



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE
MÉXICO

**Instituto de Neurobiología
Campus UNAM, Juriquilla**

**“Síntesis y secreción de hormona de crecimiento
en células testiculares de pollo”**

Que para obtener el grado de Doctor en Ciencias Biomédicas (PDCB)

Presenta:

M en C Carlos Guillermo Martínez Moreno

Tutora:

Dra. Maricela Luna Muñoz

Julio 2011



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

Esta tesis fue realizada en el laboratorio de Bioquímica de Hormonas del Dr. Carlos Arámburo de la Hoz, en el Instituto de Neurobiología de la UNAM (campus UNAM Juriquilla, Querétaro) durante el periodo de 2006-2011, bajo la tutoría de la Dra. Maricela Luna y la supervisión del comité tutor integrado por el Dr. Enrique Pedernera y el Dr. Gonzalo Martínez de la Escalera. La tesis se realizó con apoyo financiero de los proyectos de CONACyT (F1-60296) y PAPIIT- UNAM (IN-210209), beca doctoral por parte de CONACyT (185024) y UNAM (PDCB). Apoyo económico de la fundación Alejandro Bayón establecida por C.A. Además la participación y financiamiento parcial a través del programa de formación de investigadores extranjeros del Centro de Investigación Biomédica en Red Fisiopatología de la Obesidad y Nutrición, España, y del Depto. Biología Celular, Fisiología e Inmunología, Facultad de Medicina, Universidad de Córdoba, España.

Indice

Resumen	5
Abstract	6
1. Antecedentes	
a. Hormona de crecimiento	7
i. Generalidades y estructura de la hormona de crecimiento	7
ii. Heterogeneidad molecular de la hormona de crecimiento	8
iii. Heterogeneidad molecular de la GH de pollo	11
iv. Traducción del ARN mensajero de GH	12
b. El receptor de GH (GHR)	12
i. Generalidades GHR	12
ii. Estructura GHR	13
iii. La activación de GHR, desactivación y translocación nuclear	13
c. Regulación de la secreción y síntesis de la GH	15
i. Factores liberadores de GH hipofisiaria	17
1. GHRH	17
2. TRH	18
3. Ghrelina	19
4. Leptina	20
ii. Mecanismos moleculares de acción de GHRH en somatotropos	22
iii. Factores liberadores en el testículo	22
d. Aparato reproductor masculino en aves	27
i. Estructura del aparato reproductor masculino en aves	27
ii. Espermatogénesis	27
e. GH y la función reproductiva	29
i. GH y espermatogénesis	29
ii. GH y esteroidogénesis	29
f. La hormona de crecimiento extrahipofisiaria	30
i. Hormona de crecimiento Testicular	31
1. Expresión de GH en testículo	31
2. Secuenciación del ARNm en testículo	31
3. Distribución del ARNm de GH en testículo	33
4. Concentración de GH en testículo	33
5. Distribución de la GH Testicular	34
6. Heterogeneidad molecular de GH testicular	35
7. GH autócrina/parácrina	36
g. Regulación testicular de la GH por factores hipotalámicos de expresión local	36

2. Justificación	38
3. Hipótesis	38
4. Objetivo General	39
a. Objetivos particulares	39
5. Diseño Experimental	
a. Análisis de la distribución de la GH y su receptor GHR	40
b. Caracterización de marcadores celulares en túbulo seminífero	40
c. Determinación del efecto de GH en cultivos primarios de células testiculares	40
d. Separación y caracterización de subpoblaciones testiculares de pollo	41
e. Determinación del patrón de heterogeneidad molecular de GH	41
f. Análisis de la expresión de los ARN de ghrelina, GHS-R1a, Ob-R y GnIH	42
6. Materiales y Métodos	42
a. Animales	42
b. Muestras	42
c. Obtención de células testiculares por la técnica de dispersión enzimática	43
d. Fraccionamiento celular por centrifugación en gradiente	43
e. Cultivo celular primario de células testiculares de pollo	44
f. Tratamientos	44
g. Preparación de muestras	44
h. Cuantificación de GH de pollo por ELISA	45
i. SDS-PAGE/Western Blot	45
j. Inmunohistoquímica en cortes de testículo	46
k. Microscopía electrónica de transmisión	47
l. Evaluación de los efectos de GH en células testiculares en cultivo	47
i. MTT	47
ii. ³ H-Timidina tritiada	48
m. Análisis del ARN por RT-PCR semi-cuantitativo	48
7. Resultados	51
a. Histología del testículo de pollo sexualmente maduro	51
i. Antígeno nuclear de proliferación celular (PCNA)	52
ii. Receptor de SCF (stem cell factor)	53
iii. Receptor a hormona luteinizante	54
iv. Factor transcripcional Sox9	55
v. GH testicular en cortes de testículo	56

vi.	Colocalización de GH con PCNA	57
vii.	Colocalización de GH con GHR	59
b.	Distribución intracelular de la GH y su receptor en células germinales	62
c.	Aislamiento y caracterización de subpoblaciones de células testiculares de pollo a través de centrifugación en gradiente de densidad	67
i.	Caracterización de subpoblaciones celulares de testículo	70
ii.	Determinación del patrón de heterogeneidad testicular	71
iii.	Cuantificación de GH en subpoblaciones testiculares	72
d.	Efecto de GHRH y GH	73
i.	Efecto de GHRH sobre PCNA	73
ii.	Efecto de GH sobre la tasa metabólica y proliferación de células testiculares en cultivo	74
e.	Análisis de la expresión de Ghrelina/GHS-R1a, Ob-R y GnIH	76
i.	Ontogenia	76
ii.	Estrés metabólico	79
iii.	Análisis de la distribución de ghrelina en testículo de pollo durante la ontogenia.	82
8.	Discusión	83
9.	Conclusiones	99
10.	Bibliografía	101

Resumen

La hormona del crecimiento (GH) ejerce sus efectos en el desarrollo y la función testicular de varias especies mamíferos a través de su acción endocrina, sin embargo se han propuesto efectos intracrinos, autócrinos y parácrinos a partir de su expresión local. Estudios anteriores han demostrado la distribución de los ARNm y la heterogeneidad molecular de la proteína en los testículos de pollo adulto y sus conductos deferentes. Este estudio proporciona evidencia de la presencia y distribución de GH y de su receptor (GHR) en todas las etapas de la espermatogénesis en los testículos de pollo adulto. Se encontró localización en el citoplasma y núcleo de espermatogonias, espermatocitos y espermátides. En subpoblaciones aisladas de células germinales se caracterizó el patrón de isoformas de la GH y fue posible observar que la variante molecular mayor proporción relativa en todas las subpoblaciones fue la de 17kDa. Otra variante molecular identificada fue la de 29 kDa la cual se localizó principalmente en la población espermatocitos sugiriendo acciones específicas para esta etapa. Además, mediante técnicas de inmunohistoquímica se puede observar la co-localización de GH con el antígeno de células de proliferación nuclear (PCNA), un marcador de la replicación del ADN presente en las espermatogonias. El efecto proliferativo de GHRH en los cultivos testiculares fue analizado con el marcador PCNA, los resultados muestran un aumento significativo de este marcador de proliferación al tratar cultivos primarios de células testiculares con la GHRH a 1, 10 y 100 nM. Con el ensayo de MTT se determinó el efecto sobre el metabolismo celular, el cual se incrementó significativamente con 1nM de GH. Mediante el ensayo de la incorporación de timidina tritiada se determinó el efecto proliferativo de GH a través de resultados que mostraron un aumento de la incorporación de timidina a concentración 10nM, lo que sugiere un efecto proliferativo de la GH en el testículo de pollo. Estos resultados muestran por primera vez la presencia de la GH y GHR nuclear en las células germinales de pollo adulto, estos datos permiten proponer que la GH podría participar en el control de la proliferación y diferenciación durante el complejo proceso de la espermatogénesis. Con las evidencias encontradas proponemos que la GHRH y GH están involucrados en acciones autocrino / parácrinas.

Abstract

Growth hormone (GH) has been implicated during the development and adult testicular function in several mammals species by endocrine action and recently has been proposed the intracrine, autocrine and paracrine. Previous reports have shown the distribution of mRNA and the molecular heterogeneity of GH protein in adult chicken testis and vas deferens. This study provides evidence for the presence and distribution of GH and its receptor (GHR) during all the stages of spermatogenesis in adult chicken testes. The presence of this hormone and receptor was not restricted into the cytoplasm; it was also in the nuclei of spermatogonia, spermatocytes and spermatids. In isolated germ cell subpopulations the pattern of GH isoforms in the different cells subpopulations of the testis was characterized and was possible to observe that the major molecular variant in all subpopulations was the 17kDa as well in other chicken tissues. Other detected molecular variant was 29 kDa moiety founded mainly in the enriched spermatocytes population suggesting specific stage actions. Moreover by immunohistochemistry was possible to observe the co-localization of GH with the proliferative cell nuclear antigen (PCNA) a DNA replication marker present in spermatogonial cells. The proliferative effect of GHRH in the testicular cultures was analyzed with PCNA marker, the results show a significant increase with GHRH 1, 10 and 100nM. With MTT assay we determined the metabolic effect of GH in the cultures and only with GH 1nM showed a significative increase. Using the assay of tritiated thymidine incorporation the proliferative effect of GH was determinate and the results showed that the incorporation increase by 10 nM. These results shown for the first time the presence of nuclear GH and GHR in adult chicken germinal cells, these data allow to proposing that GH could participate in the proliferation and differentiation during the complex process of spermatogenesis. Also this evidence allows proposing that the GHRH and GH are involved in autocrine/paracrine actions.

1. Antecedentes

Hormona de Crecimiento (GH)

Generalidades y estructura de la hormona de crecimiento

La hormona de crecimiento (GH) fue descrita inicialmente en la hipófisis de todos los vertebrados (peces, anfibios, reptiles, aves y mamíferos). Es una proteína de alrededor de 191 aminoácidos (22 kDa, Fig. 1), la cual muestra una amplia funcionalidad biológica ya que además de estimular el crecimiento lineal de los tejidos blandos y esqueléticos, está involucrada en la regulación del metabolismo de proteínas, lípidos, carbohidratos y ácidos nucleicos. La GH también tiene efectos importantes sobre la diferenciación y proliferación celular, la actividad enzimática, el transporte de aminoácidos, la regulación hidromineral, la estimulación de la eritropoyesis, la secreción de algunos factores hormonales y recientemente, se han descrito efectos sobre la regulación de la respuesta inmune y sobre la angiogénesis. Se ha determinado que la GH puede actuar de manera directa sobre su órgano blanco o bien, indirectamente a través de mediadores como el factor de crecimiento insulinoide tipo I (IGF-I) (Harvey et al., 1995).

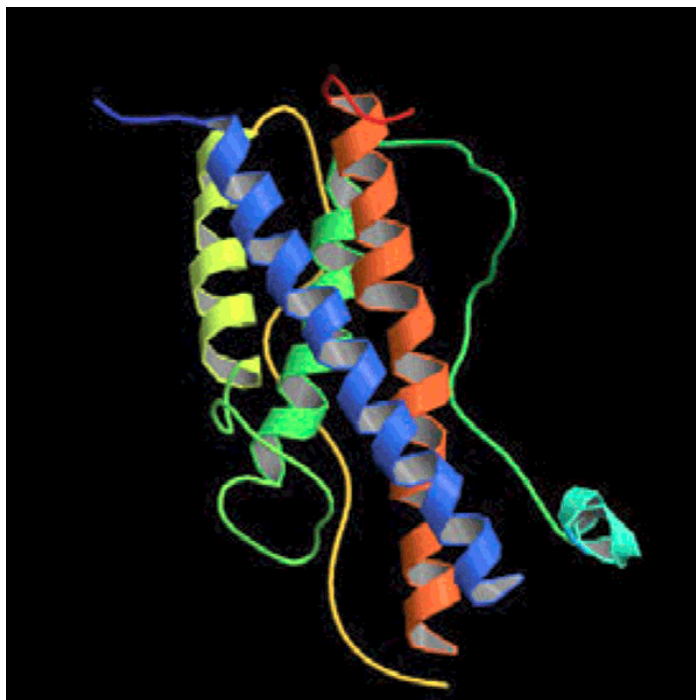


Figura 1. Estructura tridimensional de GH humana (Walsh et al., 2006).

Estructuralmente la GH presenta dos puentes disulfuro formados en sus residuos de cisteína en las posiciones 53-164 y 181-189 los cuales mantienen la estructura tridimensional de la hormona. Se encuentra conformada por cuatro α -hélices que representan el 50% de su estructura las cuales se encuentran entre los residuos 7-34, 75-87, 106-127 y 152-183 (Harvey et al., 1995).

Heterogeneidad molecular de la Hormona de Crecimiento (GH)

En todas las especies estudiadas, la hormona de crecimiento presenta más de una forma molecular. Estas variantes moleculares tienen origen por diferentes procesos, ya sea por la existencia de más de un gen, por procesamiento alternativo de su ARN mensajero o bien por modificaciones postraduccionales como son fosforilación, glicosilación, proteólisis, desamidación, acilación y agregación. Estas modificaciones pueden ocurrir intracelularmente y después de ser secretadas, como ocurre cuando se unen a proteínas transportadoras en el plasma, proteólisis por enzimas plasmáticas o de matriz extracelular así como por la metabolización en diferentes tejidos (Arámburo *et al.*, 1989; Baumann, 1991; Baumann, 1999).

Se han descrito isoformas derivadas de duplicación génica para la GH humana: la normal y la variable de expresión placentaria, hGH-N y hGH-V respectivamente (Chawla *et al.*, 1983; Seeburg 1986; Frankenne *et al.*, 1987; Cooke *et al.*, 1988). Los dos genes difieren en 13 residuos de aminoácidos y su síntesis tiene diferentes sitios de origen: el gen de hGH-N se expresa principalmente en la hipófisis cuya función se ha asociado principalmente a crecimiento y metabolismo energético mientras que el gen hGH-V se expresa en la placenta durante el tercer trimestre del embarazo con funciones aún no bien delimitadas y la cual figura como la principal GH circulante durante este período (Frankenne *et al.*, 1987). Se tiene evidencia de micro-heterogeneidad en bovinos: en la bGH, el aminoácido 127 puede ser valina o leucina; hipófisis individuales pueden producir 100% de bGH V¹²⁷, 100% L¹²⁷ o 50% de cada una. De esta manera parece haber polimorfismo alélico de GH en ganado (Seavey *et al.*, 1971).

Las diferencias en el procesamiento del ARNm de GH pueden dar origen a formas alternativas de la proteína: éste es el caso con el transcrito del gen hGH-N, las proteínas

resultantes son hGH de 22 kDa con 191 aminoácidos y hGH de 20 kDa con una delección de 15 residuos de aminoácidos (residuos 32 a 46), representando de 5 a 10% de la hGH monomérica en la hipófisis. Puede haber procesamiento alternativo del ARNm de GH de rata que resulta en la delección del exón 3 o corte en dicho exón dando lugar a moléculas que no tienen los aminoácidos 32 a 71 y 42 a 46 respectivamente (Howland et al., 1987; Parks, 1989; Petkovic *et al.*, 2010). En el caso del transcrito bovino puede retenerse el intrón D debido a un factor *trans* de 35 kDa que se une a secuencias *cis* localizadas en el exón 5 (Sun *et al.*, 1993).

Se conoce que la GH se produce en la hipófisis anterior como un precursor de 224 o 225 aminoácidos en humanos y mamíferos, 216 en pollo, en cuya forma inmadura contiene el péptido señal, el procesamiento hacia una forma madura en ocasiones relaciona la adición de aminoácidos extra en comparación a la forma monomérica predominante, esto ha sido descrito en la extremo N-terminal de bovinos. También se pueden generar modificaciones postraduccionales como la fosforilación, amidación, glicocilación, agregación y rompimiento proteolítico. Se han descrito variantes para la GH derivadas de agregación de la forma principal de GH, para formar dímeros y otros oligómeros, trímeros, tetrameros y hasta pentámeros. (Chawla *et al.*, 1983; Stolar y Baumann, 1986). Estas formas parecen representar aproximadamente el 40% de la GH inmunoreactiva (GH-IR) que se secreta al plasma en humanos, estimado con la premisa de que algunas formas oligoméricas tienen la misma inmunoreactividad (IR) inherente. La forma dimérica parece tener dos monómeros de 22 kDa ligados ya sea no covalentemente o por puentes disulfuro (Baumann, 1991). Sin embargo, al menos algo de la GH dimérica, en el caso del pollo, permanece incluso después del tratamiento con dodecilsulfato de sodio (SDS) y con 2-mercaptoetanol que deberían romper enlaces no covalentes y puentes disulfuro (Arámburo *et al.*, 1989).

Se han observado distintas formas de GH cortada y fragmentos de la misma generados por proteólisis limitada. En la hGH parece ocurrir un corte enzimático específicamente entre los residuos 133 a 146 y los residuos 43 y 44. El corte en los residuos 133 y 146 ocurre en sitios susceptibles a corte por enzimas tipo tripsina: R¹³⁴, K¹⁴⁰ y K¹⁴⁵ en la GH humana lo que abre el asa grande de la molécula dando origen a un tamaño molecular aparente de 24 kDa; después de la reducción de puentes disulfuro se originan dos

fragmentos con un tamaño de 14 y 8 kDa. Se ha reportado tal corte proteolítico en GH proveniente de la hipófisis con enzimas exógenas específicamente proteasas ácidas relacionadas a las vías de degradación lisosomal y con plasmalema de tejidos blancos de GH. Sin embargo, existe controversia sobre si el corte proteolítico del asa grande ocurre *in situ* o representa un artificio experimental. Por su parte las hipófisis humanas contienen un fragmento de GH, hGH₁₋₄₃ bien caracterizado aunque su contraparte no se ha identificado plenamente (Singh *et al.*, 1983).

Las formas fosforiladas de GH se han descrito en preparaciones de humano, rata, oveja y pollo (Oetting *et al.*, 1986; Liberti *et al.*, 1986; Arámburo *et al.*, 1989). Se conoce que la fosforilación de la GH la puede llevar a cabo una enzima tirocina cinasa A y/o C (Arámburo *et al.*, 1990, 1992). El extremo amino terminal de una baja proporción de hGH se ha descrito como acetilada; sin embargo esto no parece tener efecto sobre su actividad biológica pero si logra modificar el punto isoeléctrico de la hormona, por tal motivo se le conoce a esta variante de carga como la GH “rápida” (Baumann *et al.*, 1991).

Se han identificado formas glicosiladas de la GH (G-GH) en humano (Sinha y Lewis, 1986), cerdo (Sinha *et al.*, 1990), pollo (Berghman *et al.*, 1987; Arámburo *et al.*, 1991) y búfalo (Maithal *et al.*, 2001). En el cerdo se han visto diferencias en la proporción de la hormona glicosilada en plasma e hipófisis durante el embarazo y el desarrollo fetal (Sinha *et al.*, 1990). Se han estudiado algunas actividades de G-GH, en particular la GH humana de expresión placentaria (hGH-V) que se encuentra N-glicosilada se puede unir a receptores de prolactina y de GH (GHR) (Ray *et al.*, 1989; Baumann 1991), es mitogénica (Nickel *et al.*, 1990) y estimula el aumento de peso en ratones hipofisectomizados (Macleod *et al.*, 1991) aunque en con menor afinidad que la no glicosilada. La G-GH de pollo tiene un efecto positivo en la monodesyodación de las hormonas tiroideas en el embrión de pollo (Berghman *et al.*, 1989). Además la tasa de depuración de la G-cGH después de su inyección intravenosa en gallinas anestesiadas, es 20% mayor comparada con la forma no glicosilada. Su administración tiene un efecto similar al de la hormona no glicosilada en la producción *in vivo* de IGF-1, por lo que se sugiere que su importancia fisiológica reside más en ejercer diferentes acciones a través de la unión a otros receptores de la familia citocina tipo 1 o como un modulador negativo de la variante no glicosilada (Berghman *et al.*, 1994). Se conoce que en el pollo la G-cGH presenta un tamaño de 26

kDa bajo condiciones no reductoras y cuando se expone a un agente reductor presenta un tamaño de 29 kDa, la hormona tiene un oligosacárido de 3-4 kDa unido por un enlace N-glicosídico, probablemente a la asparagina ubicada en la posición 188. La G-cGH presenta una menor afinidad por el receptor GHR que la GH recombinante (rcGH); en el ensayo proliferativo de células Nb2 la G-cGH presenta una mayor actividad que la rcGH. Durante la madurez sexual del pollo esta variante alcanza su mayor concentración a nivel hipofisiario (Berumen *et al.*, 2004).

Heterogeneidad molecular de la GH de pollo

Farmer, Papkoff y Hayashida en 1974 encontraron que la GH de pollo (cGH) presenta heterogeneidad molecular cuando se analiza bajo sistemas de electroforesis a diferentes pH (4.5 y 8.3), lo cual explicaron se puede deber a una desamidación de la hormona. Harvey y cols en 1977 purificaron cGH y determinaron además que la cGH tiene un peso de 23,300 Da y por isoelectroenfoque (IFE) resolvieron 3 componentes cuyos puntos isoeléctricos fueron 7.5, 6.5 y 5.8; atribuyeron la heterogeneidad encontrada a la desamidación parcial de la hormona, la unión no específica a los anfolitos o a la presencia de monómeros con diferentes residuos N-terminales. La molécula de cGH tiene un peso molecular teórico de 22,126 Da calculado a partir de las fórmulas de Lehninger con base en la secuencia reportada; tiene un punto isoeléctrico teórico de 7.83, para el caso de que no tenga ninguna modificación postraducciona (<http://www.embl-heidelberg.de/cgi/pi-wrapper.pl>). El peso molecular de la hormona de crecimiento de pollo recombinante analizado a través de espectrofotometría de masas es de 22,140.1 kDa. Investigaciones realizadas por nuestro grupo han mostrado que las variantes de la hormona de crecimiento de pollo existen (Arámburo *et al.*, 1989). De acuerdo con los métodos de análisis utilizados para estudiar la heterogeneidad molecular de la GH se pueden observar variantes de carga y variantes de masa. En estudios electroforéticos las variantes de carga eléctrica aparecen cuando se lleva a cabo isoelectroenfoque o electroforesis nativa no desnaturizante. La forma mayoritaria de la cGH hipofisiaria es la monomérica (22 kDa), que consiste al menos de tres variantes de carga por electroforesis no desnaturizante en geles de poliacrilamida, con movilidades relativas de 0.23, 0.3 y 0.35 (Arámburo 1989, 1990).

Traducción, almacenamiento y liberación de la GH hipofisiaria

Durante la traducción de la GH se sintetiza una preproteína “pre-GH” con aproximadamente 225 aminoácidos y subsecuentemente es procesada en el retículo endoplásmico mediante la remoción del péptido señal para producir la proteína madura de 191 aminoácidos (Harvey *et al.*, 1995). El procesamiento de la hormona continúa en el aparato de Golgi que es muy abundante en los somatotropos así como la presencia de gran cantidad de gránulos de secreción que contienen a las diferentes variantes moleculares de GH principalmente originadas por modificaciones postraduccionales (Harvey *et al.*, 1995, Berumen *et al.*, 2004). Se sabe que el contenido de los gránulos de secreción en la hipófisis es liberado bajo el estímulo de la hormona liberadora de hormona de crecimiento (GHRH); además se sabe que éste factor liberador es capaz de inducir la transcripción del gen de GH de manera independiente de la liberación de GH. La cantidad de GH sintetizada en los somatotropos representa aproximadamente del 10 al 20% de toda la proteína celular bajo condiciones basales aunque esta proporción es incrementada por los secretagogos de GH (Harvey *et al.*, 1995). La biosíntesis de la proteína, procesamiento y tráfico intracelular tarda horas en completarse, y se ha planteado que la hormona recién sintetizada es secretada minutos después de la activación de la traducción.

El receptor de GH (GHR)

Generalidades GHR

El receptor de GH es una pieza clave en la regulación del crecimiento postnatal y tiene importantes implicaciones en acciones metabólicas, reproductivas, gastrointestinales, cardiovasculares, hepato-biliares y renales (Lichanska y Waters, 2008). El GHR es un receptor que pertenece a la familia de receptores de las citocinas tipo 1 y se sabe que utiliza la vía de transducción de señales de JAK (Janus cinasa)/STAT (transductores y activadores de señales de transcripción); sin embargo, nueva evidencia indica que el GHR es capaz de señalar a través de vías adicionales independientes a JAK. Además, el GHR es translocado al núcleo donde se cree tiene importantes funciones biológicas, inicialmente asociadas a la proliferación celular (Lobie *et al.*, 1994).

Estructura de GHR

El receptor a hormona de crecimiento posee 3 dominios, uno extracelular donde se une el ligando, uno transmembranal que sirve de anclaje y uno intracelular el cual induce la activación de las diferentes vías de transducción de señales (Fig 2). El dominio extracelular (ECD) de GHR, consiste en dos dominios de tipo fibronectinas III- β conectadas por medio de una unión flexible. Estos 2 dominios están conectados a un dominio helicoidal transmembranal simple y rígido a través de una unión flexible. El dominio intracelular (ICD) comprende dos motivos, Box 1 y Box 2, los cuales unen a las JAK2 tirosin-cinasa. Los diferentes residuos de tirosina son el substrato de fosforilación a través de JAK2 y se vuelven sitios de unión para proteínas con dominio SH2 (Brooks *et al.*, 2008).

Los dominios de la GH que interactúan con el receptor de la GH (GHR) se han identificado mediante mutagénesis dirigida (Cunningham *et al.*, 1990) y el grado de afinidad de cada mutante se ha evaluado por ensayos de unión de la hormona (marcada radiactivamente) al receptor. Mediante estos estudios y otros en modelos de líneas celulares derivadas de humanos en donde se analizan los efectos de los anticuerpos monoclonales sobre epítopes específicos en la molécula de GH se identificaron algunos requerimientos estructurales para la unión al receptor. Hay dos sitios distintos en los que se puede unir el receptor de GH a la hormona. El sitio 1 incluye la hélice 4 desde su región central al carboxilo terminal y los residuos del asa (54-74), que forman enlaces de hidrógeno y puentes salinos con el GHR. El segundo sitio incluye la hélice 3 y la hélice 1, con puentes no covalentes con el GHR (Harvey *et al.*, 1995).

La activación de GHR, desactivación y translocación nuclear

El receptor de GH se expresa como un monómero y forma un complejo ligando-receptor constituido por una molécula de GH y dos de GHR (GH:GHR₂). Uno de los receptores se une con mayor afinidad al sitio 1 de la GH seguido de una unión más débil a un segundo receptor. El modelo clásico de la activación de GHR postula que la GH induce la dimerización del receptor lo que resulta principalmente en señalización a través de JAK/STAT por medio de la transactivación de JAKs (Waters 2006) aunque existen otras vías asociadas al receptor tales como AKT y MAPs (Fig. 3). Recientemente, se ha revelado que el receptor es encontrado como un dímero en la superficie de la célula en ausencia de

GH, de tal forma que la unión de la hormona al receptor genera un cambio conformacional generando la señalización a través de diferentes vías como las previamente mencionadas (Brown *et al.*, 2005; Gent *et al.*, 2002).

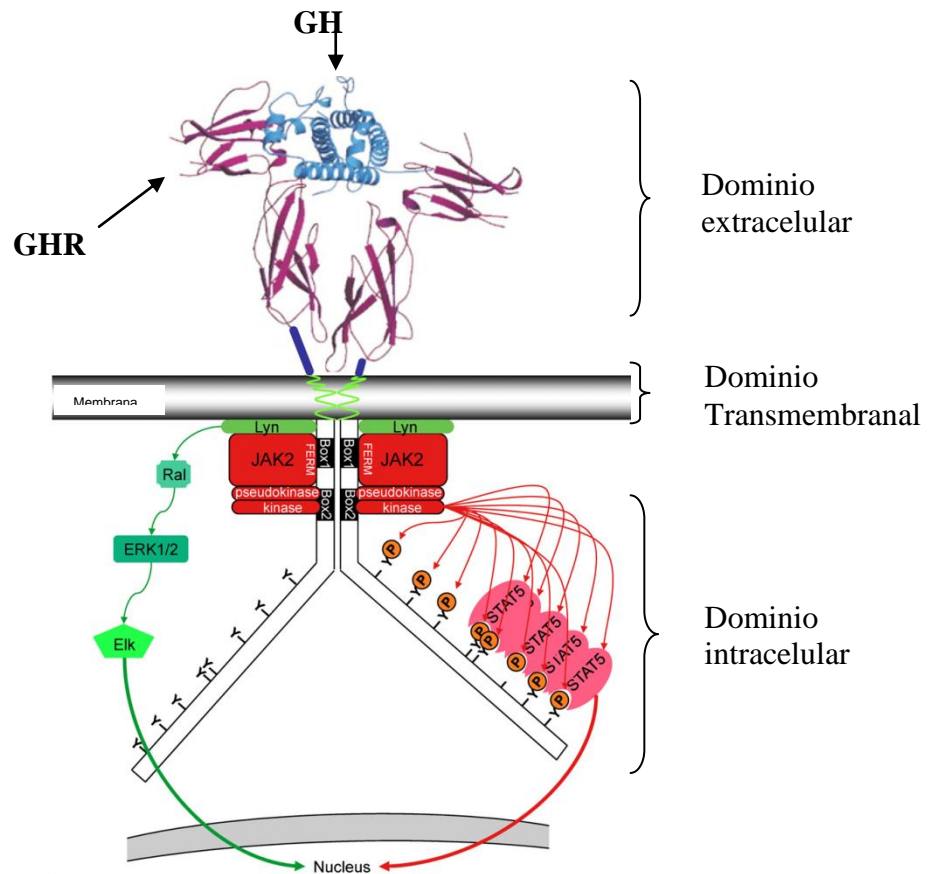


Figura 2. Estructura del receptor de hormona de crecimiento asociado a la vía de señalización JAK-STAT (Brooks *et al.*, 2008).

La rotación individual de las moléculas de GHR es un componente importante en los cambios estructurales inducidos por la unión de GH, tal como lo han ilustrado estudios estructurales y bioquímicos (Brown *et al.*, 2005). Este modelo de activación del receptor de GH no es único, ya que se ha descrito un mecanismo similar en el receptor de eritropoyetina el cual pertenece a la misma familia de receptores (Lu *et al.*, 2006).

El GHR tiene una vida media de aproximadamente 1 h y es continuamente degradado aún en ausencia de GH en el hígado de rata. Existen dos mecanismos conocidos involucrados en las vías de reciclaje o degradación del receptor. Primero, la unión de GH

induce endocitosis del complejo GH-GHR2 que es degradado a través de la unión específica de la ligasa de ubiquitina β TrCP (van KP *et al.*, 2007); y como segundo mecanismo, la acción de la metaloproteasa TACE (TNF-alpha-cleaving enzyme) la cual actúa en el dominio extracelular del GHR generando por proteólisis del receptor las proteínas de unión a GH (GH-BP), aunque cabe mencionar que otras enzimas relacionadas a las metaloproteasas como ADAM-10 han mostrado actividad proteolítica sobre el GHR (Loesch K *et al.*, 2006). El fragmento remanente puede ser blanco del rompimiento dependiente de γ -secretasa liberando el dominio intracelular (ICD), el cual se transloca intracelularmente hacia el núcleo (Cowan *et al.*, 2005).

La mayor parte de los receptores a GH se encuentran en retículo endoplásmico y la superficie celular, también en algunos tejidos (ej. reproductor de rata) es posible encontrar localización nuclear del receptor (Lobie *et al.*, 1990; Lincoln *et al.*, 1998, 2000). La localización nuclear no es una característica exclusiva de GHR; de igual manera otros receptores transmembranales incluyendo el de prolactina, FGFR-1, FGFR-3, ErbB2, ErbB3, ErbB4 y el receptor del factor de crecimiento del endotelio vascular F1k1/KDR se localizan en el núcleo (Giri *et al.*, 2005; Johnson *et al.*, 2004). El transporte del receptor de GH al núcleo se ha vinculado con la interacción con las importinas- α/β (Conway-Campbell *et al.*, 2007) y se conoce que este mecanismo está presente en otros receptores tales como FGFR2, ErbB-2 y el receptor para interferón γ (Ahmed y Johnson 2006; Giri *et al.*, 2005; Marchetti *et al.*, 2006).

Regulación de la Secreción y Síntesis de la GH

La secreción de GH en la hipófisis de todos los vertebrados estudiados durante su desarrollo muestra un patrón pulsátil. Además, los humanos y ratas exhiben un dimorfismo sexual en la secreción de GH. Específicamente, en rata macho, la secreción de GH ocurre en pulsos discretos con bajos niveles inter-picos. Al contrario, la liberación de GH en ratas hembra presenta menor pulsatilidad y los niveles inter-pico son mayores (Giustina y Veldhuis, 1998). En el pez, también han sido descrito variaciones diurnas de la secreción de GH para la trucha arcoíris (Gómez *et al.*, 1996), salmón del atlántico (Bjornsson *et al.*, 2000), pez dorado (Marchant y Peter 1986) y carpa (Zhang *et al.*, 1994). Estas variaciones circadianas son caracterizadas por la existencia de diferentes pulsos a través del día siendo

más altos durante la fase oscura (Boujard *et al.*, 1992; Boujard 1995; Gómez *et al.*, 1996).
 El control hipotalámico de la secreción de GH en mamíferos ha sido considerado como el

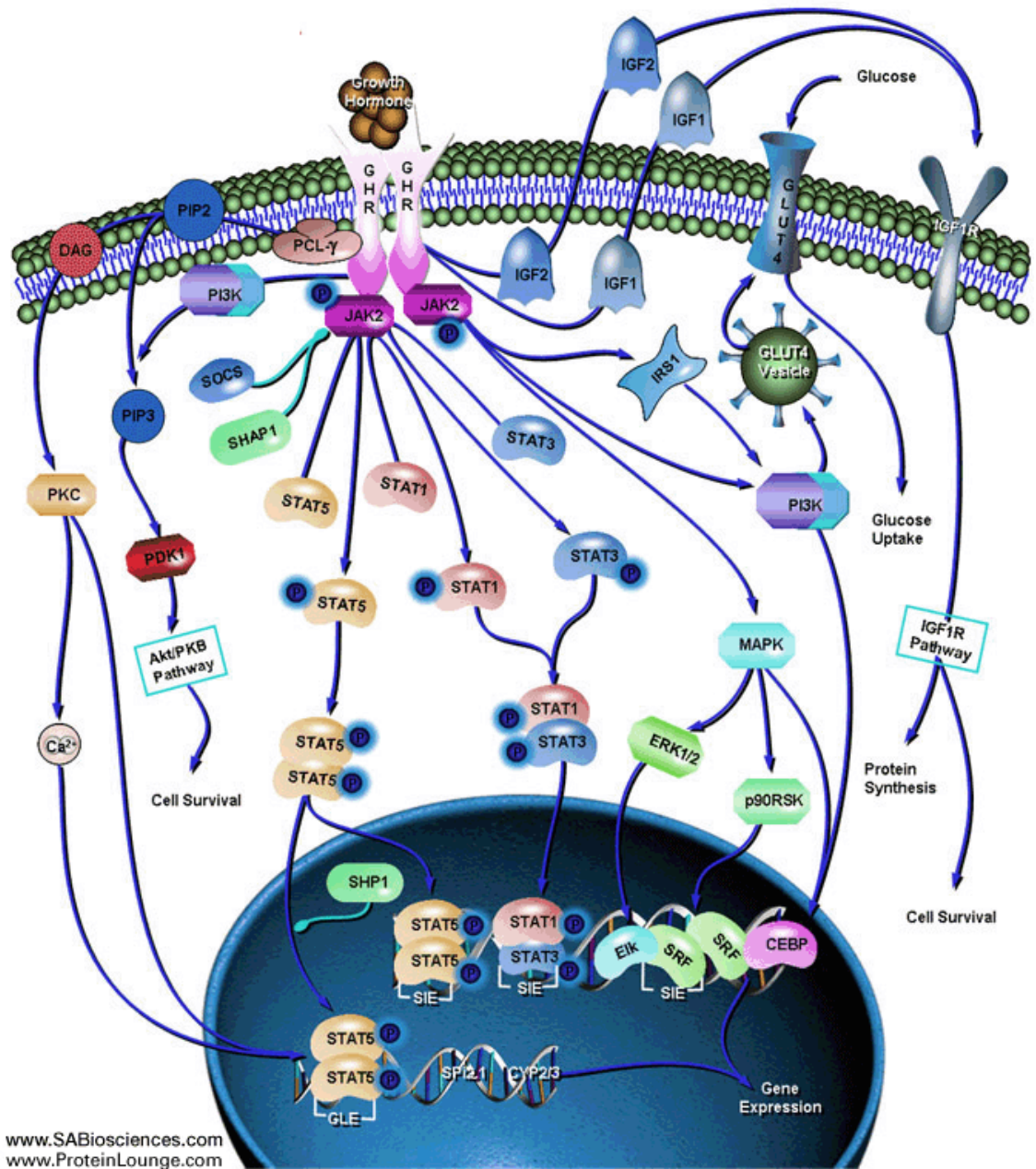


Figura 3. Vías de señalización activadas por el receptor de GH (JAK/STAT, PI3K/AKT, MAPK)

www.sabosciences.com

paradigma clásico del sistema de “control dual” sobre la secreción hipofisaria. La hormona liberadora de GH (GHRH) y el factor inhibidor de la liberación de somatotropina (SRIF; o somatostatina) regulan directamente la secreción de GH de la adenohipófisis (McMahon *et al.*, 2001; Goldenberg y Barkan. 2007). Sin embargo y a pesar de la reciente evidencia que muestra la importancia de péptidos adicionales (por ejemplo: señales metabólicas, otros factores hipotalámicos y citocinas) en la regulación de GH, la regulación hipotalámica de GH aparentemente es más compleja y heterogénea en vertebrados no mamíferos que en mamíferos (Gahete *et al.*, 2009).

La regulación de la GH en peces difiere significativamente de otros grupos de vertebrados porque presentan una organización del eje hipotálamo-hipófisis única en teleósteos. Las células endócrinas de la hipófisis anterior presentan una distribución zonal (Doerr-Schott 1980) y están inervadas directamente por fibras nerviosas provenientes del hipotálamo (Gorbman 1995). Consecuentemente, un número de factores neuro-endócrinos pueden actuar directamente a nivel hipofisario para regular la secreción de GH. Por otra parte, en anfibios y reptiles, se han descrito tres péptidos hipotalámicos (GHRH, SRIF, y PACAP) los cuales son los principales reguladores de la liberación pulsátil de GH. Finalmente, en aves, la regulación de la liberación de GH, está también bajo un control “dual” similar al presente en mamíferos, donde GHRH, TRH y SRIF representan los factores hipofisiotróficos más importantes. A pesar de las diferencias entre los grupos, aparentemente en la mayoría se encuentran involucrados factores hipotalámicos, hipofisarios y periféricos (ghrelina, leptina, hormonas esteroides y factores de crecimiento) en el control de la función de los somatotropos ejerciendo un papel comparable en los diferentes grupos, donde su importancia relativa ha cambiado durante la evolución.

Factores liberadores de GH hipofisaria

GHRH: GHRH es un péptido de 44 aminoácidos producido en el núcleo arcuato del hipotálamo e inicialmente identificado en 1982 en un tumor pancreático causante de acromegalia (Guillemin *et al.* 1982, Rivier *et al.* 1982) y subsecuentemente aislado y caracterizado en otras especies (Malagón *et al.* 2006). En contraste a la mayoría de neurohormonas hipofisiotróficas, la estructura primaria de GHRH es altamente variable.

Estudios iniciales que intentaron analizar el papel potencial de la GHRH en la liberación de GH en el pez fallaron en demostrar una acción estimuladora, probablemente por el hecho de que los péptidos originales en pez que corresponden a GHRH son homólogos de péptidos relacionados con PACAP (Malamed *et al.* 1995; Montero *et al.* 1998; Blaise *et al.* 1995; Luo *et al.* 1990; Vaughan *et al.* 1992). Sin embargo, la reciente identificación de GHRH y su receptor en el pez dorado ha dado luz a este tema a través de mostrar que este péptido es un potente estímulo para la liberación de GH hipofisiaria en estas especies (Lee *et al.* 2004). En anfibios, ha sido demostrado que la GHRH es capaz de estimular la secreción de GH, y su efecto es inhibido por SRIF en una manera dependiente de la dosis (Jeandel, *et al.* 1998). Finalmente, en aves y mamíferos, GHRH ha sido inequívocamente probado como el principal neuropéptido estimulador en generar y mantener la secreción y pulsatilidad de GH (McMahon *et al.* 2001, Tannenbaum, *et al.* 1989, Plotsky y Vale. 1985, Bertherat *et al.* 1995, Wang *et al.*, 2007) aunque existen evidencias importantes para relacionar la participación de TRH como un potente factor liberador de GH (Ahene *et al.*, 1991).

TRH: TRH es un tripéptido sintetizado en neuronas del núcleo paraventricular del hipotálamo que en la mayoría de las especies estimula la liberación de la hormona estimuladora de la tiroides (TSH) y PRL en la adenohipófisis. Adicionalmente, TRH también ha mostrado que tiene acción estimuladora en la liberación de GH en somatotropos de todos los grupos de vertebrados, aunque con algunas diferencias específicas de especie. El papel somatotropogénico de TRH está importantemente conservado durante la evolución de los vertebrados. En peces, la liberación de GH estimulada por TRH o la activación de los somatotropos ha sido reportada en especies de teleósteos, tales como pez dorado y carpa (Trudeau *et al.*, 1992), pero no se han observado efectos en tilapia (Melamed *et al.*, 1995), anguila, y lenguado (Rousseau *et al.*, 2001; Rousseau *et al.*, 1999). La acción directa de TRH en la función de los somatotropos ha sido reportada en anfibios (Gracia-Navarro *et al.*, 1991) y reptiles (Hall y Chadwick, 1984) así como en aves. La TRH parece ser equipotente a la GHRH (Kuhn *et al.*, 2005) en el caso de los pollos (Ahene *et al.*, 1991) pero no para otras aves de corral (Ahene *et al.*, 1991, Harvey, 1990; Lea *et al.*, 1990; Lea y Harvey. 1990). En mamíferos, se ha demostrado que TRH estimula la liberación de GH en

bovinos (Convey *et al.*, 1973) y cabras (Rivier *et al.*, 1982; Blanchard *et al.* 1987; Fletcher y Clarke. 1994). En humanos, la habilidad de TRH de inducir la liberación de GH es mantenido en células tumorales de somatotropos, mientras que este efecto es menos evidente en sujetos normales, así que se sugiere, como PACAP, que TRH ha perdido, al menos en parte, su capacidad para actuar como el estímulo primario del eje somatotrópico (Okinaga *et al.*, 2005; Giustina *et al.*, 1995, 1997; Somjen *et al.*, 1999).

Ghrelina: Ghrelina es un péptido de 20 a 30 aminoácidos, dependiendo de la especie, predominantemente producido por el estómago aunque también expresado en muchos otros tejidos, incluyendo el páncreas, el sistema cardiovascular, y el hipotálamo (van der Lely *et al.*, 2004). Es producido en dos diferentes formas, acilada la cual se une al receptor del secretagogo de GH (GHS) conocido como GHS-R tipo 1a y se considera biológicamente activa y desacilada la cual no se une a GHS-R1a y se pensaba era inactiva pero ahora ha mostrado diversas actividades en tejidos endócrinos y neuroendócrinos (van der Lely *et al.*, 2004). Este péptido, como se sugirió inicialmente por estudios con análogos sintéticos (GHSs), ejerce diversas acciones biológicas, incluyendo la modulación de la secreción de GH y potentes acciones orexigénicas (Kaiya *et al.*, 2008). En teleosteos, la ghrelina actúa como un potente estimulador directo de la liberación de GH en la hipófisis de diversas especies tales como el pez dorado (Unniappan y Peter, 2004), tilapia (Kaiya *et al.*, 2003; Riley *et al.*, 2002), trucha arcoíris (Kaiya, *et al.* 2005), pez gato (Kaiya *et al.*, 2005) y anguila (Kaiya *et al.*, 2003). Este péptido es capaz de estimular la liberación de GH de los somatotropos en anfibios (Kaiya *et al.*, 2001) y reptiles (Kaiya *et al.*, 2004). El papel estimulador de ghrelina ha sido también reportado en pollo por acción directa sobre los somatotropos (Baudet y Harvey, 2003). Finalmente, en mamíferos, la ghrelina tiene una función estimuladora de la secreción de GH, como se reporto por ejemplo, en ratas (Yamazaki *et al.*, 2002), cerdos (Malagon *et al.*, 2003), primates (Kineman y Luque, 2007) y humanos (Lengyel, 2006; Dimaraki y Jaffe, 2006). Consecuentemente se ha concluido que la ghrelina estimula la actividad de los somatotropos en todas las especies estudiadas hasta la fecha. En modelos de ratón carentes de ghrelina y GHS-R no se observaron cambios en la liberación de GH; por lo tanto, aparentemente la función reguladora de ghrelina sobre la GH en los somatotropos es de menor importancia al compararse con

GHRH y PACAP. Sin embargo, el incremento de evidencia relativa a este péptido orexigénico sugiere que podría actuar como una asociación entre el estatus metabólico, el crecimiento y la función reproductiva (Dimaraki y Jaffe, 2006).

Leptina: La leptina es una citocina helicoidal clase I descubierta por la clonación posicional de un gen de obesidad murina y su homólogo humano (Zhang *et al.*, 1994). La leptina es una hormona circulante principalmente secretada, en mamíferos, por el tejido adiposo pero también por algunos otros pocos tejidos. Está ampliamente aceptado que la leptina secretada por los adipocitos comunica al cerebro la cantidad de energía almacenada (lípidos). Este péptido ha sido también detectado en vertebrados inferiores, pero en contraste con los mamíferos, la leptina de pez parece estar principalmente producida por el hígado (Huisling *et al.*, 2006; Kurokawa *et al.*, 2005). Más aún, la inmunoreactividad a la leptina ha sido también detectada en el estómago de anfibios (Muruzabal *et al.* 2002) y en el estómago, plasma, hígado y tejido graso de reptiles (Muruzabal *et al.* 2002; Paolucci *et al.* 2001). Al menos en mamíferos, la leptina también actúa como un neurotransmisor porque este péptido y sus receptores están expresados en el hipotálamo y en células hipofisarias de ratón, rata, oveja y humano (Couce *et al.*, 1997; Dyer *et al.*, 1997; Malik y Young 1996; Morash *et al.*, 1999). No existen datos reportados respecto a la modulación de la secreción de GH por leptina en vertebrados no mamíferos. En contraste, diversos estudios han mostrado que en mamíferos, la leptina ejerce un efecto directo sobre los somatotropos. En ratones y cerdos, la leptina actúa directamente en los somatotropos, induciendo la secreción de GH (Baratta *et al.*, 2002; Luque *et al.*, 2007; Saleri *et al.*, 2004). En ratas y vacas, el efecto de leptina en la regulación de la liberación de GH es además dependiente del estado de alimentación (Carro *et al.*, 1997). En tejidos adenomatosos secretores de GH la leptina parece ejercer un ligero efecto inhibitorio de la secreción espontánea de GH y un efecto estimulador en la secreción de GH estimulada por GHRH. Si bien, la leptina tiene capacidad para modular la secreción de GH de la hipófisis en mamíferos existen evidencias que sugieren que esta modulación difiere entre las especies estudiadas hasta la fecha y falta explorar su papel en vertebrados inferiores (Gahete *et al.*, 2009).

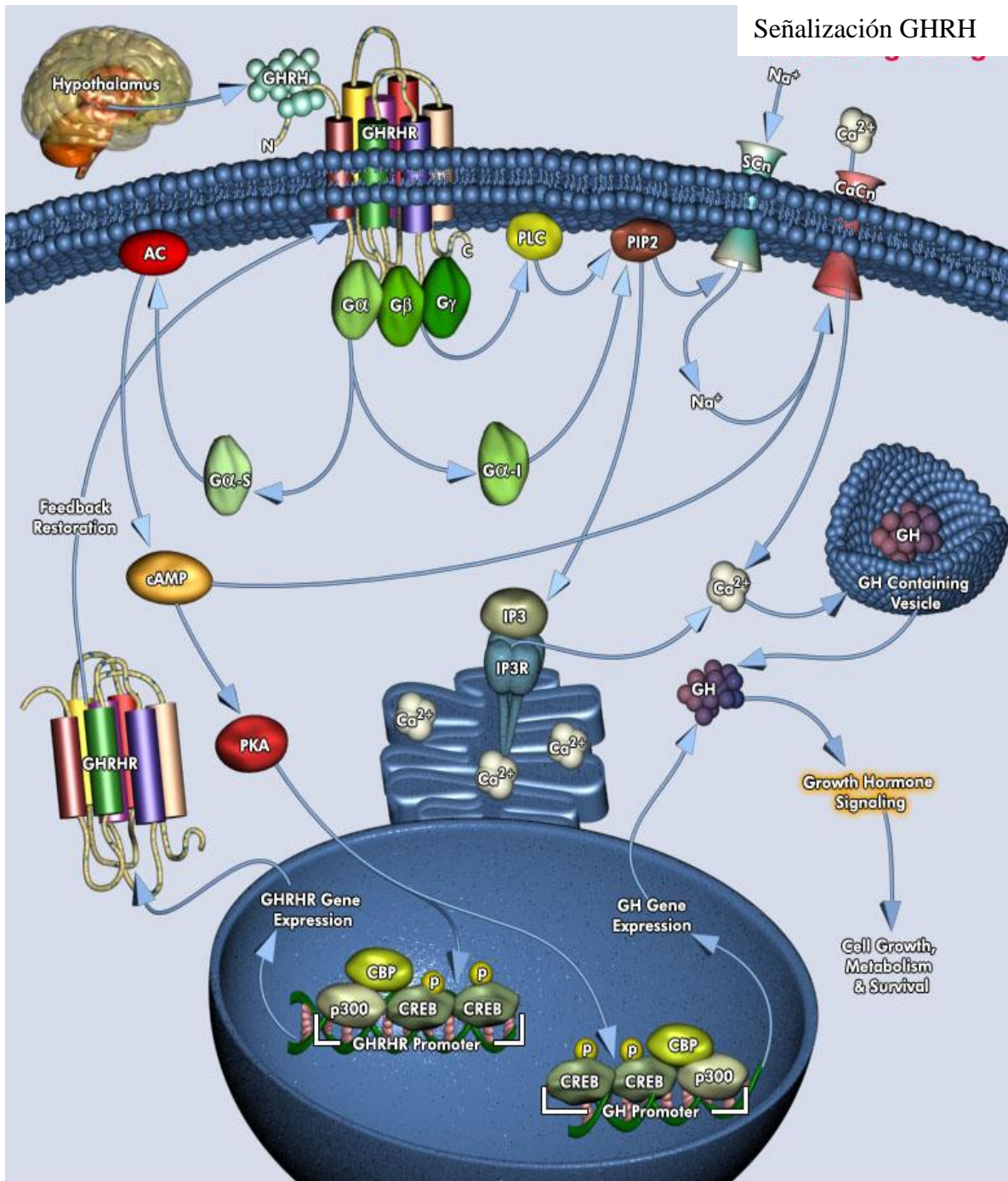


Figura 4. Vía de señalización de GHRH. Efecto sobre la transcripción del gen de GH, el gen del receptor de GHRH y sobre la secreción de hormona de crecimiento (www.sabosciences.com).

Mecanismos moleculares de acción de GHRH

Durante la regulación de la secreción de la GH en respuesta a GHRH se activa la vía de la adenilato ciclasa que a través del AMPc fosforila y activa a la cinasa de proteína A; en consecuencia, se producen rearrreglos en el citoesqueleto que permiten la fusión de las vesículas de secreción. Como efecto de la apertura de los canales de Na^+ se despolariza la membrana y se abren canales de Ca^{2+} dependientes de voltaje, lo que permite la entrada de calcio indispensable para la liberación de GH. Después, se activa la ATPasa de Ca^{2+} que restaura los niveles de Ca^{2+} intracelular. Además de esta vía se ha observado en los somatotropos la activación de la fosfolipasa A_2 en respuesta a la GHRH, esto induce la movilización de Ca^{2+} intracelular desde el retículo endoplásmico a través de la apertura de canales de calcio por la unión del trifosfato de inositol (IP_3) y la fusión de las vesículas de secreción por la activación de la proteína cinasa C activada por diacilglicerol y ácido araquidónico. La inhibición de este proceso está dada principalmente por la SRIF a través de la unión al receptor. La SRIF es capaz de inhibir mediante una proteína Gi la formación de AMPc y la entrada de Ca^{2+} y, como consecuencia, la secreción de GH (Harvey *et al.*, 1995). En la Figura 4 se ejemplifican los principales efectos de la GHRH sobre el gen de GH y en la secreción de GH.

Factores liberadores en Testículo

GHRH: Se ha encontrado la expresión de GHRH en testículo de pollo, rata y humano. En la rata su distribución es en células germinales (espermátides y espermatogonias), en células de Sertoli y Leydig, así como un receptor que une a GHRH como se esquematiza en la Figura 5 (Wang *et al.*, 2007; Berry *et al.*, 1992; Fabbri *et al.*, 1995; Moretti *et al.*, 2002). En el caso de las aves el grupo de Wang describió la expresión de GHRH (Fig. 6) y de su receptor, sin embargo no se ha descrito la distribución de este sistema en el testículo de estos vertebrados.

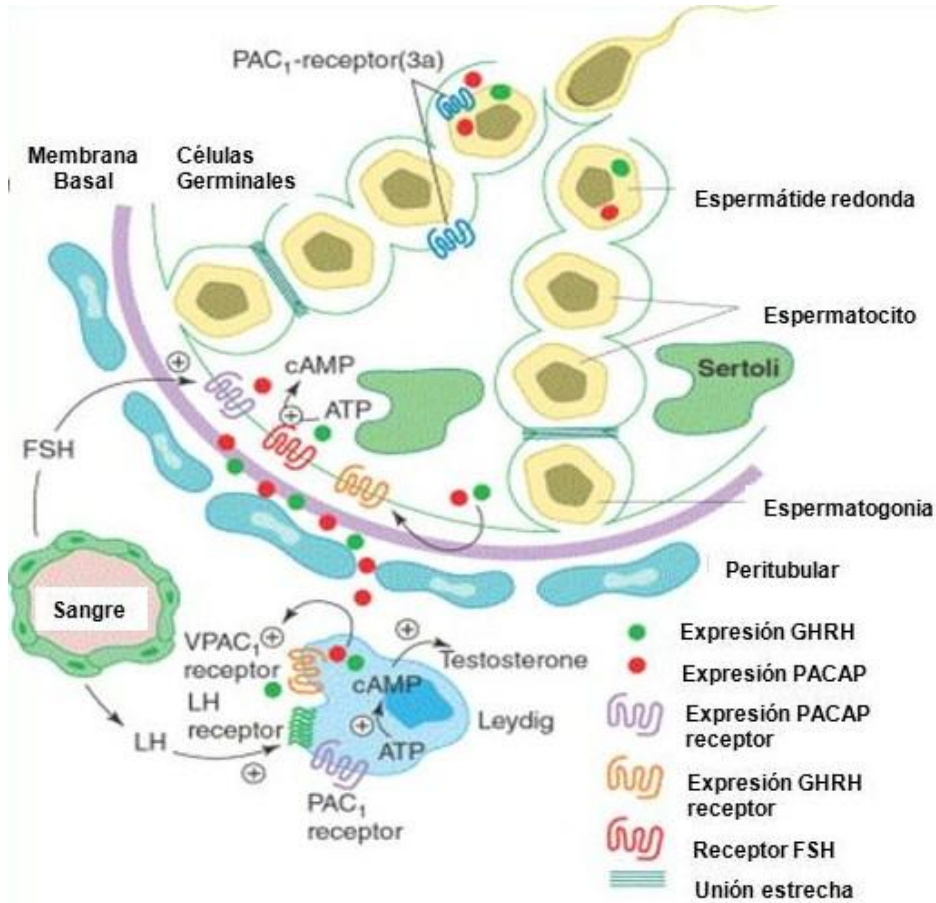


Figura 5. Distribución de GHRH en testículo de rata (Moretti *et al.*, 2002).

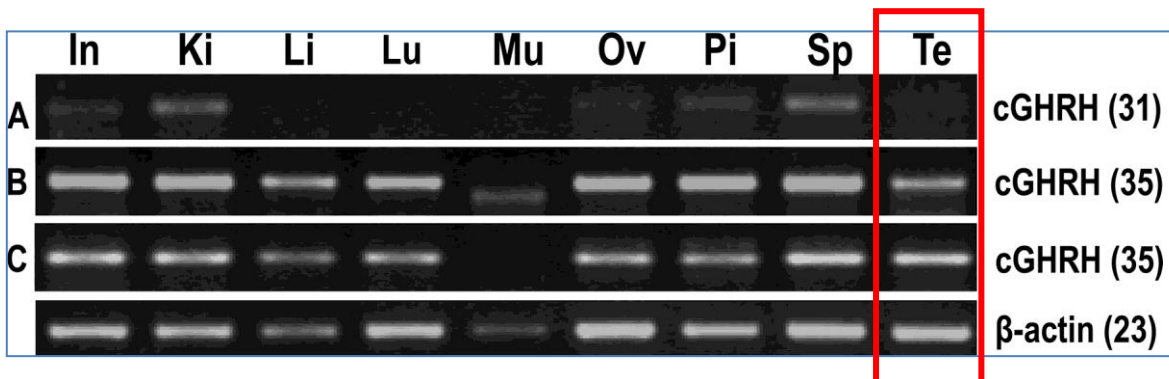


Figura 6. Expresión de ARNm de GHRH en tejidos de pollo; en A la aplicación del ARNm de GHRH se realizó con 31 ciclos; B y C con 35 ciclos; actina se amplificó con 23 ciclos. In, inestiuo; Ki, riñón; Li, hígado; Lu, pulmón; Mu, músculo; Ov, ovario; Pi, hipófisis; Sp, bazo y Te, testículo (Wang *et al.*, 2007).

Se conoce que las células de Leydig de rata en cultivo son capaces de sintetizar hormonas hipotalámicas como CRH y GHRH (Srivastava *et al.*, 1993a); es también

conocido que la gonadotropina coriónica humana (hCG) promueve la liberación de GHRH en estas células en cultivo. Existen evidencias que señalan que la GHRH y el péptido intestinal vasoactivo (VIP) compiten por el mismo receptor en las células de Leydig de rata en cultivo (Ciampani *et al.*, 1992).

Ghrelina: La actividad de ghrelina en relación a su efecto sobre la reproducción se evaluó primero en los testículos, si bien, la probabilidad de que éste péptido presente algún efecto fue concebible gracias a estudios previos que describen los efectos de otros reguladores de balance energético periféricos tales como la leptina sobre los testículos (Tena-Sempere y Barreiro, 2002). Así mismo, la presencia del receptor funcional de ghrelina el GHS-R1a en los testículos de mamíferos llevó a pensar que ghrelina tiene efectos directos y específicos en la regulación de hormonas gonadales (García *et al.*, 2007). Es posible que estos efectos gonadales se lleven a cabo sobre la espermatogénesis a través de la modulación de la actividad esteroidogénica como lo han demostrado estudios donde la adición de ghrelina modifica la actividad de enzimas esteroidogénicas.

Tanaka y col. (2001) describieron la expresión testicular del gen de ghrelina en roedores y paralelamente la expresión del receptor gonadal. Se demostró la expresión de ghrelina en etapas postnatales y su distribución específica en las células de Leydig. Se determinó también que en la rata la presencia del receptor GHS-R1a se mantiene relativamente constante a lo largo de la vida posnatal, y su localización se reportó principalmente en células Sertoli y de Leydig, aunque eventualmente también en la línea germinal (Barreiro *et al.*, 2002; Tena-Sempere *et al.*, 2002). Se demostró que ghrelina inhibe de manera dependiente de la dosis la secreción de testosterona a través de disminuir los niveles de expresión de enzimas de la ruta esteroidogénica tales como la proteína reguladora de esteroides (StAR), la enzima de rompimiento de la cadena lateral (P450_{scc}), la 3 β hidroxiesteroide deshidrogenasa (HSD) y la 17 β -HSD tipo III específica de testículo (Tena-Sempere *et al.*, 2002). Considerando que el mayor estimulante de la expresión gonadal de ghrelina es la LH hipofisaria, es posible especular que ghrelina podría estar operando como un regulador local de las acciones esteroidogénicas de LH, lo que puede estar autolimitando la respuesta testicular de testosterona a la estimulación gonadotrópica (Barreiro *et al.*, 2002). De tal forma, se ha descrito que los niveles elevados de ghrelina circulante como los observados bajo insuficiencia energética podrían contribuir a la

supresión del eje reproductivo en situaciones de balance energético negativo, tales como en el ayuno (Dornonville *et al.*, 2005). En adición a los efectos sobre esteroidogénesis, la ghrelina podría estar regulando funciones directas dentro de los túbulos seminíferos, ya que se ha demostrado la expresión de GHS-R1a en el compartimiento tubular de los testículos. De hecho, ghrelina es capaz de inhibir la expresión de SCF (stem cell factor), el cual es un producto de las células de Sertoli y a quien se le ha identificado como el principal estimulador parácrino del desarrollo de la línea germinal, donde funciona como un factor de sobrevivencia en espermatogonias, espermátocitos y espermátides (Barreiro *et al.*, 2003, 2004; Hakovirta *et al.*, 1999; Yan *et al.*, 2000).

Leptina: La leptina es un factor de unión entre el almacén de energía y diferentes funciones vitales, tales como ingesta de alimento, homeostasis energética y función reproductiva (Zang *et al.*, 1994; Halaas *et al.*, 1995; Chehab *et al.*, 1996). Estas acciones son mediadas por el receptor a leptina conocido como Ob-R el cual pertenece a la familia de receptores a citocinas (Tartaglia *et al.*, 1995). El mayor sitio de acción de la leptina es en el hipotálamo donde la concentración de la isoforma funcional del receptor a leptina se encuentra expresada a su nivel máximo (Fei *et al.*, 1997). Los receptores a leptina han sido identificados en diferentes tejidos endócrinos de órganos como ovarios, adrenales, páncreas y testículo (Specier *et al.*, 1997; Karlsson *et al.*, 1997; Ryan *et al.*, 2002; Bornstein *et al.*, 1997; Kieffer *et al.*, 1996). La activación del receptor Ob-R presente en las células de Leydig de roedores tiene la capacidad de inhibir la producción de testosterona inducida por hGC en estas células aisladas (Caprio *et al.*, 1999). Resultados similares se obtuvieron con células ováricas y adrenales donde se demostró que la leptina tiene la capacidad de inhibir la producción de estradiol estimulada por FSH y la producción de cortisol bajo estímulo de ACTH respectivamente (Specier *et al.*, 1997; Zachow *et al.*, 1999; Bornstein *et al.*, 1997; Parlong *et al.*, 1998).

La expresión del receptor en testículo de rata desde la vida gestacional hasta su madurez presentó un patrón de expresión similar al RLF o factor similar a relaxina el cual es un indicador de la maduración de las células de Leydig (Balvers *et al.*, 1998; Speiss *et al.*, 1999; Caprio *et al.*, 2003). Durante la vida prenatal de las ratas la inmuno-reactividad testicular a Ob-R no está presente y en la vida postnatal la inmuno-reactividad se presenta hasta la pubertad (Caprio *et al.*, 2003).

Hormona Inhibidora de gonadotropinas (GnIH): La hormona inhibidora de gonadotropinas (GnIH) fue aislada inicialmente en el hipotálamo de codorniz y ha mostrado la capacidad de inhibir la secreción de la hormona luteinizante (LH) de la hipófisis anterior tanto *in vitro* como *in vivo* (Tsutsui *et al.*, 2000); además en ratas se demostró que un péptido homólogo de la familia de las RFamidas (RFRP-3), las cuales son similares a la GnIH induce la liberación de hormona de crecimiento hipofisiaria (Johnson *et al.*, 2007). La GnIH es un dodecapéptido que pertenece a la familia de los péptidos RFamida con un motivo C-terminal Pro-Xaa-Arg-Phe-NH₂. El gen que codifica a la proteína precursora de GnIH en la codorniz japonesa, pollo y gorriones ha sido clonado y se encontró que comparte un alto grado de homología entre estas especies (Satake *et al.*, 2001; Osugi *et al.*, 2004; Ikemoto y Park 2005). Las neuronas inmunoreactivas (IR) a GnIH se encontraron primordialmente en el núcleo paraventricular del hipotálamo mientras que las fibras IR-GnIH se encontraron a en diferentes zonas del cerebro incluyendo la eminencia media en codorniz japonesa (Ukenta *et al.*, 2003) y en gorriones (Bentley *et al.*, 2003). Además a las especies de aves, las RFamidas, se han encontrado en hamsters, ratas y ratones (Kriegsfeld *et al.*, 2006) donde los cuerpos celulares de las neuronas IR-GnIH se encuentran en el hipotálamo mediobasal con pronunciadas proyecciones y terminales a lo largo del sistema nervioso central. Los receptores para péptidos RFamida (RFRPs) homólogos a GnIH han sido previamente identificados en ratas y ratones (Hinuma *et al.*, 2000, Ukena y Tsutsui 2001; Ukena *et al.*, 2002). La amplia distribución de fibras IR-GnIH en múltiples áreas del cerebro es consistente con la idea de que GnIH tiene diversas funciones tales como la conducta de alimentación en pollos (Tachibana *et al.*, 2005) y la conducta sexual en gorriones de corona blanca (Bentley *et al.*, 2006). Debido a la posición proximal que presentan las neuronas GnRH y GnIH se ha sugerido que exista una posible interacción entre estos 2 tipos neuronales (Kriegsfeld *et al.*, 2006). Se conoce que la expresión de GnIH en el cerebro de la codorniz es regulada foto-periódicamente aparentemente con incremento ante la administración de melatonina en animales pinealectomizados (Ubuka *et al.*, 2005).

Al administrar GnIH vía intracerebro ventricular o periférica a hamsters sirios ovariectomizados se observó una disminución en las concentraciones plasmáticas de LH, lo que da evidencia del efecto inhibitor de la liberación de gonadotropinas (Kriegsfeld *et*

al., 2006). También se ha descrito que el tratamiento con GnIH en rebanadas de hipófisis de pollo disminuye la liberación de FSH y LH (Ciccione *et al.*, 2004). Se demostró la presencia de GnIH en el testículo de codornices japonesas y pavorreal, además se demostró que es capaz de inducir apoptosis testicular y decrementar la actividad espermatogénica cuando se administra GnIH continuamente durante 2 semanas en codornices japonesas (Ubuka *et al.*, 2006). Se conoce que además de la expresión central e hipofisaria del receptor de GnIH éste se encuentra presente en las gónadas de aves y su expresión se encuentra influenciada por esteroides y por la maduración sexual de la gónada (Maddineni *et al.*, 2008).

Aparato reproductor masculino en aves

Estructura del aparato reproductor masculino en aves

En las aves machos los testículos se encuentran ubicados en pares en la zona cráneo-ventral en el primer lóbulo del riñón. El conducto deferente emerge medialmente y pasa caudalmente a la cloaca donde tiene una desembocadura común con el uréter en el Urodeum. La porción terminal de los conductos deferentes está hinchada como un órgano de almacenamiento: el glomus seminales (o vesícula seminal como se muestra en la figura 7 a la izquierda). Al igual que en algunos mamíferos, la formación de espermatozoides es sensible a la temperatura y la maduración de los espermatozoides es potenciada con la disminución de la temperatura nocturna (Ritchie *et al.*, 1994).

Espermatogénesis

La espermatogénesis representa el proceso por el cual los precursores denominados espermatogonias llevan a cabo a una serie de divisiones mitóticas y meióticas para dar lugar a espermatozoides. Las células del epitelio germinal se ubican desde la membrana basal de los túbulos seminíferos hasta la luz del túbulo. Los perfiles citoplasmáticos de las células de Sértoli son extremadamente complejos, ya que esta célula extiende una serie de procesos que rodean a las células germinales adyacentes en un patrón arbóreo. La espermatogénesis se puede dividir en tres fases principales (i) la proliferación y diferenciación de las espermatogonias, (ii) la meiosis, (iii) y espermiogénesis lo que representa una metamorfosis de procesos relacionados con la transformación de espermátides redondas que derivan de la división final de la meiosis en la estructura del espermatozoide.

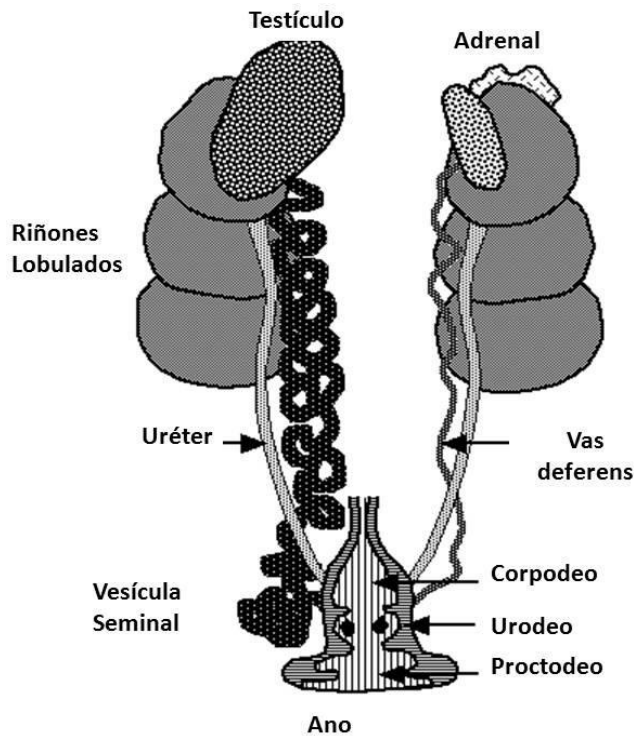


Figura 7. Sistema reproductor masculino de aves. Se muestran los testículos en 2 estadios, durante época reproductiva (izquierda) y durante regresión testicular (derecha), además se muestran los riñones tri-lobulados, uréteres, vas deferens y vesícula seminal.

Las espermatogonias representan una población celular que se divide por mitosis, proporcionando tanto la renovación de una población de células madre, así como espermatogonias que se han comprometido a entrar en el proceso de meiosis. La identificación de los tipos de espermatogonias es diferente y variable entre las diversas especies de vertebrados estudiados, debido a la falta de marcadores moleculares definitivos y conservados que permitan identificar a etapas específicas. Hasta la fecha, la clasificación de estas células ha dependido solamente de las características de sus núcleos y, en particular, sus patrones de la cromatina, así como la disposición histológica y su asociación con otras etapas de diferenciación. Actualmente se conoce que la identificación de las diferentes etapas de diferenciación de la línea germinal se lleva a cabo a través del análisis de la expresión de diferentes proteínas, por ejemplo: células germinales primordiales: SSEA-1, fosfatasa alcalina; gonocitos: AP2gamma, OCT3; espermatogonia: c-kit; espermatocito: DAZ (Stukenborg et al., 2010).

GH en la función reproductora en el pollo

GH y Espermatogénesis

La posibilidad de que la GH afecte la función del tracto reproductivo de machos fue considerada en 1963 por Boccabella, quien sugirió que la GH puede estimular la espermatogénesis en ratas. Posteriormente Spiteri-Grech y Nieschaleg (1992) concluyeron que la GH tiene un papel menor en la espermatogénesis; sin embargo otros estudios sugieren una fuerte relación entre la GH y la fertilidad masculina (Shoham *et al.*, 1994). También se sabe que la motilidad espermática se ve disminuida en ratas y ratones deficientes de GH y es restablecida por la administración de GH (Kuroda 1989; Breier *et al.*, 1996; Gravance *et al.*, 1997). Este mismo grupo observó un decremento en el número de espermatozoides maduros pero un nivel normal de espermátides en roedores deficientes de GH y por lo tanto es factible mencionar que la GH puede afectar los procesos finales (espermiación) más que la espermatogénesis (Kuroda, 1989). Matsushima *et al.*, (1986) notaron un número menor de espermatogonias, espermatocitos, espermátides y espermatozoides en roedores GH-deficientes en los cuales al suplementarles GH recuperaban las cuentas normales. Además de sus efectos en la línea germinal se observó que en células de Leydig y Sertoli, también se ve afectada su maduración cuando existe deficiencia de GH y al adicionar GH exógena se ve recuperado el tamaño y funcionalidad del testículo (Shoham *et al.*, 1994).

GH y Esteroidogénesis

Está bien establecido que la GH puede modular la gametogénesis afectando la síntesis de testosterona, ya que esta hormona es necesaria para la producción de espermatozoides en todas las especies de vertebrados estudiadas. Esta propuesta se apoya en la presencia del ARN mensajero del GHR en células de Leydig progenitoras, inmaduras y maduras (Kanzaki y Morris, 1999), así como en la disminución de la secreción de testosterona en ratones resistentes a GH (Chandrashekar *et al.*, 1999). La acción esteroidogénica de la GH también se puede reflejar a través de la inducción de receptores testiculares a hormona luteinizante (LH) en ratones enanos (Chatelain *et al.*, 1991), rata (Bex *et al.*, 1978) y en el hámster dorado (Zipf *et al.*, 1978) todos ellos con deficiencia de

GH. Por medio de inmuno-histoquímica en cortes de testículo de pollo ha sido posible identificar inmunoreactividad a GH en el epitelio germinal y en los intersticios de los túbulos seminíferos donde se encuentran las células de Leydig (Luna *et al.*, 2004).

La acción esteroidogénica de la GH podría ser a través del IGF-1 local/ hepático, aunque estudios *in vitro* sugieren un papel independiente de la IGF-1 en la función de las células de Leydig. Kanzaki y Morris (1999) han mostrado que la GH incrementa la síntesis de andrógenos (testosterona) en 3 horas de incubación de células progenitoras de células de Leydig en rata (PLCs). En cultivos de células de Leydig de rata se ha demostrado que la GH y el IGF-1 son capaces de potenciar el efecto de interleucina-1 α sobre la producción de testosterona y dihidro-testosterona (Colón *et al.*, 2005). Sin embargo en cultivos de células de Leydig de equinos a diferentes etapas de madurez sexual se encontró que no existe efecto de GH ni de IGF-1 en la producción de testosterona y estradiol (Hess *et al.*, 2005).

Se ha planteado que la GH tiene su efecto sobre los pasos iniciales de la vía de síntesis esteroidogénica debido a que los niveles del ARN mensajero de la proteína reguladora de la esteroidogénesis (StAR, la cual regula la translocación del colesterol a la membrana interior de la mitocondria) y de la enzima 3 β -hidroxiesteroide deshidrogenasa 3 β HSD (la cual convierte pregnenolona en progesterona) se ven incrementados en el estudio de Kanazaki y Morris (1999). El grado de respuesta a GH puede ser asociado a la abundancia del GHR, debido a que el ARN mensajero de GHR es menos abundante en PLCs que en las células inmaduras y adultas (Kanzaki y Morris, 1999). Sin embargo, la GH realiza la transducción de señal a través de STAT5 en PCLs e inmaduras (Kanzaki y Morris, 1998). Así se pudo plantear que la GH induce tempranamente la diferenciación de las células de Leydig y además la producción de esteroides por medio de un mecanismo dependiente de STAT-5, y adicionalmente influenciar las enzimas esteroidogénicas de una manera independiente de STAT-5.

La Hormona de Crecimiento (GH) Extrahipofisiaria

Se ha encontrado el ARNm de GH así como una proteína semejante a la GH, la cual se sintetiza en otros tejidos extra-hipofisarios como en el sistema nervioso, reproductor e

inmune de pollo, incluso en algunos que se consideraban órganos y tejidos blanco de la hormona (Harvey *et al.*, 1995).

Hormona de Crecimiento Testicular

Expresión de GH en testículo

La expresión del gen de hormona de crecimiento no se encuentra restringida a los somatotropos de la hipófisis de vertebrados ya que recientemente ha sido demostrada su expresión extrahipofisiaria en diferentes tejidos. La posibilidad de que la expresión del gen ocurra en el tracto reproductor de machos ha sido propuesta con anterioridad y solamente se había detectado a nivel testicular en humanos en donde demostraron que era la variante placentaria y no la hipofisiaria la que es transcrita (hGH-V) (Berger *et al.*, 1999; Untergasser *et al.*, 1997, 1998). Sin embargo recientemente se logró encontrar el ARN mensajero de GH en testículo y vasos deferentes de gallos adultos. También fue reportada la presencia del ARN mensajero de Pit-1 en estas estructuras lo que sugiere la acción de éste factor transcripcional en la expresión del gen GH en el tracto reproductor masculino (Harvey *et al.*, 2004).

Secuenciación del ARN mensajero en testículo

La secuencia del ARN mensajero de GH en testículo solamente se ha descrito en pollo y este mensajero tiene una abundancia 1000 veces menor a la hipofisiaria (no detectable por Northern blot). La secuenciación del ADNc de la GH testicular obtenida de un RT-PCR de 690 pb presentó una homología del 99.6% con la secuencia consenso publicada para ADNc de GH hipofisiaria de pollo. Esta secuencia solo difiere del ADNc consenso de la GH hipofisiaria en tres sustituciones de pares de bases: una sustitución de base en el residuo 102 (137 del fragmento de ADNc) (una T por una C), una sustitución de base en la posición 461 (496 del fragmento de ADNc) (una G por una A) y una sustitución de base en la posición 588 (623 del fragmento de ADNc) (una A por una G). Las sustituciones en los residuos 102 y 588 no alteraron la secuencia de aminoácidos predicha para la proteína, y solo difiere un solo aminoácido (glicina por aspartato), en el residuo 154 de la pro-hormona (residuo 129 de la hormona madura) (Tanaka *et al.*, 1996; Harvey *et al.*, 2004), lo que nos indica que es el mismo gen. La comparación de las secuencias se muestra en la Figura 8.

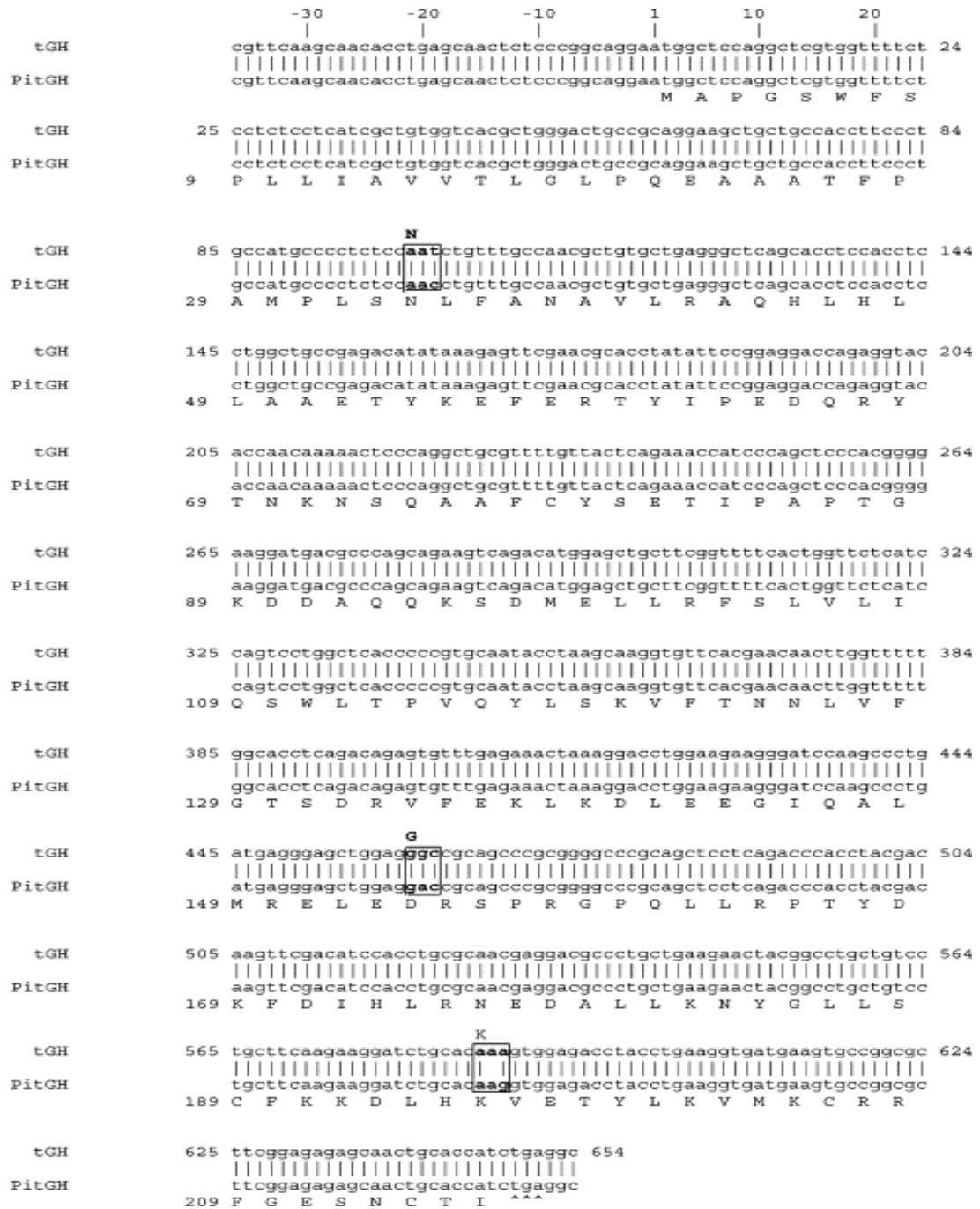


Figura 8. Comparación de la secuencia de la GH hipofisaria vs GH testicular de pollo. Se señala en recuadros las diferencias y el aminoácido que cambia se muestra en la parte superior. tGH, hormona de crecimiento testicular de pollo; PitGH, GH hipofisaria de pollo (Harvey *et al.*, 2004).

Distribución del ARN mensajero de GH en testículo

El ARN mensajero fue localizado por medio de hibridación *in situ* en cortes de testículo de pollos prepuberes en los cuales fue posible localizar marca positiva para el ARN en la zona correspondiente a espermatogonias y espermatocitos primarios en los túbulos seminíferos (Fig. 9). Cabe mencionar que se observó un patrón diferente en la distribución en la inmuno-reactividad testicular al anticuerpo contra GH, ya que principalmente se observó en espermatocitos secundarios, espermátides y en la zona correspondiente a espermatozoides inmaduros (Harvey *et al.*, 2004; Luna *et al.*, 2004).

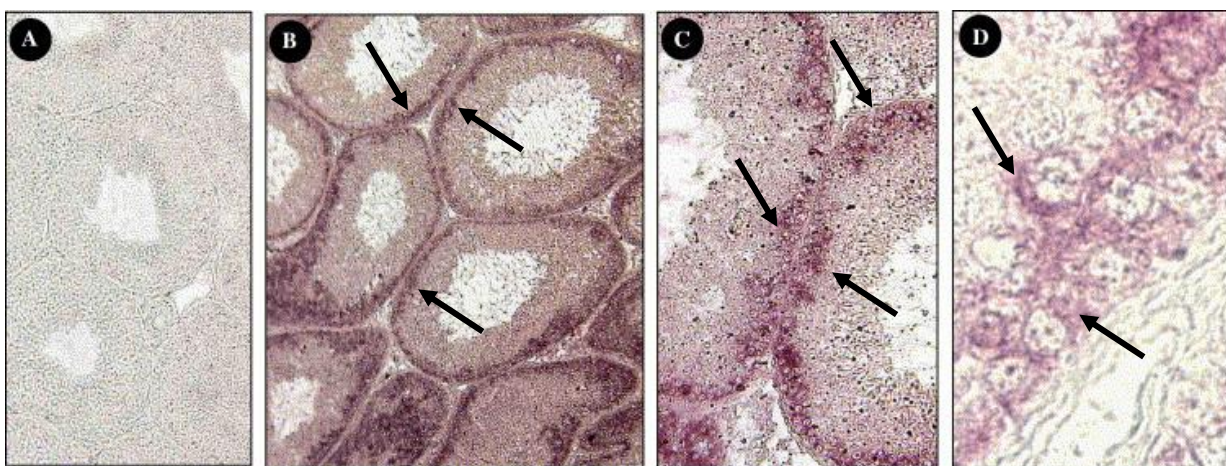


Figura 9. Distribución de ARN mensajero de la GH en testículos de pollos sexualmente maduros. A) Control negativo B, C y D) muestran marca positiva para el ARNm de GH en túbulos seminíferos. Flechas señalan ejemplos de localización de ARNm de GH. (Harvey *et al.*, 2004).

Concentración de GH en testículo

La concentración de GH detectada en los testículos de pollo es 1000 veces menor que la presente en la hipófisis, por lo tanto es poco probable que contribuya significativamente a la GH circulante. Sin embargo, es posible que la producción local tenga como fin modular acciones locales en el testículo. Esta sugerencia está sostenida en el hecho de que los resultados de la inmuno-histoquímica muestran IR a GH dentro de la barrera hemato-testicular (formada por las células de Sertoli a través de uniones ocluyetes las cuales impiden el paso de proteínas hacia la luz del túbulo seminífero) implicando la idea de que no se secrete hacia el plasma. Los testículos deben ser 5 a 1000 veces de mayor tamaño que la hipófisis, de tal forma, que el contenido total de GH en la gónada en ciertas edades, particularmente después de la maduración sexual, puede ser significativo y

comparable con el contenido total a nivel hipofisiario. La concentración de GH testicular se modifica con la edad; a las 35 semanas (etapa de mayor fertilidad) se presenta la mayor concentración, en tanto que a las 4 semanas (infantil) ocurre un incremento marcado en la concentración comparado con etapas embrionarias (18 días de embrión) y neonatales (1 día); esta concentración se mantiene a través de la pubertad (15 semanas) y es hasta la semana 66 (adulto) que la cantidad tiene una tendencia a disminuir como se muestra en la Figura 10 (Luna *et al.*, 2004).

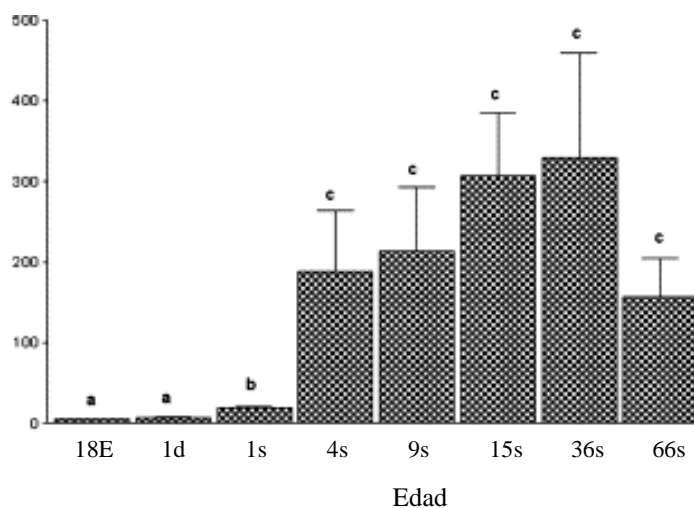


Figura 10. Concentración testicular de GH durante la ontogenia del pollo determinado por ELISA. Letras diferentes muestran diferencias significativas. 18E, embrión; 1día, neonato; 4-9 semanas, infantil; 15 semanas, puberal y 36-66 semanas, adulto. Escala en ng de GH / mg de proteína (Luna *et al.*, 2004).

Distribución de la GH testicular

En los testículos, la inmuno-reactividad a GH se pudo asociar con células germinales, específicamente en espermatoцитos y espermátides, aunque no está presente en espermatoгонias de pollos de 15 semanas de edad. También fue posible observar marca en la zona intersticial de los túbulos seminíferos donde se encuentran las células de Leydig como se puede observar en la figura 11 (Luna *et al.*, 2004). El descubrimiento de GH en los mioцитos circundantes de los túbulos seminíferos es consistente con las presencia de ARN mensajero en células epiteliales de otros tejidos como por ejemplo en el músculo liso de vasos sanguíneos, lo cual sugiere que la GH podría cumplir alguna función autócrina en la contracción del túbulo (Recher *et al.*, 2001).

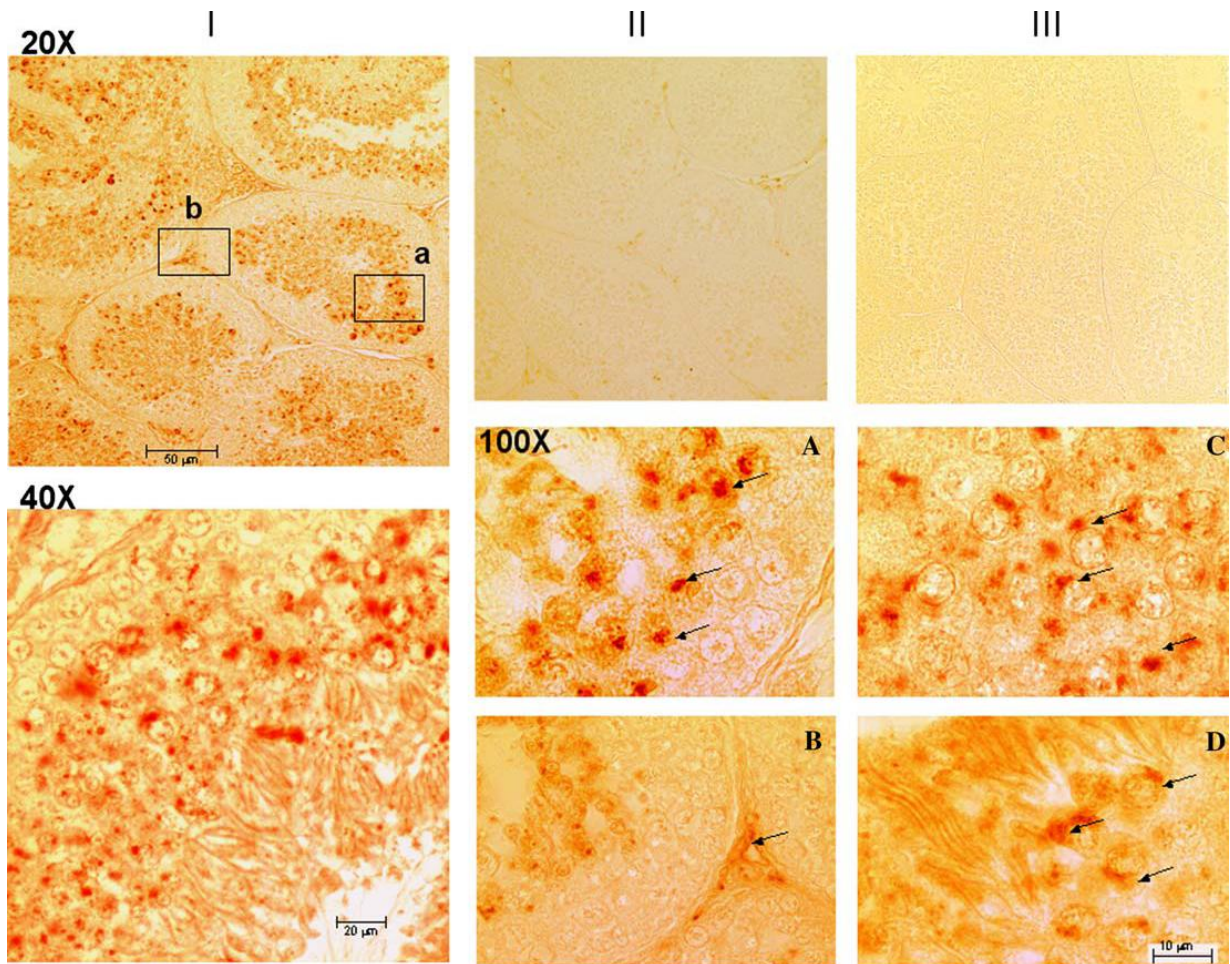


Figura 11. Distribución de la inmunoreactividad contra GH en cortes de testículo de pollos prepuberales de 15 semanas. **I** se muestran panorámicas de la distribución de GH en el epitelio germinal (aumentos 20x y 40x), en **II** y **III** se presentan controles negativos. **A** y **C** muestran inmunoreactividad a GH en espermatocitos; **B** inmunoreactividad a GH en zonas intersticiales y células de Leydig; **D** en espermatídes. Las flechas señalan ejemplos de inmunoreactividad. (Luna *et al.*, 2004).

Heterogeneidad Molecular de GH testicular

La GH testicular en pollos presenta variantes moleculares de 14, 15, 17, 23, 26, 29, 32, 35, 40, 45 y 52-kDa donde la variante que posee la mayor abundancia relativa es la de 17 kDa a lo largo de todo el desarrollo. La GH testicular presenta cambios en la proporción relativa de sus variantes durante la ontogenia, incluyendo un marcado decremento de la proporción de la banda de 14 y 40-kDa (bajo condiciones reductoras, CR) entre los 18 días de embrión y 66 semanas de edad. La proporción relativa de la variante de 17-kDa aumenta entre los días 1-7 post-eclosión y se mantiene constante hasta las 66 semanas (Luna *et al.*,

2004). Cabe hacer mención que la variante de mayor abundancia relativa en la hipófisis y plasma de pollos es el monómero de 26-kDa (CR) (Arámburo *et al.*, 1989, 2001).

GH autócrina/parácrina

Los testículos se encuentran vascularizados eficientemente y muchas de las acciones testiculares de la GH exógena descritas son aparentemente el reflejo de acciones endocrinas de la GH hipofisiaria a través de su efecto esteroideogénico o probablemente a través del IGF-1 local. Sin embargo la barrera hemato-testicular así como la presencia del receptor en células por dentro de la barrera (germinales), nos hace suponer que algunas de las acciones de la GH en las células de Sertoli y su función en la gametogénesis pueden ser reflejo de acciones de la GH producida localmente (Harvey, 2010).

La posibilidad de que la GH testicular actúe localmente para afectar la función reproductiva directa o indirectamente está fundamentada en la distribución del GHR en el tracto reproductor masculino. La inmuno-reactividad (IR) a GHR está presente de manera abundante en los conductos Wolffiano/Mulleriano, uréter y epidídimo, conductos deferentes, vesícula seminal, y gónadas de fetos de ratas (García-Aragón *et al.*, 1992). En rata adulta la inmuno-reactividad de GHR está distribuida en conductos deferentes, epidídimo, próstata, células de Leydig y Sertoli, y en menor proporción en las células germinales de túbulos seminíferos (Kanzaki y Morris 1990; Lobie *et al.*, 1990; Reiter *et al.*, 1992).

De manera similar en testículo de pollo adulto ha sido bien documentada la IR al receptor de GH y el ARN mensajero lo que apoya la idea de una función autócrina y/o parácrina (Lobie *et al.*, 1990; Harvey *et al.*, 2002).

Regulación testicular de la GH por factores hipotalámicos de expresión local

El transcrito del gen de GH se encuentra presente en testículos humanos y de pollo (Untergasser *et al.*, 1998, 1997; Luna *et al.*, 2002) lo que ha permitido plantear que la síntesis y/o secreción de GH en los testículos, como en la hipófisis, podría estar controlada por hormonas “hipotalámicas” reguladoras de la GH (hormona liberadora de hormona de crecimiento ó GHRH, ghrelina, somatostatina y hormona liberadora de tirotrina ó TRH)

las cuales se producen también de manera local. En adición la presencia de una barrera como la hemato-testicular fundamenta esta hipótesis ya que se sabe que esta barrera no permite el paso libre de péptidos generando un compartimiento aislado en la parte luminal de los túbulos seminíferos.

Existen reportes en diferentes especies de vertebrados sobre la expresión en el testículo de factores hipotalámicos implicados en la regulación de la síntesis y secreción de GH a nivel adenohipofisario. El ARN mensajero de GHRH y su péptido están presentes en los testículos de humanos (Pescovitz *et al.*, 1990; Berry *et al.*, 1992) y de otros mamíferos (Tsagarakis *et al.*, 1991; Monts *et al.*, 1996; Moretti *et al.*, 2002); específicamente ha sido localizado tanto el mensajero como la inmuno-reactividad a la GHRH en células de la línea germinal y en células de Leydig. De igual forma ha sido descrito el receptor a GHRH en células testiculares, específicamente en células de Sértoli y Leydig de rata se encuentra el receptor a GHRH-R pertenece a la familia de receptores acoplados proteína G (Fabbri *et al.*, 1995; Srivastava *et al.*, 1993). En estudios *in vitro* se ha demostrado que la GH es secretada por células testiculares de pollo en cultivo primario bajo el estímulo de GHRH, donde las principales variantes secretadas son las de 17 y 35-kDa (Martínez-Moreno *et al.*, preparación).

Por otra parte, otros factores relacionados a la síntesis y secreción de GH descritos a nivel testicular como ghrelina y su receptor GHS-R tipo-1a así como el receptor a leptina también se encuentran presentes en gónadas de rata (Tanaka *et al.*, 2001, Tena-Sempere *et al.*, 2002; Gaytan 2004); además se ha encontrado la expresión de TRH testicular (Wilber y Xu, 1998, Li *et al.*, 2002). Por otra parte también se expresa localmente somatostatina cuya función es de factor inhibidor de la secreción de GH a nivel hipofisario (Pekary *et al.*, 1984, Zhu *et al.*, 1998).

Si bien la presencia de estos péptidos con acción sobre la síntesis y secreción de GH a nivel hipofisario podría formar parte de un sistema regulador de la función reproductiva a nivel testicular. Sin embargo aún no existen estudios en el pollo que relacionen y definan el papel de estos reguladores en funciones autocrinas y paracrinas en las células testiculares.

2. Justificación

Tanto en la adenohipófisis (Arámburo 1990, 2001, Houston y Goddard, 1998), como en plasma (Montiel, 1992) se han encontrado suficientes evidencias de la presencia de variantes de carga y de masa para la GH. En el caso de los órganos del sistema reproductor de pollo como epidídimo y testículo, recientemente se encontró evidencia sobre la presencia del ARN mensajero de la GH y su receptor (Harvey et al. 2004, Luna et al., 2004). Además en resultados previos obtenidos en nuestro laboratorio se encontró que la GH está presente en los testículos de pollos de diferentes edades y que su heterogeneidad molecular es diferente a la de la hipófisis, además éste cambia a lo largo del desarrollo (Luna et al., 2004). Se determinó además en cultivos primarios que esta hormona es producida y secretada al medio de cultivo.

Sin embargo, faltaba investigar cual es linaje celular específico que se encarga de la síntesis y liberación de la GH en la gónada de pollo; de igual manera, fue necesario realizar ensayos a fin de determinar el papel de los factores implicados en la regulación de la síntesis y secreción de las diferentes variantes moleculares de la GH en pollo.

Este conocimiento nos permitirá integrar a la cGH testicular en los procesos de regulación hormonal de la espermatogénesis y esteroidogénesis, para así entender su papel autócrino y/o parácrino.

3. Hipótesis

“La GH es sintetizada en el testículo de pollo en las diferentes etapas de la línea germinal y ejerce efectos sobre la proliferación. Además de manera local se expresan péptidos involucrados en la regulación de su síntesis y secreción”.

4. Objetivo General

“Determinar la localización de la GH testicular y su receptor GHR en las diferentes etapas de diferenciación de la línea germinal así como su patrón de heterogeneidad molecular y realizar el análisis de la expresión local de factores vinculados a la regulación de la síntesis y secreción de la GH hipofisiaria”.

Objetivos particulares

1.- Describir la distribución de la GH y sus isoformas así como la de su receptor GHR en las diferentes etapas de diferenciación de las células testiculares.

- a) Determinar la distribución de la GH y su receptor en cortes de testículo de pollo adulto.
- b) Aislar y caracterizar subpoblaciones testiculares con marcadores celulares de la GH.
- c) Determinar el patrón de heterogeneidad molecular de la GH en los diferentes tipos celulares.

2.- Determinar el efecto de GH en cultivos primarios de células testiculares.

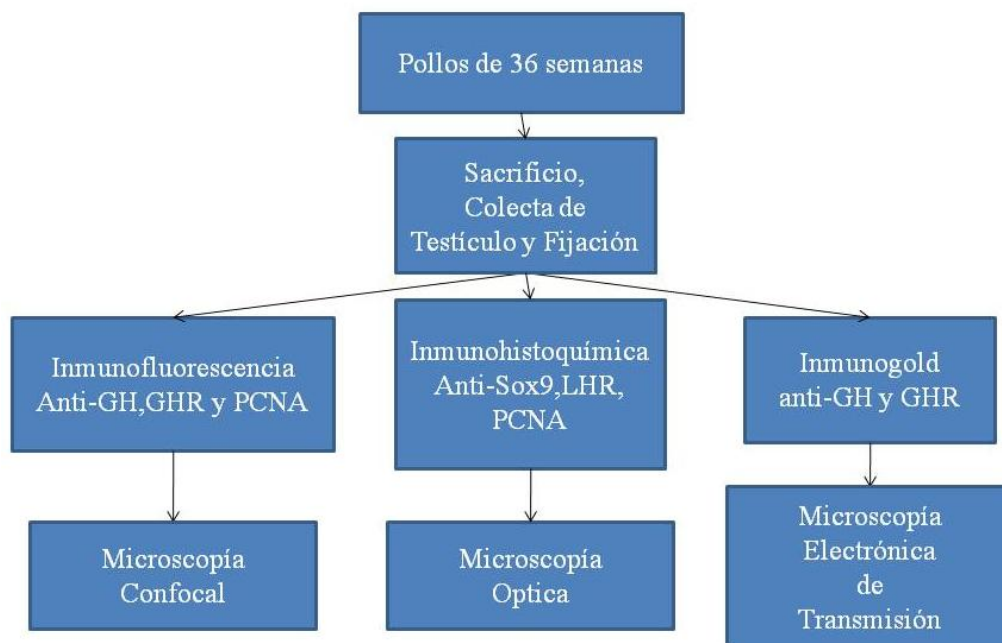
- a) Determinar a través de ensayos de proliferación la participación de GH en la renovación de espermatogonias.
- b) Establecer el efecto de la GH sobre la tasa metabólica de células testiculares.

3.- Identificar factores reguladores de la síntesis y secreción de GH en testículo de pollo.

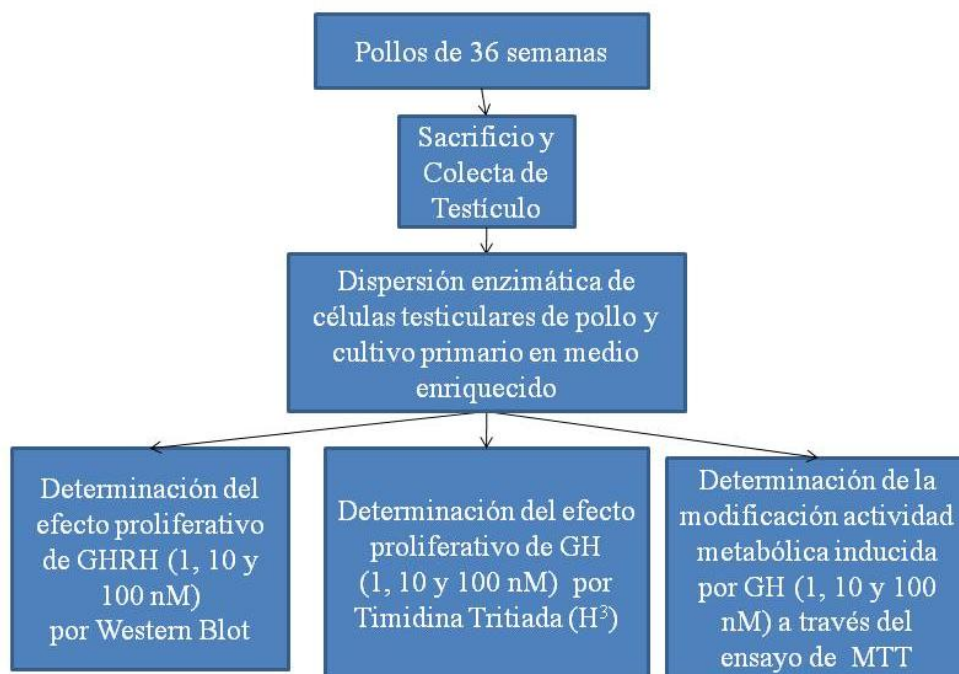
- a) Determinar la expresión de factores metabólicos periféricos en la gónada de pollo durante la ontogenia.
- b) Identificar el efecto del estrés metabólico inducido por restricción de alimento como posible modulador de la expresión de los factores metabólicos vinculados a la GH.

5. Diseño Experimental

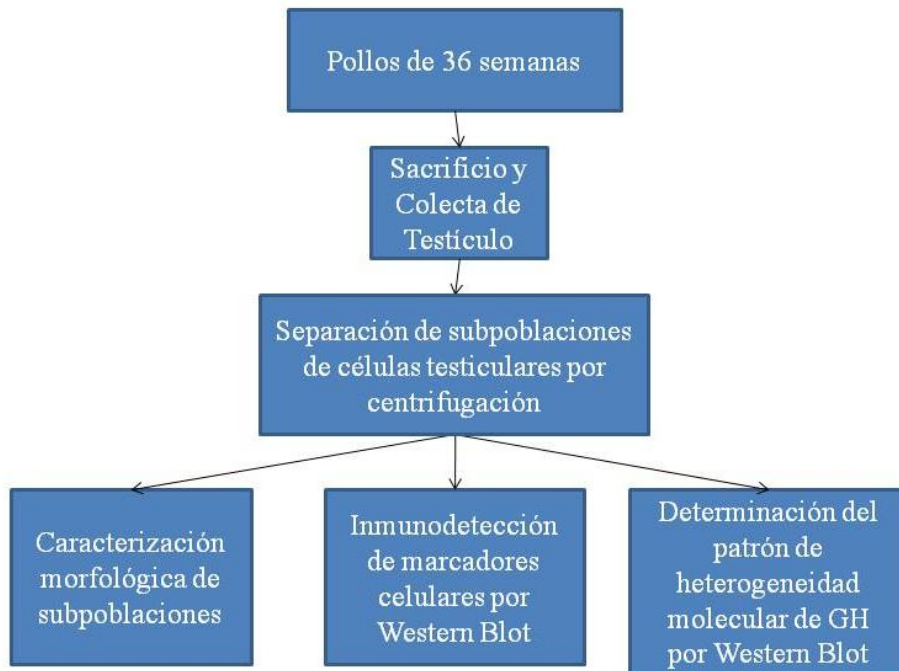
Análisis de la Distribución de la GH y su receptor GHR. Caracterización de Marcadores Celulares en Túbulo Seminífero.



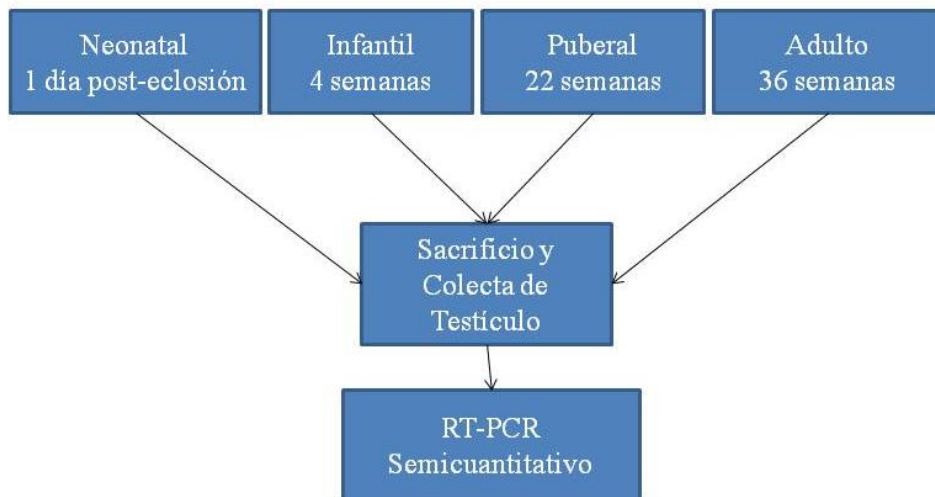
Determinación del efecto de GH en cultivos primarios de células testiculares



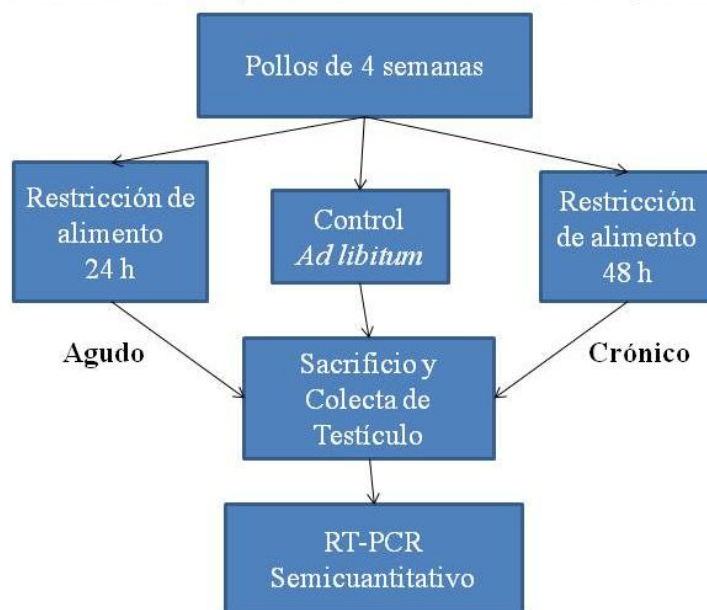
**Separación y caracterización de subpoblaciones testiculares de pollo.
Determinación del patrón de heterogeneidad molecular de GH.**



Análisis de la Expresión del ARNm de ghrelina/GHS-R1a, Ob-R y GnIH durante el Desarrollo (ontogenia).



Análisis de la Expresión del ARNm de ghrelina/GHS-R1a, Ob-Ry GnIH durante Estrés metabólico por restricción de alimento (fasting)



Materiales y Métodos

Animales

Pollos de engorda raza Ross de 1 día post-eclosión, 4, 22 y 36 semanas fueron mantenidos con agua y alimentados *at libitum* con alimento especial para aves. Período de luz oscuridad de 12:12 horas (luz:oscuridad). Los pollos fueron sacrificados por decapitación. Los animales fueron adquiridos en Pollos Querétaro S.A. de C.V.

Muestras

Los testículos izquierdos de pollos fueron colectados en condiciones asépticas en el aviario e inmediatamente transportados al laboratorio para su análisis en solución balanceada de Hanks y procesados para obtener las células para cultivo primario y para la separación por centrifugación en gradiente de densidad. Para el caso del análisis bioquímico los testículos fueron inmediatamente congelados utilizando hielo seco y almacenados a -80°C hasta su utilización. En el caso de los testículos colectados para la realización de análisis inmunohistológico, fueron colocados en solución fijadora de Bouin-Holland durante 48 h y para los estudios por medio de microscopía electrónica de

transmisión las muestras de testículo fueron fijadas en glutaraldehído al 0.5% durante 30 min.

Obtención de células testiculares por la técnica de dispersión enzimática

La dispersión enzimática se desarrolló mediante el método utilizado por Nagano et al., 1998 con ligeras modificaciones. Los testículos de pollos adultos fueron desencapsulados y posteriormente cortados con tijera y bisturí en piezas pequeñas que se resuspendieron con medio DMEM (Gibco-BRL). Después de 2 lavados con DMEM (Gibco-BRL) y centrifugación a 800g, la suspensión se incubó con colagenasa tipo II al 0.3% en DMEM (Gibco-BRL) en agitación moderada durante 1h a 37°C. Con ayuda de una pipeta Pasteur, se realizó un reflujo con el fin de deshacer agregados de tamaño grande. Las células fueron lavadas de la colagenasa II (Sigma Labs) dos veces con medio de cultivo DMEM (Gibco-BRL) y finalmente resuspendidas y filtradas a través de una malla de nylon de 50 µm para complementar el proceso de desagregación. Se tomó una alícuota de la suspensión celular y se contaron las células en un hemocitómetro.

Fraccionamiento Celular por Centrifugación en Gradiente

El fraccionamiento celular se realizó en tubos Corning de 30 ml, donde previamente se formó un gradiente lineal continuo con Iodixanol (Optiprep, Sigma Labs) y medio de cultivo DMEM (Gibco-BRL) (Payne et al., 1980; Ford et al., 1994). El gradiente se preparó utilizando un formador de gradiente (Bio-Rad) y una bomba peristáltica con un flujo de 1.45 ml/min. La linealidad del gradiente se comprobó leyendo la densidad óptica (D.O.) de fracciones de 1 ml utilizando espectrofotómetro a una longitud de onda de 360 nm. Una vez formado el gradiente (0% a 17.5% de iodixanol) con un rango de densidad de 0.998 a 1.098 g/ml se colocó en la parte superior del gradiente 1 ml de suspensión celular con 30×10^6 de células y se centrifugó durante 40 min a 1800 g a 14°C. Se formaron 3 bandas que se lavaron diluyendo en tres volúmenes de DMEM y la pastilla obtenida después de centrifugar a 800g se resuspendió con medio Megacell (Sigma Labs, M4192) para su cultivo y en medio mínimo M199 (Gibco-BRL) sin suplementación para medidas en células no cultivadas. El número de células se contó en hemocitómetro y la viabilidad se determinó por exclusión con azul de tripano, este colorante tiñe células muertas con daño en membrana.

Cultivo Celular Primario de Células Testiculares de Pollo

Se realizaron cultivos primarios de células testiculares. Para el caso del análisis de proliferación a través del marcador PCNA por Western blot (se describe adelante en métodos) , se colocaron 5×10^6 células en un volumen de 5 ml de medio Megacell (Sigma Labs, M4192) , dicho medio de cultivo se encuentra suplementado con 3% desuero fetal bovino, el cultivo se realizó en placas de policarbonato con tamaño de 60x15 mm tratadas para alta-unión celular (Corning). En el caso de los cultivos que fueron analizados a través de la técnica de MTT se sembraron en placas de cultivo de 96 pozos (Corning) con 1×10^5 células en 100 μ l de medio Megacell. Para el análisis de proliferación por medio de la incorporación de timidina tritiada (^3H) se cultivaron 5×10^5 células en 250 μ l de medio Megacell en placas de policarbonato multiwell de 48 pozos (Corning). En las 3 modalidades de cultivo primario se adicionó 1% de penicilina/estreptomicina y se permitió la estabilización del cultivo durante 24 h hasta la realización de los tratamientos. Las células fueron incubadas a 37°C en atmósfera saturada de agua con 95% de aire y 5% de CO₂ en una incubadora (NuAire US Autoflow CO₂ Water Jacketed).

Tratamientos

Los tratamientos con factor liberador GHRH humano sintético (Sigma, 1-44 G8895) a concentraciones 1nM, 10nM y 100nM fueron preparados en medio mínimo Megacell (Sigma Labs, M4192) y bajo las mismas concentraciones se prepararon los tratamientos con hormona de crecimiento recombinante de pollo (rcGH). En el caso de los cultivos primarios que se analizaron mediante las técnicas de MTT y Western blot de PCNA, en ambas condiciones se implementaron después de 24 h de incubación con los tratamientos. En el caso de la incorporación de timidina tritiada (^3H) ésta se colocó a las 24 horas después del tratamiento y se incubó durante 18 horas.

Preparación de las muestras

Las células fueron cosechadas/recuperadas y lisadas por sonicación en presencia de inhibidor de proteasas Mini-Complete (Roche) y centrifugadas a 13,000 g en una centrifuga Sorvall RMC 14 a 4°C. El sobrenadante se recuperó y se cuantificó proteína por el método de Bradford (Bradford, et al., 1976). Para el análisis por SDS-PAGE/Western Blot se hicieron alícuotas de 35 μ g de proteína las cuales fueron congeladas hasta su utilización a una temperatura de -80°C.

Cuantificación de GH de pollo por ELISA

La presencia de inmunoreactividad a GH (IR-GH) en extractos de células de testículo de pollo y medio de cultivo se investigó por medio de un ensayo inmunoenzimático (ELISA) (Martínez-Coria et al., 2002). Este ensayo tiene paralelismo entre extractos hipofisarios y testiculares (Luna et al., 2004). En resumen, placas de 96 pozos (Immulon 2HB, Chantully, VA) fueron forradas durante toda la noche a 4°C con 12 ng de hormona recombinante de pollo (rcGH) en 100 µl de buffer de carbonatos a pH 10.3 y posteriormente la placa se bloqueó con leche descremada (Biorad) al 3% durante 1 h para bloquear sitios libres para evitar unión inespecífica. La placa fue lavada 5 veces con PBS (0.01M fosfato de sodio, 0.15 mM NaCl, pH 7) utilizando un lavador automático de placas (Amersham Biosciences). Este proceso de lavado se repitió después de cada incubación en este procedimiento. Se realizaron diluciones seriadas de 1024 a 0.5 ng en TPBS (0.01M fosfato de sodio, 0.15 mM NaCl, v/v Tween 20, pH 7) las cuales fueron incubadas con anticuerpo policlonal contra GH purificada de hipófisis de pollo (este anticuerpo es específico para GH y no tiene inmunoreactividad cruzada (<0.0001%) con ninguna otra hormona hipofisaria, Arámburo et al., 1989) a una concentración de 1:100,000 en TPBS con 1% de leche en polvo sin grasa. Las muestras y estándares fueron colocados en los pozos forrados en un volumen de 100 µl con tiempo de incubación de 2 h a temperatura ambiente (22°C). Se preparó la solución del 2do anticuerpo a una dilución de 1:3000 y se incubó el mismo volumen por pozo durante 2 h a temperatura ambiente. Se desarrolló reacción de color con el sustrato de 2'-amino-di-[3-etilbenzothiazolina sulfatada] (ABTS de Roche Mannheim, Germany). Las placas se leyeron a los 20 min después de agregar la solución de revelado en un lector de microplacas de ELISA (Bio-Rad) a una longitud de onda de 405 nm. La sensibilidad del ensayo es de 2ng/pozo (20 ng/ml) y coeficientes de variación inter e intraensayo del <4%.

SDS-PAGE/Western Blot

Las muestras fueron normalizadas por el método de cuantificación de proteínas de Bradford (Bradford et al., 1976) y después fueron analizadas por electroforesis en gel de acrilamida (SDS-PAGE) de 1.0 mm de grueso, 6 cm de largo, al 12.5%, en una cámara mini-Protean II (Bio-Rad). Se colocaron 30 µg de proteína por carril y se utilizaron

marcadores de peso molecular preteñidos (Page Ruler, Fermetas Life Sciences). Las muestras fueron corridas en condiciones reductoras en presencia de 5% 2-beta-mercaptoetanol. Después de la electroforesis los geles fueron equilibrados en buffer de transferencia (25mM Tris-HCl, 192mM glicina, 20% (v/v) metanol, pH 8.3) durante 30-60 min y electro-transferidas (a 200mA por 1 h) a membranas de nitrocelulosa (Bio-Rad). Después las membranas fueron lavadas por 5 min con 30mM Tris, 500mM NaCl, pH 7.5 (TBS) y después bloqueadas con 5% (p/v) de leche en polvo sin grasa (Bio-Rad) en TBS por 2 horas a temperatura ambiente.

Se incubaron las membranas a temperatura ambiente durante toda la noche con los diferentes anticuerpos primarios. Un policlonal anti-GH de pollo CAP1 (Arámburo et al., 1989, 1990), un monoclonal anti-PCNA humano sin conjugar (PC10 sc-56, Santa Cruz Biotechnology), un policlonal anti-Sox9 humano generado en conejo (Sigma Aldrich, S6943); anti-receptor de hormona luteinizante humano o LHR (H-50 sc-25828, Santa Cruz Biotechnology). Los anticuerpos primarios se utilizaron a una dilución 1:1000. Las membranas fueron lavadas tres veces con TTBS y se agregó la solución de 2dos anticuerpos anti-IgG de conejo o anti-ratón acoplados a peroxidasa (Zymed) diluidos 1:3000 en 1% (p/v) de leche en polvo descremada por 2 h a temperatura ambiente. El revelado se llevó a cabo con sustrato quimo-luminiscente ECL (Amersham-Pharmacia, Buckinghamshire, UK) durante 10 min y expusieron las membranas a filmes Biomax ML de Kodak.

Inmunohistoquímica en cortes de testículo

Para el análisis inmunohistoquímico los testículos fueron fijados en sublimado Bouin-Holland por 48 h, deshidratados en etanol y embebidos en parafina. Las secciones fueron desparafinadas con citrisolv y rehidratadas con alcohol al 95%, 70%, 50%, Lugol, tiosulfato y finalmente agua destilada. El tejido fue calentado en buffer de citratos (10nM citrato de sodio, 0.05% tween 20, pH 6.0) durante 20 min. para desenmascaramiento de epítopes. Los cortes de testículo se incubaron toda la noche a temperatura ambiente (22°C) con anticuerpos policlonal y monoclonal contra GH, anti-PCNA humano monoclonal (PC10 sc-56, Santa Cruz Biotechnology) para reconocer células en proliferación, anti-Sox9 humano (Sigma Aldrich, S6943) para marcar núcleos de células de Sértoli, anti-LHR humano policlonal (H-50 sc-25828, Santa Cruz Biotechnology) para identificar células de

Leydig y como segundos anticuerpos se utilizaron anti-IgG de conejo policlonal conjugado con HRP generado en cabra (ZYMED Laboratories Inc.), anti-IgG de conejo policlonal generado en cabra conjugado con rodamina TRITC (Bio-Rad) y anti-IgG de ratón policlonal generado en cabra conjugado con fluoresceína FITC (Bio-Rad) con un tiempo de incubación de 2 horas. Se utilizó la dilución en TPBS con 1% (p/v) de leche en polvo sin grasa de 1:200 para los anticuerpos primarios y 1:500 para los secundarios. La co-localización se realizó en un microscopio confocal Carl Zeiss LSM 510 en los cuales además se tiñeron los núcleos con DAPI (Fluka) durante 30 min.

Microscopía electrónica de transmisión

Los cortes de testículo analizados a través de microscopía electrónica fueron fijados con glutaraldeído al 0.5%, se bloquearon los sitios reactivos con glicina 50 mM y se deshidrataron gradualmente con diferentes concentraciones de etanol (20%,30%,50% y 70%) para ser embebidos en resina LR-white (Polysciences). Se obtuvieron cortes ultrafinos (90nm) en un micrótomo Ultracut y montados en rejillas pre-tratadas (resina formal de formvar-polivinil). Los cortes fueron incubados a temperatura ambiente 16 horas con el primer anticuerpo contra GH (1:3000) y después se añadió el segundo anticuerpo anti-IgG marcado con partículas de oro coloidal (GAR-10-nm-Au) a dilución 1:50 (EMS Fort Washington, PA).

Evaluación de los efectos de GH en células testiculares en cultivo

MTT (reducción metabólica del bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazol)

Este ensayo se basa en la reducción metabólica del Bromuro de 3 - (4,5 - dimetiltiazol - 2 - ilo) - 2,5-difeniltetrazol (MTT) realizada por la enzima mitocondrial succinato deshidrogenasa en un compuesto coloreado de color azul (formazan), permitiendo determinar la funcionalidad mitocondrial de las células tratadas. Se utilizó para determinar la viabilidad y el efecto proliferativo de GH en cultivos primarios de células testiculares el estuche de proliferación celular I (Roche, Mannheim Alemania, Cat.No. 1.465.007). Como previamente se describió, 5×10^5 células de los testículos de pollo previamente disgregadas se cultivaron en placas de microtitulación (96-pozos) en un volumen final de 100 μ l de medio de cultivo Megacell en incubadas en ambiente húmedo (37 ° C con un 95% de aire y 5% CO₂) durante 24 horas. Los cultivos primarios testiculares fueron tratados con la hormona de crecimiento recombinante del pollo (rcGH)

en el mismo medio Megacell. Después del período de incubación con el tratamiento, 10 μ l de la solución de MTT (concentración final de 0.5 mg / ml) se añadieron a cada pozo y se incubaron durante 4 h en ambiente húmedo. Al terminar la incubación se formaron los cristales de sal de formazán de color púrpura. Estos cristales son insolubles en disolución acuosa y fueron solubilizados añadiendo 100 μ l de la solución de solubilización, se incubaron las placas durante la noche en ambiente húmedo. El producto de formazán solubilizado se cuantificó espectrofotométricamente usando un lector automático de microplacas ELISA (Bio-Rad). Este aumento se correlaciona directamente con la cantidad de cristales de color púrpura formazán formado, determinados a través de la medición de absorbancia a 405 nm (Vistica et al., 1991).

³H-Timidina tritiada

Este ensayo se basa en la incorporación de una base nucleotídica marcada durante el proceso de replicación del ADN y se utilizó para determinar la proliferación de células testiculares en cultivo. En los experimentos de proliferación en los cuales se evaluó la incorporación de ³H-timidina, Alícuotas de 5×10^5 células fueron cultivadas durante 24 horas en Megacell para su estabilización después de esto se agregaron los tratamientos con rcGH (1, 10 y 100 nM) y se incubaron durante 24 horas y al final de este período se agregó ³H-timidina durante 18 horas. La cantidad de ³H-timidina incorporada por las células se determinó en un contador de centelleo líquido después de lavar las placas tres veces con 1 ml ácido tricloroacético 5% helado y la recolección de las células con 500 μ l NaOH 0.25 N de ebullición durante 1 hora a 37 ° C.

Análisis del ARN por RT-PCR semi-cuantitativo

La expresión testicular del ARN mensajero que codifica para ghrelina y su receptor GHS-R se realizó por RT-PCR semi-cuantitativo. De la misma manera se realizó el análisis para determinar la expresión relativa de los mensajeros que codifican para el receptor a Leptina (Ob-R) y para la hormona inhibidora de gonadotropinas (GnIH) para su análisis durante la ontogenia y bajo estrés metabólico. El ARN total fue aislado del tejido testicular mediante el método de extracción ácido de tiocianato guanidina-fenol-cloroformo. Para la amplificación de las diferentes señales se utilizaron oligonucleótidos específicos descritos en el cuadro 1. En adición, para proveer un control de carga apropiado, se realizó la

amplificación paralela de GADPH la cual es una enzima de expresión constitutiva y estable junto con la proteína ribosomal L19 presente en la subunidad 60S.

Para la amplificación de las señales, la transcripción reversa y el PCR se llevaron a cabo en pasos separados. Además, para permitir una amplificación apropiada en la fase exponencial para cada señal, el control de carga y las muestras se amplificaron en reacciones separadas con diferentes número de ciclos pero utilizando la misma cantidad de templado de ADNc, generado en una sola reacción de retrotranscripción. Brevemente, cantidades similares de ARN total (2µg) se desnaturalizaron con calor y se retrotranscribieron por medio de la incubación a 42°C durante 60 min con 12.5 U de retrotranscriptasa reversa de virus de mieloblastoma aviar AMV (Promega Corp. Madison, WI), 20 U inhibidor de ribonucleasa RNasin (Promega Corp.), 200 nM de mezcla de 5' trifosfato deoxinucleosidos y 1 pM de oligonucleótidos antisentido específicos de señales y controles de carga en un volumen final de 30µl de buffer 1x de AMV. Las reacciones fueron terminadas por calentamiento a 97°C por 5 min y enfriadas en hielo, se llevó a un volumen final de 60µl con agua libre de nucleasas.

Para la PCR semi-cuantitativa, alícuotas de 10µl de las muestras de ADNc se amplificaron en 50µl de buffer 1x en presencia de 2.5 U de Taq DNA polimerasa (GoTaq flexi, Promega Corp.), 200 nM e mezcla de 5' trifosfato deoxinucleosidos y los oligonucleótidos (10pM) correspondientes para cada señal. La PCR consistió en un primer ciclo desnaturalizante a 97°C durante 5 min, seguido por un número variable de ciclos que incluyen desnaturalización a 96°C durante 30 segundos, alineamiento 30 seg y extensión a 72°C de 30 segundos. Se incluyó una extensión final de 5 min a 72°C. Las temperaturas de alineamiento para cada señal fueron las siguientes: 58°C para ghrelina, 63°C GHS-R1a, Ob-R 56°C, GADPH 58°C, L19 55°C y 60°C GnIH. Se probaron diferentes números de ciclos para identificar la fase exponencial de amplificación así como para la optimización de la temperatura de alineamiento (datos no mostrados).

Los fragmentos generados por la PCR se resolvieron en geles de agarosa al 1.5% y se visualizaron mediante la tinción con bromuro de etidio. En todas las reacciones se incluyó control negativo sin ADNc. El análisis cuantitativo del RT-PCR se llevo a cabo por medio de densitometría para lo cual se utilizó un sistema de análisis de imagen digital (1-D Manager, TDI ltd., Madrid, Spain).

Señal	Secuencia (5'- 3')	Tamaño	Ciclos
cGhrelin	Ghrelin sense (5'-ATA CAA GAA AAC CAA CAG CAA GAT-3')	444	35
	Ghrelin as (5'-ACT AAG GAA GGA AAT AAA ATA AGC-3')		
cGHS-R type1a	GHS-R1a sense (5'-CCA ACG AGT GCC GTG CCA CGG AGT-3')	339	35
	GHS-R1a as (5'-GGA CAC CAA GTT GCA GTA CTG GCT-3')		
cOb-R	Ob-R sense (5'-TAT GTT GTT CAG GTC CGCTG-3')	398	34
	Ob-R as (5'-GGG TTC GGT ACA TCT TCC CA-3')		
GnIH	GnIH sense (5'-GAG CTT CCT AAC TGA GCTTC-3')	143	32
	GnIH as(5'-CAC GGT GCA TCT TTT CTG GG-3')		
cGADPH	GADPH sense (5'-GTC AAG GCT GAG AAC G-3')	228	28
	GADPH as (5'-GAC ACC CAT CAC AAA CAT-3')		

Cuadro 1. Secuencias de oligonucleótidos utilizados en la reacción en cadena de la polimerasa (PCR). A- Adenina; T-Tiamina; C-Citocina; G-Guanina

Resultados

Histología del testículo de pollo sexualmente maduro

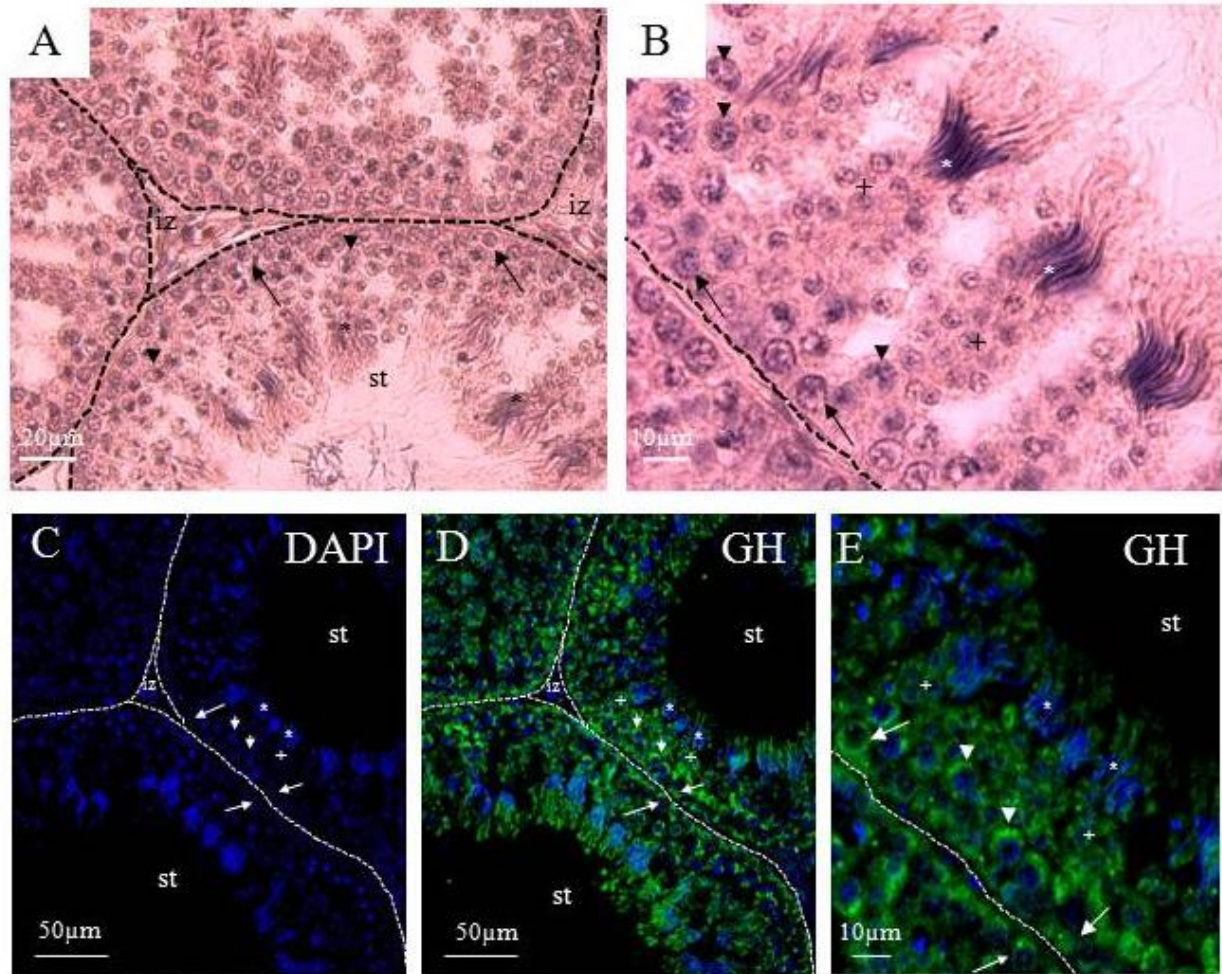


Figura 12. Micrografías de corte histológico de testículo de pollo de 36 semanas teñido con hematoxilina y eosina e inmunohistoquímica de GH. **A, B** muestran cortes teñidos con hematoxilina–eosina de la distribución de células germinales y Sertoli en los túbulos seminíferos. La línea punteada señala la lámina propia y delimita los túbulos seminíferos; **C** control negativo incubado con anticuerpo anti-GH preabsorbido con exceso de GH recombinante. **D y E** muestran la distribución de GH inmunoreactiva en los túbulos seminíferos utilizando un anticuerpo policlonal (CAP1) en verde. En azul se muestra la tinción de DAPI específica para núcleos. Las flechas indican espermatogonias; las cabezas de flechas muestran ejemplo de espermatocitos primarios; cruces, muestran espermatocitos de segundo orden; asteriscos, señalan espermátides elongadas. *iz*, zona intersticial; *st*, lumen o luz del túbulo seminífero.

Los resultados muestran la caracterización histológica de testículo de pollo sexualmente maduro en cortes de testículo a través de su morfología, distribución e immuno-localización con marcadores moleculares de los diferentes tipos celulares.

Utilizando la tinción de hematoxilina-eosina en secciones testiculares de pollo se pudieron identificar túbulos seminíferos bien definidos con un epitelio germinal completamente desarrollado y zonas intersticiales (iz) donde se localizan las células de Leydig (Fig. 12A). Se observó que las espermatogonias están localizadas adyacentes a la membrana basal de la *túnica propria*, proximal al área donde los espermatocitos primarios (cabeza de flecha) y secundarios (+) han sido localizados formando racimos. Además fue posible identificar espermátides alargadas agrupados cabeza-cabeza en forma de penachos (asteriscos), y finalmente cercano al lumen están localizados las espermátides elongadas que posteriormente serán liberados hacia el lumen del túbulo seminífero, donde se observan algunos espermatozoides con la tinción basófila característica de sus núcleos (azul) (Fig. 12B).

Los resultados de la inmunohistoquímica para determinar la distribución de GH mostraron que las células de la línea germinal en todas las fases de diferenciación fueron inmunoreactivas contra GH (IR); particularmente en el caso de espermatogonias la señal de IR estuvo distribuida en citoplasma y zona perinuclear (Fig. 12D, 12E). En los espermatocitos encontramos GH-IR en forma de casquete cercano al núcleo (Fig. 12E; cabeza de flecha). Las espermátides alargadas también mostraron marca positiva para GH, como se puede observar en la Fig. 12D y 12E, éstas se encuentran agrupadas por la zona de las cabezas (núcleos, azul) en forma de penachos (asterisco). En la Figura 12C es el control preabsorbido con un exceso de GH donde no se observó marca para GH y solo se observaron los núcleos teñidos con DAPI (azul) como contra-tinción y al contrario de la clara señal concéntrica de color verde que se observó en las células germinales (Fig.12D, 12E) que representa la GH-IR.

Antígeno nuclear de proliferación celular (PCNA)

Para caracterizar los diferentes tipos celulares que integran el túbulo seminífero se utilizaron varios marcadores como el antígeno nuclear de proliferación celular (PCNA); este antígeno es propio de células en proliferación; se sabe que esta proteína es un cofactor vinculado con la activación de las ciclinas y por ende a la modulación de la replicación del ADN. La inmuno-reactividad contra este antígeno se presentó principalmente en el núcleo de las células del epitelio germinal adyacentes a la membrana basal y en contacto con la

túnica propria (Fig. 13) que por sus características morfológicas y de ubicación son las espermatogonias; además de éstas células, se observó inmunoreactividad en algunas otras células, que se encuentran más hacia el interior del lumen del túbulo seminífero que podrían ser espermatoцитos primarios o secundarios. Está bien definido que las células en contacto con la membrana basal de la *túnica propria* corresponden a células germinales en división mitótica o sea en su fase de espermatogonias por lo que se utilizará al PCNA como su marcador celular.

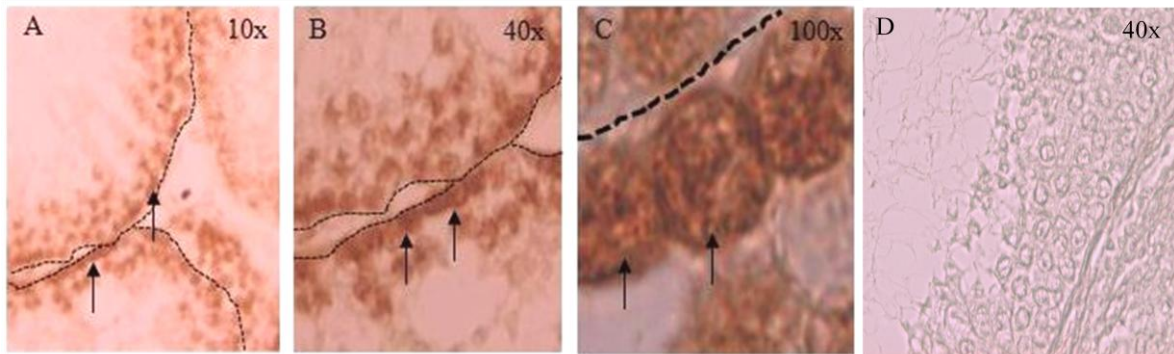


Figura 13. Micrografías de cortes de túbulo seminífero de testículo de 35 semanas de edad para evaluar la distribución de antígeno nuclear de proliferación celular (PCNA). **A, B, C** Se muestra immuno-reactividad (IR) contra PCNA en cortes de testículo de pollo adulto; **D** control negativo sin anticuerpo primario en contraste de fases. La IR se observó principalmente en las espermatogonias señaladas con flechas. La línea punteada delimita cada túbulo seminífero.

Receptor de SCF (stem cell factor)

Se utilizó un anticuerpo contra el receptor membranar c-kit para identificar células germinales (Fig.14). El c-kit es el receptor del ligando *stem cell factor* (SCF), dicho receptor en el caso de mamíferos está implicado en el paso de espermatogonias A, a la etapa de espermatogonia B, además de ser un sistema relacionado con la polarización y migración de células germinales hacia la luz del túbulo seminífero. Se observó (Fig. 14 A-C) una mayor immuno-marca membranar en células contiguas a la membrana basal pero esta marca positiva puede ser observada hasta etapas de diferenciación posteriores como espermatoцитos y espermátides, las cuales están distribuidas y localizadas hacia el lumen del túbulo seminífero. También se logró localizar marca positiva en los agregados de espermátides elongadas previo a su liberación hacia la luz del túbulo seminífero. Este marcador no parece ser específico de etapa pero si de células germinales.

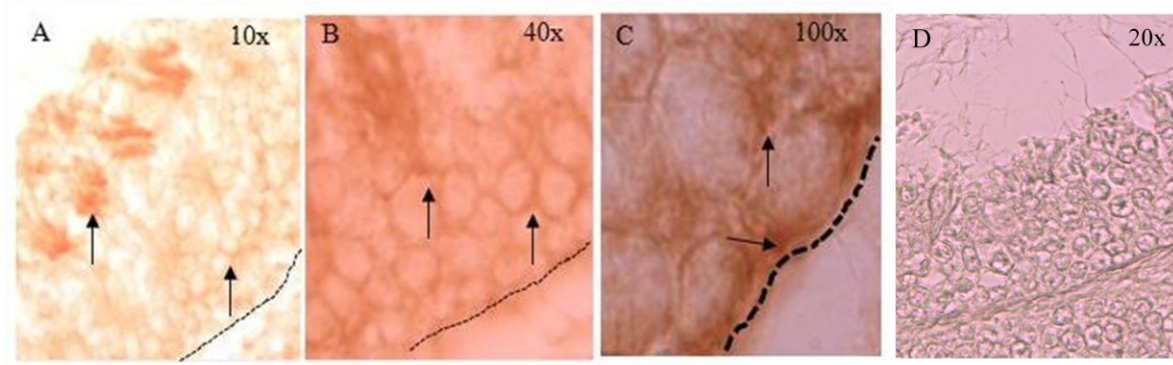


Figura 14. Micrografías de una sección de testículo de pollo adulto (35 semanas) incubada con un anticuerpo para receptor C-Kit. **A, B, y C** muestra inmunoreactividad contra C-kit en cortes de testículo de pollo. **D** control negativo sin anticuerpo primario en contraste de fases. La señal inmunoreactiva se observó en la membrana de las diferentes células del epitelio germinal se señalan con flechas. La línea punteada delimita la membrana basal.

Receptor a hormona luteinizante (LHR)

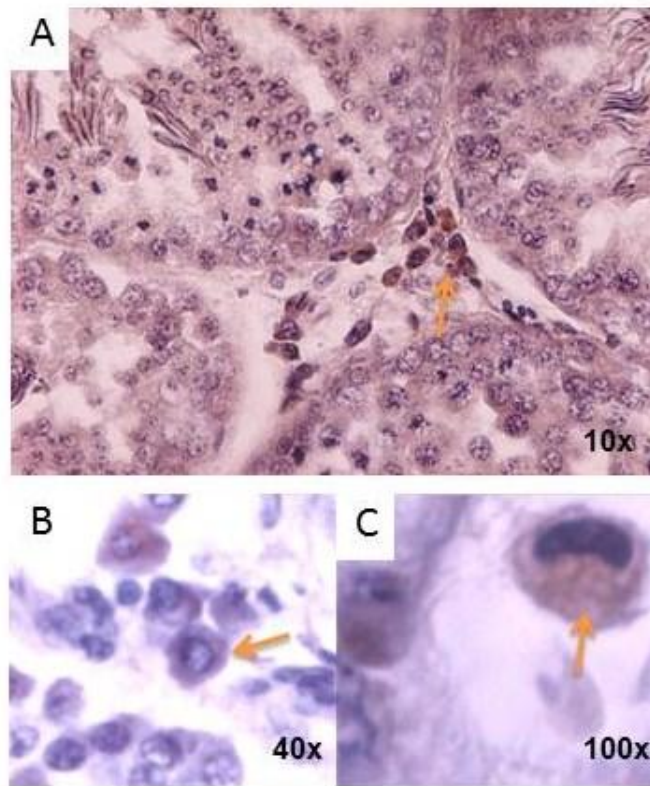


Figura 15. Secciones de testículo de pollo adulto que fueron incubadas con un anticuerpo policlonal dirigido contra la región extracelular del receptor a LH (LHR). **A-C** Se muestra inmuno-reactividad en células ubicadas fuera del túbulo seminífero que pueden ser células de Leydig. Las flechas señalan células IR. Contraintinción con hematoxilina.

Se realizó la inmunolocalización positiva del receptor a LH en células intersticiales o de Leydig en cortes de testículo (Fig. 15). Los resultados de la inmunohistoquímica mostraron una inmunoreactividad en células de las zonas intersticiales del testículo de pollo; el número de células presente en el tejido intersticial fue variable, en algunos se agrupaban hasta más de 10 células inmunoreactivas a LHR mientras que en algunos intersticios se encontraron sin presencia de inmunoreactividad (datos no mostrados). Se realizó una contra-tinción con hematoxilina lo que permitió destacar a las células teñidas con el anticuerpo contra LHR (Fig. 15, color marrón, flechas); una característica morfológica que permitió su identificación fue su forma ovoide así como nucleación excéntrica. Todas estas características morfológicas y de tinción nos permitieron utilizar a este marcador para identificar células de Leydig.

Factor transcripcional Sox9

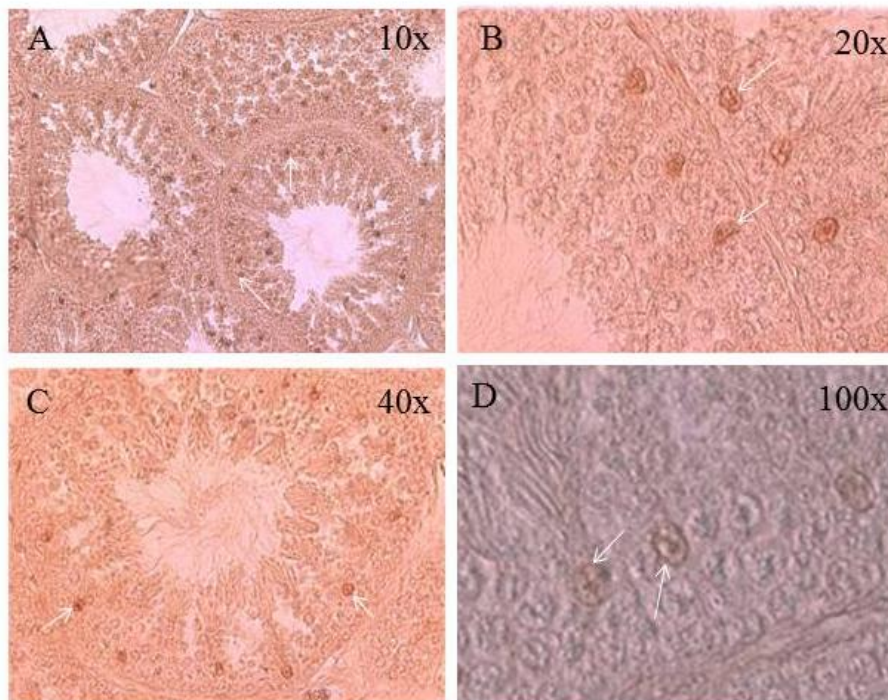


Figura 16. Micrografías de una sección de testículo de pollo adulto (35 semanas) incubada con un anticuerpo contra el factor SOX9. **A-D)** Se muestran la immuno-reactividad contra Sox9. Las flechas muestran los núcleos inmunopositivos en células cercanas a la membrana basal con características de células de Sertoli.

El factor transcripcional Sox9 relacionado al gen SRY determina la diferenciación gonadal de machos; este marcador molecular fue de utilidad para identificar los núcleos de las células de Sertoli en cortes de testículo de pollo sexualmente maduro, ya que se conoce que se encuentra específicamente en este tipo celular durante la madurez sexual. Se observó en la Fig. 16 los núcleos inmunoreactivos de células dentro del túbulo seminífero con disposición radial respecto al lumen y paralelas a la membrana basal. Se observan de 14 a 20 núcleos en cada corte de 7 μm de túbulo seminífero; en el centro de dichos núcleos es posible identificar un nucléolo grande.

GH testicular en cortes de testículo de pollo sexualmente maduro

Previos estudios habían demostrado la presencia de GH en diferentes tipos celulares del testículo de animales de 15 semanas de edad; en estos animales se observó una inmunoreactividad al anticuerpo contra GH solamente en espermátocitos primarios, secundarios y espermátides; sin embargo no se había podido identificar la señal en las espermatogonias. En este análisis inmunohistológico se utilizaron animales maduros sexualmente de 35 semanas de edad y los resultados se muestran en la Fig. 17. Se observó inmunoreactividad en espermatogonias, espermátocitos y espermátides utilizando un anticuerpo policlonal contra la GH nativa. La marca se observó tanto en el citoplasma como en el núcleo de las espermatogonias adyacentes a la lámina basal, esto en la mayoría de los túbulo seminíferos; sin embargo en algunas zonas no se observó esta señal. Estas diferencias en el marcaje podrían estar relacionadas con etapas diferentes de maduración de las células del epitelio germinal que como se sabe es en forma de espiral y no lineal.

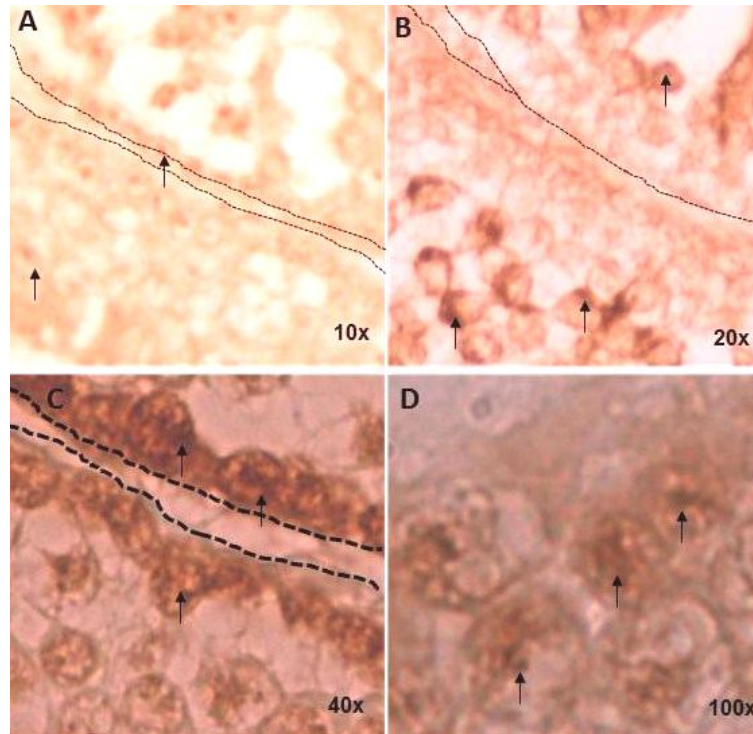


Figura 17. GH-IR en cortes de testículo de pollo de 35 semanas. **A-D)** Se muestra inmunoreactividad en espermatogonias. Las flechas señala la marca de IR contra GH en células cercanas a la membrana basal. Las líneas punteadas señalan la membrana basal del túbulo seminífero.

Colocalización de GH con PCNA en cortes de testículo de pollo

En la Fig. 18 se muestra la colocalización de células positivas a PCNA (FITC, verde) con GH-IR (CY3-rojo) en secciones testiculares de pollos de 36 semanas. La señal positiva de GH fue observada principalmente en las células germinales (Fig. 18A, rojo) como se muestra en la Fig. 18 A, D, G, J donde la marca inmunoreactiva fue más intensa alrededor del núcleo de las espermatogonias ubicadas en contacto con la membrana basal. En estas mismas células y mediante un anticuerpo monoclonal anti-PCNA se mostró tinción nuclear como se muestra en la figura 18 B, E, H, K y una clara colocalización indicada por flechas como se muestra en la Fig. 18C, 18F, 18I, 18L (amarillo). En algunos espermatocitos primario podemos ver señal de GH-IR en forma de casquete (rojo) que rodea al núcleo positivo para PCNA (verde) (Fig. 18C, F, I, L; cabeza de flechas) por lo que pensamos que pueden ser células germinales en activa diferenciación. Durante la etapa de espermátide se muestra señal inmunopositiva a GH (rojo) en menor proporción y ya no se observan los núcleos con inmunofluorescencia para PCNA así como tampoco en espermatozoides del lumen (Fig. 18I; asterisco).

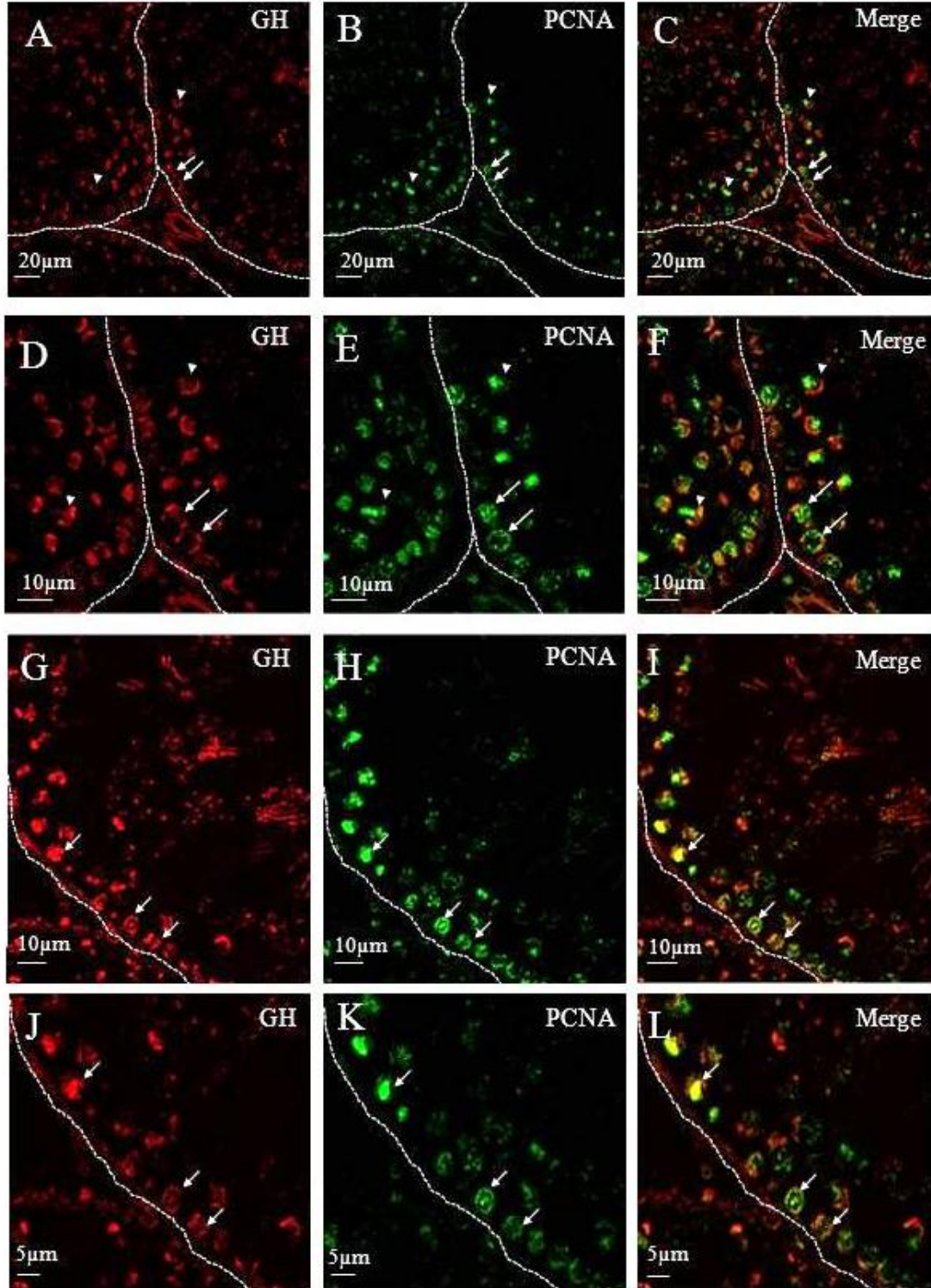


Figura 18. Colocalización de GH y PCNA en testículo de pollo de 36 semanas. Se utilizó un anticuerpo monoclonal contra PCNA (verde) y un anticuerpo policlonal contra la forma recombinante de GH (C1, rojo), el color amarillo muestra co-localización. Las flechas señalan espermatogonias, las cabezas de flecha señalan espermatocitos, la línea punteada señala la membrana basal.

Co-localización GH con GHR en cortes de testículo de pollo

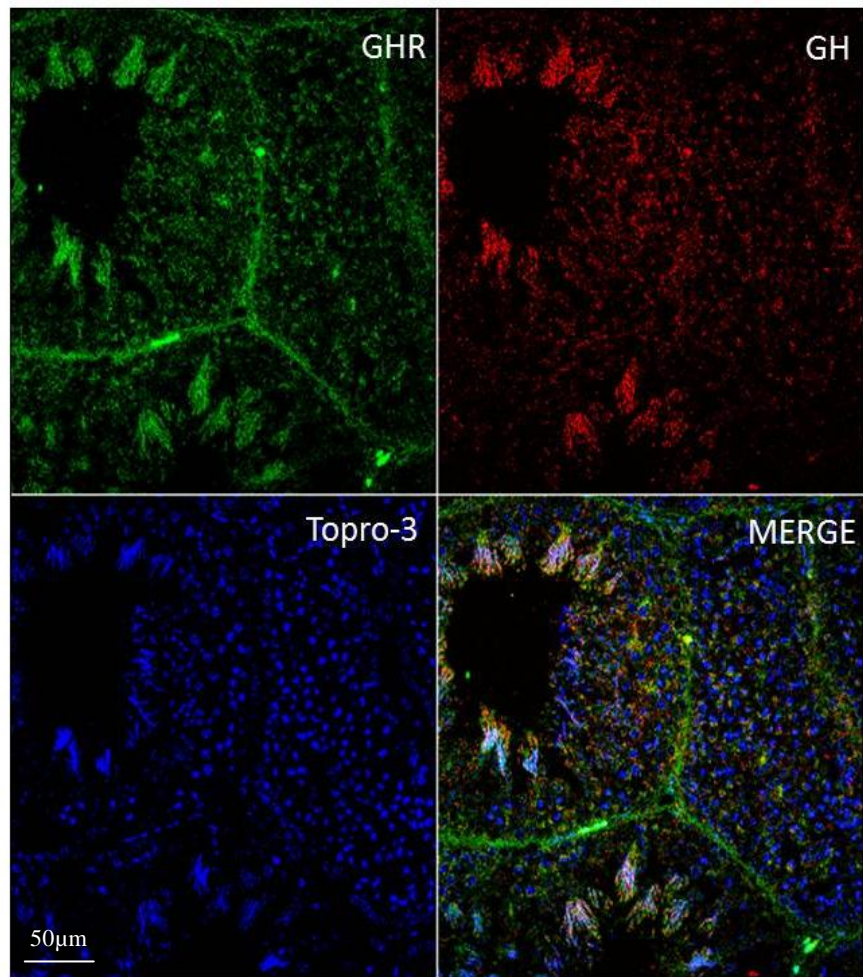


Figura 19. Vista panorámica de una inmunohistoquímica para la co-localización de la GH/GHR en túbulo seminífero de pollo de 36 semanas de edad. La distribución de la marca IR para GH (rojo) , GHR (verde) y Topro-3 para marcaje de núcleos (azul).

La distribución del receptor para GH (GHR), fue similar a la previamente observada para GH; está presente en todas las etapas de la línea germinal durante la espermatogénesis (Figura 19A-D), aunque también se encontró colocalización de GH y GHR en las células de Leydig en las zonas intersticiales. También es posible identificar el GHR en la mayor parte de la membrana basal de los túbulos seminíferos (Figura 19B), donde se encuentran las células miodes y destaca una mayor fluorescencia con respecto a la GH.

Con el objetivo de corroborar esta co-localización se realizó una inmunohistoquímica en secciones de testículos pollos adultos utilizando un anticuerpo policlonal contra la GH recombinante y un anticuerpo monoclonal contra el receptor. Los resultados mostraron nuevamente una amplia distribución de células positivas para GH en el túbulo seminífero pero principalmente esta IR se observó en células con morfología característica de espermátocitos, con menor intensidad en espermatogonias y en espermátides y en contraste en el lumen del túbulo los espermatozoides no mostraron señal (Fig. 20A, 20D; rojo).

Con un mayor aumento, se observó que la GH-IR fue localizada en espermatogonias con una distribución más intensa en el citoplasma rodeando la envoltura nuclear, en concordancia con los resultados previos (Fig. 20D, -D1, -D2 y -D3; rojo; flechas). En espermátocitos (Fig. 20D, -D1 y -D2; cabeza de flecha) la señal de IR fue identificada de manera similar a la figura anterior, en forma de casquete polarizado muy cercano al núcleo en el área correspondiente al aparato de Golgi similar con resultados previos en pollos de 15 semanas de edad (Luna et al., 2004). Además, fue evidente la inmunotinción positiva para GH en espermátides alargadas pero no fue posible definir su distribución intracelular por medio de microscopia confocal; solamente se observó la señal en el área de las cabezas de las espermátides alargadas (Fig. 20D, -D1; asterisco).

Respecto a la distribución del receptor (GHR, verde) este se observó en todas las células del túbulo seminífero similar a la distribución de la GH-IR (espermatogonia, espermátocito primario y secundario y espermátides); no hubo inmunoreactividad detectable en los espermatozoides presentes en el lumen del túbulo (Fig. 20B, 2E, -E1, -E2 y E3). La co-localización de GH y GHR fue principalmente citoplasmática y se observó en todas las etapas de diferenciación del epitelio germinal (Fig. 20C, 2F, -F1, -F2 y -F3). En el espermátocito, el GHR estuvo principalmente localizado en el citoplasma y en menor intensidad en el núcleo. También la colocalización se mostró en espermátides alargadas con una gran intensidad en la zona nuclear (Fig. 20C, 2F y -F1; amarillo).

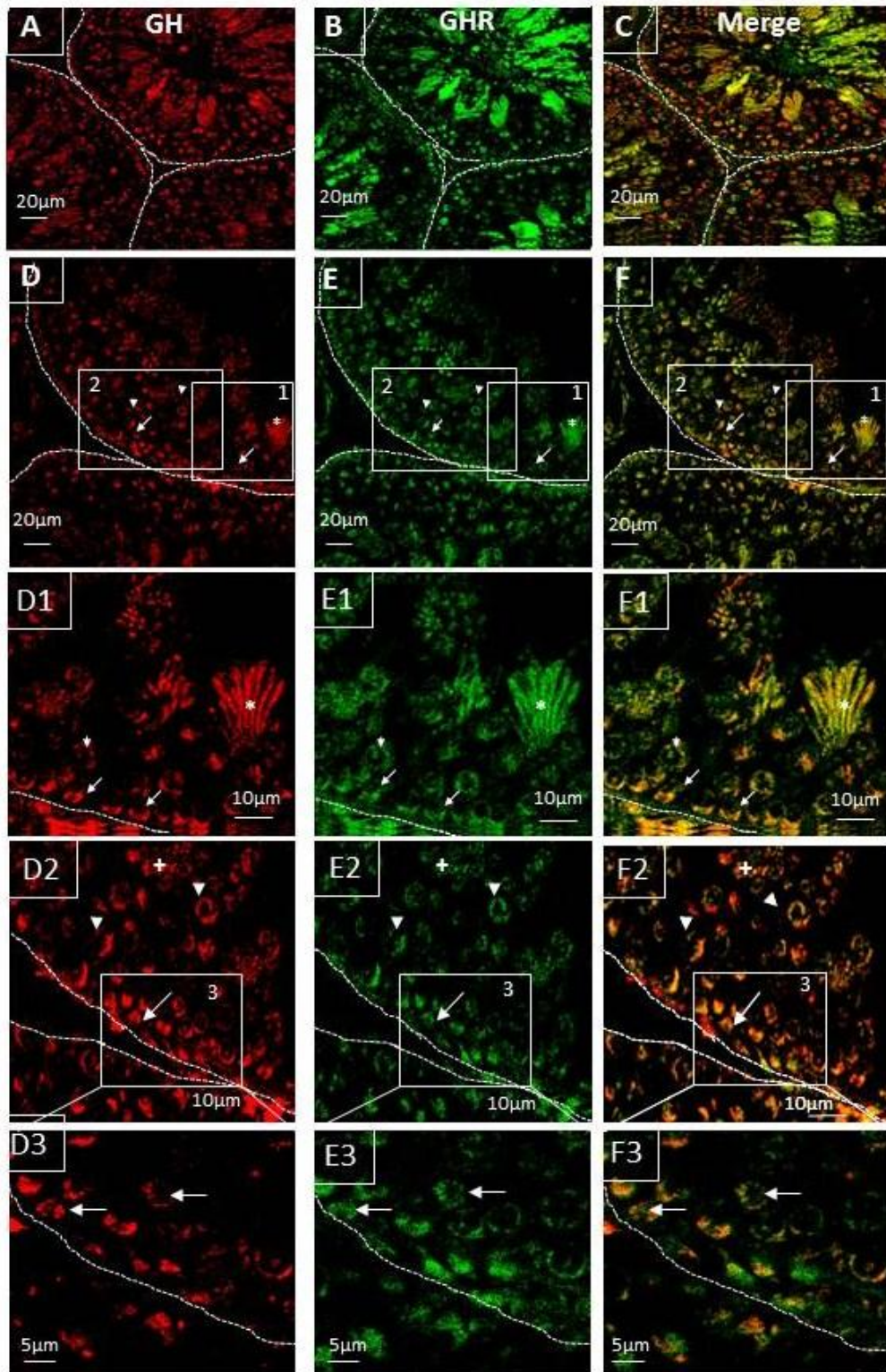


Figura 20. Colocalización de GH y GHR en testículo de pollo de 36 semanas. Se utilizó un anticuerpo monoclonal contra el receptor de GHR (CH17) y un anticuerpo policlonal contra la forma recombinante de GH (C1). Las flechas señalan espermatogonias y espermatocitos, las cabezas de flecha señalan espermátides y los asteriscos espermátides alargadas y espermatozoides inmaduros, la línea punteada señala la membrana basal. A-F) Barra corresponde a 20µm; D1-F2) barra de 10µm; D3-F3) barra de 5µm.

DISTRIBUCION INTRACELULAR DE LA GH Y SU RECEPTOR EN CÉLULAS GERMINALES.

En cortes de testículo de pollo de 36 semanas de edad se logró identificar la distribución intracelular de la hormona de crecimiento (GH) y su receptor (GHR), para lo cual se utilizó como control positivo hipófisis de pollo y como control negativo se realizó la incubación de células germinales e hipófisis con anticuerpo contra GH preabsorbido con un exceso de (200 ug/ml) GH recombinante de pollo (rcGH).

Se identificaron las características morfológicas de las células testiculares a través de micrografías generadas por microscopía electrónica fue necesario establecer puntos de referencia histoanatómica como la membrana basal y el lumen de los túbulos seminíferos (Fig. 21). A partir de estas referencias respecto a distribución celular del epitelio germinal (*lamina propria* hacia el lumen) se logró establecer características de electrodensidad y tamaño para los diferentes tipos celulares. Las espermatogonias (SPG) cuya referencia histológica es la proximidad a la membrana basal del túbulo seminífero fueron asociadas con una alta electrodensidad citoplasmática así como un patrón específico diferencial de la cromatina. Los espermatocitos (SPC) son la etapa subsecuente a las espermatogonias, en las cuales la cromatina se descondensa y los núcleos presentan un gran tamaño así como un citoplasma menos electrodensito; durante ésta etapa es evidente la gran cantidad de mitocondrias aunque no es posible definir espermatocitos primarios y secundarios únicamente por su morfología. Finalmente se identificaron las espermátides por su posición proximal a la luz del tubo, las cuales se encuentran en la fase final de la espermatogénesis, previo a ser libradas para la maduración espermática. Las espermátides presentan un núcleo pequeño y condensado, escaso citoplasma y en el mayor de los casos fueron identificados en un corte transversal.

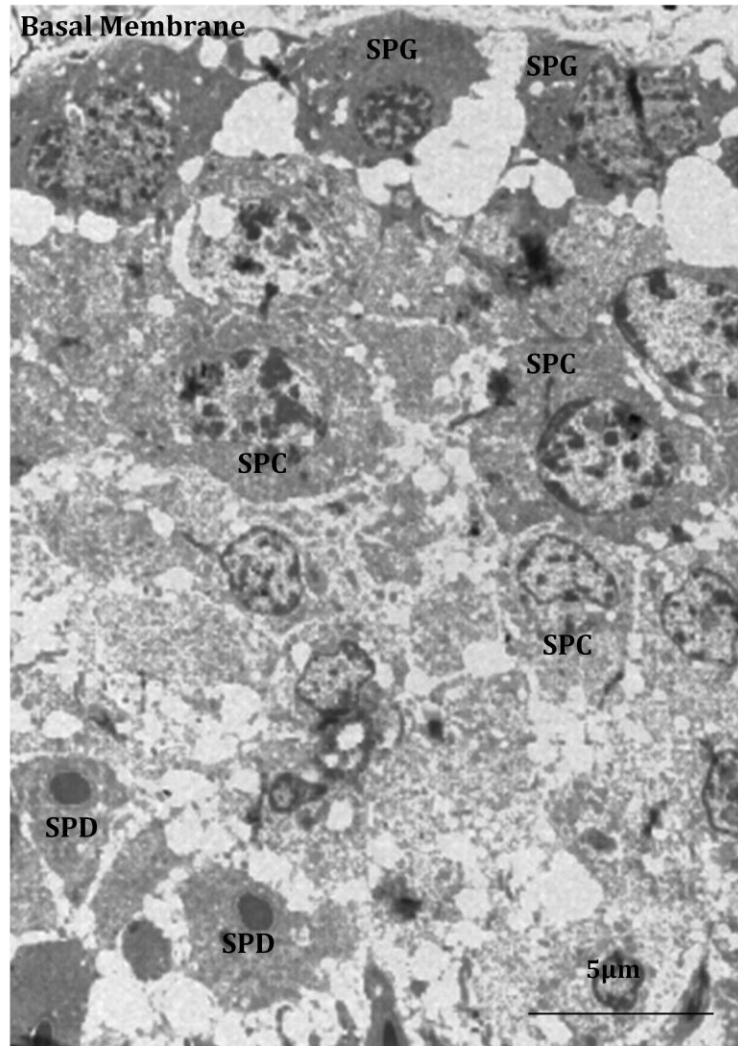


Figura 21. Ultraestructura de células testiculares de pollo en corte ultrafino de túbulo seminífero de pollo de 36 semanas de edad. Se muestra el epitelio germinal constituido por la membrana basal, espermatogonias (SPG), espermatocitos (SPC), espermatídes (SPD) y el lumen del túbulo contra-teñido con osmio y nitrato de plata.

Para estandarizar y realizar la inmunocitoquímica para localización y distribución de la hormona de crecimiento se utilizó como control positivo cortes de hipófisis de pollos adultos que fueron incubados con anticuerpo contra GH (C1). Como se muestra en la figura 22A se observa un somatotropo con marca inmunoreactiva en los gránulos de secreción, los cuales presentan un tamaño promedio de 300 μm . La marca positiva se muestra como partículas esféricas de oro coloidal (10 nm) ya que se utilizó un segundo anticuerpo policlonal contra IgG de conejo acoplado a estas. Por medio de la preabsorción del anticuerpo contra GH con un exceso de hormona recombinante se estableció (control

negativo) la especificidad de esta reacción como se muestra en la figura 22B. La marca se ve abolida casi en su totalidad en las células de la línea germinal para estos controles (Fig. 23C, 23F y 23I).

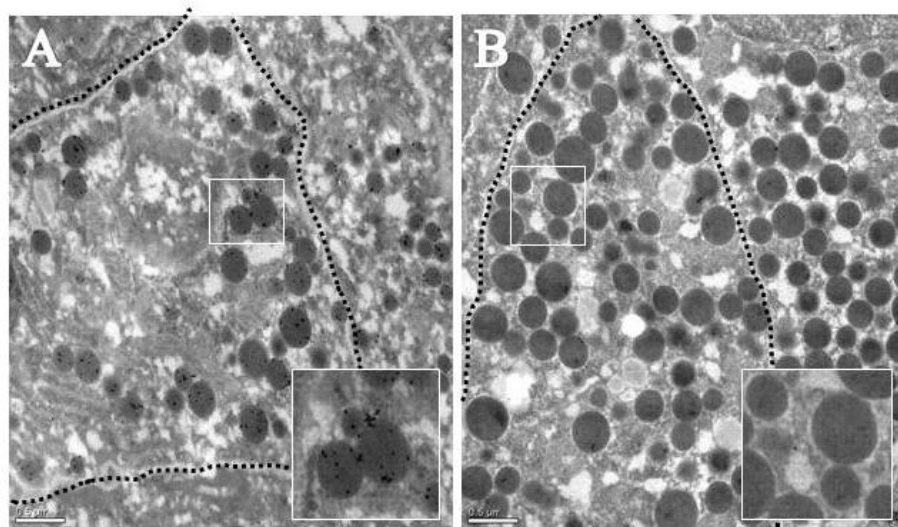


Figura 22. Inmunohistoquímica de cGH en somatotropos de hipófisis de pollos adultos como control positivo para la inmunoreactividad a GH utilizando un anticuerpo específico (C1) y segundo anticuerpo acoplado con partículas de oro coloidal de 10nm. **A:** Control positivo, gránulos de secreción de somatotropos con gránulos inmunopositivos. **B:** Control negativo, muestra cortes incubados con el primer anticuerpo C1 preabsorbido con un exceso de GH recombinante de pollo. Barra de escala 0.5 µm. La línea punteada delimita células y en el recuadro se observa una mayor aumento (2.5 veces).

En contraste se observó marcaje positivo contra GH en las 3 principales etapas de la espermatogénesis: espermatogonias, espermatocitos y espermátides. En el caso de las espermatogonias se observó marca nuclear para GH (Fig. 23B, flecha) y en el citoplasma encontramos marcaje perinuclear y adyacente a la membrana basal (Fig. 23A, flecha). En el caso de los espermatocitos se encontró marca distribuida ampliamente en el citoplasma (Fig. 23D, flecha) y con una abundancia aparentemente mayor en contraste con el núcleo (Fig. 23E, Flecha), donde también fue posible observar marca positiva. Las espermátides por su lado también presentaron marca en ambos compartimientos celulares; sin embargo dado el escaso citoplasma (Fig. 23G, flecha), la mayor parte de la marca se logró observar en el núcleo (Fig. 23G, círculos y 23H, flechas).

El receptor de GH también fue inmunolocalizado en las tres etapas de diferenciación de la línea germinal estudiadas en este trabajo como se muestra en la Fig. 24 con flecha; dicha marca positiva para GHR también se observó tanto en el citoplasma (Fig. 24A, 24C y 24E) como en el núcleo (Fig. 24B, 24D y 24F). El receptor de GH presenta un patrón de

distribución similar al observado para la hormona. También fue posible identificar marcaje positivo tanto para GH como para GHR en intersticio de los túbulos seminíferos como se muestra en la Fig. 25 que podrían ser células de Leydig.

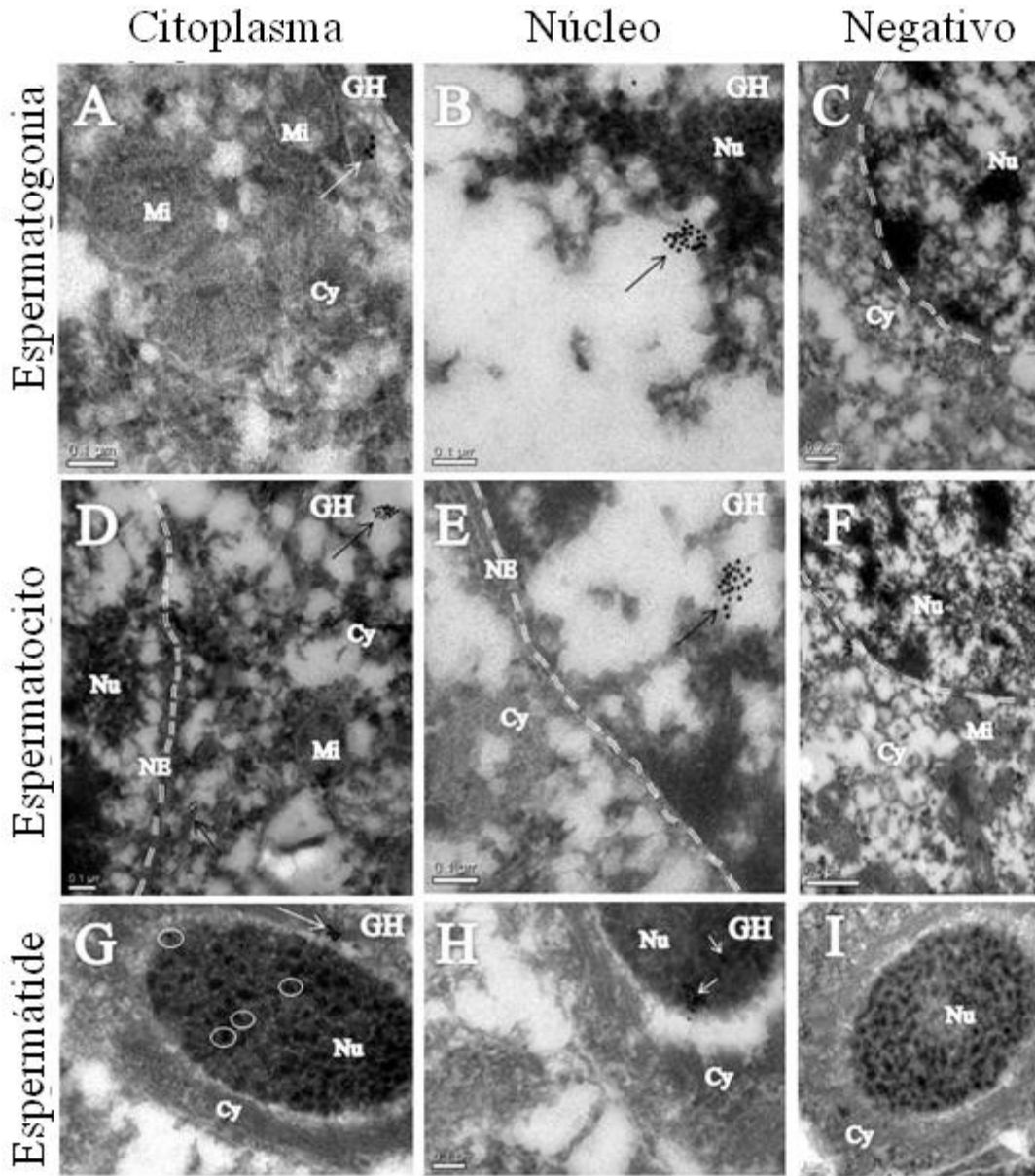


Figura 23. Inmunocitoquímica de cGH en cortes ultrafinos de túbulos seminíferos de pollos adultos. **A)** GH en el citoplasma de una espermatogonia; se observa marca positiva. **B)** GH en un núcleo de espermatogonia. **C)** Control negativo de espermatogonia. **D)** Marca positiva de GH en citoplasma de espermatocito. **E)** marca inmunopartículas para GH en núcleo de espermatocito. **F)** Control negativo de espermatocito. **G y H)** GH positiva en espermátide. Partículas de 10nm de oro coloidal indican marcaje positivo. Las fechas y los círculos marcan zonas de inmunopartículas de oro. La doble línea punteada delimita la envoltura nuclear. La barra representa 0.1 μm . **Nu**, núcleo; **Cy**, citoplasma; **Mi**, mitocondria; **NE**, envoltura nuclear.

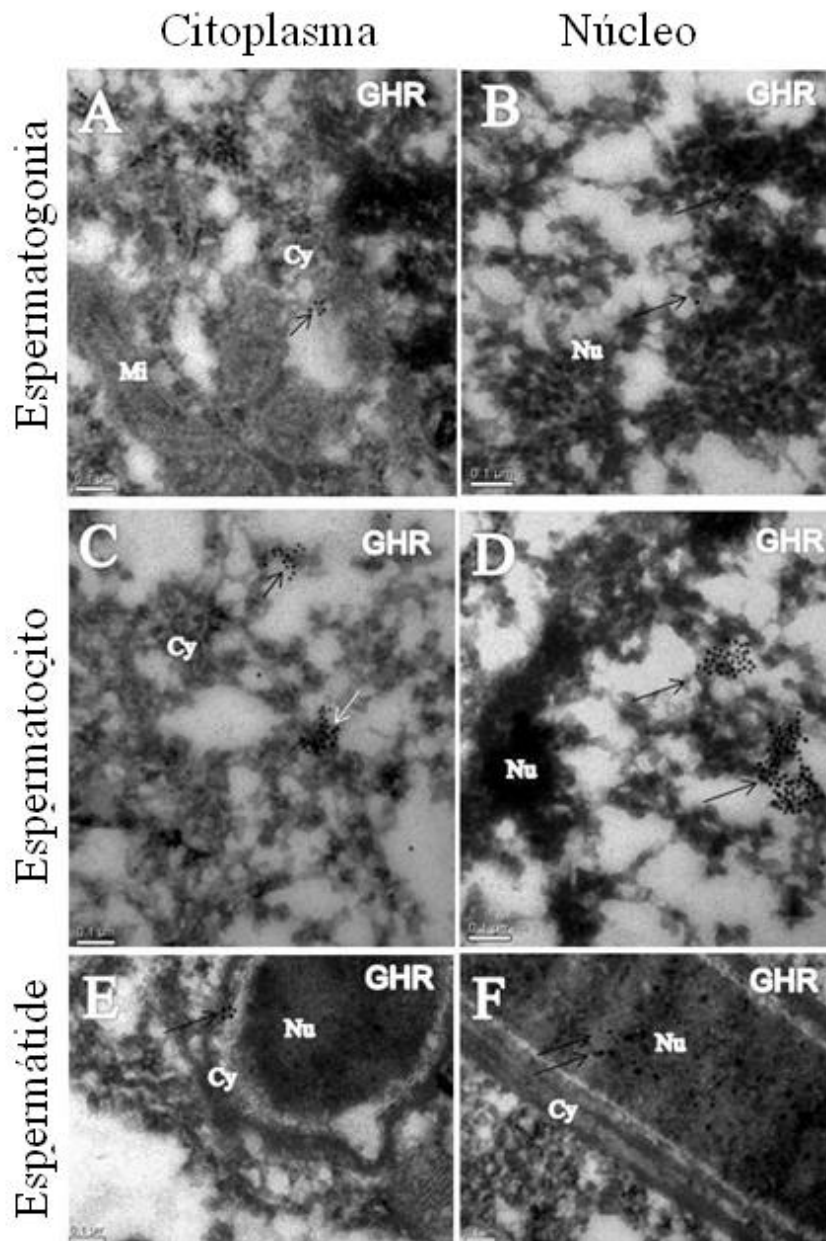


Figura 24. Inmunocitoquímica del receptor de GH (GHR) en cortes ultrafinos de túbulos seminíferos de testículo de pollos adultos. **A)** Marca positiva para el anticuerpo a GHR en citoplasma y **B)** núcleo de espermatogonia. **C y D)** Marca positiva a GHR en citoplasma y núcleo de espermatocito respectivamente. **E y F)** GHR en citoplasma y núcleo de espermátide. Las flechas señalan inmunoreactividad positiva (Partículas de 10nm de oro coloidal indican marcaje positivo). La barra representa 0.1 μm . Nu, núcleo; Cy, citoplasma; Mi, mitocondria; NE, envoltura nuclear.

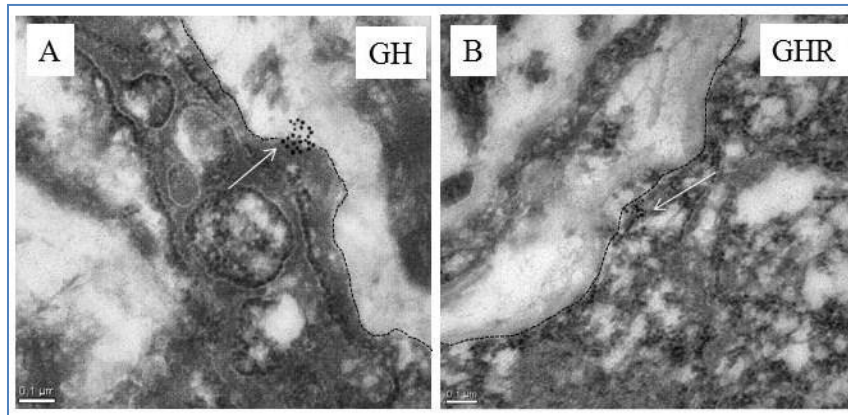


Figura 25. Inmunocitoquímica de cGH y GHR en cortes de testículo de pollo adulto. **A)** marca positiva a cGH en célula de Leydig y membrana basal. **B)** marca positiva para GHR en célula de Leydig y membrana basal. Línea punteada delimita la lámina propia del túbulo seminífero y la célula de Leydig. Las flechas señalan inmunoreactividad positiva. Partículas de 10nm de oro coloidal indican marcaje positivo.

Aislamiento y caracterización de subpoblaciones de células testiculares de pollo a través de centrifugación en gradiente de densidad

Se separaron subpoblaciones mixtas de células testiculares por medio de centrifugación en un gradiente lineal continuo de 0-17.5% de iodixanol en medio DMEM, el cual tuvo un intervalo de densidad entre 0.998 – 1.096 g/ml. La linealidad del gradiente se verificó mediante espectrometría midiendo fracciones de 1 ml a una absorbancia a 360nm mostrando una correlación lineal de $r^2=0.96$ (Fig. 26).

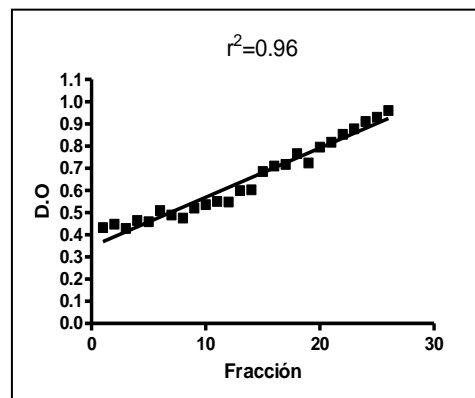


Figura 26. Se muestra la regresión lineal de la absorbancia de fracciones del gradiente lineal continuo de iodixanol - DMEM (0-17.5%). Las lecturas se realizaron a una longitud de onda de 360 nm. Se colectaron 30 fracciones de 1ml. Se realizó una regresión lineal obteniéndose una $r^2= 0.96$.

La suspensión celular previamente disgregada por métodos mecánico-enzimáticos se separó mediante la centrifugación en el gradiente de iodixanol durante 40 min a 1800 x g con lo cual se formaron 3 bandas de células como se muestran en la Fig. 27. Al observar las

subpoblaciones recuperadas del gradiente mediante microscopía de luz y en contraste de fases se logró identificar diferentes características morfológicas entre las subpoblaciones, las cuales aportaron datos para su caracterización.

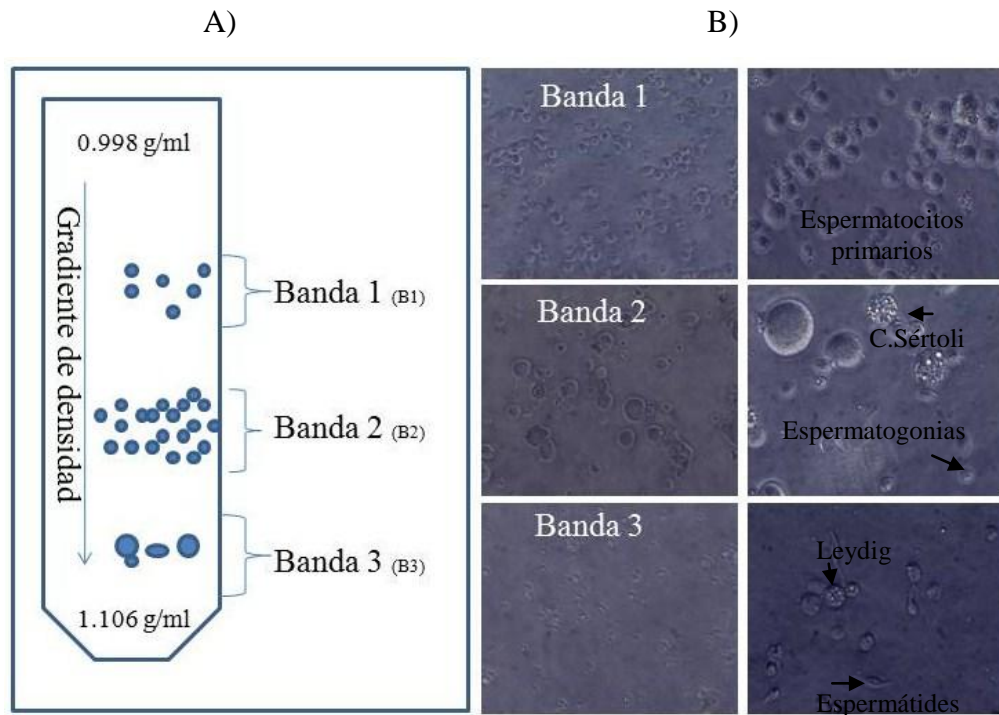


Figura 27. A) Esquema del gradiente de separación lineal continuo de Iodixanol (0-17.5%; Densidad 0.998-1.096 g/ml); después de la centrifugación a 3500 x rpm durante 30 min se formaron 3 bandas : B1, B2, y B3 dependientes de sus diferentes densidades. B) Células testiculares de pollo separadas a partir de su densidad observadas en contraste de fases; tinción azul de tripano 5:1 observadas en aumento 40x.

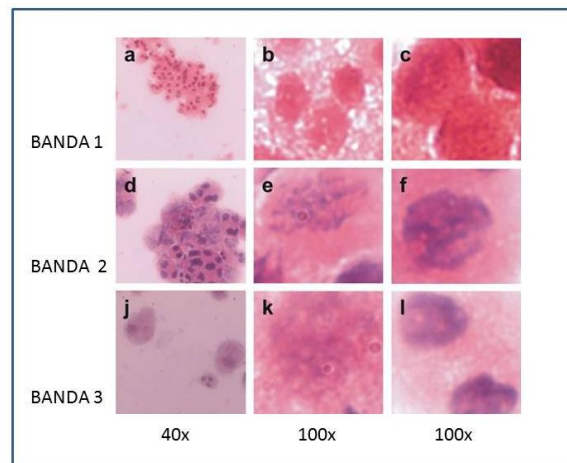


Figura 28. Tinción de hematoxilina y eosina en cultivo de células testiculares de pollo separadas por gradiente de densidad. **a, d, j** muestran micrografías panorámicas a 40x y **b,c, e, f, k, l** se muestran los principales tipos celulares a mayor detalle (aumento 100x).

Se separaron células testiculares en tres bandas o subpoblaciones celulares las cuales presentaron densidades diferenciales y fueron clasificadas de acuerdo a su morfología (Fig. 28 y cuadro 2) y marcadores moleculares (Fig. 29). En la primera banda o subpoblación (B1) con densidad de 1.045 g/ml se observaron células de tamaño y forma homogénea en las cuales con la técnica de hematoxilina y eosina fue posible identificarlas con citoplasma acidófilo y núcleo basófilo; el 95.64% presentó un núcleo descondensado lo que identifica estas células como espermátocitos primarios, el resto presentó núcleo condensado uniforme por lo que se trata de espermatogonias (2.55%). La segunda banda celular (B2) presentó una densidad de 1.068 g/ml y se observaron 2 tipos celulares predominantes formando agregados con confluencia celular; se identificaron un 9.62% de células de tamaño grande, forma irregular y con una refringencia citoplasmática a la luz muy diferente al resto de las células las cuales fueron identificadas como células de Sertoli; el otro tipo celular (55.29%) son células de la línea germinal con un tamaño que corresponde a espermatogonias. El patrón de tinción citoplasmático de estas últimas es parecido al encontrado en la primera banda de células recuperadas del gradiente, las cuales tuvieron núcleo bien definido y condensado por lo que se sugiere que también sean espermatogonias en diferente estado de maduración. En la banda 3, constituida de células que presentan una mayor densidad (1.087 g/ml), se encontró una sub-población con una proporción relativa de 41.26% de células con formas alargadas en algunos casos flageladas que corresponden a la morfología descrita para espermátides alargadas y por otro lado encontramos un 56.46% de células de mayor tamaño de forma redonda, núcleo excéntrico y basófilo, citoplasma abundante y ligera afinidad a la tinción con eosina y con una difracción citoplasmática de luz identificadas como células de Leydig; estas células son de mayor tamaño.

Tipo Celular	Subpoblación 1 (B1)	Subpoblación 2 (B2)	Subpoblación 3(B3)
Espermatogonias	3.55±1.3%	55.29±6.09%	-
Espermatocitos	95.64±11.4%	-	-
Espermátides	-	32.60±4.7%	41.26±9.9%
Células de Leydig	-	-	56.46±16.1%
Células de Sértoli	-	9.62±3.2%	2.10±1.6%
densidad (δ)	1.045 g/ml	1.068 g/ml	1.087 g/ml

Cuadro 2. Proporción relativa de células testiculares de pollo adulto en cada subpoblación separada por centrifugación en gradiente de densidad. Se realizó el conteo de células de 4 animales. \pm S.E.M. Densidad en g/ml.

Caracterización de subpoblaciones celulares de testículo mediante marcadores celulares

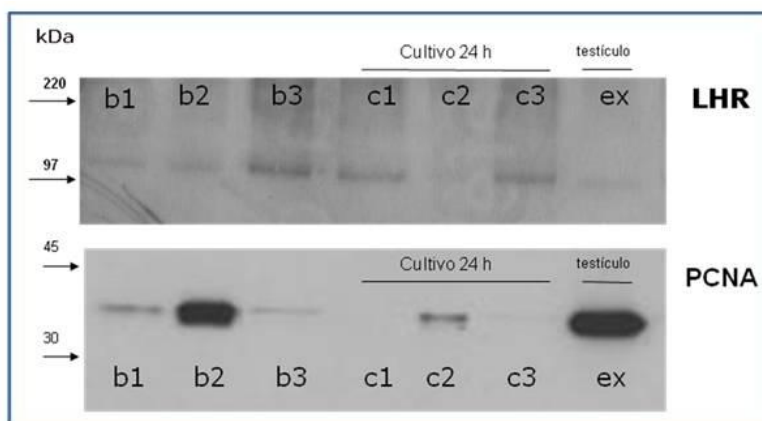


Figura 29. Detección de LHR y PCNA por Western bolt. Luminograma de bandas inmuno-reactivas al LHR y PCNA. Banda de células 1 (b1), banda 2 (b2) y banda (b3) provenientes de la centrifugación en gradiente. Cultivos celulares de banda 1 (C1), cultivo de banda 2 (C2) y Cultivo de banda 3 (C3); extracto de testículo (ex). Unidades en kilodaltones (kDa). Se colocaron 35 μ g de proteína por carril.

Mediante SDS-PAGE en condiciones no reductoras y Western blot y la utilización de anticuerpos contra marcadores de los diferentes tipos celulares se trataron de identificar las diferentes subpoblaciones de células separadas a partir de su densidad, tanto en células recién separadas por el gradiente como cultivadas durante 24 h (Fig. 29). Se encontró inmuno-reactividad contra el receptor a hormona luteinizante (LHR) en las células de la tercera banda (b3) donde existe una proporción del 56.46 % de células de Leydig; en tanto a las 24 h de cultivo se observó inmuno-reactividad en el cultivo de la banda 1 (c1) así como en el cultivo de la banda 3 (c3); como control positivo se usó homogenado de testículo de

pollo adulto donde se determinó una proteína de peso molecular aproximado de 108 kDa que coincide con el PM teórico para el receptor a LH.

La inmuno-detección del antígeno nuclear de proliferación celular (PCNA) mostró una banda inmuno-reactiva con un peso molecular de 35.4 kDa, en las 3 bandas (b1, b2, b3) de células recién recuperadas del gradiente de centrifugación; sin embargo después de 24h dicha inmuno-reactividad solo se encontró en el cultivo celular de la segunda banda (c2) expresando una proporción significativamente menor que en la banda b2 y en extracto de testículo.

Determinación del patrón de heterogeneidad molecular de GH en subpoblaciones testiculares

Con el fin de determinar el patrón de heterogeneidad molecular de la GH en las subpoblaciones de células testiculares se realizó una electroforesis en condiciones reductoras (RC) y se detectó a la GH con un anticuerpo contra la forma nativa de la hormona (CAP-1). Se lograron identificar 3 isoformas principales que mostraron diferentes proporciones relativas entre las bandas de células separadas en gradiente de densidad (Fig. 30). Se observó una isoforma de 29 kDa de peso molecular en la primera banda celular (B1) la cual se encontró presente en menor proporción cuando se comparó con la banda 2 (B2) y banda 3 (B3) (Fig. 30A); la diferencia fue significativa ($P < 0.01$). La forma monomérica de 26 kDa se encontró principalmente en B3 y B2 y en menor abundancia relativa en B1 la cual presentó diferencia significativa ($P < 0.05$) (Fig. 30B). En B1 se presentó una diferencia respecto a la isoforma de 17kDa con respecto a las dos subpoblaciones de mayor densidad (Fig. 30B), esta se encontró en una proporción relativa menor a las otras bandas.

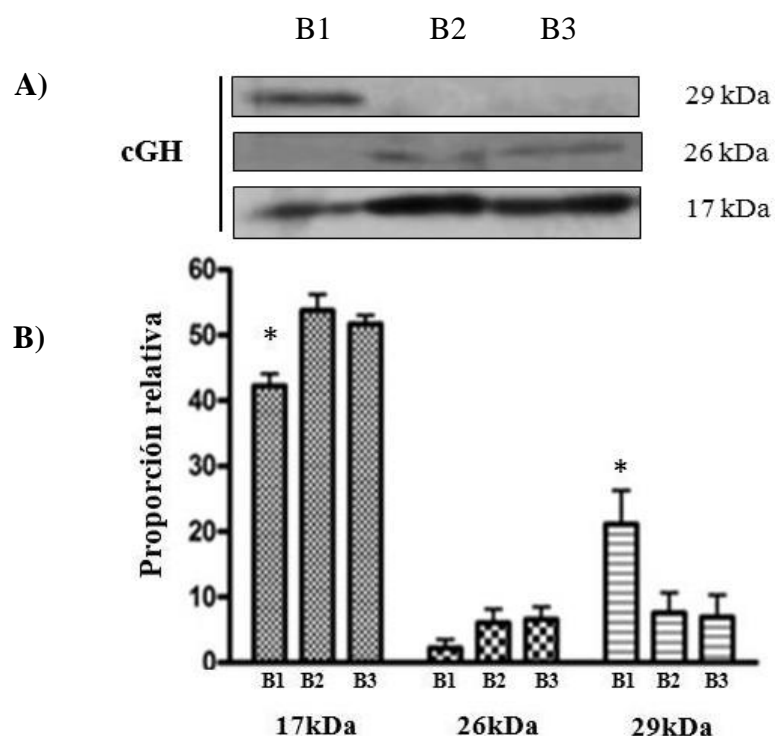


Figure 30. A) Luminograma representativo de Western Blot de GH en extractos de células previamente fraccionadas en subpoblaciones. Las proteínas fueron transferidas a membranas de nitrocelulosa y reveladas a través de quimioluminiscencia Unidades en kilodaltones (kDa). Banda celular 1 (B1), banda celular 2 (B2), banda celular 3 (B3). B). Proporción relativa de isoformas por banda celular, se muestra la media \pm error estándar. (*) señala diferencias significativas ($P < 0.05$) $n=5$.

Cuantificación de GH en subpoblaciones testiculares

Para cuantificar el contenido total de hormona de crecimiento (GH) en células testiculares de pollo separadas por centrifugación se realizó un ensayo inmuno-enzimático (ELISA) (Fig. 31). Se encontró una diferencia significativa entre la cantidad encontrada en la banda B1 y B2 (71.22 ± 6.4 y 77.85 ± 8.2 ng / mg de proteína respectivamente) al compararse con la tercera banda (B3) donde fue de 32.2 ± 15.1 ng / mg de proteína. Se encontraron diferencia significativa ($P < 0.001$) entre B1/B2 vs B3 como se muestra en la Fig. 31; ésta cuantificación se realizó en al menos 3 animales y se analizó por medio de ANOVA de 1 vía con prueba post hoc de Tukey.

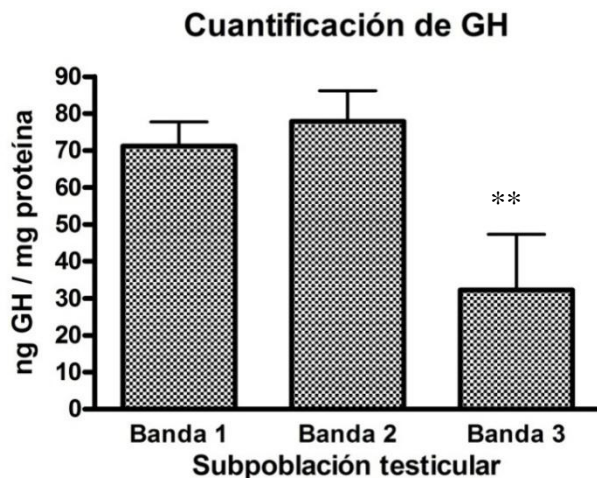


Figura 31. Cuantificación de cGH. Se muestra la media \pm error estándar de la concentración de cGH en subpoblaciones de células de testículo de pollo sexualmente maduro. Cuantificación por el método de ELISA indirecto por competencia. (**) Diferencia significativa ($P < 0.001$) a través de ANOVA de 1 vía con prueba de Tukey.

Efecto de GH y GHRH en cultivos de células testiculares

Efecto de GHRH sobre PCNA

En cultivos primarios de células testiculares incubados con GHRH durante 24 h en medio enriquecido se determinó el efecto sobre la proliferación. Las células fueron cultivadas durante 24 h previas a su estimulación para estabilización; durante su colecta y homogenización se usaron inhibidores de proteasas. Mediante el método de SDS-PAGE/Western blot y a través del análisis densitométrico se obtuvieron las áreas bajo la curva de bandas inmunoreactivas al anticuerpo contra PCNA a partir de 30 μ g de proteína y se compararon entre las condiciones control y aquellos cultivos tratados con diferentes concentraciones de GHRH (Fig. 32). Al comparar estas áreas se observó un incremento estadísticamente significativo con respecto al control de 2.7, 3.6 y 2.0 veces para los tratamientos con 1nM ($P < 0.05$), 10nM ($P < 0.01$) y 100nM ($P < 0.05$) de GHRH respectivamente (Fig. 32).

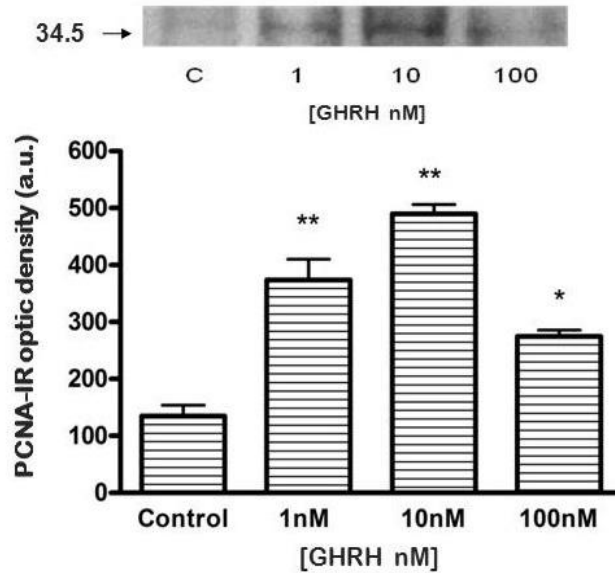


Figura 32. A) Luminograma de un SDS-PAGE y Western Blot (condiciones no reductoras) de bandas IR al anticuerpo contra PCNA. Se colocaron 30 μ g de proteína por carril y C, corresponde al control sin tratamiento; 1, 1 nM; 10, 10 nM y 100, 100 nM de GHRH, las unidades en kilodaltones (kDa). B) Análisis densitométrico de las bandas IR para PCNA control sin tratamiento con GHRH (C) y el tratamientos con GHRH, 1nM, 10 nM y 100 nM respectivamente. Cada barra representa la media \pm SEM de las unidades arbitrarias, (áreas bajo la curva) $n = 4$. Se analizaron con ANOVA y una prueba posthoc Tukey (*) $P < 0.05$, (**) $P < 0.01$.

Efecto de GH sobre la tasa metabólica y proliferación de células testiculares en cultivo

Para determinar el efecto de la hormona de crecimiento sobre el metabolismo de las células testiculares en los cultivos primarios se adicionó la GH recombinante de pollo al medio de cultivo y se evaluaron a través del ensayo de MTT (Fig. 33). Para determinar el efecto de la GH en la proliferación se determinó la incorporación de timidina tritiada (Fig. 34) 24 h después de haberse realizado el estímulo.

El ensayo de MTT mostró un incremento en la actividad metabólica (Fig. 33) al compararse con el control del 6.59 ± 1.5 , 4.84 ± 1.2 y $5.64 \pm 1.2\%$ cuando se estimularon los cultivos con 1nM, 10nM y 100nM de GH respectivamente. Solo presentó diferencia significativa ($P < 0.01$) el tratamiento de 1nM de GH al compararse contra el grupo control.

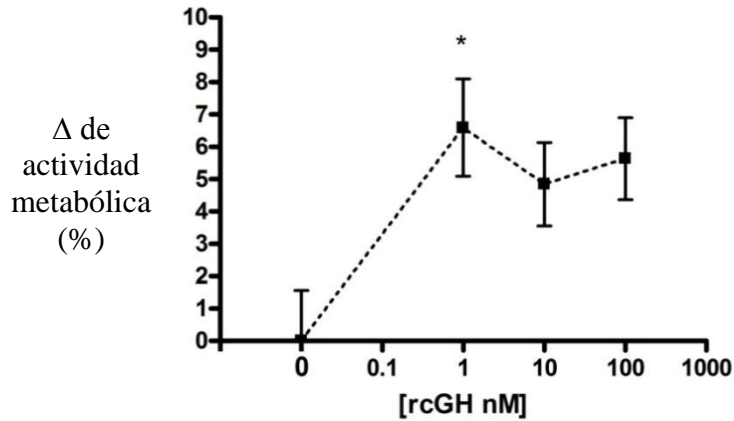


Figura 33. Efecto de rcGH en la actividad metabólica de células testiculares en cultivo primario. Mediante el ensayo de MTT se evaluó la actividad metabólica de los cultivos en condiciones control y en presencia de diferentes concentraciones de rcGH. Los resultados se muestran la diferencia en la actividad metabólica expresado en (%) \pm error estándar (N=5). Asterisco, muestra diferencia significativa al compararse con el control con ANOVA de una vía y una prueba post hoc Tukey (P<0.01).

Los resultados del ensayo de timidina tritiada (Fig. 34) dieron evidencia de un aumento en la incorporación del 18.76%, 70.79% y 2.13% respectivamente para los tratamientos con GH de 1, 10 y 100 nM. El único tratamiento que presentó diferencia significativa al compararse con el control fue 10nM de rcGH.

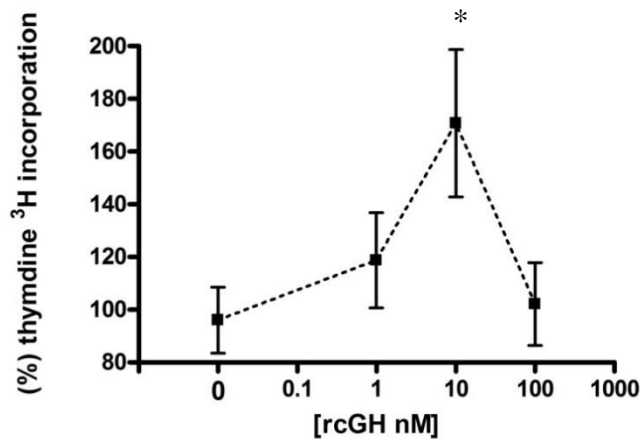


Figura 34. Efecto de rcGH en la incorporación de timidina tritiada por células testiculares en cultivo primario. Se muestra el incremento (%) en la incorporación de timidina \pm error estándar. N=4. Asterisco señala diferencia significativa ANOVA una vía con prueba de Tukey (P<0.01).

Analisis de la expresión de ghrelina, GHS-R1a, Ob-r y GnIH en el testículo del pollo

Ontogenia de la expresión en la de los genes ghrelina y GHS-R1a

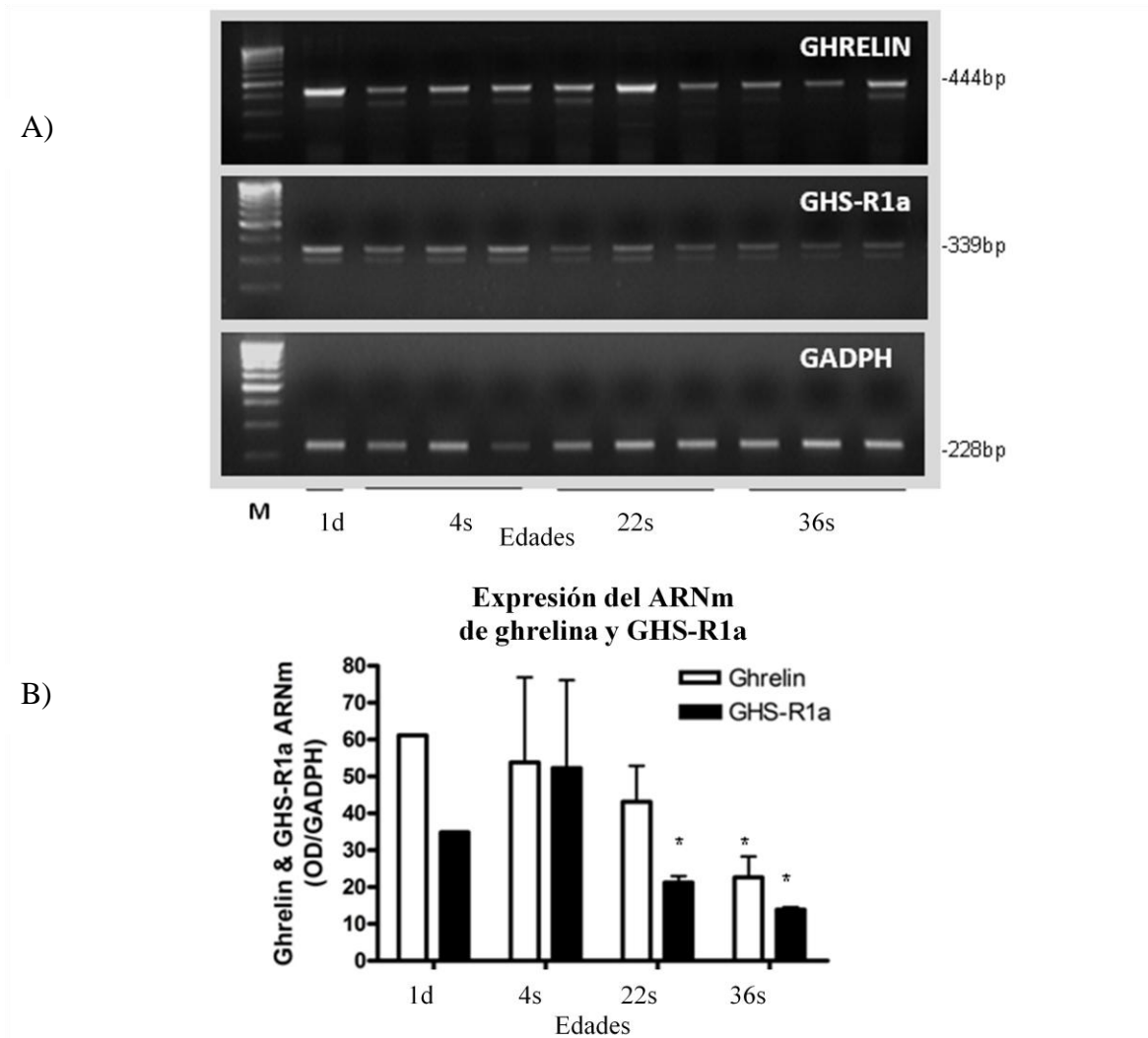


Figura 35. Expresión de ghrelina y GHS-R1a en testículo de pollo durante la ontogenia. A) se muestran un ensayo representativo de los productos de RT-PCR para el ARNm de ghrelina y GHS-R1a y como control de carga GADPH en testículo de pollos de 1 día posteclosión, 4, 22 y 36 semanas. Se utilizó un marcador en escalera de 100pb (M). B) Se presentan los datos semi-cuantitativos de los niveles de expresión del ARNm de ghrelina □ y GHS-R1a ■ por RT-PCR en las edades previamente señaladas. Las barras representan la media \pm error estándar de 3 determinaciones. (*) Diferencia significativa ($P < 0.05$) al analizarse a través de ANOVA seguida de Tukey.

Estos datos mostraron una expresión de ghrelina y su receptor a lo largo del desarrollo postnatal del pollo (Fig.35). Existen cambios tanto en el ligando como en el receptor; ghrelina tiene una tendencia a disminuir a lo largo del desarrollo, siendo ya significativa esta disminución en la edad de la madurez sexual (36-semanas de edad). Por

su parte el receptor presenta una tendencia a aumentar durante su fase exponencial de crecimiento corporal, es decir, durante su etapa infantil (4-semanas), pero en la pubertad y madurez sexual los niveles de receptor descienden significativamente.

Ontogenia de la expresión del gen del receptor a leptina (Ob-R)

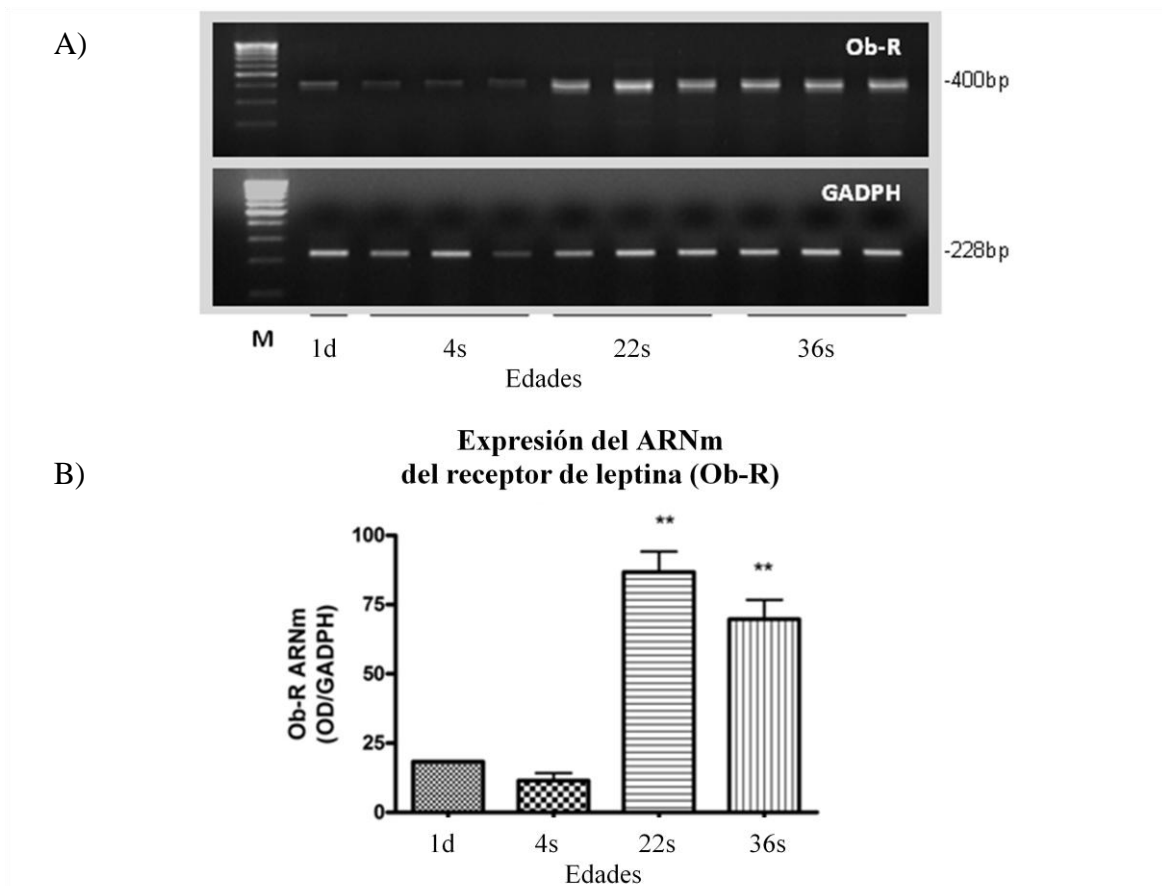


Figura 36. Expresión de Ob-R en testículo de pollo durante la ontogenia. A) se muestra un ensayo representativo de los niveles de ARNm de Ob-R por RT-PCR en pollos de 1 día post-eclosión (1d), 4, 22 y 36 semanas (4, 22 y 36w). Se utilizó GADPH como control de carga. Se utilizó un marcador en escalera de 100pb (M). B) Se presentan los datos semi-cuantitativos de los niveles de expresión del ARNm en las edades previamente señaladas. Las barras representan la media \pm error estándar de 3 determinaciones. (**) Diferencia significativa ($P < 0.01$) al analizarse a través de ANOVA seguida de Tukey.

El ARN del receptor a leptina (Ob-R) se amplificó en las diferentes etapas de desarrollo gonadal (Fig. 36). Se observó un marcado aumento en la expresión de Ob-R durante y después de la activación del eje hipotálamo-hipófisis-gónada; se presentaron niveles similares de expresión al comparar 1 día post-eclosión con la edad de 4 semanas y se incrementa significativamente entre las 22 y 36 semanas. Al comparar las edades

neonatal e infantil con la puberal y madurez sexual se observa un aumento de al menos 5 veces.

Ontogenia de la expresión de gen de la hormona inhibidora de gonadotropinas GnIH

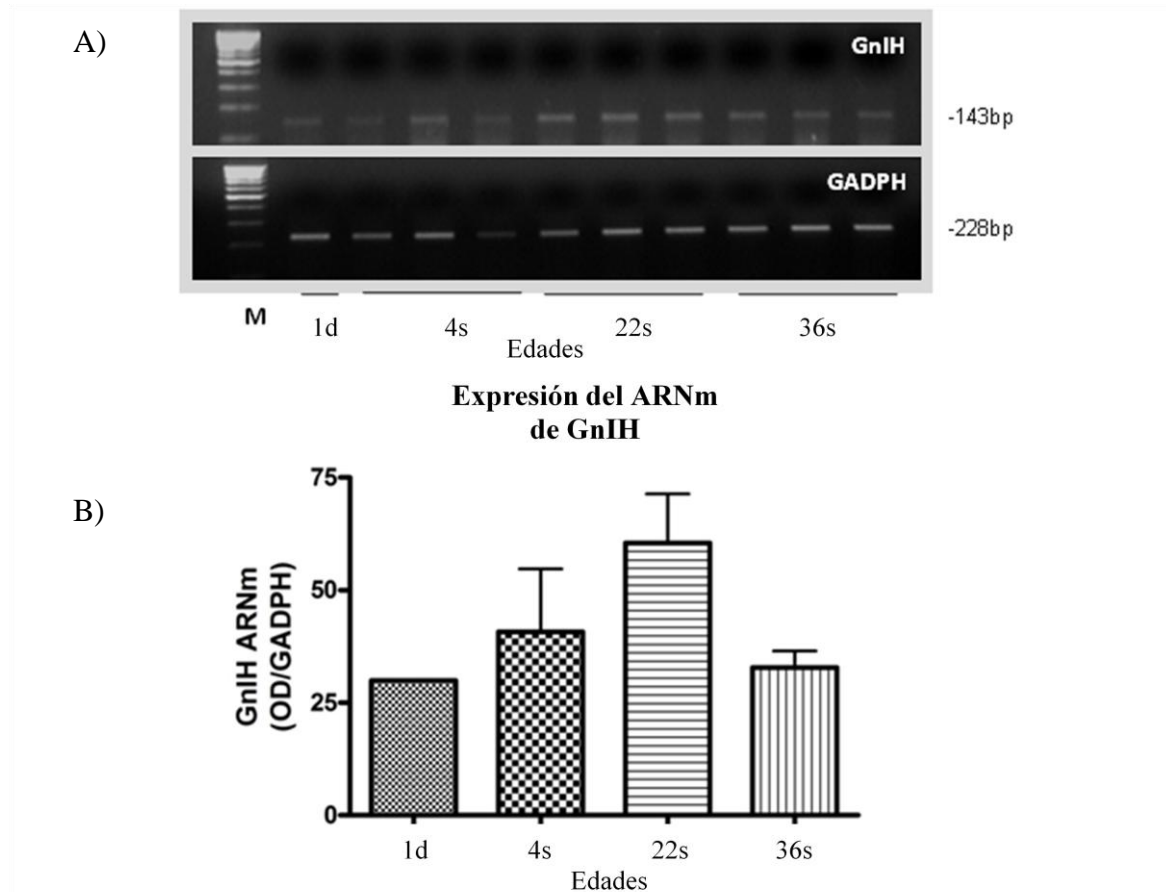


Figura 37. Expresión de GnIH en testículo de pollo durante la ontogenia. A) se muestra un ensayo representativo de los niveles de ARNm de GnIH por RT-PCR en pollos de 1 día post-eclosión (1d), 4, 22 y 36 semanas (4, 22 y 36w). Se utilizó GADPH como control de carga. Se utilizó un marcador en escalera de 100pb (M). B) Se presentan los datos semi-cuantitativos de los niveles de expresión del ARNm en las edades previamente señaladas. Las barras representan la media \pm error estándar de 3 determinaciones

En la figura 37 se muestra una tendencia a incrementar la expresión del mensajero de GnIH a partir de la etapa neonatal hasta la pubertad del pollo, y una disminución durante su madurez sexual. Si bien no existen diferencias significativas al realizar el análisis estadístico de ANOVA de una vía. Se puede señalar que se encontró la mayor expresión testicular del factor inhibidor de la liberación de gonadotropinas a las 22 semanas de edad y la menor expresión en la edad de 1 día post-eclosión.

Expresión durante el estrés metabólico de ghrelina y GHS-R1a

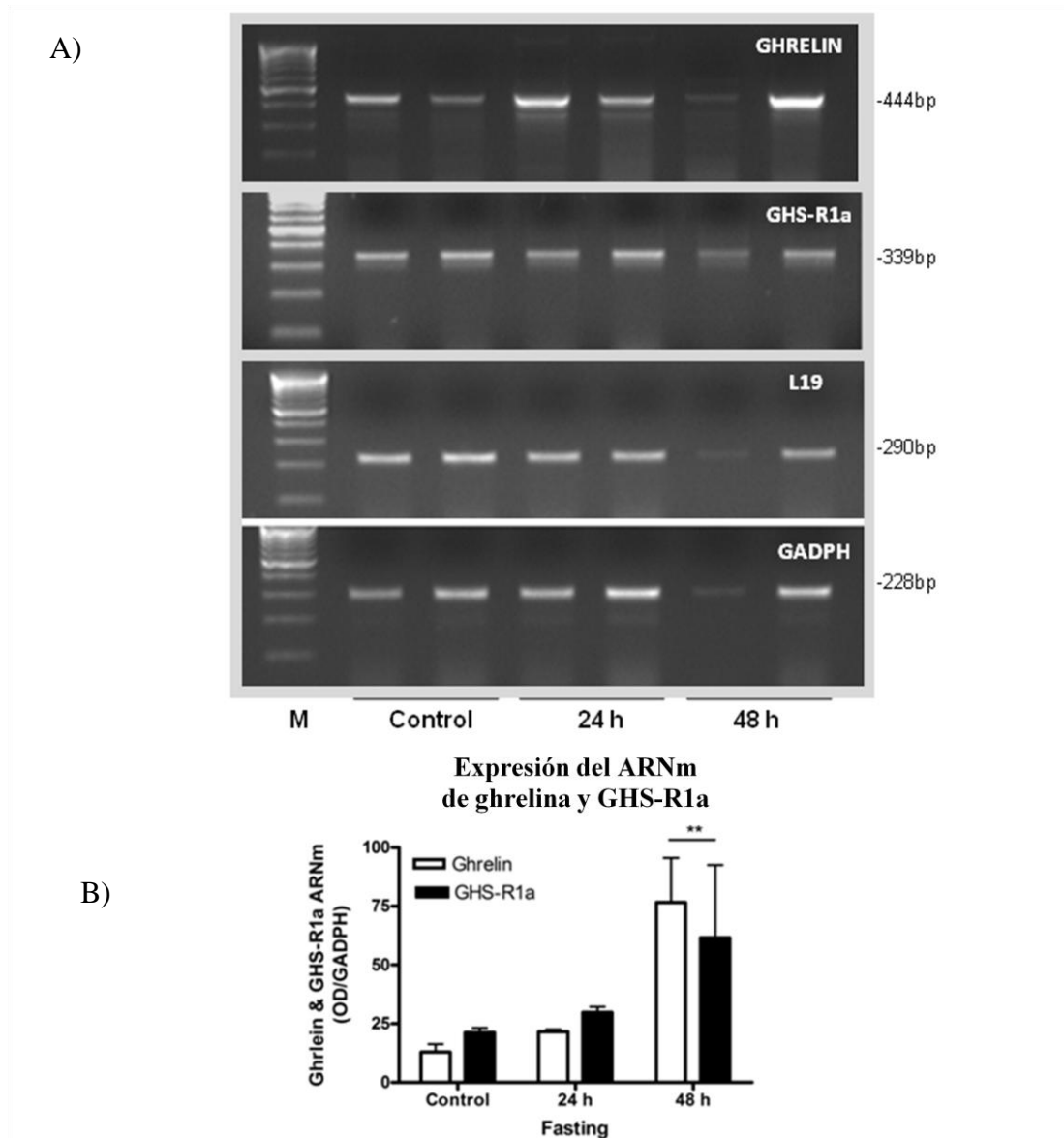


Figura 38. Expresión de ghrelina y GHS-R1a en testículo de pollo bajo estrés metabólico (*fasting*). A) se muestra un ensayo representativo de los niveles de ARNm de ghrelina □ y GHS-R1a ■ por RT-PCR de muestras por duplicado de pollos de 4 semanas. Se utilizó GADPH y L19 ribosomal como controles de carga. Se utilizó un marcador de 100pb (M). B). Las barras representan la media \pm error de la densidad óptica de la señal entre GADPH. (**) Diferencia significativa ($P < 0.01$) al analizarse a través de ANOVA seguida de Tukey.

Para obtener datos respecto a la regulación de los factores previamente estudiados durante la ontogenia del pollo, se analizó el cambio en los patrones de expresión del ARNm de las señales ghrelina/GHS-R1a, receptor a leptina y GnIH bajo estrés metabólico en 2

tiempos, 24 y 48 h con el fin de establecer una relación entre el estatus alimenticio y la regulación local de estos sistemas. Para este objetivo se utilizaron pollos de 4 semanas los cuales se mantuvieron únicamente con agua *ad-libitum*.

Fue posible amplificar los mensajeros del sistema ghrelina/GHS-R1a en los 3 grupos experimentales (Fig. 38). No existen diferencias significativas en ninguno de los 2 componentes del sistema (ligando-receptor) entre la condición control y 24h de ayuno. Sin embargo cuando el ayuno se prolonga a las 48 h si existen diferencias al comparar la expresión tanto de ghrelina como de GHS-R1a con respecto a los otros grupos experimentales, mostrando un marcado aumento del sistema en relación al estrés metabólico después de 48 horas sin alimento. Los resultados graficados en la Fig. 42B corresponden a la relación entre la densidad óptica de la señal dividida entre el control de carga GADPH.

Expresión de Ob-R durante el estrés metabólico en el testículo

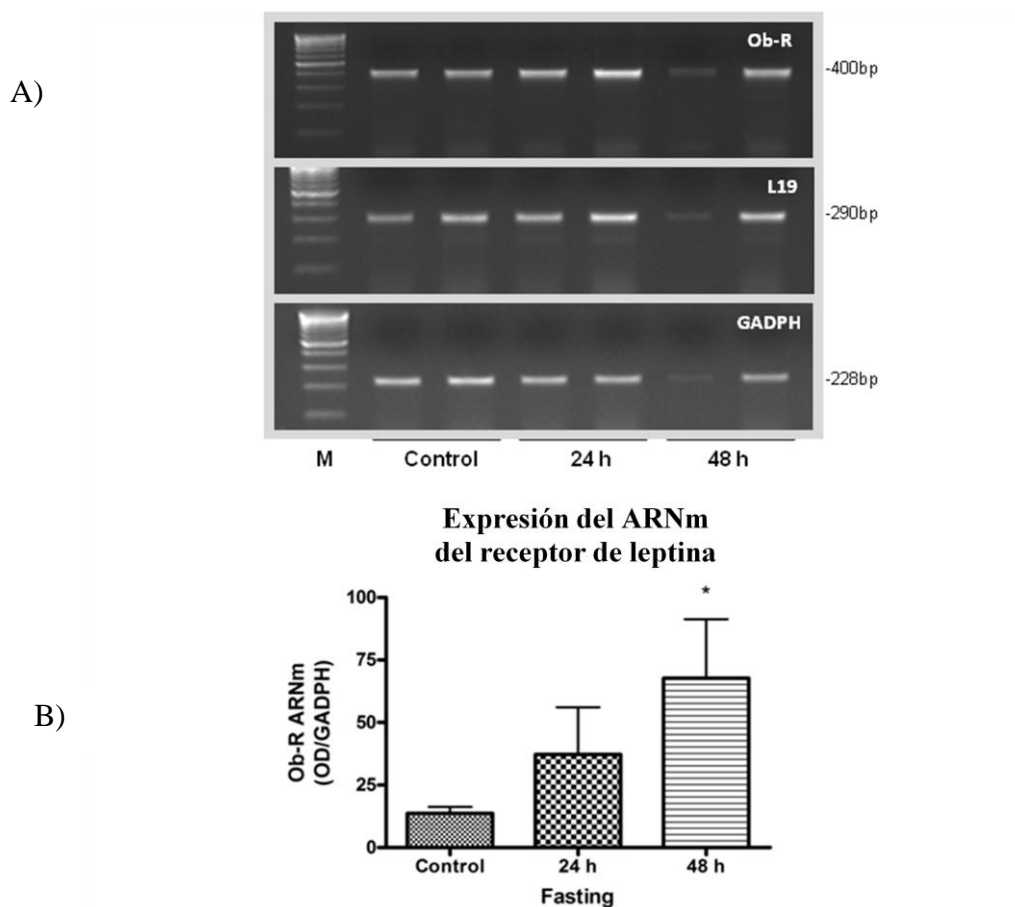


Figura 39. Expresión de Ob-R en testículo de pollo bajo estrés metabólico (*fasting*). A) se muestra un ensayo representativo de los niveles de ARNm de Ob-R por RT-PCR de muestras por duplicado en pollos de 4 semanas. Se utilizó GADPH y L19 ribosomal como controles de carga. Se utilizó un marcador de 100pb (M).

B) Se presentan los datos semi-cuantitativos de los niveles de expresión del ARNm en las edades previamente señaladas. Las barras representan la media \pm error de la densidad óptica de la señal entre GADPH estándar de 3 determinaciones para los grupos experimentales y 5 el grupo control. (*) Diferencia significativa ($P < 0.05$) al analizarse a través de ANOVA seguida de Tukey.

Existe una tendencia a aumentar la expresión del receptor a leptina bajo estrés metabólico agudo (24h) y crónico (48h). La mayor expresión de Ob-R se encontró a las 48 horas de privación de alimento donde se determinó un aumento de 3 veces con respecto al control (Fig. 39).

Expresión durante el estrés metabólico de GnIH

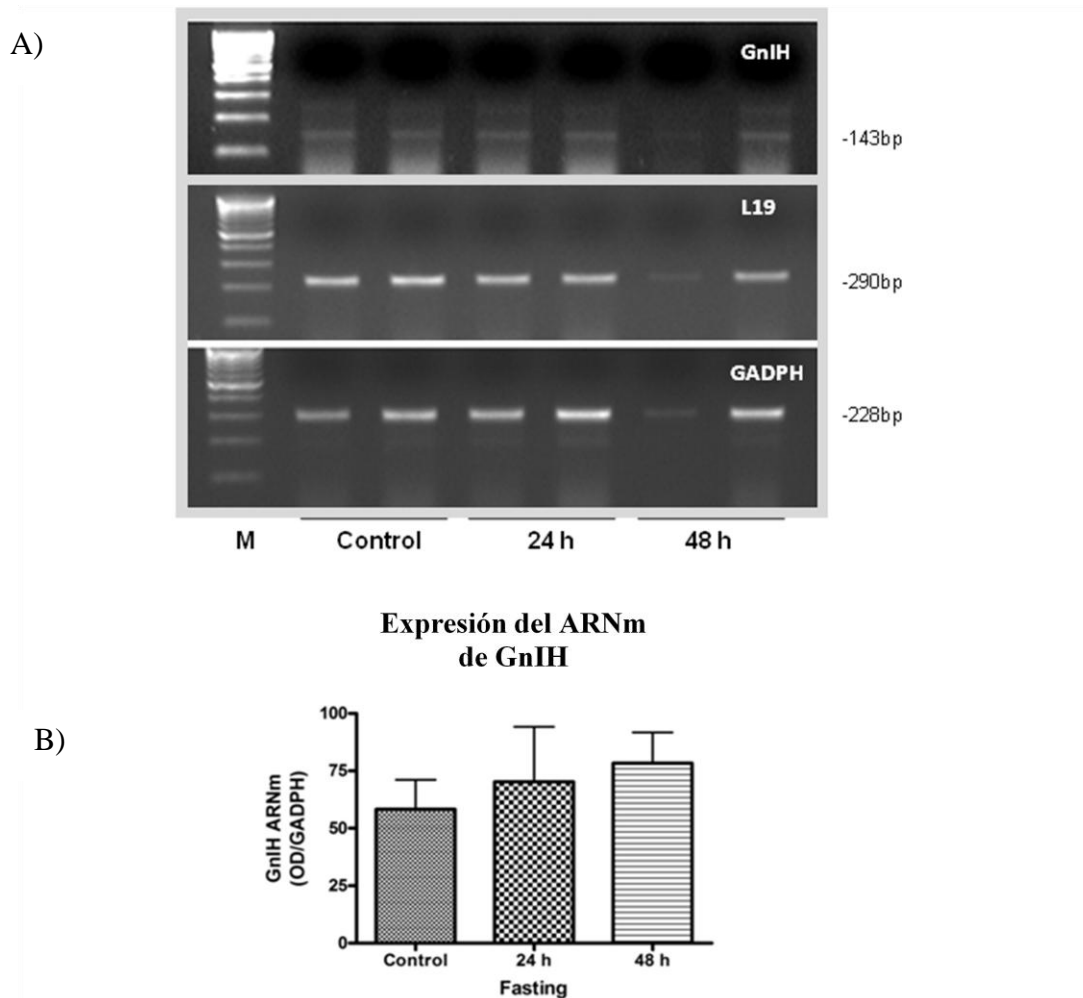


Figura 40. Expresión de GnIH en testículo de pollo bajo estrés metabólico (*fasting*). A) se muestra un ensayo representativo de los niveles de ARNm de GnIH por RT-PCR de muestras por duplicado en pollos de 4 semanas. Se utilizó GADPH y L19 ribosomal como control de carga. Se utilizó un marcador en escalera de 100pb (M). B) Se presentan los datos semi-cuantitativos de los niveles de expresión del ARNm en las edades previamente señaladas. Las barras representan la media \pm error de la densidad óptica de la señal entre GADPH estándar de 3 determinaciones para los grupos experimentales y 5 el grupo control.

Con respecto a la expresión del ARNm de GnIH tanto en el grupo control como en los dos tiempos de estrés metabólico (24 y 48 horas), el nivel de expresión se mantuvo constante lo que plantea que no existe un efecto del ayuno sobre este factor inhibidora (Fig. 40).

Ghrelina en testículo de pollo

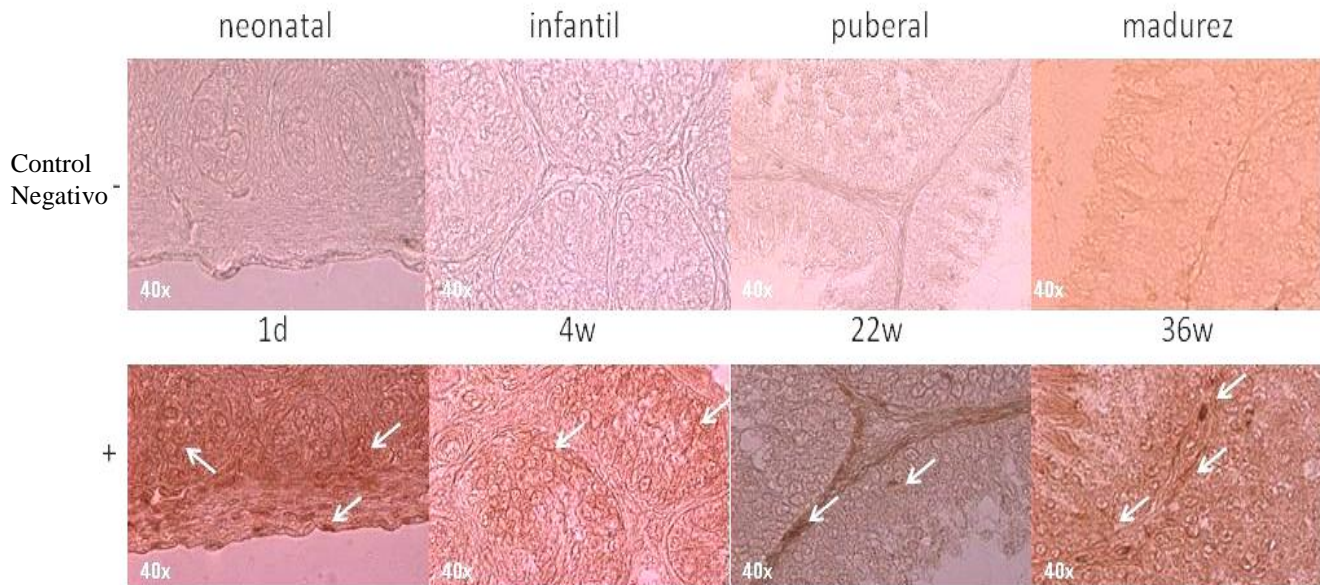


Figura 41. Inmunohistoquímica de testículo durante la ontogenia del pollo. Se muestran controles negativos sin primer anticuerpo (-) en la parte superior en 4 etapas: 1 día (1d) neonatal, 4 semanas (4w) infantil, 22 semanas (22w) puberal y 36 semanas (36w) madurez sexual. Las flechas indican células inmunoreactivas al anticuerpo contra ghrelina. Aumento 40x.

Se realizó la localización de inmunoreactividad a ghrelina a través de inmunohistoquímica en 4 edades representativas del pollo (Fig. 41). En la etapa neonatal del pollo de 1 día posteclosión encontramos una distribución de la marca para ghrelina con una distribución ubicua, tanto dentro de los túbulos seminíferos poco diferenciados como en las zonas extratubulares; en tanto a las 4 semanas de edad se observa una marca de ghrelina principalmente dentro de los túbulos seminíferos no maduros, es decir en la zona donde se encuentran tanto las células somáticas que darán origen a las células de Sertoli como los gonocitos precursores de las células germinales. En una edad representativa de la pubertad del pollo (22 semanas), los testículos presentan una marca positiva para ghrelina principalmente en las zonas intersticiales de los túbulos semíferos donde se han descrito

células mioideas y células de Leydig; dichos túbulos en esta edad ya presentan un epitelio germinal aparentemente funcional y solo algunas células muestran IR positiva. Por último la inmunoreactividad en los túbulos seminíferos de pollos sexualmente maduros de 36 semanas de edad se observó distribuida tanto en el epitelio germinal como en las zonas intersticiales y peritubulares. En todos los casos el control negativo sin anticuerpo primario resultó en la pérdida de la marca.

8. Discusión

En este trabajo describimos la localización de la inmunoreactividad para la GH y su receptor (GHR) en testículos de pollos sexualmente maduros. Se caracterizaron los diferentes tipos celulares que expresan GH y su co-localización con marcadores y también fue posible obtener evidencias sobre la distribución celular e intracelular de la GH y el GHR durante las 3 principales etapas de la espermatogénesis (espermatogonias, espermatocitos y espermátides) mediante microscopía electrónica y la marca se encontró tanto en el citoplasma como en el núcleo de estas células. Por otra parte, se demostró la participación de la GH en la proliferación celular del testículo de pollo. Finalmente se determinó en testículo la presencia de péptidos que intervienen en la regulación de la síntesis y secreción de GH hipofisaria; se determinó el patrón de expresión de ghrelina y su receptor (GHS-R1a), GnIH y del receptor de leptina (Ob-R) a lo largo de la ontogenia del pollo, así como la modificación en la expresión de estos péptidos ante un estrés metabólico.

Existen reportes sobre los efectos que tiene la GH en la espermatogénesis y esteroidogénesis (Hull y Harvey, 2000). Por otra parte se ha reportado que los receptores a GH están ampliamente distribuidos en el tejido testicular de peces (Ma et al., 2007; Davis et al., 2008), roedores (Lobie et al., 1990), cerdos (N'Diaye et al., 2002) y humanos (Berensztejn et al., 2008). Sin embargo se sabe que la GH circulante, no puede tener un acceso libre a las células testiculares debido a la presencia de la barrera hemato-testicular (Harvey, 2010). Es por eso que las acciones de la GH en las espermátides y espermatozoides (como la inducción de la motilidad espermática) podrían estar relacionadas a la producción local dentro del testículo (Champion et al., 2002; Roser, 2008). Esta posibilidad está apoyada por el hallazgo sobre la inmunoreactividad a la GH-N en los testículos humanos, aunque el ARN mensajero que se encuentra normalmente

expresado es el de GH-V (Untergasser et al., 1996, 1997; Berger et al., 1999). En el caso de los pollos se conoce que solo existe un gen de GH por lo que su expresión extra-hipofisaria se puede deber al mismo gen, ya que el análisis de su secuencia muestra una alta homología (>99%) tanto en testículo como en tejidos neurales (Harvey et al., 2004; Alba-Betancourt et al., 2010) con respecto a la secuencia hipofisaria. La expresión del ARNm de GH se ha determinado en el testículo de diferentes especies (humano, peces, pollos) y se ha observado un incremento en la expresión durante el desarrollo gonadal en caso de los peces (Harvey et al., 2004 2010; Sciara et al., 2006; Filby et al., 2007). En el pollo el ARNm de GH es también expresado en espermatogonias y espermátocitos primarios y no está presente en espermátocitos secundarios, espermátides y espermatozoides (Harvey et al., 2004). Eso sugiere que la transcripción de GH es específica de etapa y no ocurre en células haploides (Harvey, 2010).

Resultados previos sobre la cuantificación de GH mostraron que está presente en los testículos de pollos durante la ontogenia alcanzando valores máximos de su concentración local a las 35 semanas de edad. Por otra parte, la distribución de la inmunoreactividad en cortes de testículo de pollos pre-puberales (15 semanas) mostró que la marca es intensa en los túbulos seminíferos. Sin embargo no se encontró presente en el compartimento basal de las células de Sertoli, espermatogonias, espermátocitos primarios, pero es abundante en espermátocitos secundarios, espermátides y espermátides elongadas así como en células intersticiales (Leydig) y en miocitos circundantes (Luna et al., 2004). La inmunoreactividad a GH en el testículo de pollo está principalmente asociada (30-50%) con una variante submonomérica de 17-kDa y a proteínas de 32 y 45-kDa de peso molecular. La abundancia relativa de estas proteínas cambia durante la ontogenia, como se observó con las variantes de 14 y 40 kDa que disminuyen conforme a la edad en tanto que las de 17 y 45-kDa se incrementan (Luna et al., 2004). Este es el primer reporte que logró mostrar una heterogeneidad molecular de la GH dependiendo del tipo celular después de la separación de subpoblaciones testiculares en las cuales la presencia de la 17-kDa se mantuvo como la más abundante. Por otro lado, está ampliamente descrita la participación de la GH en la función testicular en mamíferos y humanos, durante el desarrollo como en la fisiología de la gónada madura (Hull y Harvey, 2000); sin embargo, en las aves no existen muchos hallazgos respecto a la participación de la GH en el funcionamiento testicular. Por primera

vez se determinó la localización del receptor de GH (GHR) por inmunohistoquímica en el testículo de pollos sexualmente maduros, ya que anteriormente solo se conocía la presencia de su ARNm (Harvey et al., 2004). Con estos resultados se puede sugerir que la GH tanto testicular como de aporte endócrino podrían llevar a cabo sus efectos mediado por la acción no solo endócrina dentro del compartimiento basal, es decir por fuera de la barrera-hemato testicular sino también autócrina y parácrina a través de estos receptor GHR una vez que las células germinales han cruzado la unión ocluyente formada por las células de Sertoli.

En todas las especies como en el pollo el principal aporte de hormona de crecimiento (GH) se lleva al cabo a través de la hipófisis una vez que se ha conectado el sistema de señales neuroendocrinas entre el hipotálamo y la hipófisis (Scanes et al., 1984). Sin embargo, la expresión extrahipofisiaria de esta hormona en diversos tejidos ha generado un aumento en la complejidad para el entendimiento de sus acciones y su regulación (Harvey, 2010). El testículo de las aves ha sido poco estudiado en comparación con otras especies de mayor relevancia pecuaria y clínica, lo cual dificulta la disposición de información respecto al complicado proceso de la espermatogénesis, aunado a esto la necesidad de la preservación cito-arquitectónica del túbulo seminífero para el estudio de su fisiología se reflejan en esta falta de información (Huleihel et al., 2007).

En el pollo sexualmente maduro se pueden identificar los diferentes tipos celulares del epitelio germinal a partir de sus características morfológicas y localización, además identificar la etapa de diferenciación en la que se encuentran (González-Morán y Soria-Castro, 2010). En las aves, al igual que en la mayoría de los mamíferos y a diferencia de los peces (Fishelson et al., 2007), existe un túbulo seminífero bien diferenciado con una membrana basal en contacto con las espermatogonias y un lumen en el centro a donde se desplazan las células diferenciadas en espermatozoides. Entre estas 2 etapas de diferenciación, las células germinales tienen cambios drásticos anatómicos y fisiológicos. En las aves se han descrito 4 etapas de diferenciación principales de la línea germinal, espermatogonias, espermatoцитos (primarios y secundarios), espermátides (redondas y alargadas) y espermatozoides (Thurston y Korn, 2000). Con la ayuda de histoquímica, inmunohistoquímica, inmunocitoquímica y microscopía (óptica, electrónica y confocal) en el presente trabajo fue posible identificar las diferentes etapas de diferenciación de la línea germinal del pollo. Una de las limitantes en la caracterización de las células testiculares de

pollo es la falta de marcadores moleculares específicos de etapa, ya que dada la diversidad de estrategias reproductivas los patrones de expresión y presencia de moléculas que permiten su identificación varía considerablemente en cada especie y durante las diferentes estaciones del año (Vigodner et al., 2001; Sekido y Lovell-Badge, 2006; Raucci y Di Fiore, 2007). A pesar de esto se realizó la caracterización de estadios de diferenciación y tipos celulares mediante la utilización de marcadores moleculares específicos como la inmunoreactividad contra los receptores C-kit (línea germinal) y LH-R (células de Leydig), el factor transcripcional Sox9 (células de Sertoli) y el antígeno nuclear de proliferación celular (PCNA) para la identificación de células en división.

El receptor C-kit se ha descrito como un marcador específico de espermatogonias en ratón (Manova et al. 1990; Sorrentino et al. 1991); en el caso del humano se ha asociado a estados inmaduros de espermatogonias con una alta expresión durante el proceso proliferativo y de renovación de espermatogonias aunque también se encontró una forma del ARN mensajero de C-kit truncada en espermátides redondas (Unni, et al., 2009).

Sin embargo en otras especies como en la rana (Raucci y Di Fiore, 2007) y el hámster (Vigodner et al., 2001) existen reportes en donde este receptor (C-kit) permanece presente durante toda la cascada de diferenciación de las células germinales. El ligando de este receptor es el stem cell factor (SCF) o factor steel, indispensable para la espermatogénesis ya que estudios han demostrado que el bloqueo de esta señal resulta en muerte por apoptosis de las espermatogonias. En este trabajo fue posible observar inmunoreactividad membranal, por medio de la cual se pudieron delimitar células en todo el epitelio germinal como espermatogonias, espermátocitos y espermátides, por lo cual, este marcador en el caso del pollo no es selectivo de un etapa particular de la espermatogénesis.

Las espermatogonias se renuevan a partir de su división en el compartimiento basal del túbulo seminífero, el cual está constituido en el espacio formado entre la parte basal de las células de Sertoli y la túnica propia. En este compartimiento las espermatogonias llevan a cabo mitosis para posteriormente ser seleccionadas e iniciar su diferenciación (de Rooij, 2001). El antígeno nuclear de proliferación celular se ha descrito como un cofactor de síntesis de ADN durante el proceso de replicación (Schlatt y Weinbauer, 1994; Chandra et al., 1997; Furuya et al., 2006). En este trabajo el anticuerpo contra PCNA marcó claramente a las células adyacentes a la membrana basal por lo que se utilizó como un marcador de

espermatogonias en el testículo de pollo sexualmente maduro; este hallazgo fué apoyado por evidencias previamente en las aves sobre su misma distribución (Thurston y Korn, 2000). En otras especies como en ratón Chandra y cols. (1997) encontraron marcaje positivo a PCNA en células que ya no proliferan, como son las espermátides elongadas; esta discrepancia puede deberse a las diferencias entre especie.

Las células de Sertoli son fundamentales para el desarrollo de la espermatogénesis y la dinámica de la barrera hemato-testicular (Petersen y Söder, 2006). Un marcador que ha sido utilizado para su identificación en reptiles, anfibios y mamíferos es el factor transcripcional vinculado al gen SRY o Sox9, cuya expresión está asociada a la determinación sexual de machos. También se ha reportado que se expresa y es esencial durante el desarrollo embrionario de la gónada de todos los vertebrados investigados hasta la actualidad (Koopman, 1999). Durante la vida postnatal y específicamente durante la madurez sexual éste factor transcripcional se expresa constitutivamente en el núcleo de células de Sertoli por lo que este factor ha sido aceptado como un marcador molecular específico de células de Sertoli. En este trabajo se pudo inmuno-localizar Sox9 eficientemente en el núcleo de éstas células en cortes de testículo de pollo adulto. En estudios de co-localización se encontró que la GH no co-localiza con Sox9 en el núcleo de este tipo celular (datos no mostrados). Por otra parte, en otras especies como en la trucha arcoíris (Gómez et al., 1998), la rata adulta (Lobie et al., 1990) y en carneros prepuberales donde se han señalado efectos directos de la GH sobre éstas células (Swanlund et al., 1995) si se ha reportada la presencia de los receptores a GH en células de Sertoli.

Las células de Leydig son las principales células esteroideogénicas del testículo y dicho proceso se encuentra regulado por las hormonas gonadotrópicas especialmente por la hormona luteinizante (LH) (Ascoli et al., 2002). Aunque este receptor (LHR) ha sido encontrado en diversos tipos celulares, es en las células de Leydig donde la expresión y función de este receptor está bien caracterizada. Estas células tienen una ubicación extratubular, particularmente en los intersticios de los túbulos seminíferos, lo que permite la exposición a la LH, que a través de la red de irrigación testicular llega al compartimento intersticial. También nosotros en este trabajo pudimos demostrar su localización con inmuno-histoquímica en la membrana de estas células en cortes de testículos de pollos sexualmente maduros. La participación del LHR en la producción de testosterona en esta

etapa de la vida reproductiva es fundamental, ya que el bloqueo de estos receptores repercute en una atrofia del epitelio germinal.

Una vez que se identificó y caracterizó la presencia de algunos marcadores moleculares en el epitelio germinal corroboramos la inmunoreactividad a GH a través de 3 diferentes anticuerpos (uno monoclonal y dos policlonales) en todas las etapas de diferenciación de la línea germinal, obteniéndose el dato novedoso de la presencia de GH en las espermatogonias de pollos sexualmente maduros. Este hallazgo abre la probabilidad de que esta hormona esté actuando como un modulador de la proliferación y diferenciación como en otros tejidos. Sin embargo, no existen datos sobre la funcionalidad de la hormona en este tipo celular como ya se ha determinado en los peces y las ratas adultas, donde se conocen acciones de la GH sobre la proliferación de espermatogonias (Loir, 1999; Matsushima, 1986). En resultados previos no observamos a la GH-IR en las espermatogonias de pollos pre-púberes (Luna et al., 2004). Sin embargo ahora si se encontró IR en espermatogonias de animales adultos permiten proponer que estas células expresen diferencialmente a la GH dependiendo de la edad o bien que dicha producción sea muy baja y que quede fuera de los límites de detección con los métodos implementados para dicho estudio. Interesantemente y en paralelo con este trabajo, se reportó la presencia de ARNm de GH en las espermatogonias de testículo de pollos adultos (Harvey et al., 2004); estos datos correlacionan positivamente con la distribución de la GH-IR mostrada en este trabajo.

Nuestros resultados sobre la GH-IR también correlacionan con la distribución de la GH en los otros estadios de las células germinales como son espermatocitos, espermátides alargadas y redondas presentes en testículos tanto pre-púberes como adultos. En estas células, especialmente en espermatocitos, la inmunoreactividad se conserva con el patrón de tinción en forma de casquete estrechamente cercano al núcleo previamente observado en pollos de 15 semanas (Luna et al., 2004).

El receptor de GH se encuentra presente en la mayoría de los tejidos a lo largo del desarrollo hasta la etapa adulta y el tejido que presenta la mayor proporción de estos receptores es el hígado. En el caso del aparato reproductor de pollo macho el GHR se localizó de manera similar que la reportada para el caso de la rata, donde tanto el receptor y su proteína transportadora (GHR/GHBP) fueron observados en el núcleo y citoplasma del

epitelio de vasos deferentes, epidídimo, células de Leydig y células de túbulos seminíferos (espermatogonias, espermátocitos primarios, secundarios, y espermátides) donde la máxima intensidad en la IR estuvo presente en las células de Leydig (Lobie et al., 1990). En el caso de la distribución testicular del receptor en el pollo se encontró mayoritariamente en el epitelio germinal, en miocitos peritubulares y en las células de Leydig y además co-localizando con la GH. Estos datos coinciden con estudios previos hechos en rata y en líneas celulares donde reportaron la co-localización del receptor y la GH ubicados en el aparato de Golgi y retículo endoplásmico, lo que sugiere una interacción GH/GHR intrácrina que permitiría explicar parcialmente la distribución en forma de casquete o cap perinucleares de la inmunoreactividad observada en los espermátocitos (Luna et al., 2004; van den Eijnden y Strous., 2007).

En conjunto los resultados anteriores sobre la expresión y distribución diferencial de la hormona de crecimiento así como su co-localización con el receptor en las células germinales e intersticiales en testículos de pollos sexualmente maduras nos permiten plantear un efecto autocrino y/o parácrino de esta hormona.

Además de la distribución de la GH y su receptor en cortes de testículo, se analizó su distribución intracelular en las diferentes etapas de diferenciación de la línea germinal mediante microscopía electrónica de transmisión. Los resultados mostraron la localización no sólo a nivel del citoplasma sino también se pudo observar una distribución nuclear de la GH y su receptor en espermatogonias, espermátocitos y espermátides. La presencia de GH y GHR en el núcleo y citoplasma incorpora la probabilidad de que estén en tráfico o biotransformación intracelular. Este planteamiento se tiene que explorar ya que los datos obtenidos hasta la fecha no permiten definirlo. Entre los mecanismos que se han propuesto en otros tipos celulares están que la GH y su receptor se perfilan hacia la vía lisosomal de degradación (Roupas y Herington 1989) o bien hacia su translocación nuclear por medio de la interacción con importinas α/β (Johnson et al., 2004). Se conoce que la unión de la GH al receptor induce la endocitosis, transducción de señal y/o degradación del receptor para lo cual se requiere la unión específica de la ligasa β TrCP y un sistema activo de nedilación (van Kerkhof et al., 2007), además de la translocación hacia la degradación vía lisosomal. Con respecto a la translocación al núcleo está parcialmente apoyada en evidencias sobre la existencia de este complejo de proteínas (las importinas) en el testículo. Sin embargo, aún

no existen datos que relacionen a estas familias de transportadores nucleocitoplasmático y la acumulación de GH y su receptor en el núcleo de las células de la línea germinal como se ha reportado para otras líneas celulares derivadas de humano y en ratas donde el complejo GH/GHR es capaz de viajar al núcleo y se ha vinculado la interacción directa con las importinas (Conway- Campbell et al., 2007, Major et al., 2011). Las importinas se encuentran presentes en las células testiculares de diferentes especies; tienen un alto grado de conservación, ya que se ha reportado durante la espermatogénesis de vertebrados inferiores (Mason D.A., et al., 2002) así como en mamíferos (Hogart y col., 2005). Está claro que las importinas ayudan a migrar macromoléculas del citoplasma al núcleo durante todos los estadios de diferenciación y renovación de la línea germinal en rata y humano (Major et al., 2011). Si bien la acumulación del GHR en el núcleo de diferentes células se ha relacionado con el desarrollo de procesos oncogénicos y tumorigénicos (Lincoln et al., 1998), también se ha detectado su presencia en procesos no patológicos de renovación celular como en tejidos en crecimiento (cartílago) o regeneración (hígado). A pesar de estos, estudios recientes han dado importancia a la producción local de GH en células no hipofisarias y se han generado datos relativos al potencial oncogénico de la GH local, pero casi ninguno sobre procesos durante la fisiología normal. Mediante el modelo de células murinas neoplásicas pro-B (BaF/3) las cuales se transfectaron con la fusión del GHR y un péptido señal de localización nuclear (NLS) se encontró que estas células son capaces de proliferar independientemente de la adición de GH exógena, por lo cual se asume que dicha proliferación fue dependiente de la GH producida localmente por estas células, es decir la GH autócrina. Además en estas mismas células se observó que mediante el silenciamiento del ARNm de GH y el uso de un antagonista de GH (G120R) se indujo un decremento en la proliferación (Brooks et al., 2008).

Este es el primer reporte que muestra la presencia de GH y GHR nuclear en espermatogonias, espermatocitos y espermátides en el pollo. Por lo tanto, tampoco se han descrito los mecanismos involucrados con esta localización de la hormona y su receptor. Debido a que se observó inmunoreactividad a la GH y su receptor en diferentes estratos de la túnica propia (lamina basal, células mioideas y matriz extracelular), se ha propuesto que la hormona circulante (aporte hipofisario) sea translocada mediante la unión con su receptor hacia el compartimiento basal. Por lo tanto con estas evidencias es factible proponer que la

presencia del GHR en las células mioideas circundantes y membrana basal forman parte de procesos de pinocitosis y endocitosis para péptidos provenientes de la circulación como propone Dym et al., 1994 en la rata.

Hallazgos anteriores sobre la distribución y concentración de GH en el testículo completo, en donde se mostró un patrón de heterogeneidad molecular de esta hormona diferente al que se expresa en la hipófisis (Luna et al 2004), permitieron proponer la estrategia de separar las diversas subpoblaciones de las células testiculares (células germinales, células de Leydig y Sertoli) con el objeto de definir la posible distribución diferencial de las isoformas de GH dependiendo del tipo celular y la etapa de diferenciación. El fraccionamiento celular por centrifugación en un gradiente lineal continuo de iodixanol (Ford, 1994) tiene la cualidad de ser no-iónico e iso-osmótico, con baja toxicidad, en comparación con metrizamida (Georgiou et al., 1987); por lo tanto se logró la separación de subpoblaciones celulares. El intervalo del gradiente de densidad seleccionado permitió la separación de 3 subpoblaciones parcialmente enriquecidas de los diversos tipos celulares: como espermatocitos en la fracción B1, espermátides y espermatogonias en la B2, y una mezcla de espermátides y células de Leydig en B3.

Como se mencionó antes, debido a que no existen marcadores específicos de etapa para los diferentes estadios de diferenciación de la línea germinal de pollo, así como las limitaciones metodológicas, la caracterización de las células se llevó a cabo a través de su morfología y se complementó con el uso de algunos marcadores moleculares para células no germinales. En la primera banda de células (B1) se obtuvo una población de células de tamaño y forma similar identificadas como espermatocitos (>95 %). Para identificar espermatogonias se utilizó como marcador celular al antígeno nuclear de proliferación celular (PCNA), que previamente se utilizó en cortes de testículo. Por medio de SDS-PAGE/Western blot se localizó al PCNA principalmente en la fracción B2, la cual presentó un 55.29% de células con morfología de espermatogonias. La señal del PCNA se presentó en las otras fracciones con menor intensidad (20 veces menos), lo cual sugiere que otras células no germinales pudieran estar en división en el momento del análisis y/o que existen espermatogonias con densidad diferente a la presente en la B2 como se muestra en el cuadro 2.

Para la identificación de las células de Sertoli en subpoblaciones separadas con el gradiente de densidad se determinó la presencia del factor transcripcional Sox9 (Koopman et al., 1999; Oreal et al., 1998), el cual se expresa específicamente en el núcleo de estas células. Se encontró inmunoreactividad a Sox9 en las 3 subpoblaciones, con mayor intensidad de la señal en la fracción B2, lo cual correlaciona con la mayor proporción de células de Sertoli evaluadas con base a su morfología en esta fracción (9.62 %), aunque cabe mencionar que en general la proporción de estas células con respecto a las otras poblaciones es mucho menor.

Por este mismo método se identificó al receptor de LH, el cual se utilizó como marcador de células de Leydig y se determinó un 56.46 % en la fracción B3 que fue la de mayor densidad (1.087g/ml). Estos resultados coincidieron en parte con reportes previos donde utilizando gradientes de metrizamida y/o Percoll pudieron separar dos subpoblaciones de células de Leydig: para el gradiente de metrizamida con una densidad igual y otra mayor (1.070-1.100 y 1.113-1.143 g/ml) en tanto que para el gradiente de Percoll fue menor e igual a 1.033-1.065 y 1.074-1.097 g/ml, pero en ambos gradientes la mayor proporción de células de Leydig se encontró en las poblaciones de alta densidad como fue el caso de Georgiou et al., 1987 y en este trabajo. Sin embargo, existe la posibilidad de que haya otra pequeña población de células de Leydig inmaduras que no presenten el LHR en cantidades detectables con nuestra metodología o bien que en el caso del pollo solo exista una sola subpoblación de células de Leydig.

Se determinó el patrón de las variantes moleculares de GH presentes en estas subpoblaciones y se observaron diferencias en la proporción, lo cual podría relacionarlas a posibles funciones diferentes que requieren ser determinadas. Esto con base en los resultados obtenidos para la fracción B1 (95.6 % espermatozoides) en donde se identificaron 2 variantes moleculares de GH (29 kDa y 17 kDa) con mayor abundancia. La isoforma de 29 kDa fue la más abundante en B1, la cual podría corresponder por su tamaño molecular aparente a la variante glicosilada (G-cGH) que previamente se ha reportado en la hipófisis y plasma de pollo (Berghman et al., 1988; Arámburo et al., 1991, 2000; Berúmen et al., 2004). Además se conoce que la glicosilación incrementa la vida media de la hormona en el plasma y es capaz de modificar su bio-actividad como se probó en un ensayo de proliferación en células NB2 (Berúmen et al., 2004). Los resultados podrían indicar una

correlación entre la presencia de la GH de 29 kDa y la etapa de espermatocitos, sugiriendo la probabilidad de una glicosilación postraducciona específica de esta etapa de la espermatogénesis. Con respecto a la variante de 17 kDa se encontró en mayor proporción a la de 29 kDa.

En contraste con la B1, en las subpoblaciones B2 y B3 se encontró en mayor proporción al monómero de 26 kDa y al fragmento de 17 kDa de GH. Esto está en concordancia con resultados previos sobre la expresión de GH en tejidos del aparato reproductor de machos y hembras (Harvey et al., 2004; Hrabia et al., 2009) donde específicamente en testículos de pollos (Harvey et al., 2004, Luna et al., 2004) se detectaron diferentes variantes de GH (14, 17, 23, 26, 29, 32, 40, 45, 52kDa) entre las cuales la variante de 17 kDa de GH presentó la mayor abundancia (Luna et al., 2004). Aunque la mayoría de la inmunoreactividad a GH en la hipófisis está asociada con el monómero de 26 kDa (bajo condiciones reductoras), en el caso del tracto reproductivo de macho y otros tejidos extrahipofisarios se describió a la variante submonomérica de 17 kDa como la isoforma mayoritaria (Luna et al., 2004, 2005).

La proporción relativa de la variante de 17 kDa de GH en la subpoblación B1 fue significativamente menor al compararla con la B2 y B3; sin embargo es importante aclarar que esta isoforma es la variante más abundante en todas las subpoblaciones (42.3 ± 1.8 , 53.8 ± 2.4 y 51.7 ± 1.3 % del total de la GH-IR en cada población, B1, B2 y B3, respectivamente). El origen y función del fragmento de 17 kDa en el testículo aún no se ha determinado. Sin embargo, con base en evidencias obtenidas en otras especies y tejidos se pueden plantear al menos 2 opciones con respecto al origen de esta variante de GH en el testículo, una es a nivel de la transcripción por corte y empalme alternativo del RNA, como se ha observado en la retina del pollo, y la otra a nivel postraducciona mediante un procesamiento proteolítico como en el caso de la prolactina donde es mediado por la expresión de metaloproteasas (Lewis et al., 2000; Takeuchi et al., 2001; Baudet et al., 2007). En células hipofisarias de rata transfectadas con el receptor para GHRH, se reportaron mutaciones en el sitio de empalme del exón 3 del gen de GH, lo que disminuye la tasa transcripcional de la GH 22 kDa e incrementa la transcripción de una isoforma de menor peso molecular 17.5 kDa (Petkovic et al., 2010). En la retina y corazón de embriones de pollo de 7 días se reportó la presencia de un ARNm pequeño de GH (426pb) publicado

por Takeuchi et al. (2001), y la expresión de una proteína de 16kDa correspondiente a la variante previamente propuesta por Baudet et al., (2007).

Estudios recientes han incrementado las evidencias sobre el contenido de variantes de menor peso molecular de la GH previamente detectadas en el humano (Lewis et al., 1980), como es el caso de los estudios en rata (Petkovic et al., 2010; Such-SanMartín et al., 2009) y en pollos (Arámburo et al., 2001), en los cuales se ha propuesto que estas variantes moleculares se generan principalmente por modificaciones postraduccionales a lo largo de su tráfico intracelular hacia las vías de la degradación lisosomal o del proteosoma y/o por procesamiento proteolítico limitado por enzimas endógenas que producen fragmentos de GH de 7, 15, 16, 17.5 kDa (Such-SanMartín et al., 2009, Petkovic et al., 2010). Dicha propuesta se apoya en estudios previos *in vitro* que han probado que la proteólisis enzimática controlada de GH de pollo, usando por ejemplo trombina, tripsina, proteasa V8, o colagenasa (Arámburo et al., 2001), así como la pepsina, la tripsina, la proteasa V, la proteinasa K y la termolisina en la GH humana (Such-SanMartín et al., 2009), son capaces de generar fragmentos de 15 kDa para GH de pollo, y otro de 5 y 17 kDa para GH humana, respectivamente. Otros reportes describen la biotransformación de GH a formas submonoméricas por las proteínas morfogénicas de hueso en la matriz extracelular endotelial; estas metaloproteasas BMP1-like procesan a la PRL y GH tanto *in vitro* como *in vivo*, para producir fragmentos N-terminal de 17 kDa con actividad anti-angiogénica (Ge et al., 2007; Clapp et al., 1993). En el caso del testículo aún no se ha encontrado ningún transcrito pequeño del ARNm de GH (Harvey et al., 2004), por lo cual se sugiere que la forma 17 kDa presente en todas las subpoblaciones puede ser originada postraduccionalmente.

Con respecto a la función de estas isoformas de GH en la diferenciación de los gametos aún no se conoce nada; sin embargo los cambios en los patrones de variantes sugieren acciones específicas aunadas a la presencia del receptor que plantean efectos autocrinos o parácrinos.

La GH hipofisiaria juega un papel importante en la diferenciación y desarrollo del tracto reproductor y testículos, determinado en casos de deficiencia de esta hormona (v.g. por hipofisectomía), donde se ha mostrado un efecto marcado en el crecimiento somático y un retraso para alcanzar la madurez sexual (Hull y Harvey, 2000). También se ha

establecido que la GH regula la esteroidogénesis, la gametogénesis y la diferenciación gonadal, así como la secreción de gonadotropinas (Zachmann et al., 1990). En la reproducción la GH ejerce sus acciones a través de la modulación de la esteroidogénesis en las células de Leydig, ya que se ha mostrado la expresión del ARNm del receptor de GH (GHR), tanto en células de Leydig de rata maduras como inmaduras (Kanzaki y Morris, 1999). En adición, se sabe que la GH es capaz de modular la producción de andrógenos por medio de la modificación de la expresión StAR y 3 β -HSD, ambas enzimas esteroidogénicas (Kanzaki y Morris, 1999). Por lo tanto, la GH tiene acciones capaces de modular la esteroidogénesis, y también de manera directa puede modificar la motilidad espermática en especies de mamíferos como el toro, el cerdo y el humano (Lechinak et al., 1999); mientras que en peces puede mejorar la proliferación *in vitro* de espermatogonias (Lior et al., 1999). Estos efectos directos de la GH están parcialmente apoyados por la presencia de inmunoreactividad al GHR en células de Sertoli, de Leydig así como en espermatogonias, espermatocitos y espermátides de rata (Lobie et al., 1990). Aunado a estas evidencias y a los resultados que hemos obtenido en el pollo sobre la expresión de los genes de GH y GHR en testículo adulto (Harvey et al., 2004), la presencia de la GH-IR y su receptor en células del epitelio germinal y en células intersticiales (Luna et al., 2004), y ahora con la distribución de esta proteína y su receptor a nivel nuclear es posible sugerir acciones intrácrinas, autócrinas y parácrinas durante la diferenciación, desarrollo y etapa de madurez sexual en las diferentes subpoblaciones testiculares además de las endocrinas previamente establecidas de la hormona de origen hipofisiario.

Se evaluó el efecto de la GHRH sobre la proliferación de células testiculares cultivadas por 24 hr a través de la detección del antígeno nuclear de proliferación celular (PCNA) por SDS-PAGE/Western blot. Este factor se vincula con la replicación del ADN y en testículo de rata marca principalmente espermatogonias indiferenciadas (Gerdes et al., 1983); este marcador ha sido utilizado para evaluar en cultivos de células testiculares de pollo el fenómeno proliferativo bajo estimulación de FSH y testosterona (Mi et al., 2004). Los resultados permitieron determinar que el tratamiento con GHRH puede inducir división celular en un lapso de 24 h en mayor proporción a 10nM sin embargo también los tratamientos a menores dosis lograron inducir un aumento en la inmunoreactividad a PCNA aunque no fueron significativamente diferentes. Estos datos sin embargo no permiten

definir si el efecto es directo o mediado a través de la inducción de la liberación de GH testicular. Existen reportes sobre la localización del receptor de GHRH en los diferentes tipos celulares de testículo de rata, y se sabe que el GHRH participa en la modulación del sistema SFC/C-kit entre las células de Sertoli y espermatogonias. También se tiene conocimiento de que este factor liberador participa en la modulación de la producción de testosterona en las células de Leydig (Cimpiani et al., 1992; Srivastava et al., 1994; Fabbi et al., 1995). Con estas evidencias se puede sugerir que existen efectos directos de GHRH sobre la función testicular, tanto en la diferenciación como en la esteroidogénesis.

En estudios previos se logró determinar que la GHRH tiene efecto sobre la liberación de GH en cultivo primario de células testiculares (*artículo en preparación*) por lo que es posible sugerir que esta GH liberada sea el transductor de señales del efecto proliferativo de GHRH. Por otra parte otro factor que puede estar regulando este efecto en el siguiente nivel es el IGF-1, el cual está participando cascada río abajo en este sistema de señales testiculares a través de sus efectos autócrinos y/o parácrinos, por lo que queda una ventana abierta a la investigación respecto a la funcionalidad de los componentes del micro-eje testicular formado por GHRH-GH-IGF-1.

Para corroborar si la GH participa directamente en la proliferación en cultivos primarios de células testiculares fueron estimulados con diferentes concentraciones de GH recombinante de pollo. Se analizó la proliferación en estos cultivos por medio de la incorporación de timidina tritiada (H^3). De manera paralela mediante el ensayo de MTT se determinó el efecto de la GH en el metabolismo celular.

La GH fue efectiva a diferentes dosis; en el caso del ensayo de MTT donde 1nM de GH indujo un mayor el número de células (metabólicamente activas) mientras que con el ensayo de la incorporación de timidina tritiada (H^3) la mayor incorporación se observó con la dosis de 10 nM de GH. Aparentemente a bajas concentraciones existe un efecto metabólico pero al aumentarse la concentración de GH se puede logra inducir un efecto proliferativo.

Por otra parte aún queda por determinar si el efecto de GH sobre la proliferación de células testiculares de pollos en cultivo primario es mediado por el IGF-1, que se produce de manera local, y puede ser regulado por la GH. Se conoce que dentro del microambiente del epitelio germinal en el testículo existe una alta capacidad proliferativa de las

espermatogonias (De Rooij, D.G. *et al.* 2001), aunque no son las únicas células que tienen capacidad de renovación, entre ellas también pueden dividirse las células de Leydig y se ha demostrado que la GH potencia su maduración (Kanzaki y Morris, 1999).

En mamíferos el número de células de Sertoli permanece constante después de la diferenciación gonadal (Orth *et al.*, 1988). Por lo anterior este tipo celular no estaría dividiéndose, a diferencia de las células de la línea germinal en su etapa de espermatogonias que son las que principalmente están proliferando. Existen evidencias directas del efecto de GH e IGF-1 sobre la proliferación de espermatogonias en trucha arcoíris, en donde se reportó un efecto máximo con concentraciones entre 0.25-6 nM de GH (Lior, M. *et al.* 1999), lo que coincide con los datos obtenidos en este trabajo donde 1-10 nM inducen este efecto en células testiculares de pollo.

Como se mencionó en la introducción existen múltiples señales hormonales periféricas vinculadas a la regulación de la síntesis y liberación de GH en la hipófisis las cuales regulan la función reproductora en machos (De Vriese *et al.*, 2007; García *et al.*, 2007).

Ghrelin y leptina son hormonas relacionadas a la regulación de la ingesta y del metabolismo; ambas señales tienen un efecto sobre el sistema nervioso central principalmente a través del hipotálamo; además de este efecto central, estos péptidos tienen efectos periféricos en tejidos como los testículos (Barreiro y Tena-Sempere, 2004; Tena-Sempere, 2005). Inicialmente se describió que la principal fuente de aporte de ghrelin es el estómago (Van Der Lely, *et al.* 2004; Ahmed y Harvey *et al.*, 2002), en tanto que la leptina es una hormona con origen en el tejido adiposo pero ahora se conoce que estas hormonas se producen en diferentes tejidos como el testículo de rata (Tena-Sempere *et al.*, 2002).

En el testículo de aves la presencia del sistema ghrelin y su receptor GHS-R1a no habían sido descritos; sin embargo, en este trabajo se determinó la presencia del RNAm de estos y su incrementó durante la edad de mayor crecimiento somático del pollo (4 semanas). Este aumento coincide con los mayores niveles de GH circulante y con el incremento de la concentración gonadal de GH observado después de la eclosión (Luna *et al.*, 2004). En edades más avanzadas este sistema (ghrelin/GHS-R) baja su nivel de expresión aunque la expresión de GH aumenta principalmente en edad reproductora.

Por otra parte utilizando un modelo de ayuno (*fasting*) de 24 y 48h se estudió la expresión del sistema (ghrelina/GHS-R) y fue posible observar que con una restricción alimenticia de 48 h se incrementaron significativamente los niveles de expresión gonadal de estos. Estudios previos han propuesto que la ghrelina inhibe la esteroidogénesis en los testículos de rata (Tena-Sempere et al., 2002). Es posible que los resultados obtenidos expliquen parcialmente la existencia de un mecanismo de inhibición de la función gonadal ante un estrés metabólico. Resultados sobre la distribución de la ghrelina en el testículo mostraron que en etapas iniciales del desarrollo gonadal la inmunoreactividad se observó principalmente dentro de los túbulos seminíferos, en tanto durante la pubertad la marca se localizó en las zonas peri-tubulares y durante la etapa de madurez sexual ésta fue ampliamente distribuida dentro del tejido gonadal. Al parecer existe una dinámica en la localización de éste péptido lo que sugiere que participa de manera diferencial durante el desarrollo gonadal y la madurez sexual. En apoyo a estos hallazgos el grupo de Sirtokin (2006) encontró la presencia de este sistema (ghrelina/GHS-R1a) en folículos ováricos de gallinas y propone que ghrelina funcione como modulador de la proliferación, la producción de hormonas y la apoptosis en el ovario.

Así mismo el gen de leptina no ha sido descrito para el pollo y existe controversia respecto a la producción de esta hormona, ya que se ha demostrado el efecto clásico de leptina a través de suministrar leptina de rata y humano; sin embargo los análisis bioinformáticos han dado evidencia de una posible pérdida del gen durante la evolución (Pitel et al., 2010). Se tiene también datos respecto a la existencia del receptor (Ob-R) en pollo a través de la unión de leptina marcada (McMurtry et al., 2004) y de su clonación (Horev et al. 2000; Ohkubo et al. 2000); sin embargo las implicaciones fisiológicas de la presencia del receptor a leptina no han sido dilucidadas.

En este trabajo los datos sobre el ARNm del receptor de leptina en testículo de pollo mostraron un incremento de 5 veces en su expresión durante la pubertad y aparentemente se mantiene durante la madurez sexual. La expresión de este receptor testicular presenta una tendencia a aumentar cuando se somete a privación de alimento durante 24 y 48 h en pollos de 4 semanas de edad por lo que aparentemente el estrés inducido por la privación de alimento tanto aguda como crónica es un factor importante en la regulación de esta señal en el tejido testicular. Sin embargo la relevancia funcional aún no se ha determinado.

La hormona inhibidora de las gonadotropinas o GnIH es una hormona hipotalámica recientemente descubierta en aves capaz de inhibir la producción y liberación de gonadotropinas hipofisarias (Tsutsui et al., 2007). En el testículo de codorniz y de gorrión se localizó a la GnIH y Bentley et al., (2008) ha propuesto que participa en la modulación de la producción de enzimas esteroideogénicas y en la maduración de las células de la línea germinal. En esta tesis obtuvimos evidencias de la expresión de GnIH en el testículo de pollo de diferentes edades y se logró determinar que la máxima expresión fue a las 22 semanas (pubertad), y presenta valores menores tanto en su fase de crecimiento somático como durante su madurez sexual. Es probable que la GnIH a nivel testicular esté correlacionada con la activación del eje hipotálamo-hipófisis-gónadas y localmente funcione como un modulador de autócrino/parácrino de la función reproductora cuya expresión aparentemente no se ve alterada ante la privación de alimento.

Aparentemente el estrés metabólico inducido por restricción alimenticia tiene un efecto principalmente sobre ghrelina/GHS-R1a y sobre el receptor a leptina (Ob-R), en respuesta al cambio de los niveles circulantes de glucosa e insulina principalmente, en tanto que GnIH aparentemente parece no verse afectada por el estrés metabólico. Sin embargo se requieren realizar estudios complementarios que definan los mecanismos que están regulando a estos factores como son aquellos que se modifican en condiciones de estrés como glucocorticoides, insulina y glucosa.

9. Conclusión

Durante el desarrollo de esta tesis los resultados más relevantes fueron con respecto a la localización de GH y su receptor (GHR) en las diferentes etapas de diferenciación de la línea germinal en pollos sexualmente maduros. Por primera vez se determinó la localización además de citoplasmática también nuclear de GH/GHR en las células germinales, lo que nos permite proponer un efecto intracrino, autócrino y/o parácrino además del endócrino en el tejido testicular.

Además con base en los resultados sobre el efecto de la GH en la inducción de la proliferación en cultivos primarios de células testiculares así como con la colocalización de esta hormona con el marcador PCNA en estas células se sugiere que está participando en el

proceso de proliferación de las espermatogonias y la modulación de este proceso en los demás tipos celulares de la línea germinal.

Por otro lado, fue posible determinar la presencia de ghrelina/GHS-R1a, el receptor a leptina y el GnIH durante la ontogenia del pollo y el efecto del estrés metabólico sobre la expresión de estos factores.

Conclusiones Particulares:

- La GH y su receptor colocalizaron en las células germinales durante todas sus etapas de diferenciación. También fue posible observar su distribución en zonas peritubulares e intersticiales en cortes histológicos de tejido testicular.
- Tanto GH como su receptor están localizados citoplasmática y nuclearmente en las 3 principales etapas de diferenciación de la línea germinal.
- GH y PCNA co-localizaron en espermatogonias en proliferación presentes en cortes de testículo de pollos adultos.
- Concentraciones de 1 a 100 nM de GHRH estimulan la proliferación de células testiculares en cultivo primario.
- Las células testiculares en cultivo primario aumentan su tasa de proliferación cuando se estimulan con GH recombinante de pollo a una concentración 10 nM.
- Existe una expresión diferencial de ghrelina y su receptor (GHS-R1a) en etapas de maduración del testículo de pollo, observándose una mayor expresión a las 4 semanas de edad.
- La expresión gonadal del receptor a leptina en testículo de pollo se encontró durante en etapa neonatal, infantil, puberal y de madurez sexual, siendo su mayor nivel de expresión durante la pubertad donde aumentó significativamente (7 veces) en comparación con su etapa previa
- El GnIH se expresa a lo largo del desarrollo posnatal en el testículo de pollo mostrando un incremento en la etapa puberal.
- El estrés metabólico inducido por restricción de alimento indujo un aumento en la expresión de ghrelina/GHR-1a y también en el receptor de leptina, pero no así en el caso del gen de GnIH.

Con base en todas las evidencias encontradas en este trabajo respecto a la localización del sistema GH/GHR en el testículo de pollo y su implicación en la regulación de la proliferación en células testiculares así como la presencia local de factores reguladores los cuales cambian durante las diferentes etapas de la ontogenia de la gónada de pollo, es posible sugerir acciones intrácrinas, autócrinas y parácrinas de la GH a nivel local. En adición la expresión de factores vinculados a la regulación de la síntesis y secreción de la GH se modifican ante un estrés metabólico lo que puede incidir en la modulación de la fisiología reproductiva.

Si bien, falta mucho por investigar en este campo, los resultados mostrados en este trabajo son un avance en el entendimiento de los mecanismos moleculares locales del testículo de pollo implicados en la regulación de la espermatogénesis.

10. Bibliografía

1. **Agellon LB, Davies SL, Lin CM, Chen TT, Powers DA** 1988 Rainbow trout has two genes for growth hormone. *Mol Reprod Dev* 1:11-17
2. **Ahene CA, Lea RW, Harvey S** 1991 Thyrotrophin-releasing hormone-induced growth hormone (GH) secretion in anaesthetized chickens: inhibition by GH-releasing factor at central sites. *J Endocrinol* 128:13-19
3. **Ahmed CM, Johnson HM** 2006 IFN-gamma and its receptor subunit IFNGR1 are recruited to the IFN-gamma-activated sequence element at the promoter site of IFN-gamma-activated genes: evidence of transactivational activity in IFNGR1. *J Immunol* 177:315-321
4. **Ahmed S, Harvey S** 2002 Ghrelin: a hypothalamic GH-releasing factor in domestic fowl (*Gallus domesticus*). *J Endocrinol* 172:117-125
5. **Alba-Betancourt C, Arámburo C, Ávila-Mendoza J, Ahumada-Solórzano SM, Carranza M, Rodríguez-Méndez AJ, Harvey S, Luna M** 2011 Expression, cellular distribution, and heterogeneity of growth hormone in the chicken cerebellum during development. *Gen Comp Endocrinol* 170:528-540
6. **Aramburo C, Carranza M, Sanchez R, Perera G** 1989 Partial biochemical and biological characterization of purified chicken growth hormone (cGH). Isolation of

cGH charge variants and evidence that cGH is phosphorylated. *Gen Comp Endocrinol* 76:330-339

7. **Aramburo C, Montiel JL, Perera G, Navarrete S, Sanchez R** 1990 Molecular isoforms of chicken growth hormone (cGH): different bioactivities of cGH charge variants. *Gen Comp Endocrinol* 80:59-67
8. **Aramburo C, Navarrete S, Montiel JL, Sanchez R, Berghman LR** 1991 Purification and electrophoretic analysis of glycosylated chicken growth hormone (G-cGH): evidence of G-cGH isoforms. *Gen Comp Endocrinol* 84:135-146
9. **Aramburo C, Montiel JL, Proudman JA, Berghman LR, Scanes CG** 1992 Phosphorylation of prolactin and growth hormone. *J Mol Endocrinol* 8:183-191
10. **Arámbaro C, Montiel JL, Perera G, Navarrete S, Sánchez R** 1990 Molecular isoforms of chicken growth hormone (cGH): different bioactivities of cGH charge variants. *Gen Comp Endocrinol* 80:59-67
11. **Arámbaro C, Navarrete S, Montiel JL, Sánchez R, Berghman LR** 1991 Purification and electrophoretic analysis of glycosylated chicken growth hormone (G-cGH): evidence of G-cGH isoforms. *Gen Comp Endocrinol* 84:135-146
12. **Arámbaro C, Luna M, Carranza M, Reyes M, Martínez-Coria H, Scanes CG** 2000 Growth hormone size variants: changes in the pituitary during development of the chicken. *Proc Soc Exp Biol Med* 223:67-74
13. **Arámbaro C, Carranza M, Reyes M, Luna M, Martínez-Coria H, Berumen L, Scanes CG** 2001 Characterization of a bioactive 15 kDa fragment produced by proteolytic cleavage of chicken growth hormone. *Endocrine* 15:231-240
14. **Arsenijevic Y, Wehrenberg WB, Conz A, Eshkol A, Sizonenko PC, 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
15. **Ascoli M, Fanelli F, Segaloff DL** 2002 The lutropin/choriogonadotropin receptor, a 2002 perspective. *Endocr Rev* 23:141-174
16. **Baldwin A, Cundy T, Butler J, Timmis AD** 1985 Progression of cardiovascular disease in acromegalic patients treated by external pituitary irradiation. *Acta Endocrinol (Copenh)* 108:26-30
17. **Balvers M, Spiess AN, Domagalski R, Hunt N, Kilic E, Mukhopadhyay AK, Hanks E, Charlton HM, Ivell R** 1998 Relaxin-like factor expression as a marker of differentiation in the mouse testis and ovary. *Endocrinology* 139:2960-2970

18. **Baratta M, Saleri R, Mainardi GL, Valle D, Giustina A, Tamanini C** 2002 Leptin regulates GH gene expression and secretion and nitric oxide production in pig pituitary cells. *Endocrinology* 143:551-557
19. **Barreiro ML, Gaytan F, Caminos JE, Pinilla L, Casanueva FF, Aguilar E, Dieguez C, Tena-Sempere M** 2002 Cellular location and hormonal regulation of ghrelin expression in rat testis. *Biol Reprod* 67:1768-1776
20. **Barreiro ML, Suominen JS, Gaytan F, Pinilla L, Chopin LK, Casanueva FF, Dieguez C, Aguilar E, Toppari J, Tena-Sempere M** 2003 Developmental, stage-specific, and hormonally regulated expression of growth hormone secretagogue receptor messenger RNA in rat testis. *Biol Reprod* 68:1631-1640
21. **Barreiro ML, Pineda R, Navarro VM, Lopez M, Suominen JS, Pinilla L, Senaris R, Toppari J, Aguilar E, Dieguez C, Tena-Sempere M** 2004 Orexin 1 receptor messenger ribonucleic acid expression and stimulation of testosterone secretion by orexin-A in rat testis. *Endocrinology* 145:2297-2306
22. **Barreiro ML, Tena-Sempere M** 2004 Ghrelin and reproduction: a novel signal linking energy status and fertility? *Mol Cell Endocrinol* 226:1-9
23. **Baudet ML, Harvey S** 2003 Ghrelin-induced GH secretion in domestic fowl in vivo and in vitro. *J Endocrinol* 179:97-105
24. **Baudet ML, Martin B, Hassanali Z, Parker E, Sanders EJ, Harvey S** 2007 Expression, translation, and localization of a novel, small growth hormone variant. *Endocrinology* 148:103-115
25. **Baumann G** 1991 Metabolism of growth hormone (GH) and different molecular forms of GH in biological fluids. *Horm Res* 36 Suppl 1:5-10
26. **Baumann G, Shaw M, Amburn K, Jan T, Davila N, Mercado M, Stolar M, MacCart J** 1994 Heterogeneity of circulating growth hormone. *Nucl Med Biol* 21:369-379
27. **Baumann G** 1999 Growth hormone heterogeneity in human pituitary and plasma. *Horm Res* 51 Suppl 1:2-6
28. **Bentley GE, Perfito N, Ukena K, Tsutsui K, Wingfield JC** 2003 Gonadotropin-inhibitory peptide in song sparrows (*Melospiza melodia*) in different reproductive conditions, and in house sparrows (*Passer domesticus*) relative to chicken-gonadotropin-releasing hormone. *J Neuroendocrinol* 15:794-802
29. **Bentley GE, Kriegsfeld LJ, Osugi T, Ukena K, O'Brien S, Perfito N, Moore IT, Tsutsui K, Wingfield JC** 2006 Interactions of gonadotropin-releasing hormone (GnRH) and gonadotropin-inhibitory hormone (GnIH) in birds and mammals. *J Exp Zool A Comp Exp Biol* 305:807-814

30. **Bentley GE, Ubuka T, McGuire NL, Chowdhury VS, Morita Y, Yano T, Hasunuma I, Binns M, Wingfield JC, Tsutsui K** 2008 Gonadotropin-inhibitory hormone and its receptor in the avian reproductive system. *Gen Comp Endocrinol* 156:34-43
31. **Berensztein EB, Baquedano MS, Pepe CM, Costanzo M, Saraco NI, Ponzio R, Rivarola MA, Belgorosky A** 2008 Role of IGFs and insulin in the human testis during postnatal activation: differentiation of steroidogenic cells. *Pediatr Res* 63:662-666
32. **Berger P, Untergasser G, Hermann M, Hittmair A, Madersbacher S, Dirnhofner 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
33. **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
34. **Berghman LR, van BJ, Decuypere E, Kuhn ER, Vandesande F** 1988 One-step purification of chicken growth hormone from a crude pituitary extract by use of a monoclonal immunoadsorbent. *J Endocrinol* 118:381-387
35. **Berghman LR, Buyse J, Huybrechts LM, Darras VM, Vandesande F, Kuhn ER, Decuypere E, Scanes CG** 1994 Disappearance rate of glycosylated and non-glycosylated chicken growth hormone: influence on biological activity. *Comp Biochem Physiol Pharmacol Toxicol Endocrinol* 108:161-169
36. **Berry SA, Srivastava CH, Rubin LR, Phipps WR, Pescovitz OH** 1992 Growth hormone-releasing hormone-like messenger ribonucleic acid and immunoreactive peptide are present in human testis and placenta. *J Clin Endocrinol Metab* 75:281-284
37. **Bertherat J, Bluet-Pajot MT, Epelbaum J** 1995 Neuroendocrine regulation of growth hormone. *Eur J Endocrinol* 132:12-24
38. **Berumen LC, Luna M, Carranza M, Martínez-Coria H, Reyes M, Cárabez A, 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
39. **Bex F, Bartke A, Goldman BD, Dalterio S** 1978 Prolactin, growth hormone, luteinizing hormone receptors, and seasonal changes in testicular activity in the golden hamster. *Endocrinology* 103:2069-2080

40. **Bjornsson BT, Hemre GI, Bjornevik M, Hansen T** 2000 Photoperiod regulation of plasma growth hormone levels during induced smoltification of underyearling Atlantic salmon. *Gen Comp Endocrinol* 119:17-25
41. **Blaise O, Weil C, Le Bail PY** 1995 Role of IGF-I in the control of GH secretion in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Growth Regul* 5:142-150
42. **Blanchard MM, Goodyer CG, Charrier J, Dulor JP, Barenton B** 1987 Effects of hypothalamic hormones (GRF, TRH, somatostatin) and insulin-like growth factor I on growth hormone secretion from prepubertal male lamb pituitary cultures. *Reprod Nutr Dev* 27:471-480
43. **Bornstein SR, Uhlmann K, Haidan A, Ehrhart-Bornstein M, Scherbaum WA** 1997 Evidence for a novel peripheral action of leptin as a metabolic signal to the adrenal gland: leptin inhibits cortisol release directly. *Diabetes* 46:1235-1238
44. **Boujard T, Dugy X, Genner D, Gosset C, Grig G** 1992 Description of a modular, low cost, eater meter for the study of feeding behavior and food preferences in fish. *Physiol Behav* 52:1101-1106
45. **Boujard T** 1995 Diel rhythms of feeding activity in the European catfish, *Silurus glanis*. *Physiol Behav* 58:641-645
46. **Breier BH, Vickers MH, Gravance CG, Casey PJ** 1996 Growth hormone (GH) therapy markedly increases the motility of spermatozoa and the concentration of insulin-like growth factor-I in seminal vesicle fluid in the male GH-deficient dwarf rat. *Endocrinology* 137:4061-4064
47. **Brooks AJ, Wooh JW, Tunny KA, Waters MJ** 2008 Growth hormone receptor; mechanism of action. *Int J Biochem Cell Biol* 40:1984-1989
48. **Brown RJ, Adams JJ, Pelekanos RA, Wan Y, McKinstry WJ, Palethorpe K, Seeber RM, Monks TA, Eidne KA, Parker MW, Waters MJ** 2005 Model for growth hormone receptor activation based on subunit rotation within a receptor dimer. *Nat Struct Mol Biol* 12:814-821
49. **Caprio M, Isidori AM, Carta AR, Moretti C, Dufau ML, Fabbri A** 1999 Expression of functional leptin receptors in rodent Leydig cells. *Endocrinology* 140:4939-4947
50. **Caprio M, Fabbrini E, Ricci G, Basciani S, Gnassi L, Arizzi M, Carta AR, De Martino MU, Isidori AM, Frajese GV, Fabbri A** 2003 Ontogenesis of leptin receptor in rat Leydig cells. *Biol Reprod* 68:1199-1207
51. **Carro E, Senaris R, Considine RV, Casanueva FF, Dieguez C** 1997 Regulation of in vivo growth hormone secretion by leptin. *Endocrinology* 138:2203-2206

52. **Champion ZJ, Breier BH, Ewen WE, Tobin TT, Casey PJ** 2002 Blood plasma concentrations of insulin-like growth factor-I (IGF-I) in resting standardbred horses. *Vet J* 163:45-50
53. **Chandra AM, Qualls CW, Jr., Campbell GA, Reddy G** 1997 Testicular effects of 1,3,5-trinitrobenzene (TNB). II. Immunolocalization of germ cells using proliferating cell nuclear antigen (PCNA) as an endogenous marker. *J Toxicol Environ Health* 50:379-387
54. **Chandrashekar V, Bartke A, Coschigano KT, Kopchick JJ** 1999 Pituitary and testicular function in growth hormone receptor gene knockout mice. *Endocrinology* 140:1082-1088
55. **Chatelain PG, Sanchez P, Saez JM** 1991 Growth hormone and insulin-like growth factor I treatment increase testicular luteinizing hormone receptors and steroidogenic responsiveness of growth hormone deficient dwarf mice. *Endocrinology* 128:1857-1862
56. **Chawla RK, Parks JS, Rudman D** 1983 Structural variants of human growth hormone: biochemical, genetic, and clinical aspects. *Annu Rev Med* 34:519-547
57. **Chehab FF, Lim ME, Lu R** 1996 Correction of the sterility defect in homozygous obese female mice by treatment with the human recombinant leptin. *Nat Genet* 12:318-320
58. **Ciampani T, Fabbri A, Isidori A, Dufau ML** 1992 Growth hormone-releasing hormone is produced by rat Leydig cell in culture and acts as a positive regulator of Leydig cell function. *Endocrinology* 131:2785-2792
59. **Cicccone NA, Tsutsui K, Sharp PJ, Dunn IC** 2004 Does gonadotrophin inhibiting hormone (GnIH) play a functional role in avian reproduction? *Br Poult Sci* 45 Suppl 1:S28-S29
60. **Clapp C, Martial JA, Guzman RC, Rentier-Delure F, Weiner RI** 1993 The 16-kilodalton N-terminal fragment of human prolactin is a potent inhibitor of angiogenesis. *Endocrinology* 133:1292-1299
61. **Colon E, Svechnikov KV, Carlsson-Skwirut C, Bang P, Soder O** 2005 Stimulation of steroidogenesis in immature rat Leydig cells evoked by interleukin-1alpha is potentiated by growth hormone and insulin-like growth factors. *Endocrinology* 146:221-230
62. **Convey EM, Tucker HA, Smith VG, Zolman J** 1973 Bovine prolactin, growth hormone, thyroxine and corticoid response to thyrotropin releasing hormone. *Endocrinology* 92:471-476
63. **Conway-Campbell BL, Wooh JW, Brooks AJ, Gordon D, Brown RJ, Lichanska AM, Chin HS, Barton CL, Boyle GM, Parsons PG, Jans DA,**

- Waters MJ** 2007 Nuclear targeting of the growth hormone receptor results in dysregulation of cell proliferation and tumorigenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104:13331-13336
64. **Cooke NE, Ray J, Emery JG, Liebhaber SA** 1988 Two distinct species of human growth hormone-variant mRNA in the human placenta predict the expression of novel growth hormone proteins. *J Biol Chem* 263:9001-9006
 65. **Couce ME, Burguera B, Parisi JE, Jensen MD, Lloyd RV** 1997 Localization of leptin receptor in the human brain. *Neuroendocrinology* 66:145-150
 66. **Cowan JW, Wang X, Guan R, He K, Jiang J, Baumann G, Black RA, Wolfe MS, Frank SJ** 2005 Growth hormone receptor is a target for presenilin-dependent gamma-secretase cleavage. *J Biol Chem* 280:19331-19342
 67. **Cunningham BC, Bass S, Fuh G, Wells JA** 1990 Zinc mediation of the binding of human growth hormone to the human prolactin receptor. *Science* 250:1709-1712
 68. **Davis LK, Pierce AL, Hiramatsu N, Sullivan CV, Hirano T, Grau EG** 2008 Gender-specific expression of multiple estrogen receptors, growth hormone receptors, insulin-like growth factors and vitellogenins, and effects of 17 beta-estradiol in the male tilapia (*Oreochromis mossambicus*). *Gen Comp Endocrinol* 156:544-551
 69. **de Rooij DG** 2001 Proliferation and differentiation of spermatogonial stem cells. *Reproduction* 121:347-354
 70. **De VC, Hacquebard M, Gregoire F, Carpentier Y, Delporte C** 2007 Ghrelin interacts with human plasma lipoproteins. *Endocrinology* 148:2355-2362
 71. **Dimaraki EV, Jaffe CA** 2006 Role of endogenous ghrelin in growth hormone secretion, appetite regulation and metabolism. *Rev Endocr Metab Disord* 7:237-249
 72. **Doerr-Schott J** 1980 Immunohistochemistry of the adenohypophysis of non-mammalian vertebrates. *Acta Histochem Suppl* 22:185-223
 73. **Dornonville de la CC, Lindqvist A, Egecioglu E, Tung YC, Surve V, Ohlsson C, Jansson JO, Erlanson-Albertsson C, Dickson SL, Hakanson R** 2005 Ghrelin treatment reverses the reduction in weight gain and body fat in gastrectomised mice. *Gut* 54:907-913
 74. **Dyer CJ, Simmons JM, Matteri RL, Keisler DH** 1997 Leptin receptor mRNA is expressed in ewe anterior pituitary and adipose tissues and is differentially expressed in hypothalamic regions of well-fed and feed-restricted ewes. *Domest Anim Endocrinol* 14:119-128
 75. **Dym M** 1994 Basement membrane regulation of Sertoli cells. *Endocr Rev* 15:102-115

76. **Fabbri A, Ciocca DR, Ciampani T, Wang J, Dufau ML** 1995 Growth hormone-releasing hormone in testicular interstitial and germ cells: potential paracrine modulation of follicle-stimulating hormone action on Sertoli cell function. *Endocrinology* 136:2303-2308
77. **Farmer SW, PAPKOFF H, Hayashida T** 1974 Purification and properties of avian growth hormones. *Endocrinology* 95:1560-1565
78. **Fei H, Okano HJ, Li C, Lee GH, Zhao C, Darnell R, Friedman JM** 1997 Anatomic localization of alternatively spliced leptin receptors (Ob-R) in mouse brain and other tissues. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94:7001-7005
79. **Filby AL, Tyler CR** 2007 Cloning and characterization of cDNAs for hormones and/or receptors of growth hormone, insulin-like growth factor-I, thyroid hormone, and corticosteroid and the gender-, tissue-, and developmental-specific expression of their mRNA transcripts in fathead minnow (*Pimephales promelas*). *Gen Comp Endocrinol* 150:151-163
80. **Fishelson L, Gon O, Holdengreber V, Delarea Y** 2007 Comparative spermatogenesis, spermatocytogenesis, and spermatozeugmata formation in males of viviparous species of clinid fishes (Teleostei: Clinidae, Blennioidei). *Anat Rec (Hoboken)* 290:311-323
81. **Fletcher TP, Clarke IJ** 1994 Effects of hypothyroidism on the growth hormone axis in sheep. *J Endocrinol* 140:495-502
82. **Forbes SH, Knudsen KL, North TW, Allendorf FW** 1994 One of two growth hormone genes in coho salmon is sex-linked. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91:1628-1631
83. **Ford T, Graham J, Rickwood D** 1994 Iodixanol: a nonionic iso-osmotic centrifugation medium for the formation of self-generated gradients. *Anal Biochem* 220:360-366
84. **Frankenne F, Rentier-Delrue F, Scippo ML, Martial J, Hennen G** 1987 Expression of the growth hormone variant gene in human placenta. *J Clin Endocrinol Metab* 64:635-637
85. **Furuya M, Adachi K, Kuwahara S, Ogawa K, Tsukamoto Y** 2006 Inhibition of male chick phenotypes and spermatogenesis by Bisphenol-A. *Life Sci* 78:1767-1776
86. **Gahete MD, Duran-Prado M, Luque RM, Martinez-Fuentes AJ, Quintero A, Gutierrez-Pascual E, Cordoba-Chacon J, Malagon MM, Gracia-Navarro F, Castano JP** 2009 Understanding the multifactorial control of growth hormone release by somatotropes: lessons from comparative endocrinology. *Ann N Y Acad Sci* 1163:137-153

87. **Garcia-Aragon J, Lobie PE, Muscat GE, Gobijs KS, Norstedt G, Waters MJ** 1992 Prenatal expression of the growth hormone (GH) receptor/binding protein in the rat: a role for GH in embryonic and fetal development? *Development* 114:869-876
88. **Garcia MC, Lopez M, Alvarez CV, Casanueva F, Tena-Sempere M, Dieguez C** 2007 Role of ghrelin in reproduction. *Reproduction* 133:531-540
89. **Gaytan F, Barreiro ML, Caminos JE, Chopin LK, Herington AC, Morales C, Pinilla L, Paniagua R, Nistal M, Casanueva FF, Aguilar E, Dieguez C, Tena-Sempere M** 2004 Expression of ghrelin and its functional receptor, the type 1a growth hormone secretagogue receptor, in normal human testis and testicular tumors. *J Clin Endocrinol Metab* 89:400-409
90. **Ge G, Fernández CA, Moses MA, Greenspan DS** 2007 Bone morphogenetic protein 1 processes prolactin to a 17-kDa antiangiogenic factor. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104:10010-10015
91. **Gent J, van KP, Roza M, Bu G, Strous GJ** 2002 Ligand-independent growth hormone receptor dimerization occurs in the endoplasmic reticulum and is required for ubiquitin system-dependent endocytosis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99:9858-9863
92. **Georgiou M, Payne AH** 1987 Functional and physical characteristics of rat Leydig cell populations isolated by metrizamide and Percoll gradient centrifugation. *Biol Reprod* 37:335-341
93. **Gerdes J, Schwab U, Lemke H, Stein H** 1983 Production of a mouse monoclonal antibody reactive with a human nuclear antigen associated with cell proliferation. *Int J Cancer* 31:13-20
94. **Ghizzoni L, Mastorakos G, Ziveri M, Furlini M, Solazzi A, Vottero A, Bernasconi S** 2001 Interactions of leptin and thyrotropin 24-hour secretory profiles in short normal children. *J Clin Endocrinol Metab* 86:2065-2072
95. **Giri DK, li-Seyed M, Li LY, Lee DF, Ling P, Bartholomeusz G, Wang SC, Hung MC** 2005 Endosomal transport of ErbB-2: mechanism for nuclear entry of the cell surface receptor. *Mol Cell Biol* 25:11005-11018
96. **Giustina A, Doga M, Bresciani E, Bussi AR, Chiesa L, Misitano V, Giustina G** 1995 Effect of glucocorticoids on the paradoxical growth hormone response to thyrotropin-releasing hormone in patients with acromegaly. *Metabolism* 44:379-383
97. **Giustina A, Ragni G, Bollati A, Cozzi R, Licini M, Poiesi C, Turazzi S, Bonfanti C** 1997 Inhibitory effects of galanin on growth hormone (GH) release in cultured GH-secreting adenoma cells: comparative study with octreotide, GH-releasing hormone, and thyrotropin-releasing hormone. *Metabolism* 46:425-430

98. **Giustina A, Veldhuis JD** 1998 Pathophysiology of the neuroregulation of growth hormone secretion in experimental animals and the human. *Endocr Rev* 19:717-797
99. **Goldenberg N, Barkan A** 2007 Factors regulating growth hormone secretion in humans. *Endocrinol Metab Clin North Am* 36:37-55
100. **Gomez JM, Boujard T, Fostier A, Le Bail PY** 1996 Characterization of growth hormone nycthemeral plasma profiles in catheterized rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *J Exp Zool* 274:171-180
101. **Gomez JM, Weil C, Ollitrault M, Le Bail PY, Breton B, Le GF** 1999 Growth hormone (GH) and gonadotropin subunit gene expression and pituitary and plasma changes during spermatogenesis and oogenesis in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Gen Comp Endocrinol* 113:413-428
102. **Gonzalez-Moran MG, Soria-Castro E** 2010 Histological and stereological studies on Leydig cells in the testes of *Gallus domesticus* from pre-hatching to sexual maturity. *Anim Reprod Sci* 120:129-135
103. **Gorbman A** 1995 Olfactory origins and evolution of the brain-pituitary endocrine system: facts and speculation. *Gen Comp Endocrinol* 97:171-178
104. **Gracia-Navarro F, Castano JP, Malagon MM, Torronteras R** 1991 Subcellular responsiveness of amphibian growth hormone cells after TSH-releasing hormone stimulation. *Gen Comp Endocrinol* 84:94-103
105. **Gracia-Navarro F, Lamacz M, Tonon MC, Vaudry H** 1992 Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide stimulates calcium mobilization in amphibian pituitary cells. *Endocrinology* 131:1069-1074
106. **Gravance CG, Breier BH, Vickers MH, Casey PJ** 1997 Impaired sperm characteristics in postpubertal growth-hormone-deficient dwarf (dw/dw) rats. *Anim Reprod Sci* 49:71-76
107. **Guillemin R, Brazeau P, Bohlen P, Esch F, Ling N, Wehrenberg WB** 1982 Growth hormone-releasing factor from a human pancreatic tumor that caused acromegaly. *Science* 218:585-587
108. **Hakovirta H, Yan W, Kaleva M, Zhang F, Vanttinen K, Morris PL, Soder M, Parvinen M, Toppari J** 1999 Function of stem cell factor as a survival factor of spermatogonia and localization of messenger ribonucleic acid in the rat seminiferous epithelium. *Endocrinology* 140:1492-1498
109. **Halaas JL, Gajiwala KS, Maffei M, Cohen SL, Chait BT, Rabinowitz D, Lallone RL, Burley SK, Friedman JM** 1995 Weight-reducing effects of the plasma protein encoded by the obese gene. *Science* 269:543-546

110. **Hall TR, Chadwick A** 1984 Effects of synthetic mammalian thyrotrophin releasing hormone, somatostatin and dopamine on the secretion of prolactin and growth hormone from amphibian and reptilian pituitary glands incubated in vitro. *J Endocrinol* 102:175-180
111. **Harvey S, Godden PM, Scanes CG** 1977 Plasma growth hormone concentrations during growth in turkeys. *Br Poult Sci* 18:547-551
112. **Harvey S** 1990 Thyrotrophin-releasing hormone: a growth hormone-releasing factor. *J Endocrinol* 125:345-358
113. **Harvey S, Scanes CG, Daughaday WH** 1995 *Growth Hormone*. Boca Raton: CRC Press, Inc.
114. **Harvey S, Lavelin I, Pines M** 2002 Growth hormone (GH) action in the brain: neural expression of a GH-response gene. *J Mol Neurosci* 18:89-95
115. **Harvey S, Baudet ML, Murphy A, Luna M, Hull KL, Aramburo C** 2004 Testicular growth hormone (GH): GH expression in spermatogonia and primary spermatocytes. *Gen Comp Endocrinol* 139:158-167
116. **Harvey S** 2010 Extrapituitary growth hormone. *Endocrine* 38:335-359
117. **Hinuma S, Shintani Y, Fukusumi S, Iijima N, Matsumoto Y, Hosoya M, Fujii R, Watanabe T, Kikuchi K, Terao Y, Yano T, Yamamoto T, Kawamata Y, Habata Y, Asada M, Kitada C, Kurokawa T, Onda H, Nishimura O, Tanaka M, Ibata Y, Fujino M** 2000 New neuropeptides containing carboxy-terminal RFamide and their receptor in mammals. *Nat Cell Biol* 2:703-708
118. **Hogarth C, Itman C, Jans DA, Loveland KL** 2005 Regulated nucleocytoplasmic transport in spermatogenesis: a driver of cellular differentiation? *Bioessays* 27:1011-1025
119. **Hondo E, Kurohmaru M, Sakai S, Ogawa K, Hayashi Y** 1995 Prolactin receptor expression in rat spermatogenic cells. *Biol Reprod* 52:1284-1290
120. **Howland DS, Farrington MA, Taylor WD, Hymer WC** 1987 Alternative splicing model for the synthesis and secretion of the 20 kilodalton form of rat growth hormone. *Biochem Biophys Res Commun* 147:650-657
121. **Hrabia A, Paczoska-Eliasiewicz HE, Berghman LR, Harvey S, Rzasa J** 2008 Expression and localization of growth hormone and its receptors in the chicken ovary during sexual maturation. *Cell Tissue Res* 332:317-328
122. **Huising MO, Geven EJ, Kruiswijk CP, Nabuurs SB, Stolte EH, Spanings FA, Verburg-van Kemenade BM, Flik G** 2006 Increased leptin expression in common Carp (*Cyprinus carpio*) after food intake but not after fasting or feeding to satiation. *Endocrinology* 147:5786-5797

123. **Huleihel M, AbuElhija M, Lunenfeld E** 2007 In vitro culture of testicular germ cells: regulatory factors and limitations. *Growth Factors* 25:236-252
124. **Hull KL, Harvey S** 2000 Growth hormone: roles in male reproduction. *Endocrine* 13:243-250
125. **Ikemoto T, Park MK** 2005 Chicken RFamide-related peptide (GnIH) and two distinct receptor subtypes: identification, molecular characterization, and evolutionary considerations. *J Reprod Dev* 51:359-377
126. **Jabbour HN, Lincoln GA** 1999 Prolactin receptor expression in the testis of the ram: localisation, functional activation and the influence of gonadotrophins. *Mol Cell Endocrinol* 148:151-161
127. **Jeandel L, Okuno A, Kobayashi T, Kikuyama S, Tostivint H, Lihrmann I, Chartrel N, Conlon JM, Fournier A, Tonon MC, Vaudry H** 1998 Effects of the two somatostatin variants somatostatin-14 and [Pro2, Met13]somatostatin-14 on receptor binding, adenylyl cyclase activity and growth hormone release from the frog pituitary. *J Neuroendocrinol* 10:187-192
128. **Johnson HM, Subramaniam PS, Olsnes S, Jans DA** 2004 Trafficking and signaling pathways of nuclear localizing protein ligands and their receptors. *Bioessays* 26:993-1004
129. **Johnson MA, Tsutsui K, Fraley GS** 2007 Rat RFamide-related peptide-3 stimulates GH secretion, inhibits LH secretion, and has variable effects on sex behavior in the adult male rat. *Horm Behav* 51:171-180
130. **Kaiya H, Kojima M, Hosoda H, Koda A, Yamamoto K, Kitajima Y, Matsumoto M, Minamitake Y, Kikuyama S, Kangawa K** 2001 Bullfrog ghrelin is modified by n-octanoic acid at its third threonine residue. *J Biol Chem* 276:40441-40448
131. **Kaiya H, Kojima M, Hosoda H, Riley LG, Hirano T, Grau EG, Kangawa K** 2003 Identification of tilapia ghrelin and its effects on growth hormone and prolactin release in the tilapia, *Oreochromis mossambicus*. *Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol* 135:421-429
132. **Kaiya H, Sakata I, Kojima M, Hosoda H, Sakai T, Kangawa K** 2004 Structural determination and histochemical localization of ghrelin in the red-eared slider turtle, *Trachemys scripta elegans*. *Gen Comp Endocrinol* 138:50-57
133. **Kaiya H, Small BC, Bilodeau AL, Shepherd BS, Kojima M, Hosoda H, Kangawa K** 2005 Purification, cDNA cloning, and characterization of ghrelin in channel catfish, *Ictalurus punctatus*. *Gen Comp Endocrinol* 143:201-210

134. **Kaiya H, Miyazato M, Kangawa K, Peter RE, Unniappan S** 2008 Ghrelin: a multifunctional hormone in non-mammalian vertebrates. *Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol* 149:109-128
135. **Kanzaki M, Morris PL** 1998 Lactogenic hormone-inducible phosphorylation and gamma-activated site-binding activities of Stat5b in primary rat Leydig cells and MA-10 mouse Leydig tumor cells. *Endocrinology* 139:1872-1882
136. **Kanzaki M, Morris PL** 1999 Growth hormone regulates steroidogenic acute regulatory protein expression and steroidogenesis in Leydig cell progenitors. *Endocrinology* 140:1681-1686
137. **Karlsson C, Lindell K, Svensson E, Bergh C, Lind P, Billig H, Carlsson LM, Carlsson B** 1997 Expression of functional leptin receptors in the human ovary. *J Clin Endocrinol Metab* 82:4144-4148
138. **Kieffer TJ, Heller RS, Habener JF** 1996 Leptin receptors expressed on pancreatic beta-cells. *Biochem Biophys Res Commun* 224:522-527
139. **Kineman RD, Luque RM** 2007 Evidence that ghrelin is as potent as growth hormone (GH)-releasing hormone (GHRH) in releasing GH from primary pituitary cell cultures of a nonhuman primate (*Papio anubis*), acting through intracellular signaling pathways distinct from GHRH. *Endocrinology* 148:4440-4449
140. **Koopman P** 1999 Sry and Sox9: mammalian testis-determining genes. *Cell Mol Life Sci* 55:839-856
141. **Kriegsfeld LJ, Mei DF, Bentley GE, Ubuka T, Mason AO, Inoue K, Ukena K, Tsutsui K, Silver R** 2006 Identification and characterization of a gonadotropin-inhibitory system in the brains of mammals. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103:2410-2415
142. **Kuhn ER, Geelissen SM, Van der GS, Darras VM** 2005 The release of growth hormone (GH): relation to the thyrotropic- and corticotropic axis in the chicken. *Domest Anim Endocrinol* 29:43-51
143. **Kuroda K** 1989 [Study on testicular tissue in animals with congenital hormone deficiency]. *Nippon Hinyokika Gakkai Zasshi* 80:3-10
144. **Kurokawa T, Uji S, Suzuki T** 2005 Identification of cDNA coding for a homologue to mammalian leptin from pufferfish, *Takifugu rubripes*. *Peptides* 26:745-750
145. **Lea RW, Ahene CA, Marsh JA, Harvey S** 1990 Short-loop inhibition of thyrotrophin-releasing hormone-induced growth hormone secretion in fowl. *J Endocrinol* 126:237-244

146. **Lea RW, Harvey S** 1990 Feedback effects of growth hormone on anterior pituitary function in chickens. *J Endocrinol* 125:409-415
147. **Lee JS, Mayes MS, Stromer MH, Scanes CG, Jeftinija S, Anderson LL** 2004 Number of secretory vesicles in growth hormone cells of the pituitary remains unchanged after secretion. *Exp Biol Med (Maywood)* 229:632-639
148. **Lengyel AM** 2006 From growth hormone-releasing peptides to ghrelin: discovery of new modulators of GH secretion. *Arq Bras Endocrinol Metabol* 50:17-24
149. **Li CH, PAPKOFF H** 1953 The stability of hypophyseal growth hormone. *J Biol Chem* 204:391-402
150. **Li Z, Zhang Y, Liu X, Xu R** 2002 Correlation of expression of preprothyrotropin-releasing hormone and receptor with rat testis development. *Chin Med J (Engl)* 115:12-16
151. **Liberti JP** 1981 Isolation and somatomedin activity of bovine growth hormone fragment 87-124. *Biochim Biophys Acta* 675:239-247
152. **Liberti JP, Joshi GS** 1986 Synthesis and secretion of phosphorylated growth hormone by rat pituitary glands in vitro. *Biochem Biophys Res Commun* 137:806-812
153. **Lichanska AM, Waters MJ** 2008 How growth hormone controls growth, obesity and sexual dimorphism. *Trends Genet* 24:41-47
154. **Lincoln DT, Sinowatz F, Temmim-Baker L, Baker HI, Kolle S, Waters MJ** 1998 Growth hormone receptor expression in the nucleus and cytoplasm of normal and neoplastic cells. *Histochem Cell Biol* 109:141-159
155. **Lincoln DT, Kaiser HE, Raju GP, Waters MJ** 2000 Growth hormone and colorectal carcinoma: localization of receptors. *In Vivo* 14:41-49
156. **Lobie PE, Breipohl W, Aragon JG, Waters MJ** 1990 Cellular localization of the growth hormone receptor/binding protein in the male and female reproductive systems. *Endocrinology* 126:2214-2221
157. **Lobie PE, Mertani H, Morel G, Morales-Bustos O, Norstedt G, Waters MJ** 1994 Receptor-mediated nuclear translocation of growth hormone. *J Biol Chem* 269:21330-21339
158. **Loesch K, Deng L, Cowan JW, Wang X, He K, Jiang J, Black RA, Frank SJ** 2006 Janus kinase 2 influences growth hormone receptor metalloproteolysis. *Endocrinology* 147:2839-2849

159. **Loir M** 1999 Spermatogonia of rainbow trout: II. in vitro study of the influence of pituitary hormones, growth factors and steroids on mitotic activity. *Mol Reprod Dev* 53:434-442
160. **Lu X, Gross AW, Lodish HF** 2006 Active conformation of the erythropoietin receptor: random and cysteine-scanning mutagenesis of the extracellular juxtamembrane and transmembrane domains. *J Biol Chem* 281:7002-7011
161. **Luna M, Huerta L, Berumen L, Martinez-Coria H, Harvey S, Aramburo 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
162. **Luna M, Barraza N, Berumen L, Carranza M, Pedernera E, Harvey S, Aramburo C** 2005 Heterogeneity of growth hormone immunoreactivity in lymphoid tissues and changes during ontogeny in domestic fowl. *Gen Comp Endocrinol* 144:28-37
163. **Luo DS, McKeown BA, Rivier J, Vale W** 1990 In vitro responses of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) somatotrophs to carp growth hormone-releasing factor (GRF) and somatostatin. *Gen Comp Endocrinol* 80:288-298
164. **Luque RM, Huang ZH, Shah B, Mazzone T, Kineman RD** 2007 Effects of leptin replacement on hypothalamic-pituitary growth hormone axis function and circulating ghrelin levels in ob/ob mice. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 292:E891-E899
165. **Ma X, Liu X, Zhang Y, Zhu P, Ye W, Lin H** 2007 Two growth hormone receptors in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*): molecular characterization, tissue distribution and expression profiles in the gonad during the reproductive cycle. *Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol* 147:325-339
166. **MacLeod JN, Pampori NA, Shapiro BH** 1991 Sex differences in the ultradian pattern of plasma growth hormone concentrations in mice. *J Endocrinol* 131:395-399
167. **Maddineni S, Ocon-Grove OM, Krzysik-Walker SM, Hendricks GL, III, Proudman JA, Ramachandran R** 2008 Gonadotrophin-inhibitory hormone receptor expression in the chicken pituitary gland: potential influence of sexual maturation and ovarian steroids. *J Neuroendocrinol* 20:1078-1088
168. **Maithal K, Krishnamurty HG, Muralidhar K** 2001 Physico-chemical characterization of growth hormone from water buffaloes (*Bubalus bubalis*). *Indian J Biochem Biophys* 38:375-383
169. **Major AT, Whiley PA, Loveland KL** 2011 Expression of nucleocytoplasmic transport machinery: Clues to regulation of spermatogenic development. *Biochim Biophys Acta*

170. **Malagon MM, Luque RM, Ruiz-Guerrero E, Rodriguez-Pacheco F, Garcia-Navarro S, Casanueva FF, Gracia-Navarro F, Castano JP** 2003 Intracellular signaling mechanisms mediating ghrelin-stimulated growth hormone release in somatotropes. *Endocrinology* 144:5372-5380
171. **Malagon MM, Vázquez-Martínez R, Martínez-Fuentes AJ, Gracia-Navarro F, Castaño JP** 2006 Growth hormone releasing hormone. In: Kastin AJ, ed. *The Handbook of Biologically Active Peptides*. Amsterdam: Elsevier; 663-672
172. **Malamed S, Gibney JA, Cain LD, Perez FM, Scanes CG** 1993 Immunocytochemical studies of chicken somatotrophs and somatotroph granules before and after hatching. *Cell Tissue Res* 272:369-374
173. **Malik KF, Young WS, III** 1996 Localization of binding sites in the central nervous system for leptin (OB protein) in normal, obese (ob/ob), and diabetic (db/db) C57BL/6J mice. *Endocrinology* 137:1497-1500
174. **Manova K, Nocka K, Besmer P, Bachvarova RF** 1990 Gonadal expression of c-kit encoded at the W locus of the mouse. *Development* 110:1057-1069
175. **Marchant TA, Peter RE** 1986 Seasonal variations in body growth rates and circulating levels of growth hormone in the goldfish, *Carassius auratus*. *J Exp Zool* 237:231-239
176. **Marchetti L, Sabbieti MG, Agas D, Menghi M, Materazzi G, Menghi G, Hurley MM** 2006 PGF2alpha increases FGF-2 and FGFR2 trafficking in Py1a rat osteoblasts via clathrin independent and importin beta dependent pathway. *J Cell Biochem* 97:1379-1392
177. **Martens GJ, Groenen PJ, Braks AA, Bussemakers MJ** 1989 Expression of two growth hormone genes in the *Xenopus* pituitary gland. *Nucleic Acids Res* 17:3974
178. **Martinez-Coria H, Lopez-Rosales LJ, Carranza M, Berumen L, Luna M, Aramburo C** 2002 Differential secretion of chicken growth hormone variants after growth hormone-releasing hormone stimulation in vitro. *Endocrine* 17:91-102
179. **Mason DA, Fleming RJ, Goldfarb DS** 2002 *Drosophila melanogaster* importin alpha1 and alpha3 can replace importin alpha2 during spermatogenesis but not oogenesis. *Genetics* 161:157-170
180. **Matsushima M, Kuroda K, Shirai M, Ando K, Sugisaki T, Noguchi T** 1986 Spermatogenesis in Snell dwarf, little and congenitally hypothyroid mice. *Int J Androl* 9:132-140
181. **McMahon CD, Radcliff RP, Lookingland KJ, Tucker HA** 2001 Neuroregulation of growth hormone secretion in domestic animals. *Domest Anim Endocrinol* 20:65-87

182. **McMurtry JP, Francis GL, Upton Z** 1997 Insulin-like growth factors in poultry. *Domest Anim Endocrinol* 14:199-229
183. **Melamed P, Eliahu N, Levavi-Sivan B, Ofir M, Farchi-Pisanty O, Rentier-Delrue F, Smal J, Yaron Z, Naor Z** 1995 Hypothalamic and thyroidal regulation of growth hormone in tilapia. *Gen Comp Endocrinol* 97:13-30
184. **Mi Y, Zhang C, Xie M, Zeng W** 2004 Effects of follicle-stimulating hormone and androgen on proliferation of cultured testicular germ cells of embryonic chickens. *Gen Comp Endocrinol* 138:237-246
185. **Miyata A, Arimura A, Dahl RR, Minamino N, Uehara A, Jiang L, Culler MD, Coy DH** 1989 Isolation of a novel 38 residue-hypothalamic polypeptide which stimulates adenylate cyclase in pituitary cells. *Biochem Biophys Res Commun* 164:567-574
186. **Montero M, Yon L, Rousseau K, Arimura A, Fournier A, Dufour S, Vaudry H** 1998 Distribution, characterization, and growth hormone-releasing activity of pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide in the European eel, *Anguilla anguilla*. *Endocrinology* 139:4300-4310
187. **Montero M, Yon L, Kikuyama S, Dufour S, Vaudry H** 2000 Molecular evolution of the growth hormone-releasing hormone/pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide gene family. Functional implication in the regulation of growth hormone secretion. *J Mol Endocrinol* 25:157-168
188. **Monts BS, Breyer PR, Rothrock JK, Pescovitz OH** 1996 Peptides of the growth hormone-releasing hormone family : Differential expression in rat testis. *Endocrine* 4:73-78
189. **Morash B, Li A, Murphy PR, Wilkinson M, Ur E** 1999 Leptin gene expression in the brain and pituitary gland. *Endocrinology* 140:5995-5998
190. **Moretti C, Mencacci C, Frajese GV, Cerilli M, Frajese G** 2002 Growth hormone-releasing hormone and pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide in the reproductive system. *Trends Endocrinol Metab* 13:428-435
191. **Muruzabal FJ, Fruhbeck G, Gomez-Ambrosi J, Archanco M, Burrell MA** 2002 Immunocytochemical detection of leptin in non-mammalian vertebrate stomach. *Gen Comp Endocrinol* 128:149-152
192. **N'Diaye MR, Sun SS, Fanua SP, Loseth KJ, Shaw Wilgis EF, Crabo BG** 2002 Growth hormone receptors in the porcine testis during prepuberty. *Reprod Domest Anim* 37:305-309
193. **Nagano M, Avarbock MR, Leonida EB, Brinster CJ, Brinster RL** 1998 Culture of mouse spermatogonial stem cells. *Tissue Cell* 30:389-397

194. **Nickel BE, Kardami E, Cattini PA** 1990 The human placental growth hormone variant is mitogenic for rat lymphoma Nb2 cells. *Endocrinology* 126:971-976
195. **Ohkubo T, Tanaka M, Nakashima K** 2000 Molecular cloning of the chicken prolactin gene and activation by Pit-1 and cAMP-induced factor in GH3 cells. *Gen Comp Endocrinol* 119:208-216
196. **Okinaga H, Takano K, Hayashi S, Yasufuku-Takano J, Teramoto A, Fujita T** 2005 Mechanisms of TRH-induced GH release (paradoxical response) in human somatotroph adenoma cells. *Endocr J* 52:763-767
197. **Oreal E, Pieau C, Mattei MG, Josso N, Picard JY, Carre-Eusebe D, Magre S** 1998 Early expression of AMH in chicken embryonic gonads precedes testicular SOX9 expression. *Dev Dyn* 212:522-532
198. **Orth JM, Gunsalus GL, Lamperti AA** 1988 Evidence from Sertoli cell-depleted rats indicates that spermatid number in adults depends on numbers of Sertoli cells produced during perinatal development. *Endocrinology* 122:787-794
199. **Osugi T, Ukena K, Bentley GE, O'Brien S, Moore IT, Wingfield JC, Tsutsui K** 2004 Gonadotropin-inhibitory hormone in Gambel's white-crowned sparrow (*Zonotrichia leucophrys gambelii*): cDNA identification, transcript localization and functional effects in laboratory and field experiments. *J Endocrinol* 182:33-42
200. **Paolucci M, Rocco M, Varricchio E** 2001 Leptin presence in plasma, liver and fat bodies in the lizard *Podarcis sicula*: fluctuations throughout the reproductive cycle. *Life Sci* 69:2399-2408
201. **Parker DB, Power ME, Swanson P, Rivier J, Sherwood NM** 1997 Exon skipping in the gene encoding pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide in salmon alters the expression of two hormones that stimulate growth hormone release. *Endocrinology* 138:414-423
202. **Parks JS** 1989 Molecular biology of growth hormone. *Acta Paediatr Scand Suppl* 349:127-135
203. **Payne AH, Downing JR, Wong KL** 1980 Luteinizing hormone receptors and testosterone synthesis in two distinct populations of Leydig cells. *Endocrinology* 106:1424-1429
204. **Peeters K, Langouche L, Vandesande F, Darras VM, Berghman LR** 1998 Effects of pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide (PACAP) on cAMP formation and growth hormone release from chicken anterior pituitary cells. *Ann N Y Acad Sci* 865:471-474
205. **Pekary AE, Yamada T, Sharp B, Bhasin S, Swerdloff RS, Hershman JM** 1984 Somatostatin-14 and -28 in the male rat reproductive system. *Life Sci* 34:939-945

206. **Peng C, Huang YP, Peter RE** 1990 Neuropeptide Y stimulates growth hormone and gonadotropin release from the goldfish pituitary in vitro. *Neuroendocrinology* 52:28-34
207. **Pescovitz OH, Berry SA, Laudon M, Ben-Jonathan N, Martin-Myers A, Hsu SM, Lambros TJ, Felix AM** 1990 Localization and growth hormone (GH)-releasing activity of rat testicular GH-releasing hormone-like peptide. *Endocrinology* 127:2336-2342
208. **Petersen C, Soder O** 2006 The sertoli cell--a hormonal target and 'super' nurse for germ cells that determines testicular size. *Horm Res* 66:153-161
209. **Petkovic V, Godi M, Lochmatter D, Eble A, Fluck CE, Robinson IC, Mullis PE** 2010 Growth hormone (GH)-releasing hormone increases the expression of the dominant-negative GH isoform in cases of isolated GH deficiency due to GH splice-site mutations. *Endocrinology* 151:2650-2658
210. **Pitel F, Faraut T, Bruneau G, Monget P** 2010 Is there a leptin gene in the chicken genome? Lessons from phylogenetics, bioinformatics and genomics. *Gen Comp Endocrinol* 167:1-5
211. **Plotsky PM, Vale W** 1985 Patterns of growth hormone-releasing factor and somatostatin secretion into the hypophysial-portal circulation of the rat. *Science* 230:461-463
212. **Pralong FP, Roduit R, Waeber G, Castillo E, Mosimann F, Thorens B, Gaillard RC** 1998 Leptin inhibits directly glucocorticoid secretion by normal human and rat adrenal gland. *Endocrinology* 139:4264-4268
213. **Raiti S, Moore WV, Van VG, Kaplan SL** 1986 Growth-stimulating effects of human growth hormone therapy in patients with Turner syndrome. *J Pediatr* 109:944-949
214. **Raucci F, Di Fiore MM** 2007 The c-kit receptor protein in the testis of green frog *Rana esculenta*: seasonal changes in relationship to testosterone titres and spermatogonial proliferation. *Reproduction* 133:51-60
215. **Ray J, Jones BK, Liebhaber SA, Cooke NE** 1989 Glycosylated human growth hormone variant. *Endocrinology* 125:566-568
216. **Recher S, Raccurt M, Lambert A, Lobie PE, Mertani HC, Morel G** 2001 Prenatal and adult growth hormone gene expression in rat lymphoid organs. *J Histochem Cytochem* 49:347-354
217. **Reiter E, Hennuy B, Bruyninx M, Cornet A, Klug M, McNamara M, Closset J, Hennen G** 1999 Effects of pituitary hormones on the prostate. *Prostate* 38:159-165

218. **Riley LG, Hirano T, Grau EG** 2002 Rat ghrelin stimulates growth hormone and prolactin release in the tilapia, *Oreochromis mossambicus*. *Zoolog Sci* 19:797-800
219. **Ritchie BW, Harrison GJ, Harrison LR** 1994 *Avian Medicine: Principles and Application*. Wingers Pub.
220. **Rivier J, Spiess J, Thorner M, Vale W** 1982 Characterization of a growth hormone-releasing factor from a human pancreatic islet tumour. *Nature* 300:276-278
221. **Rosenstrauch A, Weil S, Degen AA, Friedlander M** 1998 Leydig cell functional structure and plasma androgen level during the decline in fertility in aging roosters. *Gen Comp Endocrinol* 109:251-258
222. **Roser JF** 2008 Regulation of testicular function in the stallion: an intricate network of endocrine, paracrine and autocrine systems. *Anim Reprod Sci* 107:179-196
223. **Roupas P, Herington AC** 1989 Cellular mechanisms in the processing of growth hormone and its receptor. *Mol Cell Endocrinol* 61:1-12
224. **Rousseau K, Le BN, Marchelidon J, Dufour S** 1999 Evidence that corticotropin-releasing hormone acts as a growth hormone-releasing factor in a primitive teleost, the European eel (*Anguilla anguilla*). *J Neuroendocrinol* 11:385-392
225. **Rousseau K, Le BN, Pichavant K, Marchelidon J, Chow BK, Boeuf G, Dufour S** 2001 Pituitary growth hormone secretion in the turbot, a phylogenetically recent teleost, is regulated by a species-specific pattern of neuropeptides. *Neuroendocrinology* 74:375-385
226. **Ryan NK, Woodhouse CM, Van der Hoek KH, Gilchrist RB, Armstrong DT, Norman RJ** 2002 Expression of leptin and its receptor in the murine ovary: possible role in the regulation of oocyte maturation. *Biol Reprod* 66:1548-1554
227. **Saleri R, Giustina A, Tamanini C, Valle D, Burattin A, Wehrenberg WB, Baratta M** 2004 Leptin stimulates growth hormone secretion via a direct pituitary effect combined with a decreased somatostatin tone in a median eminence-pituitary perfusion study. *Neuroendocrinology* 79:221-228
228. **Satake H, Hisada M, Kawada T, Minakata H, Ukena K, Tsutsui K** 2001 Characterization of a cDNA encoding a novel avian hypothalamic neuropeptide exerting an inhibitory effect on gonadotropin release. *Biochem J* 354:379-385
229. **Scanes CG, Carsia RV, Lauterio TJ, Huybrechts L, Rivier J, Vale W** 1984 Synthetic human pancreatic growth hormone releasing factor (GRF) stimulates growth hormone secretion in the domestic fowl (*Gallus domesticus*). *Life Sci* 34:1127-1134

230. **Schlatt S, Weinbauer GF** 1994 Immunohistochemical localization of proliferating cell nuclear antigen as a tool to study cell proliferation in rodent and primate testes. *Int J Androl* 17:214-222
231. **Sciara AA, Rubiolo JA, Somoza GM, Arranz SE** 2006 Molecular cloning, expression and immunological characterization of pejerrey (*Odontesthes bonariensis*) growth hormone. *Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol* 142:284-292
232. **Seavey BK, Singh RN, Lewis UJ, Geschwind II** 1971 Bovine growth hormone: evidence for two allelic forms. *Biochem Biophys Res Commun* 43:189-195
233. **Seeburg PH** 1986 Human growth hormone: from clone to clinic. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* 51 Pt 1:669-677
234. **Sekido R, Lovell-Badge R** 2007 Mechanisms of gonadal morphogenesis are not conserved between chick and mouse. *Dev Biol* 302:132-142
235. **Shoham Z, Zalel Y, Jacobs HS** 1994 The role of growth hormone in male infertility. *Clin Endocrinol (Oxf)* 41:1-5
236. **Sinha YN, Jacobsen BP, Lewis UJ** 1989 Antibodies to newly recognized murine 13-18 KDa pituitary peptides crossreact with growth hormone and prolactin from several species, including man. *Biochem Biophys Res Commun* 163:386-393
237. **Sinha YN, Klemcke HG, Maurer RR, 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
238. **Sirotkin AV, Grossmann R, Maria-Peon MT, Roa J, Tena-Sempere M, Klein S** 2006 Novel expression and functional role of ghrelin in chicken ovary. *Mol Cell Endocrinol* 257-258:15-25
239. **Somjen D, Tordjman K, Greenman Y, Kohen F, Ouaknine GE, Stern N** 1999 TRH is a tonic secretagogue in growth hormone secreting but not in nonfunctioning pituitary tumors. *J Endocrinol Invest* 22:104-108
240. **Sorrentino V, Giorgi M, Geremia R, Besmer P, Rossi P** 1991 Expression of the c-kit proto-oncogene in the murine male germ cells. *Oncogene* 6:149-151
241. **Spiteri-Grech J, Nieschlag E** 1992 The role of growth hormone and insulin-like growth factor I in the regulation of male reproductive function. *Horm Res* 38 Suppl 1:22-27
242. **Srivastava CH, Breyer PR, Rothrock JK, Peredo MJ, Pescovitz OH** 1993 A new target for growth hormone releasing-hormone action in rat: the Sertoli cell. *Endocrinology* 133:1478-1481

243. **Srivastava CH, Collard MW, Rothrock JK, Peredo MJ, Berry SA, Pescovitz OH** 1993 Germ cell localization of a testicular growth hormone-releasing hormone-like factor. *Endocrinology* 133:83-89
244. **Such-Sanmartin G, Bosch J, Segura J, Gutiérrez-Gallego R** 2009 Generation of 5 and 17 kDa human growth hormone fragments through limited proteolysis. *Growth Factors* 27:255-264
245. **Sun Q, Hampson RK, Rottman FM** 1993 In vitro analysis of bovine growth hormone pre-mRNA alternative splicing. Involvement of exon sequences and trans-acting factor(s). *J Biol Chem* 268:15659-15666
246. **Swanlund DJ, N'Diaye MR, Loseth KJ, Pryor JL, Crabo BG** 1995 Diverse testicular responses to exogenous growth hormone and follicle-stimulating hormone in prepubertal boars. *Biol Reprod* 53:749-757
247. **Tachibana T, Sato M, Takahashi H, Ukena K, Tsutsui K, Furuse M** 2005 Gonadotropin-inhibiting hormone stimulates feeding behavior in chicks. *Brain Res* 1050:94-100
248. **Takeuchi S, Haneda M, Teshigawara K, 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
249. **Tanaka M, Hosokawa Y, Watahiki M, Nakashima K** 1992 Structure of the chicken growth hormone-encoding gene and its promoter region. *Gene* 112:235-239
250. **Tanaka M, Hayashida Y, Nakao N, Nakai N, 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
251. **Tannenbaum GS, Painson JC, Lengyel AM, Brazeau P** 1989 Paradoxical enhancement of pituitary growth hormone (GH) responsiveness to GH-releasing factor in the face of high somatostatin tone. *Endocrinology* 124:1380-1388
252. **Tartaglia LA, Dembski M, Weng X, Deng N, Culpepper J, Devos R, Richards GJ, Campfield LA, Clark FT, Deeds J, Muir C, Sanker S, Moriarty A, Moore KJ, Smutko JS, Mays GG, Wool EA, Monroe CA, Tepper RI** 1995 Identification and expression cloning of a leptin receptor, OB-R. *Cell* 83:1263-1271
253. **Tena-Sempere M, Barreiro ML, Gonzalez LC, Gaytan F, Zhang FP, Caminos JE, Pinilla L, Casanueva FF, Dieguez C, Aguilar E** 2002 Novel expression and functional role of ghrelin in rat testis. *Endocrinology* 143:717-725
254. **Tena-Sempere M, Barreiro ML** 2002 Leptin in male reproduction: the testis paradigm. *Mol Cell Endocrinol* 188:9-13

255. **Thurston RJ, Korn N** 2000 Spermiogenesis in commercial poultry species: anatomy and control. *Poult Sci* 79:1650-1668
256. **Trudeau VL, Somoza GM, Nahorniak CS, Peter RE** 1992 Interactions of estradiol with gonadotropin-releasing hormone and thyrotropin-releasing hormone in the control of growth hormone secretion in the goldfish. *Neuroendocrinology* 56:483-490
257. **Tsagarakis S, Ge F, Besser GM, Grossman A** 1991 Similar high molecular weight forms of growth hormone-releasing hormone are found in rat brain and testis. *Life Sci* 49:1627-1634
258. **Tsutsui K, Saigoh E, Ukena K, Teranishi H, Fujisawa Y, Kikuchi M, Ishii S, Sharp PJ** 2000 A novel avian hypothalamic peptide inhibiting gonadotropin release. *Biochem Biophys Res Commun* 275:661-667
259. **Tsutsui K, Sakamoto H, Ukena K** 2003 Biosynthesis and action of neurosteroids in the cerebellar Purkinje neuron. *J Steroid Biochem Mol Biol* 85:311-321
260. **Tsutsui K, Bentley GE, Ubuka T, Saigoh E, Yin H, Osugi T, Inoue K, Chowdhury VS, Ukena K, Ciccone N, Sharp PJ, Wingfield JC** 2007 The general and comparative biology of gonadotropin-inhibitory hormone (GnIH). *Gen Comp Endocrinol* 153:365-370
261. **Ubuka T, Bentley GE, Ukena K, Wingfield JC, Tsutsui K** 2005 Melatonin induces the expression of gonadotropin-inhibitory hormone in the avian brain. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102:3052-3057
262. **Ubuka T, Ukena K, Sharp PJ, Bentley GE, Tsutsui K** 2006 Gonadotropin-inhibitory hormone inhibits gonadal development and maintenance by decreasing gonadotropin synthesis and release in male quail. *Endocrinology* 147:1187-1194
263. **Ukena K, Ubuka T, Tsutsui K** 2003 Distribution of a novel avian gonadotropin-inhibitory hormone in the quail brain. *Cell Tissue Res* 312:73-79
264. **Unni SK, Modi DN, Pathak SG, Dhabalia JV, Bhartiya D** 2009 Stage-specific localization and expression of c-kit in the adult human testis. *J Histochem Cytochem* 57:861-869
265. **Unniappan S, Peter RE** 2004 In vitro and in vivo effects of ghrelin on luteinizing hormone and growth hormone release in goldfish. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 286:R1093-R1101
266. **Untergasser G, Kranewitter W, Walser F, Madersbacher S, Dirnhofer S, Berger P** 1996 [The testis as eutopic production site of human growth hormone, placental lactogen and prolactin: possible autocrine/paracrine effects on testicular function]. *Wien Klin Wochenschr* 108:541-546

267. **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
268. **Untergasser G, Hermann M, Rumpold H, Berger P** 1998 Complex alternative splicing of the GH-V gene in the human testis. *Eur J Endocrinol* 139:424-427
269. **van den Eijnden MJ, Strous GJ** 2007 Autocrine growth hormone: effects on growth hormone receptor trafficking and signaling. *Mol Endocrinol* 21:2832-2846
270. **van der Lely AJ, Tschop M, Heiman ML, Ghigo E** 2004 Biological, physiological, pathophysiological, and pharmacological aspects of ghrelin. *Endocr Rev* 25:426-457
271. **van KP, Putters J, Strous GJ** 2007 The ubiquitin ligase SCF(betaTrCP) regulates the degradation of the growth hormone receptor. *J Biol Chem* 282:20475-20483
272. **Vaudry D, Gonzalez BJ, Basille M, Yon L, Fournier A, Vaudry H** 2000 Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide and its receptors: from structure to functions. *Pharmacol Rev* 52:269-324
273. **Vaughan JM, Rivier J, Spiess J, Peng C, Chang JP, Peter RE, Vale W** 1992 Isolation and characterization of hypothalamic growth-hormone releasing factor from common carp, *Cyprinus carpio*. *Neuroendocrinology* 56:539-549
274. **Vigodner M, Lewin LM, Shochat L, Golan R** 2001 Spermatogenesis in the golden hamster: the role of c-kit. *Mol Reprod Dev* 60:562-568
275. **Wang Y, Li J, Wang CY, Kwok AH, Leung FC** 2007 Identification of the endogenous ligands for chicken growth hormone-releasing hormone (GHRH) receptor: evidence for a separate gene encoding GHRH in submammalian vertebrates. *Endocrinology* 148:2405-2416
276. **Waters MJ** 2006 Endocrinology: the next 60 years--the helix and the chip. *J Endocrinol* 190:11-12
277. **Wilber JF, 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
278. **Yamazaki M, Nakamura K, Kobayashi H, Matsubara M, Hayashi Y, Kangawa K, Sakai T** 2002 Regulatory effect of ghrelin on growth hormone secretion from perfused rat anterior pituitary cells. *J Neuroendocrinol* 14:156-162
279. **Yan W, Kero J, Huhtaniemi I, Toppari J** 2000 Stem cell factor functions as a survival factor for mature Leydig cells and a growth factor for precursor Leydig

- cells after ethylene dimethane sulfonate treatment: implication of a role of the stem cell factor/c-Kit system in Leydig cell development. *Dev Biol* 227:169-182
280. **Yon L, Jeandel L, Chartrel N, Feuilloley M, Conlon JM, Arimura A, Fournier A, Vaudry H** 1993 Neuroanatomical and physiological evidence for the involvement of pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide in the regulation of the distal lobe of the frog pituitary. *J Neuroendocrinol* 5:289-296
281. **Zachmann M** 1990 Assessment of growth hormone secretion in children. *Keio J Med* 39:173-186
282. **Zachow RJ, Weitsman SR, Magoffin DA** 1999 Leptin impairs the synergistic stimulation by transforming growth factor-beta of follicle-stimulating hormone-dependent aromatase activity and messenger ribonucleic acid expression in rat ovarian granulosa cells. *Biol Reprod* 61:1104-1109
283. **Zhang WM, Lin HR, Peter RE** 1994 Episodic growth hormone secretion in the grass carp, *Ctenopharyngodon idellus* (C. & V.). *Gen Comp Endocrinol* 95:337-341
284. **Zhang Y, Proenca R, Maffei M, Barone M, Leopold L, Friedman JM** 1994 Positional cloning of the mouse obese gene and its human homologue. *Nature* 372:425-432
285. **Zheng JX, Liu ZZ, Yang N** 2007 Deficiency of growth hormone receptor does not affect male reproduction in dwarf chickens. *Poult Sci* 86:112-117
286. **Zhu LJ, Krempels K, Bardin CW, O'Carroll AM, Mezey E** 1998 The localization of messenger ribonucleic acids for somatostatin receptors 1, 2, and 3 in rat testis. *Endocrinology* 139:350-357
287. **Zieba DA, Amstalden M, Morton S, Gallino JL, Edwards JF, Harms PG, Williams GL** 2003 Effects of leptin on basal and GHRH-stimulated GH secretion from the bovine adenohypophysis are dependent upon nutritional status. *J Endocrinol* 178:83-89
288. **Zipf WB, Payne AH, Kelch RP** 1978 Prolactin, growth hormone, and luteinizing hormone in the maintenance of testicular luteinizing hormone receptors. *Endocrinology* 103:595-600