolsa con las membranas se colocó en un cassette (X-Omatic, *Kodak*) y se expuso en una placa de rayos-X (*Biomax Kodak*) por 1-2 min. La película fue fijada y revelada durante 30 s con el kit GBX (*Kodak*) 1:4.5 y alternadamente se enjuagó con agua corriente. Por último se dejaron secar y se analizaron por densitometría. Además se utilizó un control negativo para el “Western blot” incubando previamente el primer anticuerpo con un exceso de hormona de crecimiento recombinante (rcGH, 1 mg/500 µl).

5.4 Análisis de las variantes de cGH por densitometría.

El análisis cuantitativo de las bandas inmunorreactivas a cGH se realizó por medio de densitometría de los luminogramas. Para digitalizar la imagen del luminograma se empleó un Scanner (ScanJet Hewlett Packard). Con esto se obtuvo 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 obtuvo la densidad óptica del área total de cada banda. Estos datos fueron graficados comparando las diferencias entre las distintas bandas inmunorreactivas presentes en los grupos de cada experimento. Para normalizar los datos se obtuvo la concentración relativa de cada banda considerando la inmunoreactividad total de cada muestra como el 100 %, de tal manera que cada variante molecular identificada por los anticuerpos representa un porcentaje del total de cGH encontrada en el tejido. El análisis estadístico se realizó por ANOVA de una vía más pruebas post hoc (Tukey y Dunnet) que comparó la proporción relativa de cada una de las bandas correspondientes al control y a los experimentales.

5.5 Determinación de la presencia y expresión del ARNm en los tejidos del aparato reproductor de pollas adultas

5.5.1 Purificación del ARN total de oviducto y capas foliculares.

Para aislar el ARN total de oviducto y capas foliculares se utilizó una técnica de purificación con una solución monofásica de fenol mezclado con tiocianato de guanidina (Chomczynski y Sacchi, 1987). Cada 100 mg de tejido (oviducto y capas foliculares) fueron mezclados con 1 ml de Trizol (*Invitrogen*) y homogeneizados con el “politron” (*Brinkmann*). A esta solución se adicionaron 200 µl de cloroformo (*Sigma*), se mezcló manualmente por 30 s e incubó a temperatura ambiente por 3 min. Después la solución se centrifugó a 10,000 x g (RMC14 *Sorvall*) por 15 min a 4 °C para obtener una fase acuosa y una orgánica; la fase acuosa fue transferida a tubos eppendorf estériles libres de ARNasas y ADNasas (*Rainin*) y mezclada con 500 µl de una solución de alcohol isoamílico-cloroformo-fenol 1:24:25, se agitó por 2 min en “vórtex” (*Scientific industries, Inc.*) y se centrifugó a 10,000 x g por 5 min a 4 °C. El paso anterior se repitió por 3 ocasiones y el sobrenadante final fue transferido a tubos Eppendorf estériles para adicionarle 500 µl de isopropanol (*Sigma*); la mezcla se agitó manualmente y se incubó a temperatura ambiente por 10 min, luego fue centrifugada a 10,000 x g por 10 min a 4 °C; después de la centrifugación se retiró el sobrenadante y el precipitado se dejó secar durante 5 min a temperatura ambiente. El precipitado fue lavado con etanol frío al 75 % por 3 ocasiones sin resuspender la pastilla, después se dejó secar por 20 min a temperatura ambiente y se resuspendió en 100 µl de agua estéril tratada con dietilpirocarbonato, DEPC (*Sigma*) al 0.1 % v/v.

5.5.2 Análisis de la pureza e integridad del ARN total de hipófisis, oviducto y capas foliculares.

Para determinar la pureza del ARN se hizo una dilución 1:200 con 5 µl de ARN de cada muestra mas 995 µl de agua estéril tratada con DEPC 0.1% v/v. Por medio de un espectrofotómetro se obtuvo la absorbencia a 260 nm de la dilución, se obtuvo también la proporción de densidad óptica (DO) a 260 nm/280 nm, cuyo índice cercano o igual a 2 es indicativo de una significativa pureza en los ácidos nucleicos purificados. La concentración del ARN fue obtenida aplicando la fórmula $[\text{ARN } \mu\text{g}/\mu\text{l}] = \text{Factor de dilución} * 38 \mu\text{g}/\mu\text{l} * \text{DO}$ a 260 nm, (Sambrook y Russell, 2001).

Para analizar la integridad del ARN se realizó electroforesis unidimensional a voltaje constante de 80 V con geles de agarosa al 1.2 % en TAE 1X (*Invitrogen*), en cámaras electroforéticas (*Bio-rad*). Las muestras se prepararon con alícuotas de 3 µl de ARN más 1 µl de bromuro de etidio (*Gibco BRL*) 0.5 µg/µl más 1 µl de amortiguador de muestra Blue Juice 5 X (*Invitrogen*).

5.5.3 Obtención del ADNc de hipófisis, oviducto y capas foliculares.

Para producir el ADNc por transcripción reversa (RT) se utilizaron 5 µg de ARN de cada muestra (hipófisis, oviducto o capas foliculares) más 1 µl de oligo-dT (50 µg/µl), 1 µl de mezcla dNTP (10 mM) y DEPC 0.1 % v/v en agua suficiente para 12 µl; esta solución se incubó por 5 min a 65 °C en el termociclador (*Perkin Elmer*) y rápidamente se colocó en hielo. Se adicionaron 7 µl de mezcla de reacción (amortiguador de reacción 5X y DTT 0.1 M, RNaseOUT™, 40 unidades/µl) y se incubó por 2 min a 42 °C. Después de esto se adicionó 1 µl de enzima transcriptasa reversa (Superscript™ II reverse transcriptase, 200 U/µl, *Invitrogen*) a cada una de las muestras. Los tubos se incubaron durante 50 min a 42 °C y la reacción se inactivó a 70 °C por 15 min. Una alícuota de 5 µl fue utilizada para amplificación por la reacción de la polimerasa en cadena (PCR), el resto se almacenó a -20°C.

5.5.4 Amplificación del ADNc de hipófisis, oviducto y capas foliculares.

Una alícuota de 5 μ l del ADNc obtenido por RT se amplificó mediante PCR adicionando 5 μ l de amortiguador de PCR (Tris-HCl 200 mM, pH 8.4; KCl 500 mM), 8 μ l de dNTP 1.25 mM, 3 μ l MgCl₂ 50 mM, 0.5 μ l de los oligonucleótidos específicos para GH en hipófisis CRE1 (5'-3') y CRE2 (3'-5'), 25 pM/ μ l. La mezcla de reacción y el ADNc se incubaron a 94 °C por 3 min, después se adicionó 0.5 μ l de taq ADN polimerasa, 5 U/ μ l (Render et al., 1995b), se mezcló con punta estéril y los tubos se colocaron en el termociclador por aproximadamente 3 h. Los controles negativos se hicieron mezclando la muestra más la mezcla de reacción pero sin taq ADN polimerasa.

Las condiciones en el termociclador para la reacción de PCR fueron:

Alineación { 72 °C por 3 min }

Extensión { 94 °C por 1 min
55 °C por 1.5 min
72 °C por 1 min }

Inactivación { 72 °C por 10 min
4 °C por 5 min }

Al término de la PCR, el producto fue analizado por electroforesis a voltaje constante de 80 V en geles de agarosa al 1.2 % en TAE 1X (*Invitrogen*), en cámaras electroforéticas (*Bio-rad*). Las muestras se prepararon con alícuotas de 3 μ l del producto más 1 μ l de bromuro de etidio (*Gibco BRL*) 0.5 μ g/ μ l más 1 μ l de amortiguador de muestra Blue Juice 5 X (*Invitrogen*). El tamaño de la banda esperada es de 690 pb.

5.6 Secuenciación del gen de cGH en oviducto y capas foliculares.

5.6.1 Purificación de la banda de 690 pb.

La banda de 690 pb obtenida por RT-PCR fue purificada con el kit de purificación GFXTM PCR DNA and GEL BAND (*Amersham*) mediante una solución de captura de ADN, un amortiguador con acetato como agente caotrópico para desnaturalizar proteínas, disolver la agarosa y promover la unión de doble cadena de ADN, además de una solución iónica de lavado (amortiguador Tris-HCl pH 8.0, EDTA 1 mM y etanol absoluto a una concentración final del 80 %). También se utilizaron columnas de microfuga pre-fabricadas con una matriz de vidrio. El ADN purificado resuspendido en agua con DEPC 1 % v/v estéril se utilizó para la ligación con un plásmido o vector.

5.6.2 Ligación de un fragmento de ADN dentro de un vector y transformación de células competentes (*E. coli*).

La ligación del plásmido con el fragmento de ADN se hizo colocando en un tubo estéril 4 µl del producto más 1 µl de solución salina más 1 µl del vector TOPO 4 (*Amersham*). El tubo se incubó 30 min a temperatura ambiente y luego se pasó rápidamente a hielo para detener la reacción. Dos µl de esta ligación fueron adicionados a un frasco de células competentes (*Invitrogen*) que después de mezclarse suavemente se incubó en hielo por 15 min, luego 30 min a 42 °C en el termoblock (este paso es conocido como choque térmico) y se colocó en hielo al término de la incubación para adicionarle 250 µl de medio SOC. El frasco fue agitado por 1 h a 37 °C en un agitador orbital (*Environment shaker*). Se tomaron 10, 50 y 100 µl de células competentes transformadas con el vector y el inserto de 690 pb y se sembraron bajo mechero, con ayuda de perlas de vidrio estériles, en cajas de agar con antibiótico (ampicilina 100 µg/caja) (Unidad de Proteogenómica, Dra. Anaid Antaramián). Las cajas de agar con siembra fueron incubadas por 16 h a 37 °C en una incubadora. Las colonias blancas se picaron con un palillo y fueron resembradas en medio Luria (Unidad de Proteogenómica, Dra. Anaid Antaramián), se incubaron con agitación constante en el agitador orbital (*Environment shaker*) por 16 h a 37 °C.

5.6.3 Purificación de ADN plasmídico.

El paquete de células transformadas fue obtenido de 3 ml de medio Luria (paso anterior) centrifugado a $10,000 \times g$ por 5 min a temperatura ambiente. Este paquete fue utilizado para purificar el ADN del vector que contenía el inserto de ADN de 690 pb por medio del kit Wizard Plus sv Minipreps DNA Purification System (*Promega*). Las células fueron resuspendidas (solución de Tris-HCl 50 mM, pH 7.5, EDTA 10 mM y RNasa A 100 $\mu\text{g/ml}$) y después de una incubación de 5 min a temperatura ambiente se les adicionó 250 μl de amortiguador de lisis (NaOH 200 mM y SDS 1%), 10 μl de solución alcalina de proteasas, 350 μl de solución de neutralización (Hidrocloruro de guanidina, acetato de potasio 759 mM y ácido acético glacial 2.12 M) y se centrifugaron a $10,000 \times g$ por 10 min para recuperar el sobrenadante. Éste se pasó a una columna de fibra de vidrio (sílice), a la que se le hicieron tres lavados con solución de lavado (acetato de potasio 162.8 mM, Tris-HCl 22.6 mM pH 7.5 y EDTA 0.109 mM) con centrifugaciones a $10,000 \times g$ por 1 min, entre cada uno de ellos. Luego se eluyó el ADN plasmídico que contenía el inserto con 100 μl de agua libre de nucleasas centrifugando la columna a la misma velocidad por 1 min a temperatura ambiente. Se analizó el ADN plasmídico purificado de cada una de las clonas en gel de agarosa al 1 %, con 8 μl de bromuro de etidio 0.5 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$; en cada carril se corrió a 90 V por 1 h, una muestra de 3 μl de cada clon más 1 μl amortiguador de muestra 5X (*Invitrogen*).

5.6.4 Digestión de la construcción del vector con el inserto de 690 pb.

Para corroborar si teníamos el inserto del fragmento de ADN en el vector se hizo una digestión con los clones de oviducto y capas foliculares adicionando 1 μl enzima de restricción EcoR1 (*Invitrogen* 200 U/1 μl). Las digestiones se analizaron en gel de agarosa, preparado de la misma manera que en pasos anteriores.

5.6.5 Secuenciación del ADN plasmídico puro.

15 μ l del ADN plasmídico puro se secuenció en la Unidad de Protegeómica (Dra. Anaïd Antaramián) usando un oligonucleótido M13 reverso y M13 directo (-20) para la región promotora M13 del vector, TOPO4 (*Amersham*) empleando un secuenciador automático ABI PRISM, 310 Genetic Analyzer (*Applied Biosystems*). Las secuencias obtenidas se alinearon nucleótido-nucleótido con ayuda de la biblioteca genómica del NIH en internet (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast>) y del programa DNAMAN (*Lynnon Corporation*) para encontrar la homología con otros genes.

6. RESULTADOS

6.1 Cuantificación de proteínas por el método de Bradford.

La curva patrón obtenida para el ensayo de cuantificación de proteína por el método de Bradford [Figura 7] presentó un coeficiente de variación estándar intraensayo de 4.8 % y de interensayo de 6 %, además de que el coeficiente de correlación fue de 0.99; estos valores indican reproducibilidad y confiabilidad de los resultados.

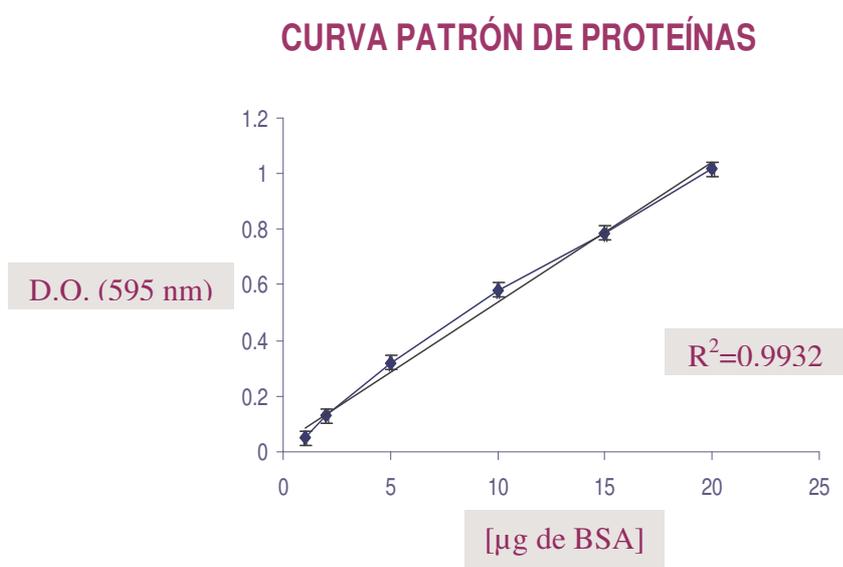


Figura 7. Curva patrón para la cuantificación de proteínas totales por el método de Bradford. Se utilizó una solución de albúmina sérica bovina (0.1 µg/µl). Se obtuvo la Densidad Óptica (DO) en un espectrofotómetro a 595 nm. Promedio±DE, n=12.

En la Tabla I se muestran las concentraciones de proteína total para cada uno de los tejidos estudiados. En la Tabla IA se observa que la proteína presente tanto en el oviducto como en la hipófisis (µg de proteína/mg tejido) se incrementó a través del desarrollo. El menor valor de proteína en oviducto fue encontrado a las 13 semanas (10.83±3.05), el cual fue 2 veces menor que el de hipófisis (19.16±0.28); oviductos de 15 y 18 semanas presentaron una concentración de proteína sin diferencia significativa entre ellos ni al ser comparados con la hipófisis de la edad correspondiente, de igual manera se encontró en edades de 21 y 25 semanas ya que no tuvieron diferencia significativa entre ellos pero con respecto a la hipófisis el valor fue 2 veces mayor en éstos. En el oviducto de 48 semanas (119.34±24.67) el valor de

proteína se incrementó hasta ser 1.7 veces mayor que en hipófisis (69.20 ± 18.72). En la Tabla IB se observa que la concentración de proteína de todos los estadios de maduración de los ovocitos es mayor a la encontrada en hipófisis, la mayor concentración de proteína estuvo en O4, O3 y O2 (etapas preovulatorias) donde el valor fue 2.9, 2.5 y 2.7 veces, respectivamente. La concentración de proteína en las capas foliculares fue mayor que en la hipófisis, en la Tabla IC se observan las diferencias significativas encontradas, donde el valor más alto fue en el estadio de C5, 2.4 veces mayor que el de hipófisis.

Tabla I. A) Comparación de la concentración de μg proteína/mg de tejido de oviductos de diferentes edades contra sus controles hipofisiarios; B) Comparación de la concentración de μg proteína/mg de tejido de ovocitos (O); C) Comparación de la concentración de μg proteína/mg de tejido de capas foliculares (C) en diferentes estadios de maduración, edad 48 semanas. Anova de una vía seguido de una prueba post hoc (Dunnet) que comparó el promedio de las medias \pm DE de los oviductos con las de la hipófisis, $n= 5$.

A

Tejido	μg de proteína/mg tejido Media \pm DE	Diferencias Significativas $P < 0.05$
Hipófisis 13 semanas	19.16 ± 0.28	a
Hipófisis 15 semanas	23.19 ± 3.19	b
Hipófisis 18 semanas	24.51 ± 0.43	b
Hipófisis 21 semanas	26.59 ± 4.08	b
Hipófisis 25 semanas	38.98 ± 10.66	c
Hipófisis 48 semanas	69.20 ± 18.72	d

Tejido	μg de proteína/mg tejido Media \pm DE	Diferencias Significativas $P < 0.05$
Oviducto 13 semanas	10.83 \pm 3.05	a
Oviducto 15 semanas	24.60 \pm 0.75	b
Oviducto 18 semanas	28.08 \pm 4.32	b
Oviducto 21 semanas	51.63 \pm 13.80	c
Oviducto 25 semanas	65.34 \pm 10.39	c
Oviducto 48 semanas	119.34 \pm 24.67	d

B

Tejido de 48 semanas	μg de proteína/mg tejido Media \pm DE	Diferencias Significativas $P < 0.05$
Hipófisis	69.20 \pm 18.72	b
Ow	61.16 \pm 9.41	a
Osyf	72.69 \pm 12.12	b
O5	74.02 \pm 30.11	b
O4	100.60 \pm 27.2	c
O3	88.25 \pm 15.94	c
O2	94.99 \pm 24.18	c

C

Tejido de 48 semanas	μg de proteína/mg tejido Media \pm DE	Diferencias Significativas $P < 0.05$
Hipófisis	69.20 \pm 18.72	b
Cw	37.66 \pm 15.65	a
Csyf	42.95 \pm 17.39	a
C5	82.40 \pm 8.59	b
C4	65.10 \pm 22.49	b
C3	41.91 \pm 9.79	a
C2	61.55 \pm 20.22	b

6.2 Cuantificación de cGH por ELISA.

En la Figura 8 se muestran los resultados de la curva patrón que se realizó con un intervalo de concentración de rcGH que va de 0.25 a 1024 ng/ml. Se obtuvieron coeficientes inter e intraensayo menores al 5%, mientras que la sensibilidad para la cuantificación de cGH fue de 2 ng/pozo (20 ng/ml) (Martínez-Coria et al., 2002).

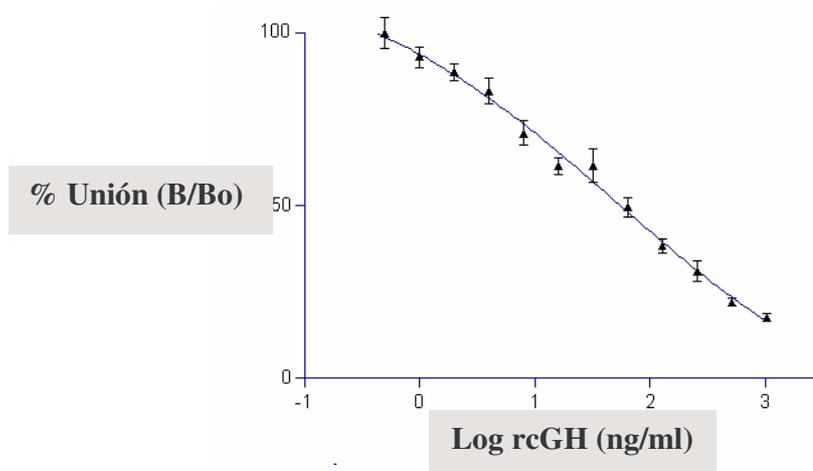


Figura 8. Curva patrón para el ensayo de ELISA específico y homólogo para rcGH. Forro de las placas con 12 ng rcGH, anticuerpo policlonal CAP1 1:100,000 v/v, segundo anticuerpo α IgG-peroxidasa 1:3,000 v/v, revelado con ABTS. Promedio \pm DE, n=9.

6.2.1 Concentración de cGH en oviducto.

Se determinó la concentración de cGH en oviductos de pollos hembras en muestras de 60 μ g de proteína total. Los oviductos [Figura 9B] mostraron diferencia significativa al compararse con el control hipofisiario [Figura 9A] de cada edad. De manera similar que en otros tejidos extrahipofisarios la hipófisis presentó la mayor concentración de GH, sin embargo, los oviductos mostraron 200 veces menos que la hipófisis mientras que otros tejidos han mostrado hasta 1000 veces menos (Luna y et al., 2004). Al analizar la concentración de hormona entre oviductos se observó que ésta tuvo una tendencia inversamente proporcional a la edad, es decir, fue disminuyendo a través del desarrollo [Figura 9B]. La mayor concentración de hormona estuvo presente a las 13 semanas de edad (etapa prepúber, 821.33

ng cGH/mg de proteína \pm 40.23), ésta mostró diferencias significativas con el resto; la concentración de la hormona encontrada a las 15 semanas fue 2 veces menor que a las 13 y aunque no mostró diferencia al compararle con la de 18 semanas, fue significativamente diferente con el resto de edades. La concentración a las 18 semanas no tuvo diferencia significativa con la de 15 semanas y 21 semanas, mientras la concentración de la GH en esta última edad fue diferente significativamente con el resto de las edades analizadas. A las 25 semanas (234.95 ng cGH/mg de proteína \pm 23.71) y a las 48 (156.72 ng cGH/mg de proteína \pm 32.39) se encontraron los valores menores de concentración y éstos tuvieron diferencias significativas con la concentración de las demás edades de oviducto.

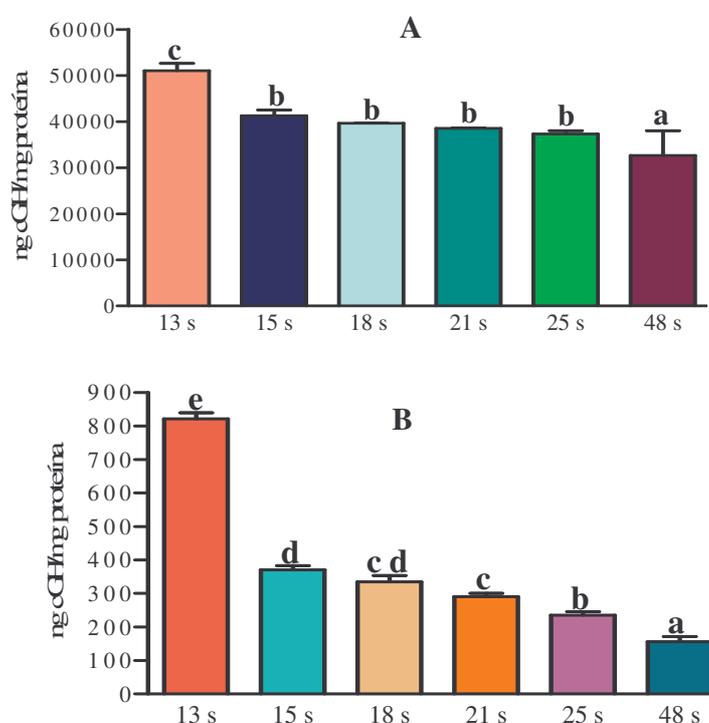


Figura 9. Concentración total de cGH en hipófisis (A) y oviductos (B) de diferentes edades, determinado por ELISA. Promedio \pm DE, n=5, letras diferentes sobre las barras indican diferencias significativas $p < 0.05$

6.2.2 Concentración de cGH en ovocitos.

La concentración de cGH en ovocitos se realizó en muestras de 90 µg de proteína total y todas las etapas (Ow-Osyf) mostraron diferencias significativas con respecto al control, mostrando más de 35 veces menos concentración de cGH que la hipófisis. Al realizar un análisis comparativo entre los estadios de desarrollo de los ovocitos se observó que la etapa que presentó mayor cantidad de hormona fue Ow (988 ng cGH/mg de proteína \pm 162) y tuvo diferencias significativas con las demás etapas. Mientras que desde Osyf hasta O2 no se observaron diferencias significativas (n=5) [Figura 10A].

6.2.3 Concentración de cGH en capas foliculares

El análisis comparativo de la concentración de GH en las capas foliculares se muestra en la Figura 10B. Todas las etapas de desarrollo folicular de las capas foliculares mostraron diferencias significativas con la concentración de hipófisis, la cual fue más de 200 veces mayor. En las etapas más indiferenciadas (Cw) se obtuvo el menor valor (27 ng cGH/mg de proteína \pm 9.03), que mostró diferencias con C5 (161.33 ng cGH/mg de proteína \pm 41), C4 (166.5 ng cGH/mg de proteína \pm 38) y C3 (82 ng cGH/mg de proteína \pm 19). Los valores más altos de concentración de hormona se obtuvieron en las etapas C5 y C4, las cuales mostraron diferencias significativas con todos los demás estadios de capas foliculares. Los valores disminuyeron en etapas de mayor maduración (preovulatorias) C3 y C2 (54.2 ng cGH/mg de proteína \pm 5.08).

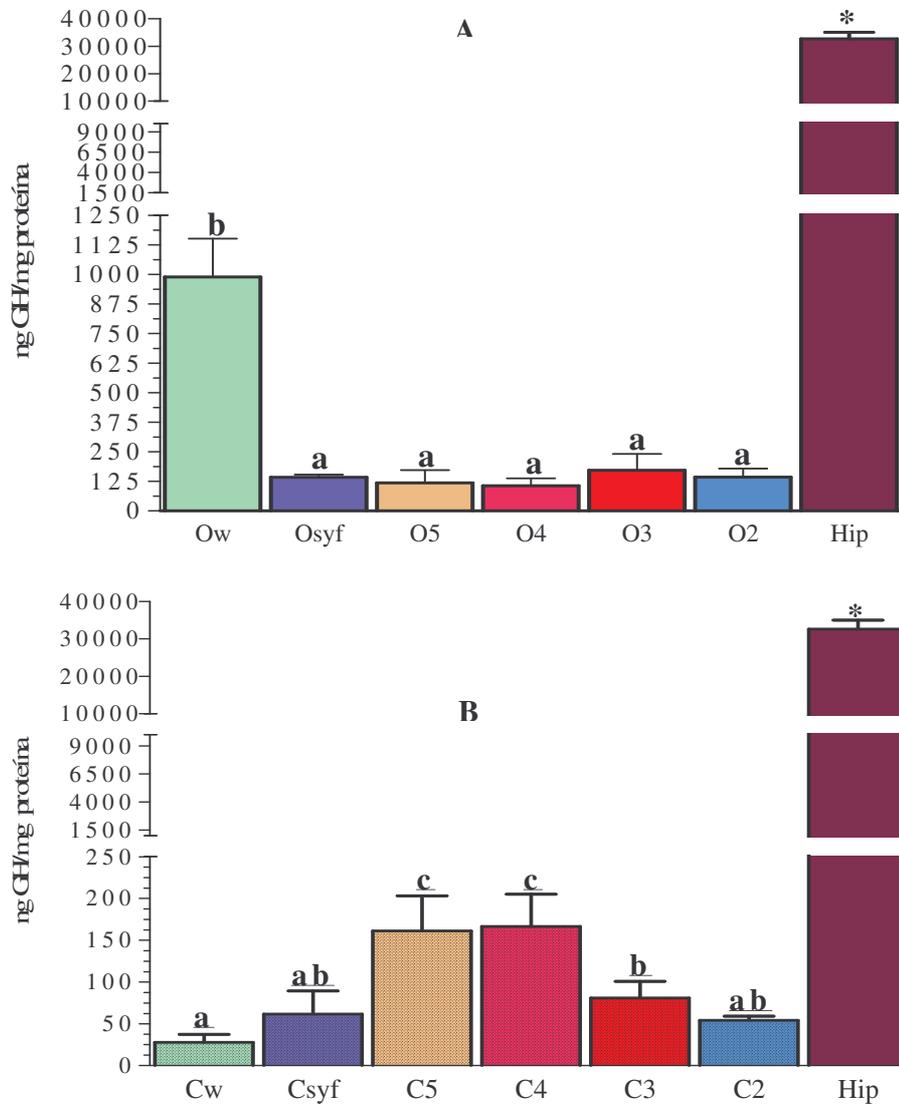


Figura 10. Concentración total de cGH en ovocitos (A) y capas foliculares (B), determinado por ELISA. Pollos hembra de 48 semanas. Promedio \pm DE, n=5, letras diferentes sobre las barras indican diferencias significativas de los ovocitos comparados entre ellos mismos, $p < 0.05$. El asterisco indica diferencia significativa de los ovocitos con la hipófisis, $p < 0.05$.

6.2.4 Contenido de cGH en oviductos.

Al analizar el peso [Figura 11A] y el contenido de cGH por tejido [Figura 11B] en el oviducto se observa que hay una relación directamente proporcional con el desarrollo. Con respecto al peso de oviductos, no hubo diferencias significativas entre las edades de 13 y 15 semanas, sin embargo estas dos edades si tuvieron diferencia estadística con el resto. El peso del oviducto a las 18 semanas tuvo diferencia significativa con todas las edades menos con 21 semanas. El valor más alto estuvo a las 48 semanas, siendo 2.4 veces mayor que el encontrado a las 25 semanas. El contenido de hormona en el oviducto mostró una tendencia a ser directamente proporcional al desarrollo, el menor contenido de cGH se observó a las 13 semanas y no tuvo diferencia significativa con el de 15 semanas, mientras que de 18 semanas a 21 semanas el contenido se incrementó 2.63 veces, de igual manera sucedió de 21 semanas a 25 semanas donde el incremento fue de 1.3 veces. El mayor contenido de cGH estuvo a las 48 semanas, éste mostró diferencia significativa con todas las edades de oviducto analizadas excepto con 25 semanas.

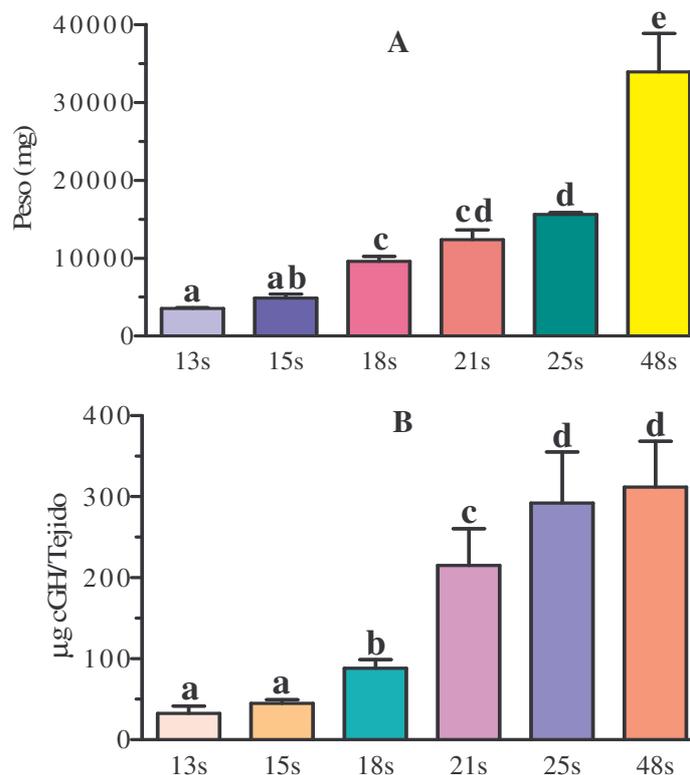


Figura 11. Comparación del peso de oviductos de diferentes edades (A) y el contenido de hormona de crecimiento en este tejido (B). Cada columna representa el promedio \pm DE, n=5, letras diferentes sobre las barras indican diferencias significativas, $p < 0.05$.

6.2.5 Contenido de cGH en ovocitos y capas foliculares.

El análisis entre los pesos y el contenido de hormona total en ovocitos y capas foliculares con respecto al encontrado en hipófisis se observa en la Figura 12 y 13. El peso de los ovocitos [Figura 12A] y las capas foliculares [Figura 13A] incrementó proporcionalmente con el desarrollo del folículo, mientras que el peso de la hipófisis (30.3 ± 1.9) fue hasta 199 veces menor con respecto a ovocitos en estadios más desarrollados (O2, 6034.2 ± 194.3) y 4 veces menor en capas de estadios más desarrollados (C2, 125.57 ± 26.7), cabe mencionar que no hubo diferencias significativas entre el peso de la hipófisis y el estadio C5. Se muestran también las diferencias significativas en el análisis de comparación del contenido de hormona del control hipofisiario con los ovocitos [Figura 12B], donde encontramos 2.4 veces más contenido en ovocitos desarrollados (O3, 82.63 ± 9.75 y O2 81.17 ± 25.5) que en hipófisis (34.0 ± 3.1). No se observó diferencia significativa entre el contenido de cGH en O5 con respecto al de hipófisis. El contenido de estadios como O_{syf} y O_w fue menor al encontrado en hipófisis. De manera similar sucedió al comparar el contenido de hipófisis con las capas foliculares [Figura 13B], donde se observó muy poco contenido en todos los estadios, el cual fue 90 veces menor en etapas de desarrollo (C3, 0.37 ± 0.09 y C2 0.36 ± 0.12).

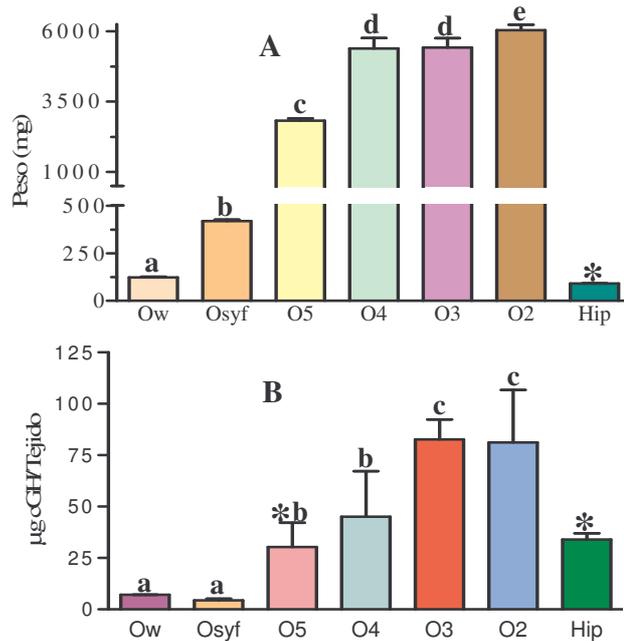


Figura 12. Comparación entre el peso de ovocitos (A) y el contenido de hormona de crecimiento en este tejido (B). Pollas hembras 48 semanas. Cada columna representa el promedio \pm DE, $n=5$, letras diferentes sobre las barras indican diferencias significativas entre los oviductos, $p<0.05$. El asterisco indica diferencias significativas con la hipófisis, $p<0.05$.

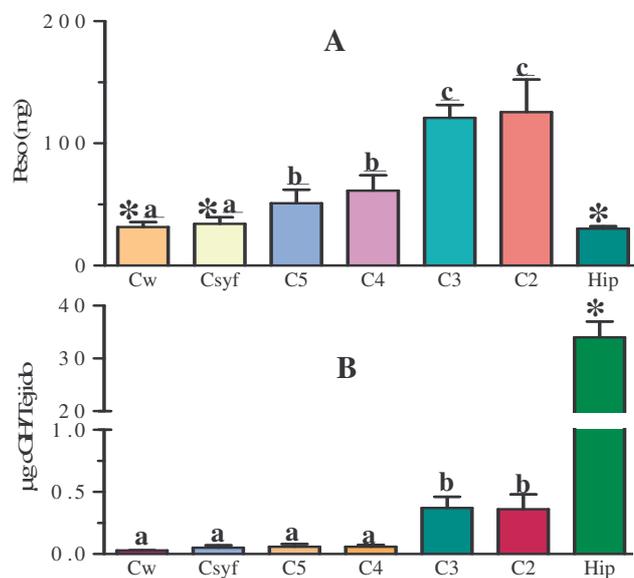


Figura 13. Comparación del peso de capas foliculares (A) y el contenido de hormona de crecimiento en este tejido (B). Pollas hembras 48 semanas. Cada columna representa el promedio \pm DE, $n=5$, letras diferentes sobre las barras indican diferencias significativas, $p<0.05$.

6.3 Análisis electroforético de las variantes moleculares de masa de cGH presente en tejidos del aparato reproductor de pollos hembras.

6.3.1 Patrón electroforético y “Western blot” de ovocitos.

En la Figura 14A se muestra un luminograma representativo del análisis electroforético y “Western blot” realizado con extractos de ovocitos (30 µg de proteína) en diferentes etapas de maduración y de forma comparativa, con un extracto hipofisiario. El patrón de variantes de GH-IR en la hipófisis correspondió a bandas de 20, 26, 45, 48 y 52 kDa (carril 8). En cambio los perfiles de bandas GH-IR en los ovocitos mostraron un patrón diferente: en el caso de Ow, O5y y O5 (estadios indiferenciados) se observaron bandas de 14, 17, 25, 26, 29, 30, 35, 40, 45, 48, 50 y 52 kDa. En los demás estadios de desarrollo, se observaron bandas de 26, 29, 35, 40, 45 y 52 kDa. El análisis de proporción relativa mostró diferencias significativas entre algunas etapas [Figura 15-16]. La variante de 14 kDa sólo se observó en los estadios Ow y O5y (etapa de prereclutamiento) y no estuvo presente en otros estadios. La banda de 17 kDa fue la más abundante en etapas tempranas de desarrollo del ovocito (Ow, O5y y O5) y desapareció en O4. La banda GH-IR de 25 kDa estuvo presente sólo en Ow y O5y. La variante de 26 kDa, que corresponde con el peso del monómero, estuvo presente en todos los estadios con poca proporción relativa, sin embargo, mostró diferencias significativas entre los folículos indiferenciados y preovulatorios. La variante de 30 kDa mostró una mayor proporción relativa en el estadio O5y comparada con la que ocupó en Ow. La banda de 29 kDa, que coincide con la variante glicosilada, incrementó su proporción relativa de O5 a O2; las variantes de 35, 40, 45, 48, 50 y 52 kDa tuvieron una mayor proporción relativa en etapas preovulatorias de O5 a O2.

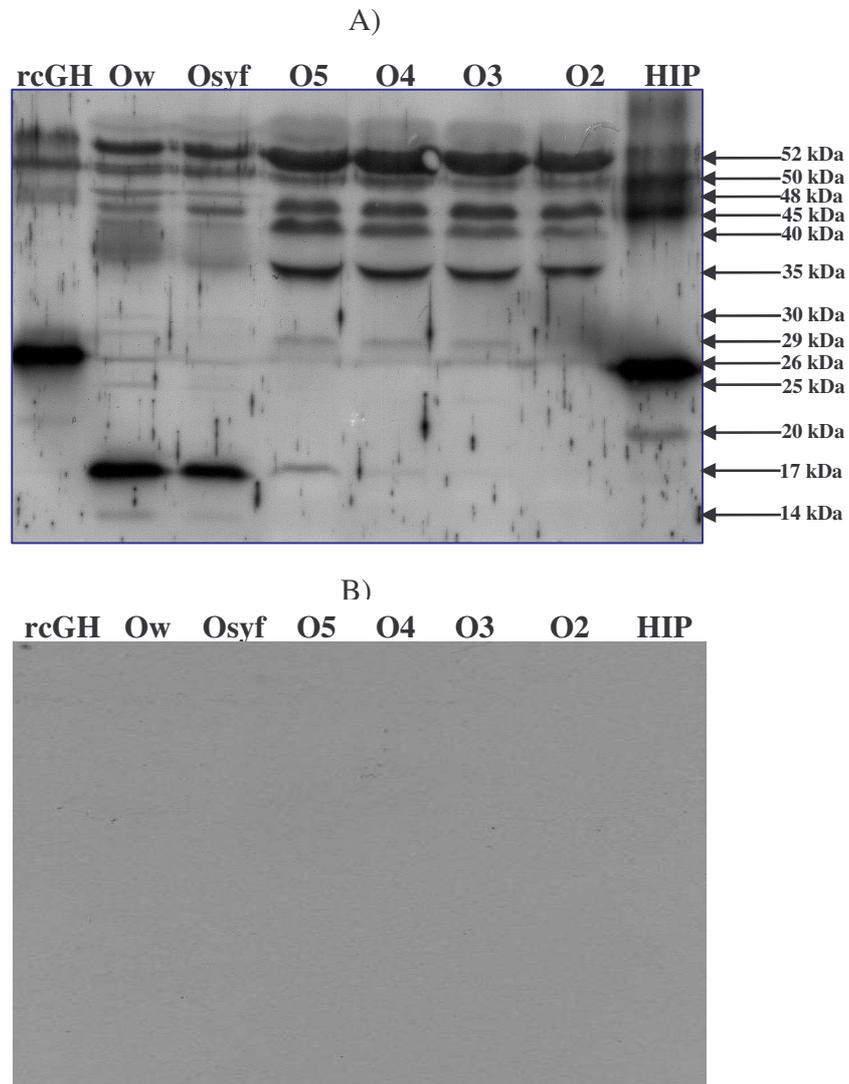


Figura 14. Análisis electroforético para el estudio de variantes de masa inmunoreactivas para hormona de crecimiento (GH-IR) en extractos de ovocitos. A) Se utilizaron extractos de ovocitos (30 μ g proteína total) en diferentes estadios de maduración (Ow-O2), pollos hembra de 48 semanas, n=5. Como control se usó un extracto hipofisiario (0.5 μ g de proteína total) o rcGH (0.1 μ g de proteína total). B) Control negativo realizado de igual manera pero con el anticuerpo policlonal contra cGH incubado con un exceso de rcGH (1 mg/500 μ l).

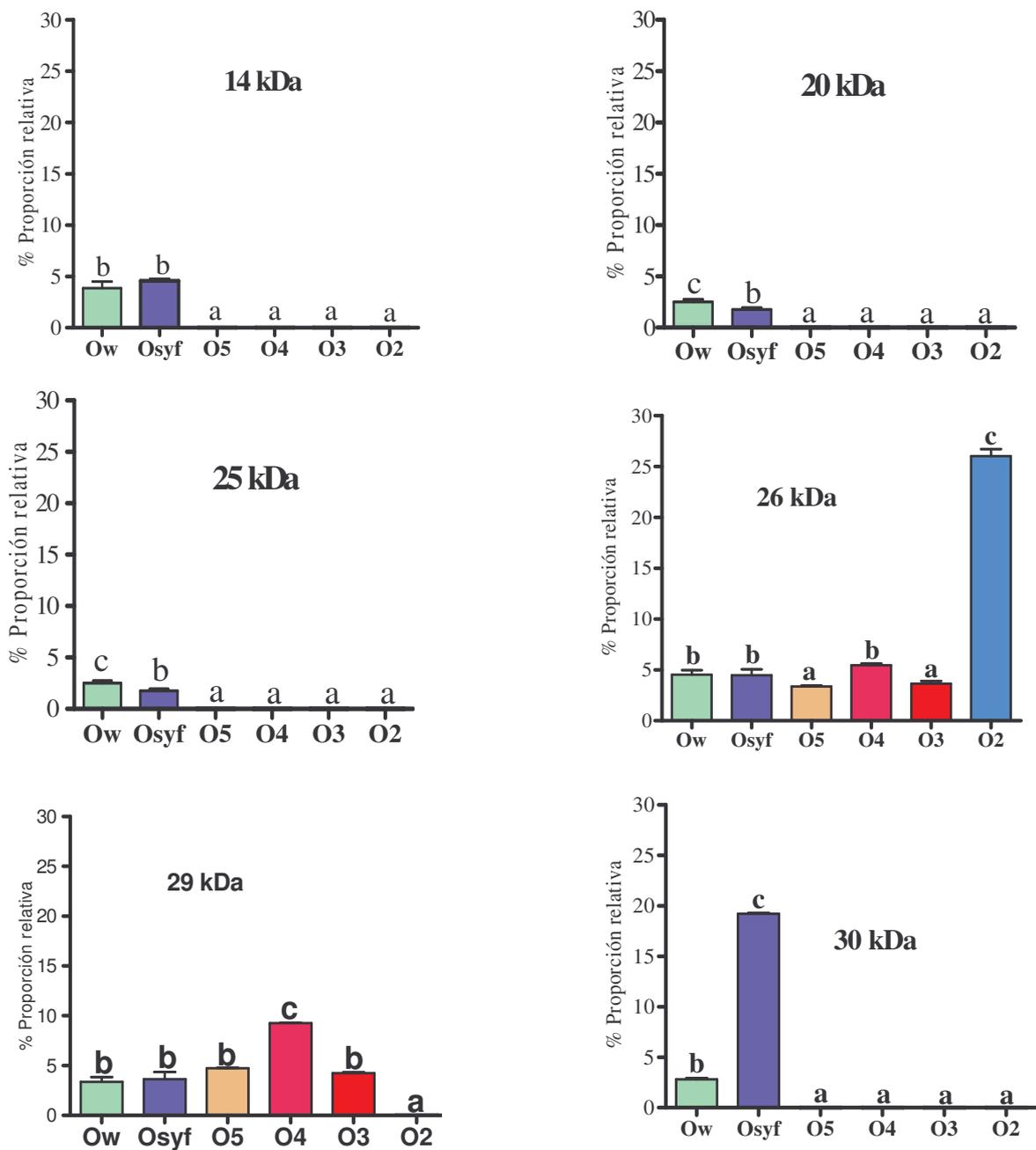


Figura 15. Proporción relativa de cada banda GH- IR (14 kDa, 20 kDa, 25 kDa, 26 kDa, 29 kDa y 30 kDa) observada en los ovocitos. Pollos hembras de 48 semanas. Letras diferentes indican diferencias significativas $p < 0.05$, promedio \pm DE, $n = 5$.

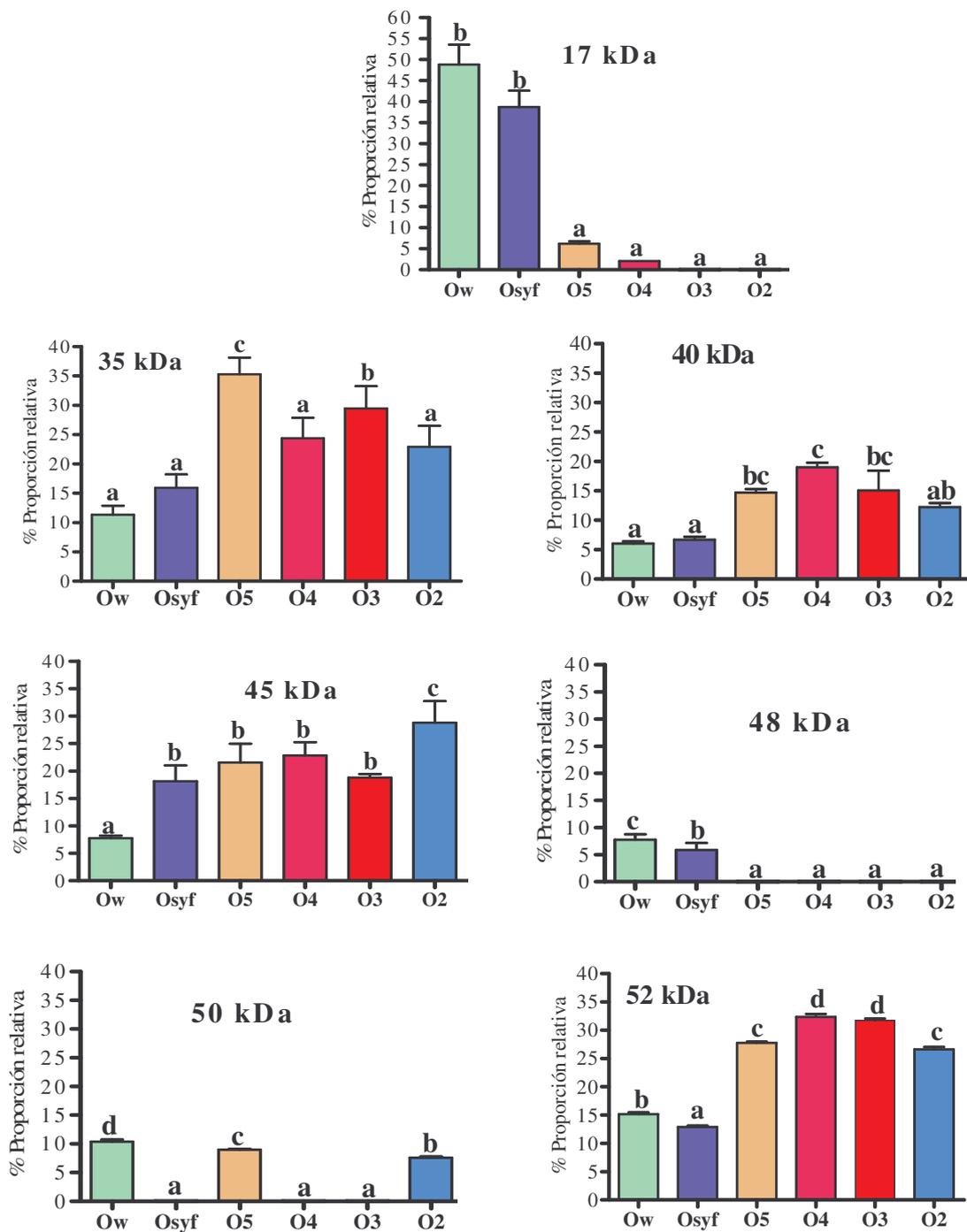


Figura 16. Proporción relativa de cada banda GH-IR (17 kDa, 35 kDa, 40 kDa, 45 kDa, 48 kDa, 50 kDa y 52 kDa) observadas en los ovocitos. Pollos hembras de 48 semanas. Letras diferentes indican diferencias significativas $p < 0.05$, promedio \pm DE, $n = 5$.

6.3.2 Patrón electroforético y “Western blot” para capas foliculares

En la Figura 17A se muestra un luminograma representativo del análisis electroforético y “Western blot” realizado con extractos de capas foliculares (30 µg de proteína) en diferentes etapas de maduración y de forma comparativa, con un extracto hipofisiario. El patrón de variantes de GH-IR en la hipófisis correspondió a bandas de 20, 26, 45, 48 y 52 kDa (carril 8). El patrón electroforético obtenido para las capas también fue diferente al de la hipófisis, se observaron bandas de 14, 17, 26, 29, 35, 40, 45, 48 y 52 kDa. Al analizar la proporción relativa que ocupó cada banda GH-IR [Figura 18-19] la variante de 14 kDa mostró un patrón constante en los estadios de reclutamiento y preovulatorios (C4-C2) pero no estuvo presente en etapas previas. La variante de 17 kDa que fue la más abundante y con una tendencia creciente a partir de los estadios indiferenciados Cw-Csyf, teniendo el pico mayor en el estadio C5, que es el punto donde comienza la preovulación, además de que su proporción disminuyó en las siguientes etapas de desarrollo, C4-C2. Estadísticamente esta variante mostró diferencias significativas tanto en los estadios previos al reclutamiento (Cw-Csyf) como en los de preovulación (C4-C2). Las variantes 26, 29 y 48 kDa se encontraron en todas las etapas de maduración excepto en el momento del reclutamiento, C5, mostraron diferencias significativas principalmente en estadios indiferenciados (Cw-Csyf) donde la proporción relativa fue mayor que en etapas preovulatorias (C4-C2). La variante de 35 kDa presentó una tendencia a aumentar dependiendo del estadio de maduración teniendo el pico mayor en C3, etapa a partir de la cual el folículo ya no sufre atresia y será ovulado cuando alcance el estadio F1. Las variantes de 40 y 45 kDa se encontraron en todos los estadios, además aumentó la proporción relativa de C4 a C2, aunque no hubo diferencias significativas entre estas etapas de desarrollo folicular. Por último la variante de 52 kDa estuvo en todas las etapas, teniendo un aumento en la proporción de los estadios Cw a C5, este último estadio mostró la mayor proporción mientras que en las etapas siguientes, C4 a C2, se observó una considerable disminución.

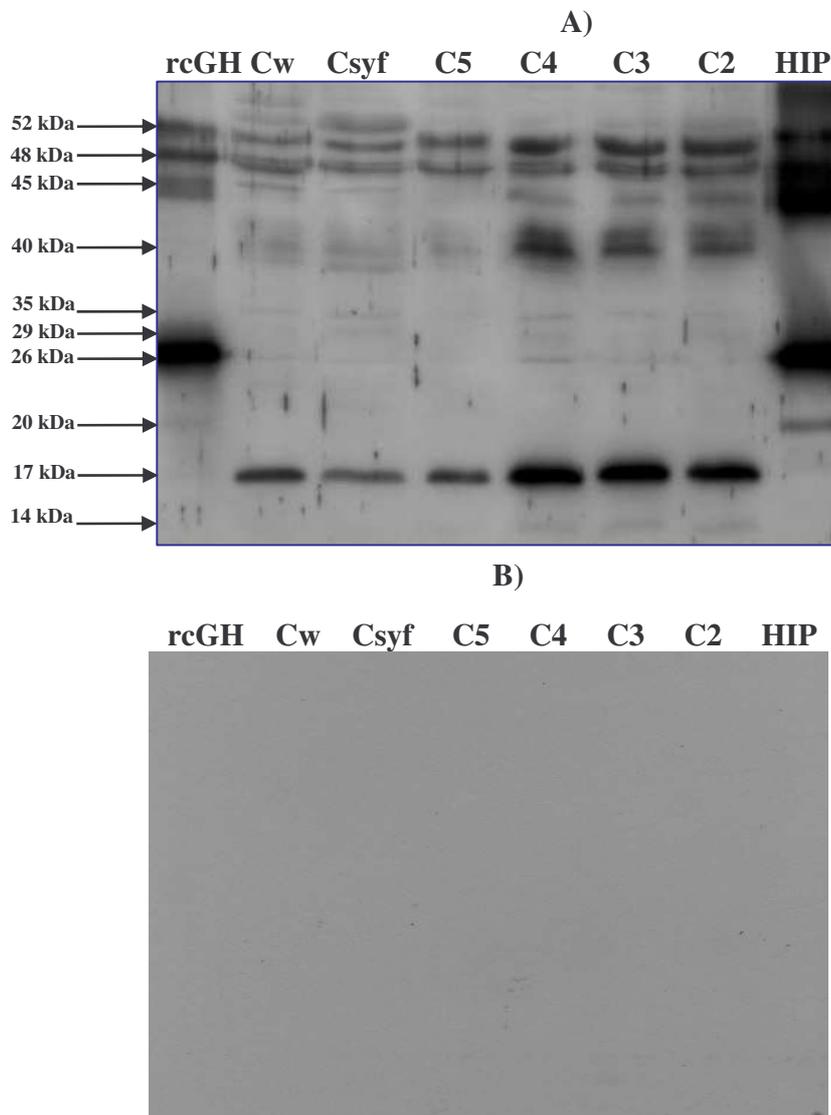


Figura 17. Análisis electroforético para el estudio de variantes de masa GH-IR en extractos de capas foliculares. A) Se utilizaron extractos de células foliculares (Cw-C2) provenientes de los ovocitos en diferentes estadios de maduración, pollos hembra de 48 semanas, $n=5$. Como control se usó un extracto hipofisiario (0.5 μg de proteína total) o rcGH (0.1 μg de proteína total). B) Control negativo realizado de igual manera pero con el anticuerpo policlonal contra cGH incubado previamente con un exceso de rcGH (1 mg/500 μl).

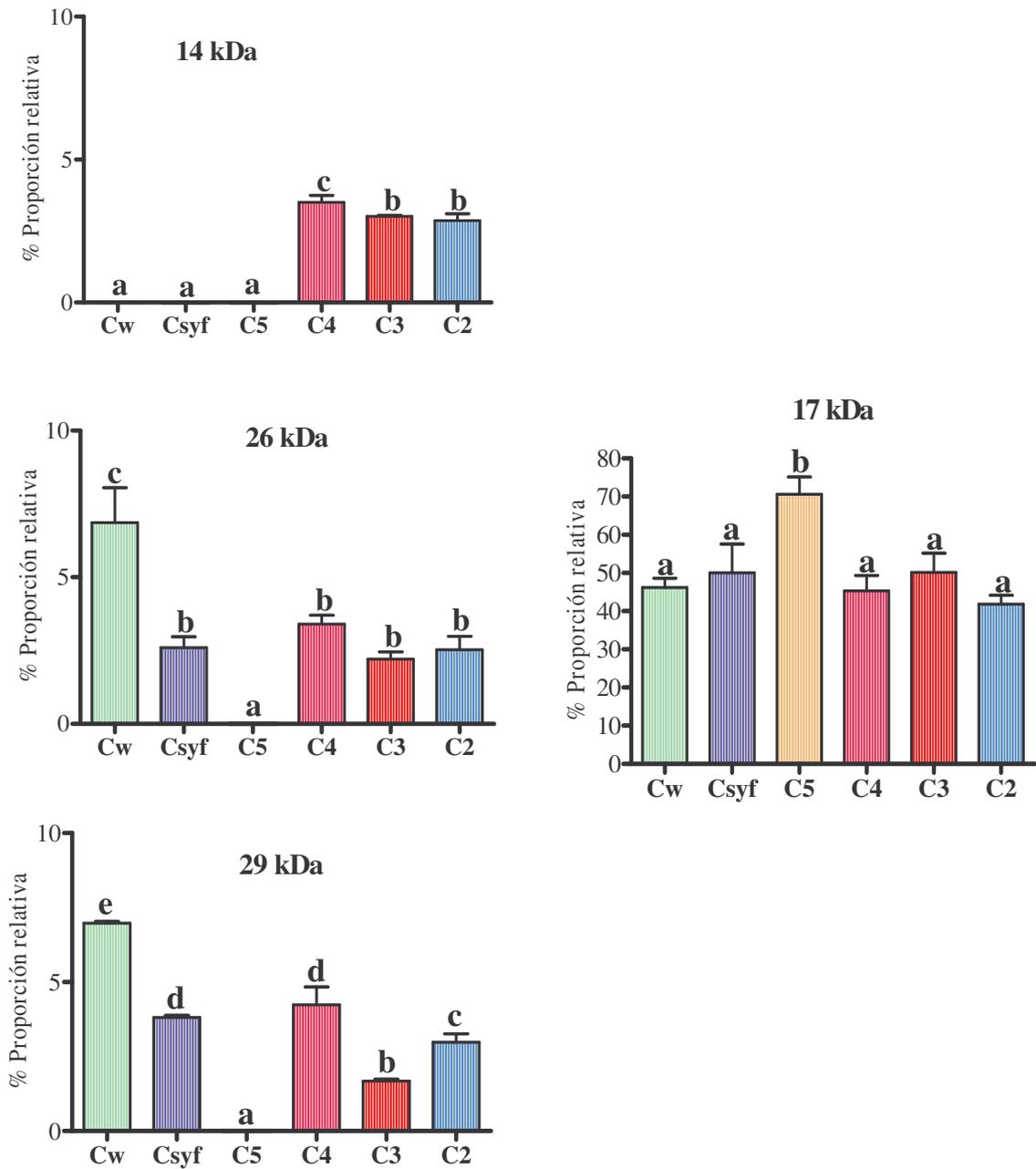


Figura 18. Proporción relativa de cada banda GH-IR (14 kDa, 17 kDa, 26 kDa y 29 kDa) observada en capas foliculares provenientes de diferentes estadios de maduración (Cw-C2). Pollos hembras de 48 semanas. Letras diferentes indican diferencias significativas $p < 0.05$, promedio \pm DE, $n = 5$.

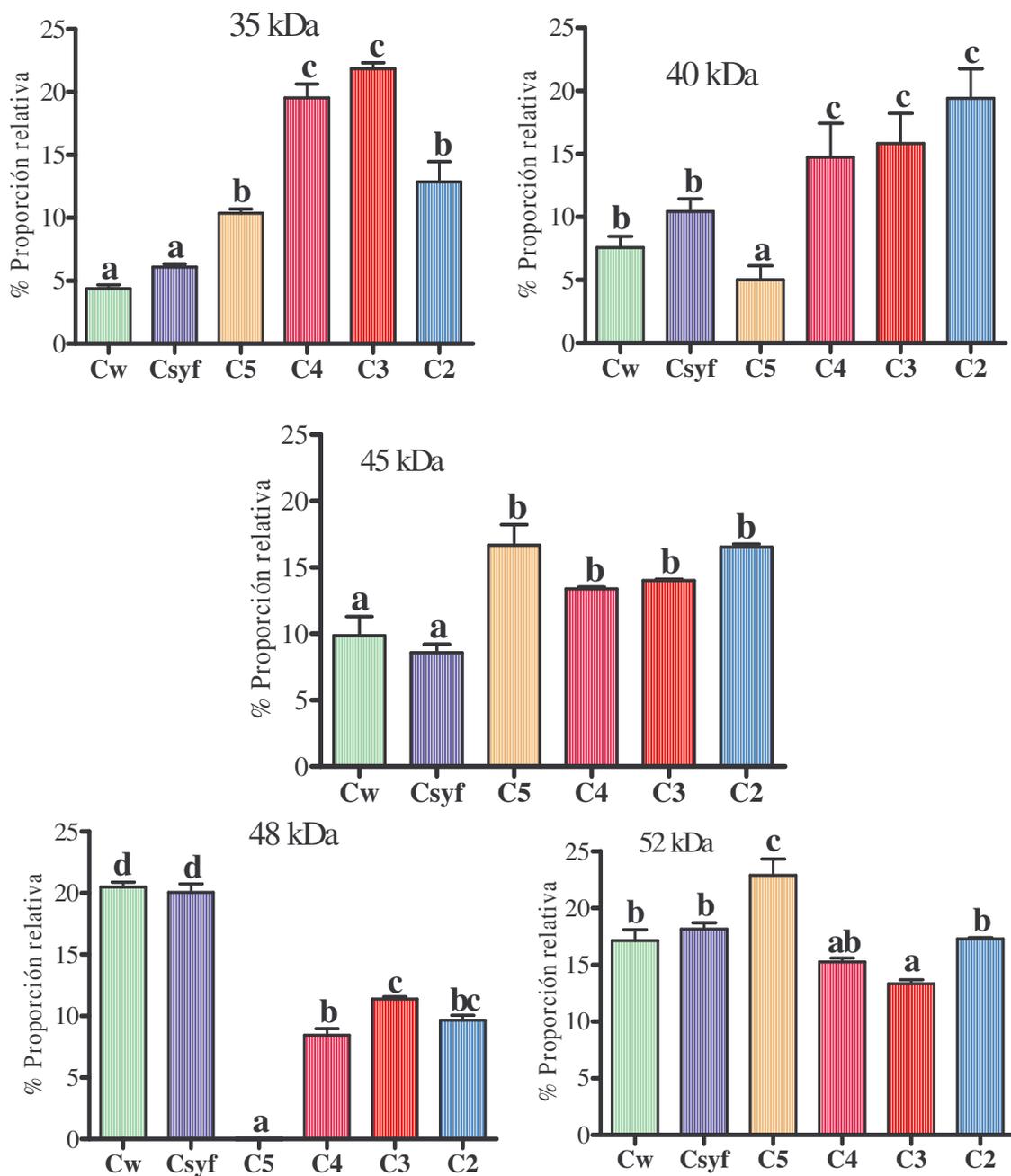


Figura 19. Proporción relativa de cada banda GH-IR (35 kDa, 40 kDa, 45 kDa, 48 kDa y 52 kDa) observada en las capas foliculares. Pollos hembras de 48 semanas. Letras diferentes indican diferencias significativas $p < 0.05$, promedio \pm DE, $n = 5$.

6.4 Extracción de ARN total y RT-PCR de oviducto, capas foliculares e hipófisis.

Al purificar el ARN total con Trizol proveniente de los tejidos del aparato reproductor de pollos hembra de 48 semanas, oviducto, capas foliculares (C5) e hipófisis de 48 semanas. [Figura 20], se observaron dos bandas que corresponden a los ARN ribosomales (18S y 5S). Después de obtener el ARN total se utilizaron oligonucleótidos diseñados para flanquear el marco de lectura abierto del gen de la GH de pollo (Render y cols., 1995a) y se logró amplificar por RT-PCR una banda de aproximadamente 690 pares de bases que migró de forma semejante para las muestras provenientes de hipófisis (H), oviducto (O) y capas foliculares, estadio 5 (C) [Figura 21]. Además, en la figura se observan los controles negativos utilizados para este experimento (ver materiales y métodos).

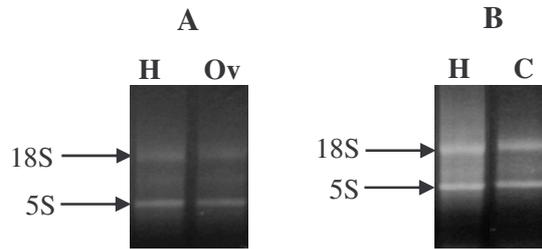


Figura 20. Luminograma representativo de las bandas obtenidas de la purificación de RNA total. A) RT a partir de 2 μ g de RNA total extraído con Trizol, 100 mg de Hipófisis (H) y 200 mg de Oviducto (Ov). Edad 48 semanas; B) RT a partir de 2 μ g de RNA total extraído con Trizol, 100 mg de Hipófisis (H) y 100 mg de Capas foliculares (C), estadio C5. Edad 48 semanas, n=3.

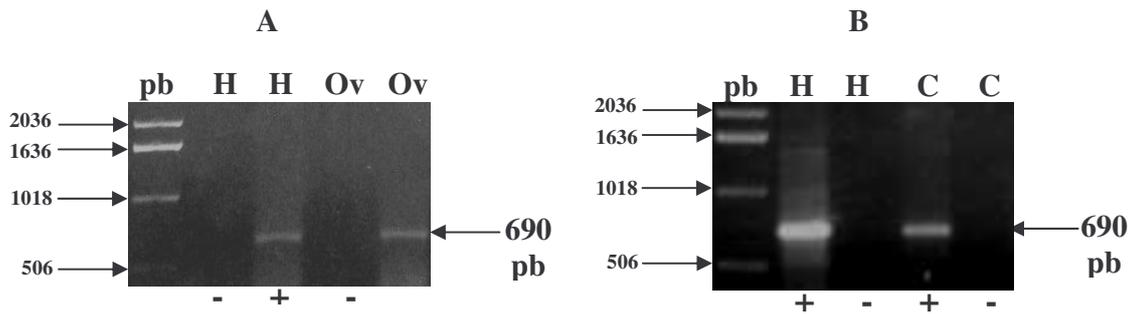


Figura 21. Análisis por PCR a partir del RT utilizando 10 μ l de ADNc y 0.5 μ l oligonucleótidos que flanquean el marco de lectura abierto de la cGH, CRE1 (reverso) y CRE2 (directo). A) Hipófisis (H), Oviducto (Ov); B) Hipófisis (H), Capas foliculares (C), estadio C5. Los controles negativos están representados por (-) mientras que las muestras positivas por (+). 48 semanas, n=3.

6.5 Purificación, clonación y secuenciación del ADNc del gen que codifica para cGH en oviducto, capas foliculares e hipófisis.

A partir del producto de PCR en el gel de agarosa, se purificó el ADNc proveniente de oviducto, capas foliculares e hipófisis. En la fotografía representativa [Figura 22A] se observa que la banda presentó aproximadamente 690 pb. Al tener el ADNc puro se procedió a insertar este fragmento en un vector, que luego fue clonado en bacterias. Al purificar el ADN plasmídico se generó una banda por PCR de 4634 pb [Figura 22B]. Se corroboró que el fragmento de ADN problema estuviera insertado en el vector haciendo una digestión con la enzima de restricción, EcoRI [Figura 22C]; aquí se obtuvieron dos bandas, una de aproximadamente 3954 pb, la cual corresponde al vector y otra de 690 pb que coincide con el tamaño del fragmento correspondiente al marco de lectura abierto del gen que codifica para la hormona de crecimiento de aves.

Después de haber comprobado que el fragmento de ADN problema estaba insertado dentro del ADN plasmídico, éste se mandó secuenciar a la Unidad de Proteogenómica del Instituto de Neurobiología. La secuencia obtenida para el control de hipófisis [Figura 23] mostró una similitud del 100 % al compararse con la reportada por Tanaka et al., 1992 [Figura 24]. La secuencia obtenida para el oviducto [Figura 25] presentó una similitud del 99.9% (n=3) con la secuencia del ADNc del gen de la hormona de crecimiento de pollo reportada por Render et al., 1995a en hipófisis, la identidad con esta misma secuencia fue de 689/690 pb [Figura 26]; esto también se repitió al compararla con otras secuencias del gen cGH hipofisiaria como con las reportadas por Zhvirblis et al., 1987; Takeuchi et al., 2001; Tanaka et al., 1992 y Baudet et al., 2003. El análisis de la secuencia mostró una mutación silenciosa en la posición 231, A por C, esta modificación al traducir a proteína codificó el mismo aminoácido, un ácido aspártico, Asp (D), en la posición 65 de la estructura primaria [Figura 26].

La secuencia obtenida para las capas foliculares [Figura 27] presentó una identidad del 100% (n=3) [Figura 28] con la secuencia reportada en hipófisis (Tanaka et al., 1992, Render et

al., 1995^a, Takeuchi et al., 2001); en tejido neural de embrión de pollo (Harvey et al., 2001) y en retina de pollo (Baudet et al., 2003).

Al traducir a proteína hipotética y compararla con las proteínas de GH reportadas, por los autores anteriores, se obtuvo una similitud del 100 % sin ninguna mutación. [Figura 28].

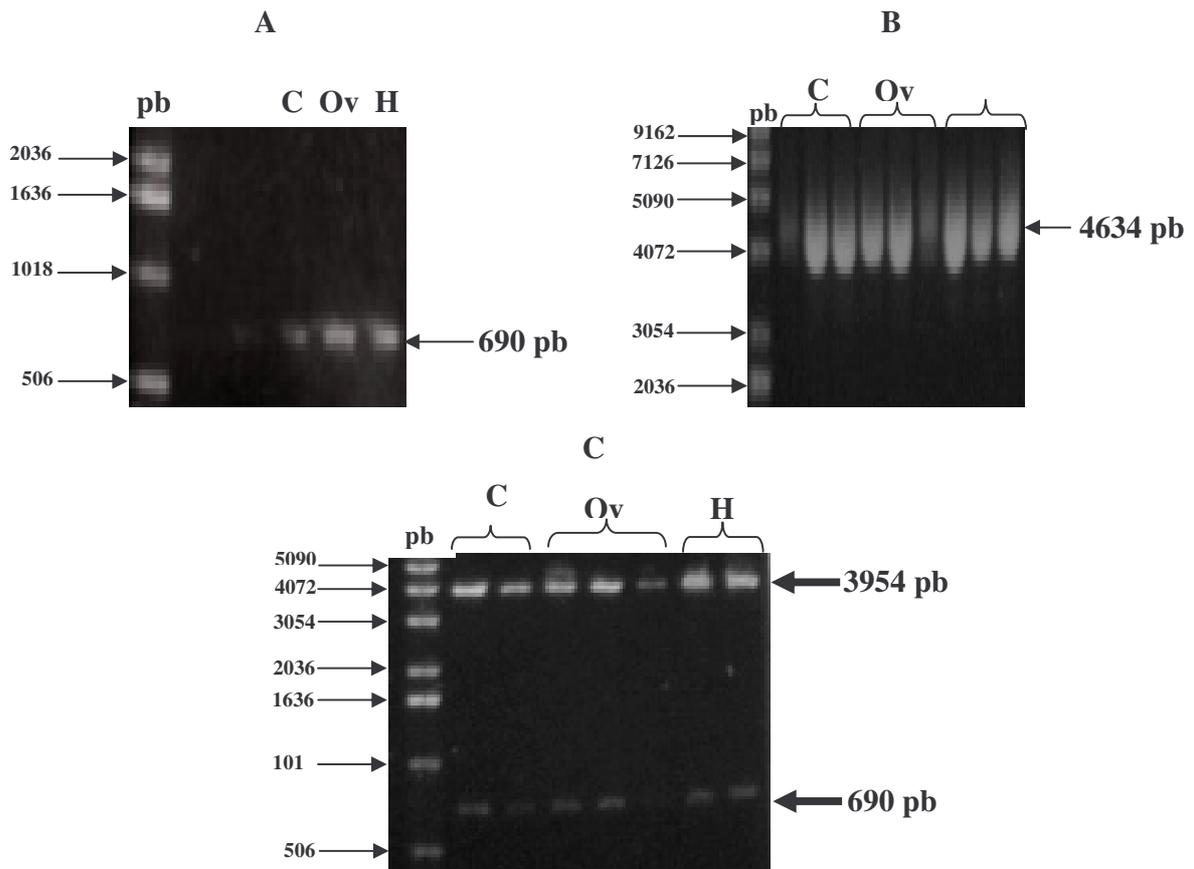


Figura 22. A) Análisis de ADNc (690 pb) purificado a partir del RT-PCR de Oviducto (Ov), Capas foliculares (C) e Hipófisis (H); B) 3 μ l de cada clon de *E. coli* transformados con el vector (TOPO) más el inserto proveniente de Ov y C (producto vector+inserto = 4634 pb); C) 3 μ l de la digestión del ADN plasmídico de cada clon con EcoR1 (vector=3954 pb e inserto = 690 pb), n=3.

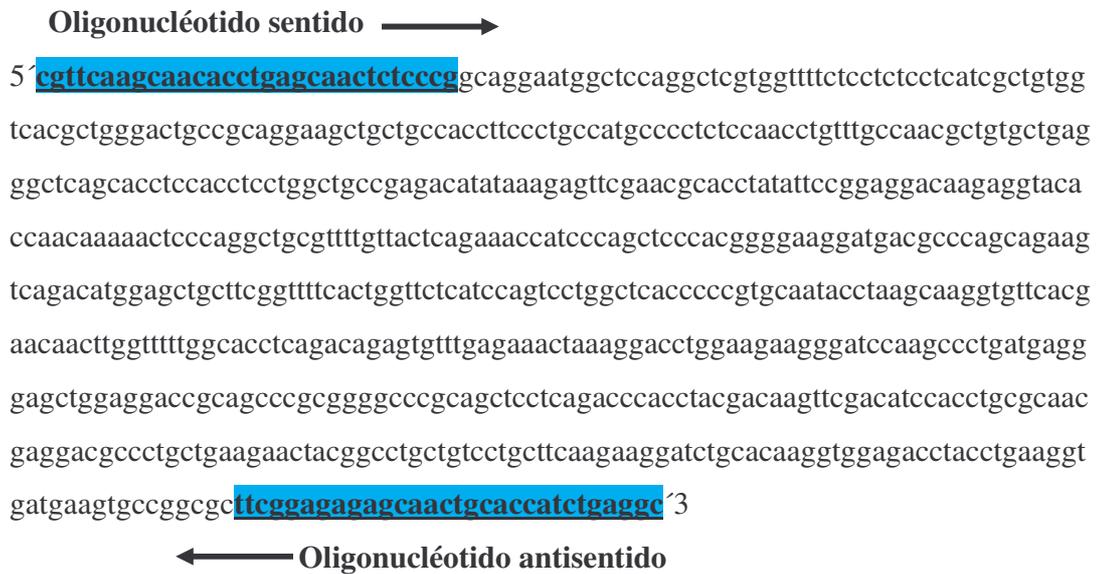


Figura 23. Secuencia para hipótesis amplificada a partir de DNA plasmídico clonado en bacterias *E. coli* competentes. Se utilizaron oligonucleótidos que flanquean el marco de lectura abierto de la secuencia del gen que codifica para la cGH (Render et al., 1995a). El análisis se realizó en un secuenciador automático ABI PRISM 310, Genetic Analyzer (*Applied Biosystems*) en la Unidad de Proteogenómica del Instituto de Neurobiología.

Oligonucléotido sentido →

5' **cgttcaagcaacacctgagcaactctccg**gcaggaatggctccaggctcgtggtttctcctcctcatcgcgtgtg
 tcacgctgggactgccgcaggaagctgctgccacctccctgccatgccctctccaacctgttgccaacgctgtgctgag
 ggctcagcacctccacctcctgctgctgccgagacataaagagttcgaacgcacctatattccggaggacaagaggtaca
 ccaacaaaaactcccaggctgcgtttgttactcagaaacctcccagctcccacggggaaggatgacgcccagcagaag
 tcagacatggagctgcttcggttttactggttctcatccagtctggctcacccccgtgcaatacctaagcaaggtgttcag
 aacaacttggttttggcacctcagacagagtggttgagaaactaaaggacctggaagaaggatccaagccctgatgagg
 gagctggaggaccgcagcccgcggggcccgcagctcctcagaccacctacgacaagttcgacatccacctgcgcaac
 gaggacgccctgctgaagaactacggcctgctgtcctgcttcaagaaggatctgcacaaggtggagacctacctgaaggt
 gatgaagtccggcgc**tcggagagagcaactgcaccatctgaggc**3'

← **Oligonucléotido antisentido**

Figura 25. Secuencia para oviducto amplificada a partir de DNA plasmídico clonado en bacterias *E. coli* competentes. Se utilizaron oligonucleótidos que flanquean el marco de lectura abierto de la secuencia del gen que codifica para cGH (Render et al., 1995a). El análisis se realizó en un secuenciador automático ABI PRISM 310, Genetic Analyzer (*Applied Biosystems*) en la Unidad de Proteogenómica del Instituto de Neurobiología. En azul se encuentra la diferencia observada a nivel de nucleótidos.

```

          -30      -20      -10      1      10      20
          |        |        |        |        |        |
GH Ovi   1  cgttcaagcaacacctgagcaactctcccggcaggaatggctccaggctcgtggttttct 60
GH Hip   1  cgttcaagcaacacctgagcaactctcccggcaggaatggctccaggctcgtggttttct
          M A P G S W F S

GH Ovi   61  cctctcctcatcgctgtggtcacgctgggactgccgcaggaagctgctgccaccttccct 120
GH Hip   61  cctctcctcatcgctgtggtcacgctgggactgccgcaggaagctgctgccaccttccct
          9  P L L I A V V T L G L P Q E A A A T F P

GH Ovi   121  gccatgccctctccaacctgtttgccaacgctgtgctgagggctcagcacctccacctc 180
GH Hip   121  gccatgccctctccaacctgtttgccaacgctgtgctgagggctcagcacctccacctc
          29  A M P L S N L F A N A V L R A Q H L H L

GH Ovi   181  ctggctgccgagacatataaagagttcgaacgcacctatattccggaggaagaggttac 240
GH Hip   181  ctggctgccgagacatataaagagttcgaacgcacctatattccggaggaagaggttac
          49  L A A E T Y K E F E R T Y I P E D Q R Y

GH Ovi   241  accaacaactcccaggctgcgctttgttactcagaacatcccagctcccacgggg 300
GH Hip   241  accaacaactcccaggctgcgctttgttactcagaacatcccagctcccacgggg
          69  T N K N S Q A A F C Y S E T I P A P T G

GH Ovi   301  aaggatgacgccagcagaagtgcagacatggagctgcttcggttttctcgttctcatc 360
GH Hip   301  aaggatgacgccagcagaagtgcagacatggagctgcttcggttttctcgttctcatc
          89  K D D A Q Q K S D M E L L R F S L V L I

GH Ovi   361  cagtcctggctcacccccgtgcaatacctaagcaaggtgttcacgaacaacttggtttt 420
GH Hip   361  cagtcctggctcacccccgtgcaatacctaagcaaggtgttcacgaacaacttggtttt
          109  Q S W L T P V Q Y L S K V F T N N L V F

GH Ovi   421  ggcacctcagacagagtgtttgagaaactaaaggacctggaagaaggatccaagcctg 480
GH Hip   421  ggcacctcagacagagtgtttgagaaactaaaggacctggaagaaggatccaagcctg
          129  G T S D R V F E K L K D L E E G I Q A L

GH Ovi   481  atgagggagctggaggaccgcagcccgggggcccgagctcctcagaccacctacgac 540
GH Hip   481  atgagggagctggaggaccgcagcccgggggcccgagctcctcagaccacctacgac
          149  M R E L E D R S P R G P Q L L R P T Y D

GH Ovi   541  aagttcgacatccacctgcgcaacgaggacgcctgctgaagaactacggcctgctgtcc 600
GH Hip   541  aagttcgacatccacctgcgcaacgaggacgcctgctgaagaactacggcctgctgtcc
          169  K F D I H L R N E D A L L K N Y G L L S

GH Ovi   601  tgcttcaagaaggatctgcacaaggtggagacctacctaaggtgatgaagtgccggcgc 660
GH Hip   601  tgcttcaagaaggatctgcacaaggtggagacctacctaaggtgatgaagtgccggcgc
          189  C F K K D L H K V E T Y L K V M K C R R

GH Ovi   661  ttcggagagagcaactgcaccatctgaggc 690
GH Hip   661  ttcggagagagcaactgcaccatctgaggc
          209  F G E S N C T I ^^^

```

Figura 26. Análisis comparativo de las secuencias codificantes de GH en hipófisis y oviducto. La diferencia a nivel de nucleótidos en un codón se observa en letra azul dentro del cuadro. En color negro (arriba del cuadro) y rojo se encuentra el aminoácido codificado por ese codón, en la secuencia hipofisiaria y la de oviducto, respectivamente. Edad 48 semanas, n=3.

Oligonucleótido sentido →

5' **cggtcaagcaacacctgagcaactctccc**gcaggaatggctccaggctcgtggtttctcctctcctcatcgctgtggtcagctgggactgccgcaggaagctgctgccaccttcctgccatgccctctccaacctgtttgccaacgctgtgctgaggctcagcacctccacctcctggctgccgagacatataaagagttcgaacgcacctatattccggaggacaagaggtacacaaacaaaactcccaggctcggtttgttactcagaaacatcccagctcccacggggaaggatgacgccagcagaagtcagacatggagctgcttcggttttactggttctcatccagtcctggctcaccctgcaatacctaagcaaggtgtcacgaaacttggttttggcacctcagacagagtgttgagaaactaaaggacctggaagaaggatccaagcctgatgaggagctggaggaccgcagcccgcggggcccgcagctcctcagaccacctacgacaagttcgacatccacctgcgcaacgaggacgccctgctgaagaactacggcctgctgtcctgcttcaagaaggatctgcacaaggtggagacctacctgaaggtgatgaagtgccggcgc**tcggagagagcaactgcacatctgaggc**3'

← **Oligonucleótido antisentido**

Figura 27. Secuencia para capas foliculares amplificada a partir de DNA plasmídico clonado en bacterias *E. coli* competentes. Se utilizaron oligonucleótidos que flanquean el marco de lectura abierto de la secuencia del gen que codifica cGH (Render et al., 1995^a). El análisis se realizó en un secuenciador automático ABI PRISM 310, Genetic Analyzer (*Applied Biosystems*) en la Unidad de Proteogenómica del Instituto de Neurobiología.

7. DISCUSIÓN

En este trabajo se demostró la existencia de proteína GH-IR por ELISA en tejidos del sistema reproductor de pollos hembras. La medición de la concentración total de GH en estos tejidos mostró que dicha proteína tiene sus valores más elevados en los folículos menos diferenciados. La hormona de crecimiento no es clásicamente considerada una hormona reproductiva, sin embargo existen evidencias de que esta hormona afecta directamente la esteroidogénesis, la gametogénesis, la diferenciación gonadal, así como la secreción de las gonadotropinas y la responsividad de sus receptores específicos, LHR y FSHR. La presencia de la hormona de crecimiento a nivel de proteína y de ácidos nucleicos en localizaciones extrahipofisarias ha sido reportada en diversas especies como en células ganglionares en retina de rata (Sanders et al., 2006), en cerebro de pollo (Harvey et al., 2002), en pulmón de ratas (Beyea et al., 2005a), en pulmón de embriones de pollo (Beyea et al., 2005b), en tejidos linfoides de pollo (Luna et al., 2005), en espermatogonias y espermatoцитos primarios en testículo de pollo (Harvey et al., 2004a), entre otros. En este trabajo de tesis se observó que los tejidos del aparato reproductor femenino de pollos [oviducto, ovocitos y células de la granulosa y teca (capas foliculares)], expresan el ARNm de GH y contienen a la proteína. La concentración total de GH en estos tejidos mostró que en el caso de los ovocitos fue significativamente mayor en los folículos menos diferenciados, ($p < 0.05$) en comparación con los estadios siguientes. Esto sugiere que la GH estimula la población folicular selectivamente, de tal manera que estimula el aumento del número de folículos preantrales (Gong et al., 1993), que posiblemente serían el equivalente al estadio Fw de pollo. En este sentido, existen datos, que indican que la GH es efectiva en mujeres menopáusicas y en otras especies durante la ausencia de gonadotropinas, por lo que tal vez la hormona podría actuar independientemente (Lanzone et al., 1992) de las hormonas reproductivas clásicas. Con respecto a las células de la granulosa y la teca, provenientes de estos ovocitos, se encontró que la mayor concentración de GH estuvo presente en etapas intermedias de diferenciación, correspondientes a folículos reclutados (Csyf-C5) y a una etapa de mayor desarrollo (C4). Sin embargo, disminuyó de manera considerable en las etapas preovulatorias (C3-C2) así como en el primer estadio de desarrollo (Cw). Estos datos permiten sugerir que la GH está participando en los procesos de diferenciación y desarrollo de las células de la teca y la granulosa en pollo. Con base en

estudios previos es probable que el papel de la GH sea aumentar la expresión de receptores a estradiol y progesterona y de igual manera, la capacidad esteroidogénica necesaria para el crecimiento y desarrollo folicular (Gong et al., 1994; Sirotkin AV, 1996). Debido a que en numerosos estudios en mamíferos se ha demostrado un incremento en la producción de esteroides después de la administración de GH *in vivo* o *in vitro* (Hull y Harvey, 2001), es decir la hormona puede inducir esteroidogénesis directamente o bien a través de potenciar la acción de las gonadotropinas (Jia et al., 1986). Otra manera de explicar esto es que la acción de GH sea a través de su mediador clásico, el IGF-I que ha sido reportado en ovario de muchas especies, ya que es conocido que el factor de crecimiento insulinoide actúa también como un mediador de la acción de las gonadotropinas, estimulando la proliferación y diferenciación de las células que rodean al ovocito y aumentando la esteroidogénesis a nivel folicular (Chandrashekar et al., 2004). También se han detectado en ovario humano las IGFBPs (proteínas transportadoras de IGF), éstas últimas teniendo un control muy fino sobre la función ovárica, por ejemplo el IGFBP-4 sobre la regulación de la secreción de estradiol inducido por FSH (Rivera y Fortune, 2003); el IGFBP-6 sobre la reducción de la secreción de LH (Bienvenu et al., 2004); y el IGFBP-1 sobre la reproducción, la cual disminuye cuando se sobreexpresa el gen de esta proteína en ratón hembra, debido a que disminuye la tasa de ovulación (Froment, et al., 2002). Estas evidencias podrían implicar la participación del IGF-I en el desarrollo de las capas foliculares de manera local siendo entonces la GH orquestadora de que el IGF-I esté presente y lleve a cabo su acción sobre la proliferación y la diferenciación de las células mencionadas (Mazerbourg et al., 2003). Las etapas correspondientes a C5 y C4 representan el momento culminante y crítico de la reclutación folicular, donde un folículo se convierte en dominante para poder ser ovulado, de lo contrario se convierte en atrésico y muere. En este evento, además de la carga esteroidogénica necesaria y de la participación de las hormonas clásicas, un secretagogo de la GH, la Ghrelina, encontrada en granulosa y teca en folículos de pollo (Sirotkin et al., 2006) juega un papel importante. Los factores del eje hipotálamo-hipófisis-gónadas, entre ellos la hormona de crecimiento, hacen posible que la granulosa y la teca maduren y el folículo ovule, adquiriendo las condiciones necesarias para poder ser fertilizado.

En el ovario desde hace ya algunas décadas se ha descrito la presencia de hormona de crecimiento y su receptor (Spiliotis, 2003) así como también en el oviducto de las aves

(Yoshimura et al., 2005). En el caso del oviducto la concentración mayor de GH fue observada en una etapa previa a la pubertad (13 semanas) y disminuyó conforme avanzó el desarrollo del animal, teniendo el valor menor a las 48 semanas, que corresponde a la etapa de mayor producción de huevos. Sin embargo, al normalizar por el peso del órgano, estos datos se invierten cuando se obtiene el contenido total de cGH por tejido, por lo que el mayor contenido de hormona se encontró a las 48 semanas. Se sabe que la GH tiene una participación importante en la aparición de la pubertad, al menos en mamíferos, ya que se ha observado que ésta se retarda en mujeres jóvenes que presentan deficiencia de GH, disfunción neurosecretora de GH (Spiliotis et al., 1984) o síndrome de Laron (Laron y Klinger, 1994). Si se genera una deficiencia de GH durante la pubertad, este evento ocasiona una interrupción que sólo se revierte a través de un tratamiento con la hormona. Se sabe que la GH y el IGF-1, en compañía de estrógenos, tienen una influencia marcada en esta etapa de la vida a través de su efecto sobre la maduración de la placa de crecimiento en los huesos. En personas normales el pico de hormona se amplía entre 2 y 3 veces, si hay retardo de la pubertad los niveles de GH se mantienen como en la etapa previa a la pubertad (Spiliotis, 2003). Por otra parte, la Ghrelina (péptido de 28 kDa sintetizado esencialmente en el estómago, regulador del control del apetito y uno de los ligandos principales del receptor de hormona de crecimiento) no sólo está en el hipotálamo, pulmón e intestino de las aves sino también, a nivel proteína y ARNm, en la región infundíbulo-magno del oviducto de codorniz, durante la etapa de preovulación en la madurez sexual (Yoshimura et al., 2005). Esto último se correlaciona con la presencia de la GH en la misma parte del oviducto (infundíbulo) a las 48 semanas, además de que posiblemente la Ghrelina pudiera estar regulando el alto contenido de hormona en esta edad, por la estimulación de la secreción de GH como uno de los efectos más significativos que tiene en aves (Baudet et al., 2003) y mamíferos (Barreiro y Tena-Sempere, 2004).

Se determinó que la cGH presente en estos tejidos mostró un patrón de heterogeneidad molecular diferente al de la hipófisis, ya que se observaron bandas-IR que van de 14 kDa a 52 kDa, siendo la de 17 kDa la variante mayoritaria, mientras que para la hipófisis las isoformas reportadas son el monómero 26 kDa, el dímero 52 kDa, la variante glicosilada 29 kDa y un fragmento 15 kDa (Arámburo et al., 2000; Arámburo et al., 2001 y Berumen et al., 2004). La proporción relativa de la banda de 17 kDa disminuye con respecto a la etapa de maduración de los ovocitos de O_w a O₄ y desaparece de O₃ a O₂, sin embargo, este comportamiento es

diferente en las células foliculares, donde aparece en todos los estadios de desarrollo y presenta el pico de mayor proporción relativa en el estadio O5, lo que puede correlacionarse con el aumento en la función esteroidogénica de estas células. Las demás variantes, tanto en ovocitos como en las células que lo recubren, varían con respecto a la etapa de maduración folicular, al parecer de manera específica. Variantes como la de 14 kDa, la de 17 kDa, que ocupa la mayor proporción relativa, la de 26 kDa que corresponde al monómero, la de 32 kDa, la de 40 kDa, la de 45 kDa y la de 52 kDa, que coincide con el peso del dímero han sido reportadas por Luna et al., (2004) en testículo de pollo, donde cambian de manera tejido-específica con respecto a la edad. Los datos obtenidos en este trabajo permiten proponer que las isoformas de cGH observadas en ovocitos y capas foliculares cambian dependiendo del estadio de maduración folicular. Los datos obtenidos sobre la presencia de cGH en estos tejidos y su patrón de heterogeneidad molecular podrían estar relacionados a través de mecanismos paracrin y/o autocrinos con la posible participación de esta hormona en etapas importantes de la foliculogénesis y la ovulación, debido a que se le encontró en estadios foliculares tempranos con un pico mayor en los folículos que serán reclutados a través de la foliculogénesis para ser ovulados. A pesar de que se sabe que estos procesos son dependientes de gonadotropinas y hormonas esteroides, la GH podría estar modulando sus efectos. La influencia de GH en aves podría ser más importante en los estadios Ow y O5f donde la participación de hormonas gonadotrópicas es menor y el desarrollo del folículo está influenciado por mecanismos intraováricos paracrin y/o autocrinos (Kessel et al., 1987).

Además de la caracterización de la hormona en el tejido reproductor de pollos hembras, se pudo determinar la expresión de un ARNm de 690 pb en oviducto y en capas foliculares. Al secuenciar dichos mensajeros se encontró una alta similitud (99% y 100%, respectivamente) e identidad (689/690 pb y 690/690, respectivamente) con la secuencia del gen de GH encontrada en hipófisis (Tanaka et al., 1992). Esto es semejante a lo reportado por otros autores, donde la GH encontrada en otros tejidos coincide con la reportada en hipófisis; este es el caso de la GH en tejido neural (Render et al., 1995^a, Harvey et al., 2001); sistema inmune (Render et al., 1995^b); ojo (Takeuchi et al., 2001); retina (Baudet et al., 2003) y testículo (Harvey et al., 2004^a). Lo anterior no sucede en ovario humano donde el gen que se expresa es el variable (GHV); sin embargo, al parecer en las gónadas de las aves, o al menos de pollo, el gen de GH que se expresa es el hipofisiario, como se ha reportado en testículo y

así mismo ha sido encontrado en oviducto. La comparación de la secuencia reportada de testículo (Harvey et al., 2004^a) con la de capas foliculares [Figura 29] mostró diferencias con respecto a la comparación con la secuencia del gen que codifica GH en hipófisis ya que ésta mostró una similitud del 99.56% (identidad de 687/690 pb) a nivel de nucleótidos con cambio de bases en la posición 138 T por C, 497 G por A y 624 A por G. Además, al comparar a nivel de posible proteína se observó una similitud del 99.53 % (identidad de 215/216 aa), lo que da lugar a dos mutaciones silenciosas, una en la posición 34 que codifica una asparagina (N) y otra en la posición 196 que codifica una lisina (K). Además se observó una mutación puntual con cambio de aminoácido en la posición 154 que codifica una glicina (G) en lugar de un ácido aspártico (D). Con respecto a la comparación de la secuencia de testículo con la del oviducto [Figura 30] también encontramos algunas diferencias, en ésta se obtuvo una similitud del 99.2 % (identidad 686/690 pb) a nivel de nucleótidos con cambio de bases en la posición 138 T por C, 231 C por A, 497 G por A y 624 A por G. Mientras que al comparar a nivel de posible proteína se observó una similitud del 99.53 % (identidad 215/216 aa) con tres mutaciones silenciosas en las posiciones 34 que codifica una asparagina (N), 65 que codifica un ácido aspártico (D) y 196 que codifica una lisina (K). Además de una mutación puntual con cambio de aminoácido en la posición 154 que codifica una glicina G en lugar de un ácido aspártico (D). Cabe mencionar entonces que este es el primer trabajo que reporta una secuencia de ARNm de GH en oviducto así como en células que recubren al folículo (granulosa y teca), donde sólo han sido caracterizados hasta el momento la presencia del GHR, IGF-1, IGF-1R, IGFbps, así como también la modulación de GH sobre la esteroidogénesis. La hormona de crecimiento no sólo al expresarse sino al presentar una regulación tejido-específica a nivel de sus isoformas, encontradas en la proteína, en tejidos como el oviducto, ovocitos, así como en las capas foliculares (granulosa y teca), debe de tener una importancia funcional en el aparato reproductor de pollos hembras tanto adultas como púberes. A fin de complementar este trabajo se pueden localizar los tipos celulares en los que se expresa GH en el oviducto por inmunohistoquímica, microscopía de luz y confocal además de hibridación *in situ*, además se puede analizar la expresión de GH en cultivos primarios de células de la granulosa y teca para conocer los mecanismos de regulación implicados. Por otra parte sería conveniente analizar los efectos de la GH sobre la esteroidogénesis en cultivos primarios de granulosa y teca por ensayos enzimáticos, donde se cuantifique la actividad enzimática de la

conversión de androstenediona a testosterona y de progesterona a estradiol. También se puede analizar la distribución de receptores de GH en oviducto, células de la granulosa y teca además de localizar el IGF-I y la presencia del posible secretagogo Ghrelina. Posteriormente podría plantearse la cuantificación del ARNm de la GH por PCR en tiempo real en las células de la granulosa y teca provenientes de los diferentes estados de maduración. Además se podría plantear la estandarización del método de ARN de interferencia para bloquear transientemente la expresión de GH y observar el efecto de ésta sobre el desarrollo folicular.

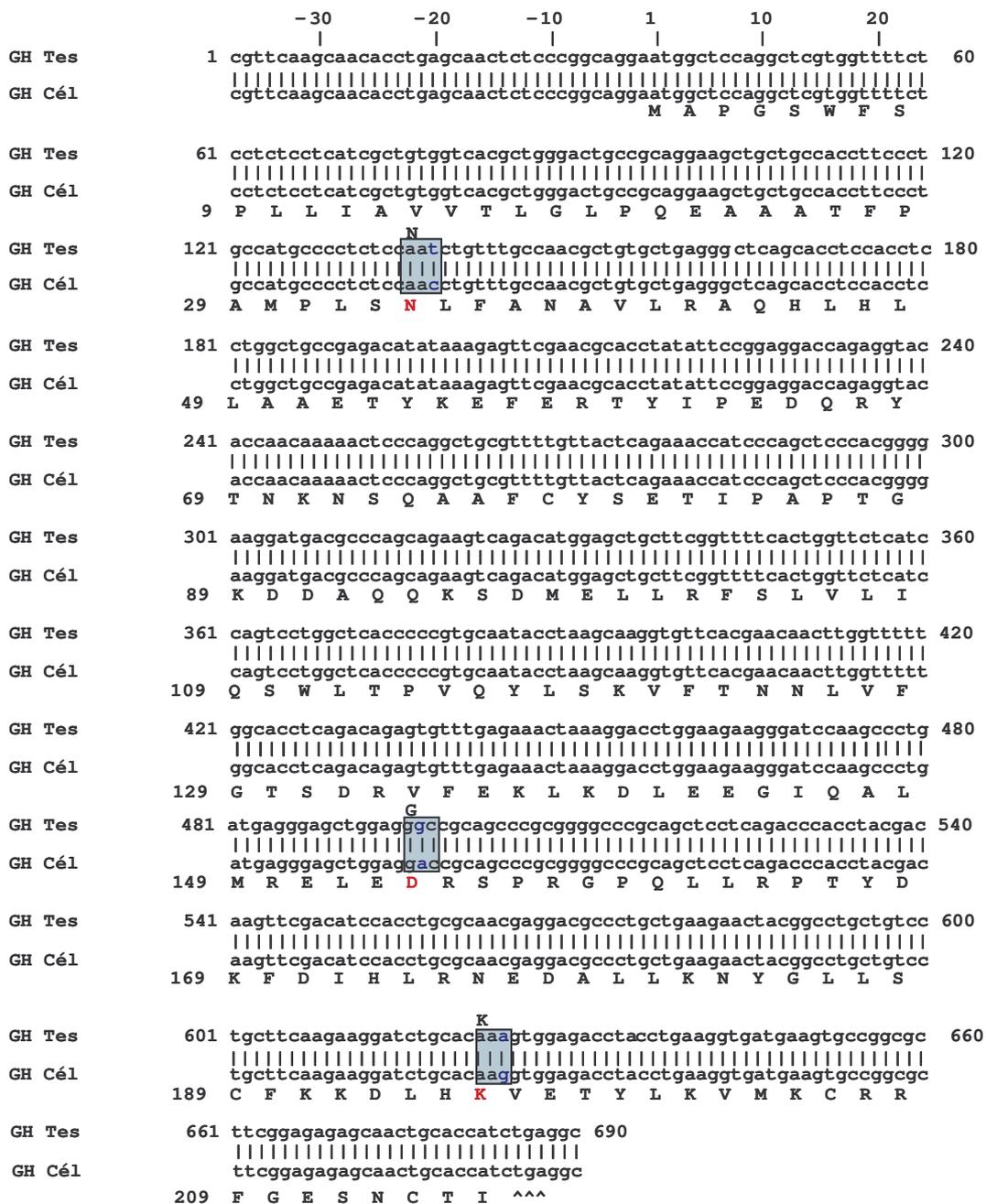


Figura 29. Análisis comparativo de la secuencia de testículo reportada (Harvey et al., 2004a) con la obtenida para capas foliculares. En azul, dentro del cuadro, la diferencia a nivel de nucleótidos. En rojo y negro (arriba del cuadro) la diferencia a nivel de estructura primaria.

```

          -30      -20      -10      1      10      20
          |        |        |        |        |        |
GH Tes   1  cggttcaagcaaacacctgagcaactctcccggcaggaatggctccaggctcgtggttttct 60
GH Ovi   |  cggttcaagcaaacacctgagcaactctcccggcaggaatggctccaggctcgtggttttct
          M A P G S W F S

GH Tes   61  cctctcctcatcgctgtggtcacgctgggactgccgcaggaagctgctgccaccttccct 120
GH Ovi   |  cctctcctcatcgctgtggtcacgctgggactgccgcaggaagctgctgccaccttccct
          9  P L L I A V V T L G L P Q E A A A T F P

          N
GH Tes   121 gccatgccctctccaactctggttgccaacgctgtgctgagggctcagcacctccacctc 180
GH Ovi   |  gccatgccctctccaactctggttgccaacgctgtgctgagggctcagcacctccacctc
          29  A M P L S N L F A N A V L R A Q H L H L

          D
GH Tes   181 ctggctgccgagacatataaagagttcgaacgcacctatattccggaggacagaggtac 240
GH Ovi   |  ctggctgccgagacatataaagagttcgaacgcacctatattccggaggacagaggtac
          49  L A A E T Y K E F E R T Y I P E D Q R Y

GH Tes   241 accaacaactcccaggctgcggtttgttactcagaacatcccagctcccacgggg 300
GH Ovi   |  accaacaactcccaggctgcggtttgttactcagaacatcccagctcccacgggg
          69  T N K N S Q A A F C Y S E T I P A P T G

GH Tes   301 aaggatgacgccagcagaagtcagacatggagctgcttcggttttctcgtctcctc 360
GH Ovi   |  aaggatgacgccagcagaagtcagacatggagctgcttcggttttctcgtctcctc
          89  K D D A Q Q K S D M E L L R F S L V L I

GH Tes   361 cagtctggtcaccctcgtgcaatacctaagcaaggtgttcacgaacaacttggtttt 420
GH Ovi   |  cagtctggtcaccctcgtgcaatacctaagcaaggtgttcacgaacaacttggtttt
          109  Q S W L T P V Q Y L S K V F T N N L V F

GH Tes   421 ggcacctcagacagagtgtttgagaaactaaaggacctggaagaaggatccaagcctg 480
GH Ovi   |  ggcacctcagacagagtgtttgagaaactaaaggacctggaagaaggatccaagcctg
          129  G T S D R V F E K L K D L E E G I Q A L

          G
GH Tes   481 atgagggagctggagggtcgcagcccgggggcccgagctcctcagaccacctacgac 540
GH Ovi   |  atgagggagctggagggtcgcagcccgggggcccgagctcctcagaccacctacgac
          149  M R E L E D R S P R G P Q L L R P T Y D

GH Tes   541 aagttcgacatccacctgcgcaacgaggacgcctgctgaagaactacggcctgctgtcc 600
GH Ovi   |  aagttcgacatccacctgcgcaacgaggacgcctgctgaagaactacggcctgctgtcc
          169  K F D I H L R N E D A L L K N Y G L L S

          K
GH Tes   601 tgcttcaagaaggatctgcacaaagtggagacctacctgaaggtgatgaagtgccggcgc 660
GH Ovi   |  tgcttcaagaaggatctgcacaaagtggagacctacctgaaggtgatgaagtgccggcgc
          189  C F K K D L H K V E T Y L K V M K C R R

GH Tes   661 ttcggagagagcaactgcaccatctgaggc 690
GH Ovi   |  ttcggagagagcaactgcaccatctgaggc
          209  F G E S N C T I ^^^

```

Figura 30. Análisis comparativo de la secuencia de testículo reportada (Harvey et al., 2004a) con la obtenida para oviducto. En azul, dentro del cuadro, la diferencia a nivel de nucleótidos. En rojo y negro (arriba del cuadro) la diferencia a nivel de estructura primaria.

8. CONCLUSIONES

La concentración de la hormona de crecimiento por ELISA en el oviducto, de manera similar que en otros tejidos extrahipofisarios fue menor que la encontrada en la hipófisis, sin embargo, mientras que otros tejidos han mostrado hasta 1000 veces menos concentración el oviducto presentó desde 62 a 200 veces menos. La concentración de cGH tuvo una tendencia inversamente proporcional a la edad. A las 13 semanas se mostró la mayor concentración de cGH (821.33 ng cGH/mg de proteína \pm 40.23), a las 25 semanas (234.95 ng cGH/mg de proteína \pm 23.71) disminuyó y a las 48 semanas (156.72 ng cGH/mg de proteína \pm 32.39) se observó la menor concentración.

La concentración de cGH en ovocitos fue más de 35 veces menor que la observada en hipófisis. El estadio más inmaduro mostró la mayor concentración de hormona, Ow (988 ng cGH/mg de proteína \pm 162) mientras que desde Oyf hasta el estadio O2 no hubo diferencia significativa al comparar la concentración de cGH entre los mismos ovocitos.

La concentración de cGH en células foliculares fue más de 200 veces menor que la de hipófisis. La menor concentración se observó en Cw (27 ng cGH/mg de proteína \pm 9.03), hubo una tendencia a aumentar la concentración a partir de esta etapa hasta alcanzar el valor más alto en C5 (161.33 ng cGH/mg de proteína \pm 41) y C4 (166.5 ng cGH/mg de proteína \pm 38), para luego volver a disminuir en C3 (82 ng cGH/mg de proteína \pm 19) y C2 (54.2 ng cGH/mg de proteína \pm 5.08).

El contenido total de hormona de crecimiento en oviducto y ovocitos tuvo una tendencia directamente proporcional al desarrollo. En el oviducto el valor mayor de contenido de cGH estuvo en etapas de madurez sexual, 48 semanas, (311.8 μ g cGH/tejido \pm 56.7), en comparación con etapas previas a la pubertad, 13 semanas, (32.5 μ g cGH/tejido \pm 8.8). De manera similar, el mayor contenido se encontró en ovocitos de mayor desarrollo, O2 (81.17 μ g cGH/tejido \pm 25.5), el cual fue disminuyendo a través del desarrollo folicular. Con respecto a las capas foliculares el contenido fue de 90 veces menos que en la hipófisis.

Las variantes GH-IR encontradas en los ovocitos (14, 17, 20, 25, 26, 29, 30, 35, 40, 45, 48, 50 y 52 kDa) y las células foliculares (14, 17, 26, 29, 30, 35, 40, 45, 48, 50 y 52 kDa) fueron diferentes al patrón de bandas para la hipófisis (20, 26, 29 y 52 kDa), predominando la variante de 17 kDa que ocupó entre el 40 y 50% de proporción relativa.

Mediante RT-PCR se obtuvieron ADNc's de 690 pb que coinciden con el tamaño del ARNm del gen que codifica GH. Al clonarse y secuenciarse estos ADNc's, se encontró una similitud del 100 % para capas foliculares y del 99.85 % para oviducto (cambio de un par de bases en la posición 231 A por C) a nivel de nucleótidos, en relación al ADNc aislado de hipófisis. A nivel de estructura primaria se encontró 100% de similitud, sin embargo, se determinó una mutación silenciosa en la posición 65 que codificó un ácido aspártico (D) en oviducto, mientras que la secuencia de capas foliculares no mostró ninguna mutación.

En resumen, en este trabajo se documentó la expresión del gen de GH en tejidos del aparato reproductor femenino del pollo, observándose cambios significativos de la proteína durante distintas etapas de maduración. Así mismo, por primera ocasión se clonó y secuenció dicho gen a partir de estos tejidos en el pollo. Todo lo anterior sugiere una participación funcional de la GH sintetizada a nivel local, que podría darse por mecanismos autocrinos y/o paracrinos.

9. GLOSARIO

aa	Aminoácidos	IGF-I	Factor de crecimiento insulinoide tipo I
ACTH	Hormona adrenocorticotrópica	IGF-R	Receptor de IGF
ADH	Hormona antidiurética o vasopresina	IRS	Receptor de insulina
ADN	Ácido desoxirribonucleico	Jak 2	Tirosina cinasa de la familia Janus
ADNc	Ácido desoxirribonucleico complementario	LH	Hormona luteinizante
ARNm	Ácido ribonucleico mensajero	MSH	Hormona estimulante de los melanocitos
cGH	Hormona de crecimiento de pollo	OT	Oxitocina
CS	Somatotropina coriónica	PACAP	Péptido activador de adenilato ciclasa hipofisiario
DAG	Diacilglicerol	PCOS	Síndrome de ovario poliquístico
FSH	Hormona folículo estimulante	Pit-1	Factor de transcripción de GH hipofisiario
G-cGH	Variante glicosilada de hormona de crecimiento de pollo	PKC	Cinasa de proteína C
G-GH	Variante glicosilada de hormona de crecimiento	PL	Lactógeno placentario
GH	Hormona de crecimiento	PLP	Proliferina
GH-IR	Inmunorreactividad para GH	PRL	Prolactina
GHR	Receptor de GH	rcGH	Hormona de crecimiento recombinante de pollo
GHRH	Hormona liberadora de GH	rtGH-I	Gen de la hormona de crecimiento de trucha-I
GLUT-1	Transportador de glucosa tipo I	rtGH-II	Gen de la hormona de crecimiento de trucha-II
hGH-N	Gen de la hormona de crecimiento humana normal	SRF	Factor de respuesta sérica
hGH-V	Gen de la hormona de crecimiento humana-variable	SRIF	Somatostatina
hMG	Gonadotropina menopáusica humana	TCF	Complejo de factores ternarios
IGFBP	Proteína transportadora de factor de crecimiento insulinoide	TRH	Tirotropina, Tiroliberina
		TSH	Hormona estimulante del tiroides

10. REFERENCIAS

Alba C. (2006). Caracterización y localización de la hormona de crecimiento (GH) en el cerebro del pollo. Tesis de Maestría, Instituto de Neurobiología, UNAM.

Allen JT., Bloor CA., Kedia RK., Knight RA., Spiteri MA. (2000). Expression of growth hormone-releasing factor, growth hormone, insulin-like growth factor-1 and its binding proteins in human lung. *Neuropeptides*. 34: 98-107.

Arámburo C., Carranza M., Sánchez R., and Perera G. (1989^a). Partial biochemical and biological characterization of purified chicken growth hormone (cGH). Isolation of cGH charge variants and evidence that cGH is phosphorylated. *Gen. Comp. Endocrinol.* 76: 330-339.

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

Arámburo C., Sánchez R., Fenton B., Perera G., y Valverde C. (1989^c). Desarrollo de un radioinmunoensayo homólogo y específico para la determinación de hormona de crecimiento de pollo (cGH). *Vet. Mex.* 20: 397-405.

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

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

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

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

Arámburo C., Montiel JL., Sánchez R., Perera G., Navarrete S., Carranza M., García-Moreno J., and 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. C. Larralde Ed. México, UNAM, 483-499.

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

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

Arsenijevic Y., Wehrenberg WB., Conz A., Eshkol A., Sizonenko PC., and Aubert ML. (1989). Growth hormone (GH) deprivation induced by passive immunization against rat GH-releasing factor delays sexual maturation in the male rat. *Endocrinology*. 124: 3050-3059.

Bahr M., Wang S., Huang M., and Calvo F. (1983). Steroid concentrations in isolated theca and granulosa layers of preovulatory follicles during the ovulatory cycle of the domestic hen. *Biol. Reprod.* 29: 326-334.

Baker BK., Lee PD., Liu F., Kwan EY., and Hintz RL. (1996). A homologous radioimmunoassay for rat insulin-like growth factor-I (IGF-I): implications for studies of human IGF-I physiology. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 81: 2002-2005.

Barreiro ML., Tena-Sempere M. (2004). Ghrelin and reproduction: a novel signal linking energy status and fertility? *Mol. Cell. Endocrinol.* 226: 1-9.

Baudet ML., Sanders EJ., and Harvey S. (2003). Retinal growth hormone in the chick embryo. *Endocrinology*. 144: 5459-5468.

Baumann G., Vance ML., Shaw MA., and Thorner MO. (1990). Plasma transport of human growth hormone in vivo. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 71: 470-473.

Berger P., Untergasser G., Hermann M., Hittmair A., Madersbacher S., and Dirnhofer S. (1999). The testis-specific expression pattern of the growth hormone/placental lactogen (GH/PL) gene cluster changes with malignancy. *Hum. Pathol.* 30: 1201-1206.

Berghman L., Darras VM., Huybrechts LM., Decuypere E., Vandesande F., Kuhn ER. (1989). Evidence for chicken GH as the only hypophyseal factor responsible for the stimulation of hepatic 5'-monodeiodination activity in the chick embryo. *Reprod. Nutr. Dev.* 29: 197-202.

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

Berumen LC., 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 TA., and Li CH (1970). Primary structures of human pituitary growth hormone and sheep pituitary lactogenic hormone compared. *Science*. 168: 1361-1362.

Beyea JA., Olson DM., and Harvey S. (2005^a). Growth hormone expression in the perinatal and postnatal rat lung. *Dev. Dyn.* 232: 1037-1046.

- Beyea JA., Olson DM., Vandergriend RA., and Harvey S. (2005^b). Expression of growth hormone and its receptor in the lungs of embryonic chicks. *Cell. Tissue Res.* 322: 379-392.
- Bienvenu G., Seurin D., Grellier P., Froment P., Baudrimont M., Monget P., Le Bouc Y., and Babajko S. (2004). Insulin-like growth factor binding protein-6 transgenic mice: postnatal growth, brain development, and reproduction abnormalities. *Endocrinology* 145: 2412-2420.
- Boguszewski CL., Svensson PA., Jansson T., Clark R., Carlsson LM., and Carlsson B. (1998). Cloning of two novel growth hormone transcripts expressed in human placenta. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 83: 2878-2885.
- Bradford MM. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 7: 248-254.
- Bryan KA., Hagen DR., Hammond JM. (1992). Effect of frequency of administration of exogenous porcine growth hormone on growth and carcass traits and ovarian function of prepubertal gilts. *J. Anim. Sci.* 70: 1454-1463.
- Carlsson B., Bergh C., Bentham J., Olsson JH., Norman MR., Billig H., Roos P., and Hillensjö T. (1992). Expression of functional growth hormone receptors in human granulosa cells. *Hum. Reprod.* 7: 1205-1209.
- Carranza M., Luna M., Mejia C., Varela A., Antaramián A., Arámburo C. (2006). Expresión de la hormona de crecimiento en el ojo del pollo. Resumen en Memorias del SMCF, C-211.
- Carter-Su C., Rui L., and Stofega MR. (2000). SH2-B and SIRP: JAK2 binding proteins that modulate the actions of growth hormone. *Recent. Prog. Horm. Res.* 55: 293-311
- Chandrashekar V., Zaczek D., and Bartke A. (2004). The consequences of altered somatotrophic system on reproduction. *Biol. Reprod.* 71: 17-27.
- Chase CC. Jr, Kirby CJ., Hammond AC., Olson TA., Lucy MC. (1998). Patterns of ovarian growth and development in cattle with a growth hormone receptor deficiency. *J. Anim. Sci.* 76: 212-219.
- Chomczynski P., and Sacchi N. (1987). Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem.* 162:156-159.
- Corbacho AM., Martínez De La Escalera G., and Clapp C. (2002). Roles of prolactin and related members of the prolactin/growth hormone/placental lactogen family in angiogenesis. *J. Endocrinol.* 173: 219-238.
- Costa A., Zoppetti G., Benedetto C., Bertino E., Marozio L., Fabris C., Arisio R., Giraudi GF., Testori O., and Ariano M. (1993). Immunolike growth hormone substance in tissues from human embryos/fetuses and adults. *J. Endocrinol. Invest.* 16: 625-633.

Devesa J., Lima L., and Tresguerres AF. (1992). Neuroendocrine control of growth hormone secretion in humans. *Trends. Endocrinol. Metab.* 3: 175-183.

Dunn AR. (2002). Morphoangiogenesis: a unique action of growth hormone. *Microvasc. Res.* 63: 295-303.

Eckery DC., Moeller CL., Nett TM., and Sawyer HR. (1997). Localization and quantification of binding sites for follicle-stimulating hormone, luteinizing hormone, growth hormone, and insulin-like growth factor I in sheep ovarian follicles. *Biol. Reprod.* 57: 507-513.

Froment P., Seurin D., Hembert S., Levine JE., Pisselet C., Monniaux M., Binoux M., and Monget P. (2002). Reproductive abnormalities in human IGF binding protein-1 transgenic female mice. *Endocrinology.* 143: 1801-1808.

Gilbert AB. (1984). Aves de corral en Hafez ES Editores. Reproducción e inseminación artificial en animales.1^a, Ed. Nueva Editorial Interamericana, S.A. de C.V., México. 21: 404-424.

Gong JG., Bramley TA., and Webb R. (1993). The effect of recombinant bovine somatotrophin on ovarian follicular growth and development in heifers. *J. Reprod. Fertil.* 97: 247-254.

Gong JG, McBride D, Bramley TA, Webb R. (1994). Effects of recombinant bovine somatotrophin, insulin-like growth factor-I and insulin on bovine granulosa cell steroidogenesis in vitro. *J. Endocrinol.* 143:157-164.

Gong JG., Baxter G., Bramley TA., and Webb R. (1997) Enhancement of ovarian follicle development in heifers by treatment with recombinant bovine somatotrophin: a dose-response study. *J. Reprod. Fertil.* 110: 91-97.

Gould J., Arámburo C., and Capdevielle M., and Scanes CG. (1995). Angiogenic activity of anterior pituitary tissue and growth hormone on the chick embryo chorio-allantoic membrane: a novel action of GH. *Life Sci.* 8: 587-594.

Guyton C. (2001). Tratado de Fisiología Médica. 10^{ma}, Ed. Interamericana McGraw-Hill, México, 1: 855-866.

Hafez ES, Levasseur MC, and Thibault C. (1984). Foliculogénesis, maduración del óvulo y ovulación en Hafez ES Editor, Reproducción e inseminación artificial en animales.1^a, Ed. Nueva Editorial Interamericana, S.A. de C.V., México. 8: 144-158.

Harvey S. (1995). Growth hormone action: neural function, en S. Harvey, C. G Scanes and W.H. Daughaday Editores, Growth hormone. 1^a. Ed. Boca Raton, CRC Press. 28: 437-451.

Harvey S., Johnson CM., and Sanders EJ. (1995). Extrapituitary growth hormone in peripheral tissues of early chick embryos. *J. Endocrinol.* 166: 489-502.

Harvey S., Azumaya Y., and Hull KL. (2000). Pituitary and extrapituitary growth hormone: Pit-1 dependence? *Can. J. Physiol Pharmacol.* 178: 1013-1028.

Harvey S., Johnson CD., and Sanders EJ. (2001). Growth hormone in neural tissues of the chick embryo. *J. Endocrinol.* 169: 487-498.

Harvey S., Lavelin I., and Pines M. (2002). Growth hormone (GH) action in the brain: neural expression of a GH-response gene. *J. Mol. Neurosci.* 18: 89-95.

Harvey S., Baudet ML., Murphy A., Luna M., Hull KL., and Arámburo C. (2004^a). Testicular growth hormone (GH):GH expression in spermatogonia and primary spermatocytes. *Gen. Com. Endocrinol.* 139: 158-167.

Harvey S., Kakebeeke M., and Sanders EJ. (2004^b). Growth hormone localization in the neural retina and retinal pigmented epithelium of embryonic chicks. *J. Mol. Neurosci.* 22: 139-145.

Hernández A., Yao H-C., and Bahr M. (2001). Extra-ovarian and intra-ovarian control of follicular growth and differentiation in the chicken ovary. *Acta Endocrinol.* 12: 180-193.

Homburg R., and Farhi J. (1995). Growth hormone and reproduction. *Curr. Opin. Obstet. Gynecol.* 7: 220-223.

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

Hu L., Lytras A., Bock ME., Yuen CK., Dodd JG., and Cattini PA. (1999). Detection of placental growth hormone variant and chorionic somatomammotropin-L RNA expression in normal and diabetic pregnancy by reverse transcriptase-polymerase chain reaction. *Mol. Cell. Endocrinol.* 157: 131-142.

Hull KL., and Harvey S. (2000). Growth hormone: roles in male reproduction. *Endocrine* 13: 243-250.

Hull KL., and Harvey S. (2001). Growth hormone: roles in female reproduction. *J. Endocrinol.* 13: 243-250.

Hull KL., Thiagarajah A., and Harvey S. (1996). Cellular localization of growth hormone receptors/binding proteins in immune tissues. *Cell Tissue. Res.* 286: 69-80.

Isaaksson G., Eden S., and Jansson O. (1985). Mode of action of pituitary growth hormone on target cells. *Annu. Rev. Physiol.* 47: 483-499.

Izadyar F., Zeinstra E., and Bevers MM. (1998). Follicle-stimulating hormone and growth hormone act differently on nuclear maturation while both enhance developmental competence of *in vitro* matured bovine oocytes. *Mol. Reprod. Dev.* 51: 339-345.

Jeay S., Sonenshein GE., Postel-Vinay MC., Kelly PA., and Baixeras E. (2002). Growth hormone can act as a cytokine controlling survival and proliferation of immune cells: new insights into signaling pathways. *Mol. Cell. Endocrinol.* 188: 1-7.

Jia XC., Kalmijn J., and Hsueh AJ. (1986). Growth hormone enhances follicle-stimulating hormone-induced differentiation of cultured rat granulosa cells. *Endocrinology*.118: 1401-1409.

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.

Kessel B., Jia XC., Davoren B., and Hsueh A. (1987). The ovarian granulosa cells as a follicle stimulating hormone target tissue? *And physiology of reproduction* (Armstrong DT., Ruf KB., Moger WH., and Friesen HG., Editores). Plenum Press, New York. 163-207.

Kolle S., Sinowatz F., Boie G., and Lincoln D. (1998). Developmental changes in the expression of the growth hormone receptor messenger ribonucleic acid and protein in the bovine ovary. *Biol. Reprod.* 59: 836-842.

Kuroda K. (1989). Study on testicular tissue in animals with congenital hormone deficiency. *Nippon Hinyokika Gakkai Zasshi*.80: 3-10

Kyle CV., Evans MC., and Odell WD. (1981). Growth hormone-like material in normal human tissues. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 53: 1138-1144.

Lanzone A., Di Simone N., Castellani R., Fulghesu AM., Caruso A., and Mancuso S. (1992). Human growth hormone enhances progesterone production by human luteal cells in vitro: evidence of a synergistic effect with human chorionic gonadotropin. *Fertil. Steril.* 57: 92-96.

Laron Z., and Klinger B. (1994). Laron syndrome: clinical features, molecular pathology and treatment. *Horm Res.* 42:198-202.

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

Lewis UJ., Sinha YN., and Lewis GP. (2000). Structure and properties of members of the hGH family a review. *Endocr. J.* 47:S1-S8.

- Li M., and Arimura A., (2003). Neuropeptides of the pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide/vasoactive intestinal polypeptide/growth hormone-releasing hormone/secretin family in testis. *Endocrinology*. 20: 201-214.
- Li Z., Zhang Y., Liu X., and Xu R. (2002). Correlation of expression of preprothyrotropin-releasing hormone and receptor with rat testis development. *J. Med. Chin.* 115: 12-16.
- Lucy MC., Byatt JC., Curran TL., Curran DF., and Collier RJ. (1994). Placental lactogen and somatotropin: hormone binding to the corpus luteum and effects on the growth and functions of the ovary in heifers. *Biol. Reprod.* 50: 1136-1144.
- Luna M., Huerta L., Berumen L., Martínez-Coria H., Harvey S., and Arámburo C. (2004). Growth hormone in the male reproductive tract of the chicken: heterogeneity and changes during ontogeny and maturation. *Gen. Comp. Endocrinol.* 137: 37-49.
- Luna M., Barraza N., Berumen L., Carranza M., Pedernera E., Harvey S., and Arámburo C. (2005). Heterogeneity of growth hormone in lymphoid tissues and changes during ontogeny in domestic fowl. *Gen. Comp. Endocrinol.* 144: 28-37.
- MacLeod JN., Liebhaber SA., MacGillivray MH., Cooke NE. (1991). Identification of a splice-site mutation in the human growth hormone-variant gene. *Am. J. Hum. Genet.* 48: 1168-1174.
- Malarkey WB., Wang J., Cheney C., Glaser R., and Nagaraja H. (2002). Human lymphocyte growth hormone stimulates interferon gamma production and is inhibited by cortisol and norepinephrine. *J. Neuroimmunol.* 123: 180-7.
- Martínez-Coria H., López-Rosales J., Carranza M., Berumen L., Luna M., and Arámburo C. (2002). Differential secretion of chicken growth hormone variants after GHRH stimulation, *in vitro*. *Endocrine* 17: 91-102.
- Matsubara S., Sato M., Mizobuchi M., Niimi M., and Takahara J. (1995). Differential gene expression of growth hormone (GH)-releasing hormone (GRH) and GRH receptor in various rat tissues. *Endocrinology* 136: 4147-4150.
- Mikami SI. (1992). Hypophysis. In: *Atlas of endocrine organs vertebrates and invertebrates*. (Matsumoto A & Ishii S, Editores), Berlín: Springer-Verlag. pp 39-62.
- Mazerbourg S., Bondy CA., Zhou J., Monget P. (2003). The insulin-like growth factor system: a key determinant role in the growth and selection of ovarian follicles? A comparative species study. *Reprod. Domest. Anim.* 38: 247-258.
- Montiel JL., Berghman LR., and Arámburo C. (1992). Identification of growth hormone molecular variants in chicken serum. *Gen. Comp. Endocrinol.* 88: 298-306.

- Morera AM., Chauvin MA., de Peretti E., Binoux M., and Benahmed M. (1987). Somatomedin C/insulin-like growth factor 1: an intratesticular differentiative factor of Leydig cells? *Horm. Res.* 28: 50-57.
- Moretti C., Mencacci C., Frajese GV., Cerilli M., and Frajese G. (2002). Growth hormone-releasing hormone and pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide in the reproductive system. *Trends. Endocrinol. Metab.* 13: 428-435.
- Nguyen AP., Chandorkar A., and Gupta C. (1996). The role of growth hormone in fetal mouse reproductive tract differentiation. *Endocrinology.* 137: 3659-3666.
- Niall HD., Hogan ML., Saber P., Rosenblum IY., and Greenwood FC. (1971). Sequences of pituitary and placental lactogenic and growth hormones: evolution from a primordial peptide by gene reduplication. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 68: 866-870.
- Nickel BE., Karmadi E., and Cattini PA. (1990). The human placental growth hormone variant is mitogenic for rat lymphoma Nb2 cells. *Endocrinology* 126: 971-976.
- Olchovsky D., Bruno JF., and Berelowitz M. (1996). Growth hormone-releasing factor expression is discordantly regulated in the hypothalamus and testis of streptozotocin-diabetic rats. *J. Endocrinol.* 148: 189-192.
- Palmetshofer A., Zechner D., Luger TA., and Barta A. (1995). Splicing variants of the human growth hormone mRNA: detection in pituitary, mononuclear cells and dermal fibroblasts. *Mol. Cell. Endocrinol.* 113: 225-234.
- Pekary AE., Yamada T., Sharp B., Bhasin S., Swerdloff RS., and Hershman JM. (1984). Somatostatin-14 and 28 in the male rat reproductive system. *Life Sci.* 34: 939-945.
- 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, Editores), San Diego, Academic Press, Inc., 13-35.
- Recher S., Raccurt M., Lambert A., Lobie PE., Mertani HC., and Morel G. (2001). Prenatal and adult growth hormone gene expression in rat lymphoid organs. *J. Histochem. Cytochem.* 49: 347-354.
- Render CL., Hull KL., and Harvey S. (1995^a). Neural expression of the pituitary GH gene. *J. Endocrinology* 147: 413-422.
- Render, CL., Hull, KL., and Harvey S. (1995^b). Expression of growth hormone gene in immune tissues. *Endocrinology* 3: 729-735.

Rivera GM., and Fortune JE. (2003). Proteolysis of insulin-like growth factor binding proteins -4 and -5 in bovine follicular fluid: implications for ovarian follicular selection and dominance. *Endocrinology*. 144:2977-2987.

Sambrook J., Fritsch EF., and Maniatis T. (2001). Extraction, purification, and analysis of messenger RNA from Eukaryotic cells. In: *Molecular cloning*. (Nolan C., Ford N., and Ferguson M., Editores). *Cold Spring Harbor Laboratory Press*. pp 7.10-7.11.

Sanders EJ., Parker E., and Harvey S. (2006). Retinal ganglion cell survival in development: Mechanisms of retinal growth hormone action. *Exp. Eye Res.* 83:1205-1214.

Scanes CG., Arámburo C. and Campbell RM. (1990). Hormonal involvement in avian growth and development: growth hormone and insulin-like growth factor I. In: *Endocrinology of Birds*. (Wada M Editores). Berlin: Springer-Verlag. pp 93-110.

Scanes CG., and Campbell RM. (1995). Growth hormone: Chemistry. In: growth hormone (S Harvey, CG Scanes, WH Daughaday, Editores). Florida, CRC Press Inc., 1-20.

Schwarzler P., Untergasser G., Hermann M., Dirnhofer S., Abendstein B., Madersbacher S., and Berger P. (1997). Selective growth hormone/placental lactogen gene transcription and hormone production in pre- and postmenopausal human ovaries. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 82: 3337-3341.

Shoham Z., Homburg R., Owen EJ., Conway GS., Ostergaard H., and Jacobs HS. (1992). The role of treatment with growth hormone in infertile patients. *Baillieres Clin. Obstet. Gynaecol.* 6: 267-281.

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

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

Sirotkin AV. (1996). Direct action of growth hormone on bovine ovarian cells: effects on estradiol, oxytocin, vasopressin release by granulosa cells and on oocyte maturation and cleavage in vitro. *Ann. Endocrinol.* 57:219-224.

Sirotkin AV., Grossmann R., Maria-Peon MT., Roa J., Tena-Sempere M., and Klein S. (2006). Novel expression and functional role of Ghrelin in chicken ovary. *Mol. Cell. Endocrinol.* 258: 15-25.

Slominski A., Malarkey WB., Wortsman J., Asa SL., and Carlson A. (2000). Human skin expresses growth hormone but not the prolactin gene. *J. Lab. Clin. Med.* 136: 476-481.

- Spiliotis BE. (2003). Growth hormone insufficiency and its impact on ovarian function. *Ann. N Y Acad. Sci.* 997: 77-84.
- Spiliotis BE., August GP., Hung W., Sonis W., Mendelson W., and Bercu BB. (1984). Growth hormone neurosecretory dysfunction. A treatable cause of short stature. *J. Amer. Med. Assoc.* 251: 2223-2230.
- Struman I., Bentzien F., Lee H., Mainfroid V., D'Angelo G., Goffin V., Weiner RI., and Martial JA. (1999). Opposing actions of intact and N-terminal fragments of the human prolactin/growth hormone family members on angiogenesis: an efficient mechanism for the regulation of angiogenesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* 96: 1246-1251.
- Takeuchi S., Haneda M., Teshigawara K., and Takahashi S. (2001). Identification of a novel GH isoform: a possible link between GH and melanocortin systems in the developing chicken eye. *Endocrinology* 142: 5158-5166.
- Tanaka M., Hayashida Y., Nakao N., Nakai N., and Nakashima K. (2001). Testis-specific and developmentally induced expression of a ghrelin gene-derived transcript that encodes a novel polypeptide in the mouse. *Biochim. Biophys. Acta* 1522: 62-65.
- Tanaka M., Hosokawa Y., Watahiki M., and Nakashima K. (1992). Structure of the chicken growth hormone-encoding gene and its promoter region. *Gene* 112: 235-239.
- Tena-Sempere M., Barreiro ML., Gonzalez LC., Gaytan F., Zhang FP., Caminos JE., Pinilla L., Casanueva FF., Dieguez C., and Aguilar E. (2002). Novel expression and functional role of ghrelin in rat testis. *Endocrinology* 143: 717-725.
- Towbin H., Staechelin T., Gordon J. (1979). Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: Procedure and applications. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.* 76: 4350-4354.
- Tresguerres JA., Ariznavarreta C., Granados B., Costoya JA., Perez-Romero A., Salame F., and Hermanussen M. (1999). Salivary gland is capable of GH synthesis under GHRH stimulation. *J. Endocrinol.* 160: 217-222.
- Untergasser G., Kranewitter W., Schwarzler P., Madersbacher S., Dirnhofer S., Berger P. (1997). Organ-specific expression pattern of the human growth hormone/placental lactogen gene-cluster in the testis. *Mol. Cell. Endocrinol.* 130: 53-60.
- Untergasser G., Hermann M., Rumpold H., and Berger P. (1998). Complex alternative splicing of the GH-V gene in the human testis. *Eur. J. Endocrinol.* 139: 424-427.
- Wang JJ. (1989). Immunocytochemical demonstration of the binding of growth-related polypeptide hormones on chick embryonic tissues. *Histochemistry* 93: 133-141.
- Warner D., Sinha Y., and Peadoby C. (1993). Growth hormone and prolactin variants in normal subjects. *Horm. Metab. Res.* 25:425-429.

Wathes DC., Perks CM., Davis AJ., and Denning-Kendall PA. (1995). Regulation of insulin-like growth factor-I and progesterone synthesis by insulin and growth hormone in the ovine ovary. *Biol. Reprod.* 53: 882-889.

Wilber JF., and Xu AH. (1998). The thyrotropin-releasing hormone gene 1998: cloning, characterization, and transcriptional regulation in the central nervous system, heart, and testis. *Thyroid* 8: 897-901.

Wu MY., Chen HF., Ho HN., Chen SU., Chao KH., Huang SC., Lee TY., and Yang YS. (1996). The value of human growth hormone as an adjuvant for ovarian stimulation in a human *in vitro* fertilization program. *J. Obstet. Gynaecol. Res.* 22: 443-450.

Yoshimura Y., Nagano K., Subedi K., and Kaiya H. (2005). Identification of immunoreactive Ghrelin and its mRNA in the oviduct of laying Japanese quail, *Coturnix japonica*. *J. Poul. Sci.* 42: 291-300.

Yoshizato H., Fujikawa T., Soya H., Tanaka M., Nakashima K. (1998). The growth hormone (GH) gene is expressed in the lateral hypothalamus: enhancement by GH-releasing hormone and repression by restraint stress. *Endocrinology* 139: 2545-2551.

Zhang CZ., Li H., Young WG., Bartold PM., Chen C., and Waters MJ. (1997). Evidence for a local action of growth hormone in embryonic tooth development in the rat. *Growth Factors* 14: 131-143.

Zhu LJ., Krempels K., Bardin CW., O'Carroll AM., and Mezey E. (1998). The localization of messenger ribonucleic acids for somatostatin receptors 1, 2, and 3 in rat testis. *Endocrinology* 139: 350-357.

Zhvirblis GS., Gorbulev VG., Rubtsov PM., Karapetian RV., and Zhuravlev IV. (1987). Genetic engineering of peptide hormones. I. Cloning and primary structure of cDNA of chicken growth hormone. *Mol. Biol.* 21:1620-1624.