

2  
25

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

Unidad Académica de los Ciclos Profesional  
y de Posgrado del C.C.H.

Instituto de Investigaciones Biomédicas

"PURIFICACION DE PROLACTINA DE POLLO"

que para obtener el Título de  
Licenciado en Investigación  
Biomédica Básica  
p r e s e n t a

Jaime García-Moreno Meade

México, D.F.

Agosto de 1990.

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN



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 está 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.

## CONTENIDO

Abreviaturas	3
Introducción	5
Hipófisis	6
Origen celular de la prolactina y control de su síntesis	6
Filogenia de la prolactina	7
Características funcionales de la prolactina	11
Prolactina en aves	11
Relaciones estructura-función	15
Purificación de prolactinas	17
Objetivos	20
Material y métodos	21
Reactivos	21
Equipo	21
Material biológico	23
Extracción de proteínas hipofisiarias	23
Determinación de proteínas	25
Métodos cromatográficos convencionales	25
Cromatografía de inmunoafinidad	27
Sistemas analíticos	28
Resultados	31
Titulación del anticuerpo	31
Cromatografías de intercambio iónico	33
Cromatografías de filtración en gel	41
Cromatografías de inmunoafinidad	46
Isoelectroenfoque	52
Discusión	56
Conclusiones	65
Apéndice 1	
Determinación de la concentración de proteína	66
Apéndice 2	
Métodos cromatográficos	67
Apéndice 3	
Electroforesis en geles de poliacrilamida (SDS-PAGE)	68
Apéndice 4	
Electroforesis en condiciones nativas (Tris-PAGE)	69

Apéndice 5	
Isoelectroenfoque analítico	70
Apéndice 6	
Tinciones para geles	72
Apéndice 7	
Dot-blot	73
Apéndice 8	
Electrotransferencia	74
Apéndice 9	
Inmunoadsorción	75
Bibliografía	77

## ABREVIATURAS

Ac	anticuerpo (s)
ACTH	corticotropina
ADH	hormona antidiurética
AMPc	monofosfato de adenosina ciclizado
AUFS	unidades de absorbencia en la escala completa
BSA	albúmina de suero bovino
cGH	hormona de crecimiento de pollo
CM-celulosa	carboximetil celulosa
col (s)	colaboradores
Con A	concanavalina A
cPRL	prolactina de pollo
d	dalton
DEAE-celulosa	dietyl aminoetil celulosa
DNA	acido desoxirribonucleico
ET	electrotransferencia
FSH	hormona estimulante del foliculo
g	gramos
GH	hormona de crecimiento
HGH	hormona de crecimiento humana
hPL	lactógeno placentario humano
HPLC	cromatografía líquida de alta presión
hr (s)	hora(s)
IEF	isoelectroenfoque
IET	inmunolectrotransferencia
IgG	inmunoglobulina G
LH	hormona luteinizante

M	molar
mA	miliamperios
ug	microgramos
min	minutos
ml	mililitros
nm	nanómetros
oGH	hormona de crecimineto ovina
oPRL	prolactina ovina
PAGE	electroforesis en geles de acrilamida
PBS	solución salina de fosfatos
pI	punto isoeléctrico
PM	punto isoeléctrico
PMSF	fenil-metil-sulfonil-fluoruro
PRL	prolactina
Rf	movilidad relativa
RIA	radioinmunoensayo
RNA	acido ribonucleico
rpm	revoluciones por minuto
SDS	dodecil-sulfato de sodio
SDS-PAGE	electroforesis en presencia de SDS
T <sub>3</sub>	triyodotironina
T <sub>4</sub>	tiroxina
TEMED	N,N,N',N'-tetrametiléndiamina
TRH	hormona liberadora de la tirotropina
Tris	hidroximetilaminometano
Tris-PAGE	electroforesis en condiciones nativas
W	watts

## INTRODUCCION

A través de millones de años de evolución, desde su aparición hasta nuestros días, la vida se ha ido haciendo cada vez más compleja. Para lograr esto se han tenido que desarrollar sistemas organizadores e integradores que permiten la coexistencia de varios sistemas, involucrados en las más diversas tareas, funcionando de manera armónica y organizada. La integración de las funciones corporales depende tanto del sistema nervioso como del sistema endócrino. Aún estos mismos sistemas integradores requieren de un "centro de control", y para el caso del sistema endócrino la glándula hipófisis podría ser considerada como el elemento organizador.

### Hipófisis

Esta glándula se sitúa en la base del cráneo dentro de la cavidad esfenooidal denominada "silla turca". Es una glándula endócrina, por verter sus secreciones directamente al torrente sanguíneo. En los mamíferos se compone de dos lóbulos cuyo origen embrionario es distinto: el lóbulo anterior o adenohipófisis, que se deriva de una evaginación del ectodermo llamada bolsa de Rathke, y el lóbulo posterior o neurohipófisis, que deriva del ectodermo neural del piso del cerebro anterior. La glándula se conecta al hipotálamo por el tallo hipofisiario y se comunica con el mismo por medio de un conjunto de vasos sanguíneos llamados sistema porta hipotalámico-hipofisiario. A través de estos vasos es que el hipotálamo hace

llegar a la adenohipófisis sus factores liberadores para ejercer control sobre la producción de las distintas hormonas (1-4).

La glándula hipófisis secreta una gran cantidad de hormonas, entre las que sobresalen por su importancia la tirotropina (TSH), la corticotropina (ACTH), las gonadotropinas (FSH y LH), la hormona de crecimiento (GH) y la prolactina (PRL). Las tres primeras ejercen su acción directamente sobre otra glándula, mientras que la GH y la prolactina tienen una gama de tejidos blanco muy amplia. La hormona de crecimiento en ocasiones requiere de la intervención de intermediarios (somatomedinas) para ejercer sus acciones fisiológicas, mientras que la prolactina a veces actúa con otras sustancias (sinlactinas) sinérgicamente (5-7).

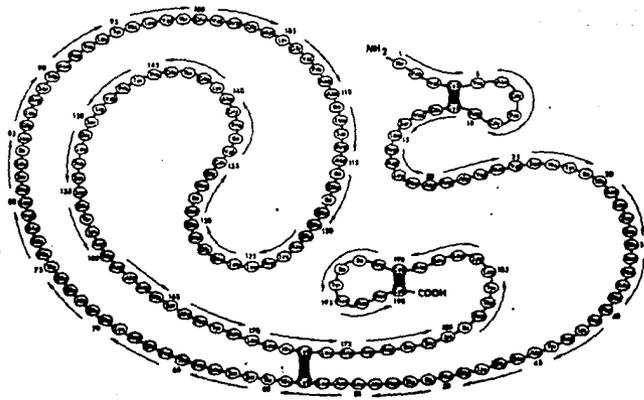
#### Origen celular de la prolactina y control de su síntesis.

La prolactina es sintetizada y secretada por células acidófilas de la hipófisis llamadas lactotrofos, que constituyen en los mamíferos alrededor del 10-20% de la población celular de la glándula. Los lactotrofos poseen una serie de características morfológicas distintivas como un gran núcleo dentro de un citoplasma pequeño, abundante retículo endoplásmico rugoso que se encuentra organizado en paralelo, un complejo de Golgi muy grande y una serie de gránulos en los que se almacena la hormona, cuyo número aumenta durante el embarazo y la lactancia en los mamíferos. (2,8,9) La secreción de esta hormona es controlada a nivel hipotalámico por diversos mecanismos, según la Clase a que se refiera. En los peces existe una innervación directa del hipotálamo a la hipófisis, y éste

ejerce un control inhibitorio sobre la glándula utilizando como mediador a la dopamina. En mamíferos y anfibios el hipotálamo también ejerce un control inhibitorio, en tanto que en las aves, y posiblemente también en los reptiles, el control hipotalámico parece ser tanto inhibitorio como estimulatorio. Existen además toda una serie de factores que inciden sobre la secreción de esta hormona, como la osmolaridad plasmática y las concentraciones de diversas sustancias: hormona liberadora de tirotrópina (TRH), monofosfato cíclico de adenosina ( $AMP_c$ ), hormonas tiroideas ( $T_3$  y  $T_4$ ), esteroides (estradiol  $17$  ( $E_2$ ), cortisol (F), etc) y prostaglandinas de la serie E (8,10-13).

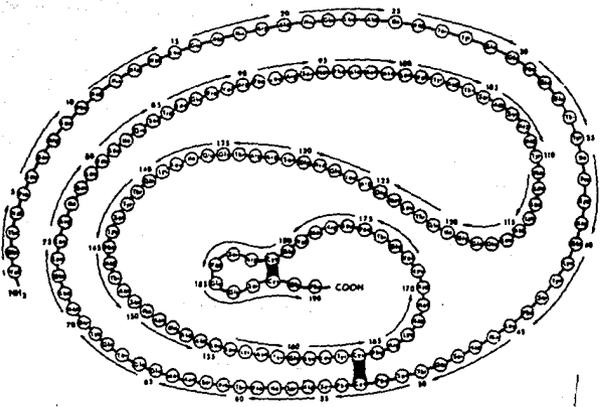
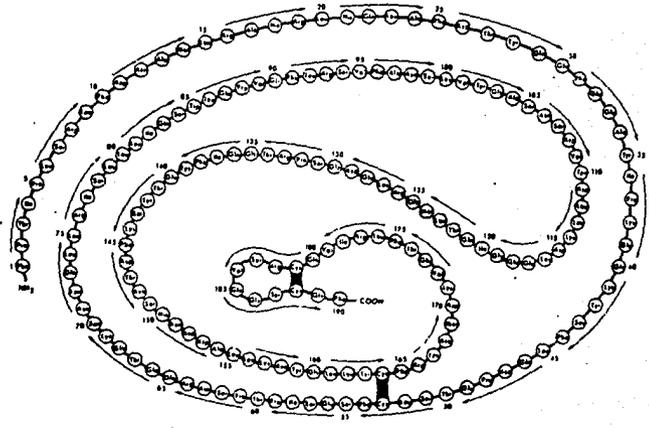
#### Filogenia de la prolactina.

Existen al menos tres hormonas en mamíferos que poseen actividad prolactinoide: la prolactina *per se*, el lactógeno placentario y la hormona de crecimiento. Estas tres moléculas constituyen una familia de hormonas relacionadas tanto funcional como estructuralmente (figura 1). Las tres son proteínas globulares y tienen cerca de 200 aminoácidos, un peso molecular alrededor de 23,000 d y dos (GH, PRL y PL) o tres (PRL) puentes disulfuro. Además existen ciertas regiones que corresponden entre sí, tienen un contenido semejante de alfa-hélice, etc (1,5,8,14-17). Estos datos sugieren que las tres hormonas se derivaron de un gen ancestral que posiblemente produjera una molécula con características tanto de GH como de prolactina hace unos  $5 \times 10^8$  años, es decir, en los inicios de la evolución de los vertebrados (figura 2) (8,14,18-21).



oPRL

hGH



hPL

Fig. 1. Estructura primaria de la prolactina ovina (oPRL), la hormona de crecimiento humana (hGH) y el lactógeno placentario humano (hPL). (Tomadas de la referencia 6).

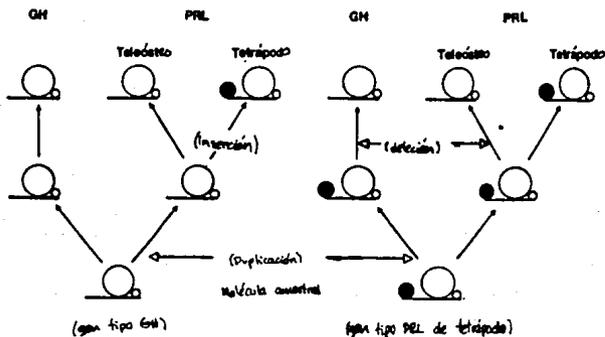


Fig. 7. Divergencia de los genes de prolactina y hormona de crecimiento a partir de un gen semejante a GH o a PRL de tetrápodos. Los círculos representan las asas que se forman en las moléculas por los puentes disulfuro. Si se parte de un gen semejante a GH debe haber ocurrido una duplicación y, más tarde, una inserción en la línea de las prolactinas de tetrápodos que origina una tercera asa. Si se parte de un gen semejante a prolactina de tetrápodos debe haber ocurrido una duplicación y luego una delección en las líneas de prolactinas de teleosteos y de GH. (tomada de la referencia 21).

En todos los vertebrados, con la posible excepción de los Ciclostomos (lampreas), se ha logrado identificar una hormona semejante a la prolactina, sin querer implicar con esto que se trate de proteínas idénticas o que desarrollen exactamente las mismas funciones. (8,14,21,88)

En la superclase Peces se ha logrado aislar prolactina de varios teleósteos, que poseen como característica distintiva el tener únicamente dos puentes disulfuro, con lo cual se asemejan más al grupo de las GH (ver figura 2) (21-27). Una molécula semejante a la prolactina de los teleósteos se ha detectado en los elasmobranquios (peces cartilaginosos) y en los Dipnoi (peces pulmonados). La prolactina de estos últimos es la molécula más primitiva de la serie que es activa en el bioensayo clásico utilizado para medir actividad prolactinoide, mediante la estimulación del crecimiento del epitelio del buche de paloma. (28)

En los tetrápodos la molécula suele tener un amplio espectro de actividades que va desde el fomentar el crecimiento de renacuajos hasta acciones mamotrópicas y luteotrópicas. Parece como si al ir evolucionando los vertebrados aumentaran las actividades biológicas de las prolactinas - las prolactinas de los peces suelen ser funcionales únicamente en los peces, mientras que las de los mamíferos funcionan en prácticamente todas las Clases - aunque no hay que olvidar que en el curso de la evolución las moléculas, pueden además de ganar funciones, perderlas (6,8).

## Características funcionales de prolactina.

La prolactina es probablemente la hormona que posee una mayor versatilidad funcional. Su espectro de actividades abarca más de 100 funciones fisiológicas diferentes que van desde el control de electrolitos hasta acciones mamotropicas y luteotropicas, crecimiento, comportamientos paternos, etc. (tabla I) (8,14,15,21).

De todas las funciones en que la prolactina se ve involucrada una buena parte de ellas puede ser relacionada de una u otra manera con la reproducción y/o con el balance de iones y agua.

Parece que en los organismos homeotermos, aves y mamíferos, las funciones de la prolactina relacionadas con la reproducción adquieren mayor importancia que las relacionadas con la osmoregulación (8,19).

### Prolactina en aves.

#### Balance de iones y agua:

Probablemente la prolactina tiene un efecto indirecto sobre el mantenimiento de la homeostasis osmótica incidiendo sobre los niveles de ingesta tanto de agua como de comida. Se sabe que estimula el apetito en etapas previas a la migración, y que su liberación parece correlacionar con la presión osmótica del plasma. Un aumento de sales induciría un aumento en la presión osmótica que a su vez provocaría la liberación de prolactina, y esto provocaría un aumento en la ingesta de agua y comida, así como una disminución del flujo urinario para lograr el equilibrio osmótico. (8,9,29)

TABLA I (Modificada de la referencia 8)  
ALGUNAS FUNCIONES EJERCIDAS POR LA PROLACTINA

**Ciclóstomos**

- Metabolismo de electrolitos

**Teleósteos**

- Sobrevivencia en agua dulce de peces eurialinos hipofisectomizados.
- Secreción mucosa de la piel, boca, agallas.
- Crecimiento y secreción de vesículas seminales.
- Comportamiento paternal.
- Estimulación de la ATPasa  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  renal.

**Anfibios**

- Transporte de agua y  $\text{Na}^+$  a través de la vejiga de sapo.
- Restauración de niveles plasmáticos de  $\text{Na}^+$  en salamandras hipofisectomizadas.
- Secreción de gelatina oviductal.
- Efecto antiespermatogénico.
- Estimulación del desarrollo glandular de la cloaca.

**Reptiles**

- Efecto antigonadotrópico.
- Restauración de niveles plasmáticos de  $\text{Na}^+$  en lagartijas hipofisectomizadas.
- Efecto diurético en quelonios acuáticos.
- Balance de  $\text{Na}^+$  en tortugas.
- Estimulación del crecimiento de la cola en lagartijas.

**Aves**

- Estimulación de la secreción de la glándula nasal.
- Incremento de la ingesta de agua.
- Incremento de la reabsorción cloacal.
- Producción de la "leche de paloma".
- Formación de las placas de incubación.
- Efecto antigonadal.
- Inquietud premigratoria.
- Comportamiento paternal.

**Mamíferos**

- Lactancia.
- Aumento de la retención de  $\text{Na}^+$  a nivel renal.
- Efecto similar a la hormona antidiurética (ADH).
- Balance de  $\text{Ca}^{++}$ .
- Incremento de colesterol en testículos.
- Efecto luteolítico en ratas.
- Comportamiento paternal.

Algunas aves de los órdenes Falconiformes (rapaces diurnas), Charadriiformes (aves playeras), Anseriformes (patos, gansos y cisnes), y Pelecaniformes (pelicanos, pájaros bobos, fragatas y relacionados), poseen una glándula nasal cuyas secreciones tienen un alto contenido de sales, y es un mecanismo alternativo que tienen para contender con los excesos de sales a que se enfrentan. Esta glándula nasal es estimulada directamente por la prolactina. El estrés por el frío a que se ven sometidas algunas aves les produce deshidratación y un aumento en la osmolaridad plasmática que provoca la liberación de prolactina y el consiguiente aumento de la actividad de la glándula nasal (8,29-31).

#### Reproducción:

a) **Incubación y crianza:** si bien las evidencias que se tienen apuntan a que estas conductas son desencadenadas por la acción de la progesterona, su manutención corre a cargo de la prolactina. Cuando la aves están incubando sus niveles de prolactina alcanzan un máximo y disminuye si se interrumpe el proceso (8,9,32-34).

b) **Formación de las placas de puesta:** la prolactina interviene en este proceso de manera conjunta con los estrógenos. En aves en las que los machos son los encargados de la incubación son ellos los que presentan un nivel más elevado de prolactina, y es posible inducir placas en animales que normalmente no incuban, mediante la administración de esta hormona. Parece ser que las relaciones entre prolactina y los esteroides ováricos en las aves son tan complejas

como en los mamíferos. También se ha sugerido que el contacto físico de la placa con los huevos estimula la secreción de prolactina, de una manera semejante a la glándula mamaria en que el pezón sensibilizado responde a estímulos táctiles que causan su liberación. (8,15,33,34)

c) **Producción de leche de paloma:** dentro del orden Columbiformes, la prolactina se relaciona con la producción de la llamada leche de paloma induciendo la proliferación del epitelio mucoso del buche, así como un aumento en la captura de fosfatos, la cantidad tanto de DNA como de RNA, de ribosomas y de ácidos grasos. Todos estos efectos son aprovechados para medir la actividad de prolactina mediante un bioensayo desarrollado por Nicoll (8,19,28,34).

d) **Efectos gonadales:** se han demostrado efectos inhibitorios tanto directos como indirectos, que son revertidos por la acción de FSH, lo que podría sugerir que el modo de acción de la prolactina en este caso es bloqueando la producción de FSH. También induce un aumento en la respuesta del oviducto a los estrógenos durante el desarrollo del ovario y del oviducto previos a la producción de huevos. (8,35)

e) **Migración:** se le involucra principalmente con la acumulación de grasa en el periodo premigratorio debido a hiperfagia y a la alteración del metabolismo de lípidos. También se le ha asociado con el comportamiento de "inquietud premigratoria" que se caracteriza por

un aumento en la actividad nocturna y direccionalidad de los movimientos. Es importante mencionar que los efectos de la prolactina varían en función de varios factores. Por un lado la época del año y la hora del día son importantes para lograr una respuesta positiva o negativa, pues su ciclo circadiano de liberación está estrechamente relacionado al de corticosterona. En primavera, cuando hay una diferencia de 12 horas entre los picos de liberación de prolactina y corticosterona, sus efectos son progonadales, mientras que en el otoño, cuando este desfase se reduce a 6 hrs, su efecto es antigonal. También es muy importante considerar la especie en la que se hacen los estudios, pues sus efectos no son iguales en las aves migratorias, que en las parcialmente migratorias o en las sedentarias. (8,9,15,36,37)

#### Relaciones estructura-función.

Se han detectado varias isoformas de prolactina circulante. En humanos circulan al menos tres formas con distinto peso molecular que al cromatografiarse por Sephadex G-100 eluyen en fracciones que corresponden a un peso de aproximadamente 23,000 d, 56,000 d, y otra forma de alto peso molecular que eluye en el volumen vacío (1,38). Nyberg y cols. obtuvieron variantes de carga, tres bandas inmunorreactivas por electroforesis, una de las cuales se resuelve, además, en dos componentes por isoelectroenfoque (5,39). Este polimorfismo no parece exclusivo de la prolactina humana (40-43).

Por otra parte, la gama de actividades en que se ve involucrada esta hormona es amplísima (ver tabla I). Se ha intentado explicar

esta multifuncionalidad, que incluye actividades a primera vista antagónicas, con varias hipótesis:

- Diferentes dominios activos en una misma molécula estimulan distintas respuestas. Se ha intentado correlacionar funciones de la hormona con regiones determinadas de la misma, y se han hecho estudios similares con otras hormonas como la GH, obteniéndose evidencias que apoyan la idea (17,21,40,44-49).

- Existencia de familias de proteínas, es decir, moléculas con características muy semejantes aunque no idénticas. Las diferencias entre ellas pueden originarse por muy diferentes causas: fenómenos genómicos, procesamiento diferencial del RNA, proteólisis, adición de grupos químicos, etc. También se han encontrado múltiples evidencias en favor de esta hipótesis (38,39,41,50-58).

- Heterogeneidad de receptores: esta hipótesis involucra a la otra parte del sistema, los receptores, proponiendo que según el tipo de receptor al que se une la molécula sería la respuesta desencadenada (6,53).

Ninguna de estas hipótesis es mutuamente excluyente, y seguramente la visión más cercana a lo que ocurre en realidad es una combinación de todas ellas.

## Purificación de prolactinas.

Dada la importancia que tiene esta hormona en la regulación de diversos procesos, así como su multifuncionalidad, se han hecho varios intentos de purificarla para así entender mejor su funcionamiento. Independientemente del caso de la prolactina humana, los primeros intentos de purificación de esta hormona en otras especies fueron impulsados por el desarrollo de la técnica de RIA. Ya con algunas prolactinas de mamíferos aisladas se comenzaron a hacer estudios de endocrinología comparada y también se encontró que es un buen modelo para hacer estudios de correlación estructura-función. Actualmente se han aislado prolactinas de todas las clases de vertebrados que se sabe que la tienen, y se buscan nuevas metodologías que incrementen los rendimientos. También hay interés en aislar prolactina de las más variadas fuentes para enriquecer los estudios comparativos, y poder entender más claramente su filogenia.

Los sistemas que se han empleado normalmente para su purificación involucran extracciones ácidas o alcalinas, precipitaciones, y diversos sistemas de cromatografía. En la tabla II se muestran los sistemas cromatográficos empleados en la purificación de algunas prolactinas.

Como se aprecia en la tabla, los métodos cromatográficos usuales han permitido la purificación de prolactinas de todos los grupos de vertebrados. No son los únicos sistemas, pues se han usado desde métodos que comprenden únicamente extracciones y precipitaciones sucesivas, manejando variables como la temperatura, el pH, etc., sin incorporar ningún paso cromatográfico (54), hasta métodos que

**TABLA II**  
**SISTEMAS CROMATOGRÁFICOS EMPLEADOS EN LA PURIFICACION DE DISTINTAS**  
**PROLACTINAS.**

PECES	Anguila	Sephadex G-75	(22)
	Salmón	Sephadex G-100, CM-celulosa	(23,24,27)
	Tilapia	Sephadex G-100, DEAE-celulosa	(26)
ANFIBIOS	Sapo	Sephadex G-100, DEAE-celulosa	(59)
	Rana	Sephadex G-100, DEAE-celulosa	(60)
REPTILES	Tortuga marina	Sephacryl S-200, DEAE-celulosa	(61)
AVES	Pollo	Sephadex G-100, DEAE-celulosa	(62)
	Pavo	Sephadex G-100, DEAE-celulosa	(63)
	Avestruz	Sephadex G-100, DEAE-celulosa	(64)
MAMIFEROS	Caballo	Sephadex G-100, DEAE-celulosa	(45)
	Cabra	Sephadex G-100, DEAE-celulosa	(65)
	Ballena	Sephadex G-100, DEAE-celulosa	(66)
	Perro	Sephadex G-100	(67)
	Ratón	Sephadex G-100	(42)
	Humano	Sephadex G-100	(1,39)

utilizan no solamente los sistemas cromatográficos convencionales, sino los más sofisticados como el HPLC (51) y la inmunoadsorción (70), pero sí son los sistemas que se han empleado de manera casi rutinaria. La purificación típica comprendería una extracción seguida usualmente por un paso de precipitación y después dos cromatografías, una de filtración en gel y otra de intercambio iónico, aunque se han hecho múltiples variantes a este esquema básico.

## OBJETIVOS

1- Desarrollar una metodología que permita la purificación de la prolactina de pollo, con la idea de poder efectuar con ella estudios de estructura-función.

2- Iniciar la caracterización de la hormona, aprovechando las distintas técnicas que permiten efectuar un conocimiento inicial de la proteína aún antes de tener purificada a la molécula.

3- Discernir si la prolactina de pollo también muestra heterogeneidad molecular, tal como se ha descrito para especies de mamíferos.

## MATERIAL Y METODOS.

### Reactivos

El agua utilizada para todas las soluciones fue desionizada en un aparato Milli-Q de Millipore.

El anticuerpo contra prolactina de pollo fue donado por el Dr. A.F. Parlow. Es un anticuerpo policlonal obtenido en conejo, diluido 1:40 en PBS con suero normal de conejo al 2% y Merthiolate al 0.1% .

El 2º anticuerpo (IgG de cabra anti-IgG de conejo acoplada a peroxidasa) fue obtenido de Bio-Rad.

Los reactivos utilizados para las electroforesis fueron todos de Bio-Rad, al igual que los de las electrotransferencias.

Las resinas para las cromatografías de intercambio iónico (DEAE-celulosa y CM-celulosa) fueron de Whatman. La resina para las cromatografías de filtración en gel (Sephadex G-100) fue de Sigma. La Sepharosa 4B activada con CNBr para la inmunoadsorción se obtuvo de Pharmacia.

Todos los demás reactivos utilizados fueron de grado analítico.

### Equipo

Para las electroforesis se utilizó una cámara Mini-Protean II y una fuente de poder 200/500, ambos de Bio-Rad.

Para las electrotransferencias se utilizó una cámara Trans-Blot, una fuente de poder 250/2.5 y membranas de nitrocelulosa, todo de Bio-Rad.

Los geles de poliacrilamida se destifieron en un destefidor 556 de Bio-Rad.

Rutinariamente se utilizaron los siguientes aparatos: potenciómetro MB4 de Radiometer (Copenhagen), espectrofotómetro Gilford Instrument 250, liofilizadora LabConco y concentrador Savant SVC 100H.

Para las cromatografías se utilizó un colector Ultrorac II 2070, un espectrofotómetro Uvicord S 2138, un monitor de pH y de iones 2195, un graficador de 2 canales 2210 y una bomba peristáltica Microperpex 2132, todos de LKB-Bromma. Los gradientes se hicieron con un formador de gradientes GM-1 de Pharmacia.

Para la purificación por inmunoafinidad se utilizó un agitador "extremo a extremo" Milli-Gen 504 y una microfuga B de Beckman.

Se utilizó un aparato Bio-Dot de Bio-Rad, para la aplicación de un número grande de muestras en la realización de "dot-blots".

Para el isoelectroenfoco se utilizó una cámara Bio-Phoresis para IEF horizontal, de Bio-Rad, con los aditamentos necesarios y una fuente de poder de alto voltaje Bio-Rad 3000 Xi.

## Material Biológico

Para purificar a las hormonas de interés en nuestro laboratorio (GH y PRL) se partió de hipófisis de pollos de la raza Filch (7-8 semanas de edad) obtenidas en el rastro "Procesadora de Aves de Morelos", ubicado en Cuernavaca, Mor. Se disectaron de cabezas de pollos recién sacrificados y se congelaron las glándulas inmediatamente con hielo seco provisionalmente hasta ser almacenadas en un congelador REVCO a  $-70^{\circ}\text{C}$  en el laboratorio.

### Extracción de proteínas hipofisiarias.

Todos los pasos referentes a la extracción de proteínas se realizaron a  $4^{\circ}\text{C}$ .

**a) Homogeneización:** Las glándulas se homogeneizaron en una solución acuosa de inhibidores de proteasas: Fenil-metil-sulfonil-fluoruro (PMSF) 0.5 mM y aprotinina 50 KIU (Unidades de kaliceína)/ml ajustados a pH 7.2. Se añadieron unos 2.5 ml de solución por gramo de tejido. Se dieron 12 golpes con un homogeneizador Potter-Elvehjem, y se ajustó el volumen para obtener unos 3 g de tejido/10 ml de solución.

**b) Alcalinización:** El homogeneizado se llevó a 9.5 con una solución de  $\text{Ca}(\text{OH})_2$  y se dejó en agitación 15 min. Posteriormente se centrifugó a 11,500 rpm (aproximadamente  $10,000 \times g$ ) durante 20 min.

en una centrifuga Sorvall RC5-B con rotor de ángulo fijo SS34. Se tomó el sobrenadante para continuar su procesado.

**c) Precipitación con  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ :** El sobrenadante alcalino se precipitó con sulfato de amonio. Primeramente se añadió, gota a gota y con agitación constante, una solución saturada de sulfato de amonio hasta que la solución tuviera un 20% de saturación. Se dejó agitando durante 15 min. y se centrifugó a  $10,000 \times g$  durante 30 min. a  $4^\circ\text{C}$  utilizando el mismo rotor y la misma centrifuga antes mencionados. El sobrenadante fue sometido a una precipitación salina al 50% de saturación de igual manera a la primera precipitación. Se tomó el precipitado y se resuspendió en agua. Si se cromatografía este extracto por una columna de DEAE-celulosa, el material no adsorbido es una fracción rica en cGH, denominada BDE-1, mientras que la fracción que se eluye con un amortiguador de alta fuerza iónica, fracción BDE-4, es rica en prolactina (52).

**d) Diálisis y liofilización:** El material fue dializado exhaustivamente contra agua durante 36 hrs, cambiándose el agua de diálisis varias veces. Se utilizaron bolsas de diálisis Spectrapor No.1, con un límite de exclusión de 6000-8000 d. Posteriormente se procedió a liofilizar en una liofilizadora LabConco.

## Determinación de Proteínas

Se siguió el método de Lowry y col. (71) modificado por Waterborg y Mattheus (72), para hacer las determinaciones de proteínas. El método y los reactivos se detallan en el apéndice 1.

## Métodos cromatográficos convencionales

Menciono las diferentes técnicas cromatográficas utilizadas, así como las condiciones bajo las que se corrieron las muestras. En el apéndice 2 se explica detalladamente la preparación de las resinas y el montaje de las columnas.

a) **DEAE-celulosa:** la primera cromatografía se realizó bajo las siguientes condiciones:

Temperatura: 4°C.  
Amortiguador: NaOH 25 mM y H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub> 95 mM, pH 8.  
Gradiente: NaOH 50 mM y KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 85 mM, pH 7.2.  
Alta fuerza iónica: Acetato de amonio 10 mM y NaCl 1 M, pH 4.  
Velocidad del papel: 0.5 mm/min.  
Longitud de onda: 280 nm.  
Escala: 0.5 AUFS.  
Flujo: 0.4 ml/min.  
Fracciones: 4 ml.

Para la segunda cromatografía se utilizó una columna de 20 cm de largo, con un diámetro interno de 1 cm, y se corrió bajo las siguientes condiciones:

Temperatura: 4°C  
Amortiguador: Tris-HCl 30 mM, pH 7.4  
Gradiente: Amortiguador + NaCl [0-1 M]  
Cambio de pH:  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$  1 M  
Velocidad del papel: 0.5 mm/min  
Longitud de onda: 280 nm  
Escala: 0.5 AUFS  
Flujo: 0.6 ml/min  
Fracciones: 3 ml (5 min)

Para la tercera cromatografía se utilizó la misma columna bajo las mismas condiciones, con la excepción del gradiente, que fue formado de la misma manera (Amortiguador + NaCl), pero la concentración del NaCl fue llevada únicamente hasta 600 mM.

b) **CM-celulosa:** la cromatografía se hizo en una columna de las mismas dimensiones que la utilizada para las cromatografías en DEAE-celulosa, y se corrió bajo las siguientes condiciones:

Temperatura: 4°C  
Amortiguador: Acetato de amonio 50 mM, pH 4.6  
Gradiente: Acetato de amonio 200 mM, pH 9.0  
Velocidad del papel: 0.5 mm/min  
Longitud de onda: 280 nm  
Escala: 0.2 AUFS  
Flujo: 0.62 ml/min  
Fracciones: 3 ml (4.8 min)

c) **Filtración en gel:** para la cromatografía en amortiguador alcalino se utilizó una columna de 85 cm de largo y con un diámetro interno de 1.6 cm. Se corrió bajo las siguientes condiciones:

Temperatura: 4°C  
Amortiguador:  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$  50 mM  
Velocidad del papel: 0.5 mm/min  
Longitud de onda: 280 nm  
Escala: 0.2 AUFS  
Flujo: 0.4 ml/min  
Fracciones: 3 ml (7.5 min)

Para la cromatografía utilizando un amortiguador ácido se utilizó una columna de 45 cm de largo por 1 cm de diámetro interno que se corrió bajo las siguientes condiciones:

Temperatura: 4°C  
Amortiguador: CH<sub>3</sub>COOH 0.1 M  
Velocidad del papel: 0.2 mm/min  
Longitud de onda: 280 nm  
Escala: 0.5 AUFS  
Flujo: 0.14 ml/min  
Fracciones: 2 ml (15 min)

#### Cromatografía de inmunoadfinidad.

Las fracciones resultantes de la filtración en gel fueron sometidas a una cromatografía de inmunoadfinidad por el método de "batch" debido al pequeño volumen que se manejó.

El inmunoabsorbente se preparó de la siguiente manera: se pesaron 4.3 mg de Sepharosa 4B activada con CNBr y a ella se acoplaron 50 ul de anticuerpo. El recipiente fué un tubo eppendorf de 1.5 ml siliconizado previamente con Photo-flo diluido 1:20. Para ver los detalles del método véase el apéndice 9.

La muestra, 0.5 mg de proteína total, se disolvió con 200 ul de amortiguador de aplicación (fosfatos 50 mM, NaCl 0.9%, pH 7.6) y se leyó su densidad óptica a 280 nm. Luego se puso a reaccionar por, al menos, 30 min. (generalmente 45 min.) con la resina con agitación. Pasado el tiempo se centrifugó por 1 min. en la microfuga y se tomó el sobrenadante, al que se le leyó su absorbencia. Posteriormente se añadieron 200 ul del amortiguador de elución (glicina-HCl 50 mM, NaCl 0.9%, pH 3) a la resina y se agitaron durante al menos 30 min.

Transcurrido este lapso se centrifugó igual que antes y se tomó el sobrenadante al que se le tomó lectura en el espectrofotómetro y se almacenó a  $-20^{\circ}\text{C}$  agregando 20 ul de Tris-HCl 0.5 N, pH 8.0, para neutralizar.

Antes de poner otra muestra a reaccionar con la resina, hay que lavarla con al menos 200 ul de amortiguador de aplicación.

### Sistemas Analíticos.

Se utilizaron diversos sistemas tanto para identificar a la prolactina como para comenzar a caracterizarla.

**a) Electroforesis en geles de poliacrilamida (SDS-PAGE):** Este sistema permite la separación de proteínas en base a su peso molecular. Se siguió el método de Laemmli (73) en geles de  $55 \times 100 \times 1$  mm al 12.5% de poliacrilamida en la región resolvidora, y de  $15 \times 100 \times 1$  mm al 4% de poliacrilamida en la región concentradora. Se utilizaron condiciones desnaturizantes en todos los casos: 5% de mercaptoetanol y hervir las muestras durante 8 min. Se corrieron a 100 V en el gel concentrador y a 200 en el resolvidor. Los detalles de la técnica se explican en el apéndice 3. Los geles se tificaron con azul de Coomassie, con plata, o se electrotransfirieron a membranas de nitrocelulosa para hacer una inmunotinción específica. Las tinciones utilizadas se describen en el apéndice 6.

**b) Electroforesis en condiciones nativas (Tris-PAGE):** Esta técnica permite la separación de proteínas sin desnaturizarlas, en

base a su carga eléctrica neta principalmente, aunque también influye el tamaño molecular. Se siguió la técnica de Nicoll y Licht (74), detallada en el apéndice 4, realizada en geles hechos en placa de las mismas dimensiones que los de SDS. Se corrieron a 50 V en la zona concentradora y a 100 V en la resolvidora. Los geles se tñieron con azul de Coomassie, con plata, o se electrotransferieron para tñirse con anticuerpo.

**c) Isoelectroenfoque analítico (IEF):** Se utilizó para conocer el punto isoeléctrico de la prolactina. Se siguió el protocolo recomendado por Bio-Rad que se describe en el apéndice 5. Se aplicaron 3 ug de proteína en un volumen de 15 ul y con 0.2 ul de anfolinas. Se inició la corrida a 5 W (potencia constante) y se fue incrementando gradualmente hasta que, después de unas 2.5 hrs. se llegó a 12 W, y así permaneció durante 1.5 hrs. La temperatura fue mantenida todo el tiempo a 4°C. Al terminar la corrida el gel fue electrotransferido y tñido con anticuerpo.

**d) Dot-blot:** Con esta técnica se pudo identificar a la prolactina en las distintas fracciones cromatográficas que se iban originando a lo largo de la purificación. Se siguió la técnica descrita por Bio-Rad, misma que se describe en el apéndice 7.

**e) Electrotransferencia:** se utilizó para transferir proteínas de los geles a membranas de nitrocelulosa y tñir con anticuerpo específico para así determinar cuales bandas correspondían a la hormona. La técnica seguida es la descrita por Towbin y cols (75).

Los detalles se encuentran en el apéndice 8. Se dejó equilibrando el gel durante 1 hr en el amortiguador de transferencia antes de transferir durante 30 min a 200 mA.

## RESULTADOS

### Titulación del anticuerpo.

Puesto que gran parte del seguimiento de la prolactina se haría, por medio de técnicas inmunológicas, lo primero que se hizo fue titular al anticuerpo. Se probó primeramente en distintas diluciones con prolactina de pavo pura (donada por el Dr. John Proudman, USDA), y posteriormente se repitió la titulación con la fracción BDE-4, que como se mencionó anteriormente, se sabía que estaba enriquecida en PRL. En la figura 3 se muestran los resultados de esta última titulación. Se hicieron varios dot-blot's poniendo dos muestras de BDE-4 en cada tira: una de 100 ng y otra de 500 ng, y se probaron varias diluciones del anticuerpo: 1:200, 1:2000, 1:10,000 y 1:20,000. Como el anticuerpo utilizado ya estaba diluido 1:40, las diluciones reales que se usaron fueron: 1:8,000, 1:80,000, 1:400,000 y 1:800,000. Se puede ver que en todos los casos hubo una reacción positiva fácilmente visible, pero para asegurar resultados se decidió utilizar la dilución 1:80,000 para todos los experimentos.

Con el anticuerpo titulado, se verificó que fuera específico para prolactina y que no cruzara con cGH. Esto también se hizo usando la técnica de dot-blot. En distintas tiras se pusieron muestras de distintas fracciones que se originan al purificar cGH, y también de cGH pura en distintas cantidades. Únicamente hubo resultados positivos en las fracciones que se presumía que tenían prolactina, y cGH dió una reacción muy tenue solamente cuando se puso en cantidades excesivas (5 ug).

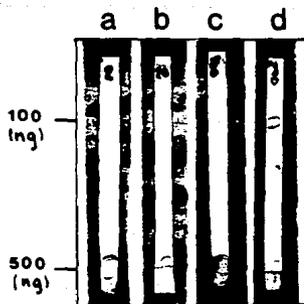


Fig. 3. Titulación del anticuerpo contra prolactina de pollo utilizando fracciones BDE-4. Cada tira tiene dos aplicaciones, una de 100 y otra de 500 ng de esta fracción. Las diluciones del anticuerpo son: 1:200 (a), 1:10,000 (b), 1:10,000 (c) y 1:20,000 (d). Para obtener la dilución real hay que multiplicar por 40, pues el anticuerpo está diluido 1:40 en PBS con suero normal de conejo al 2% y mercaptolato 0.1%.

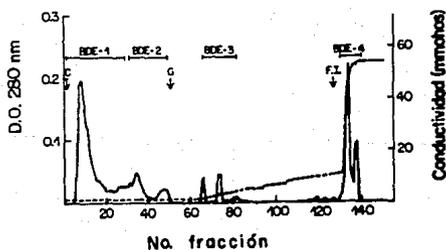


Fig. 4. Cromatografía en DEAE-celulosa del extracto hipofisario. Condiciones: flujo, 0.4 ml/min; fracciones, 4 ml; dispensador, 32.5 x 0.5 cm; abreviaturas: C, cargado; F.I., alta fuerza iónica.

## Cromatografías de intercambio iónico.

Al cromatografiar el extracto de hipófisis de pollo por una columna de DEAE-celulosa se eluyen dos fracciones, denominadas BDE-1 y BDE-2, con el amortiguador inicial (figura 4); la fracción llamada BDE-3 eluye con el gradiente, y la fracción conocida como BDE-4 eluye con el amortiguador de alta fuerza iónica. La fracción BDE-1 corresponde a cGH purificada, mientras que la BDE-4, como ya se ha dicho, es rica en cPRL.

La fracción BDE-4 se cromatografió después en una columna de DEAE-celulosa bajo diferentes condiciones (ver material y métodos). En la figura 5 se muestra un cromatograma típico de este paso. Aparecen varios picos (cinco), algunos de ellos sobrelapados, que se denominaron, según el orden de elución, BDE-4.1, BDE-4.2, BDE-4.3, BDE-4.4 y BDE-4.5. (Se escogió una nomenclatura tal que el nombre mismo de las fracciones permita conocer su procedencia. Así, la fracción BDE-4.4.4 sería el cuarto pico resultante de la cromatografía de la fracción BDE-4.4, que a su vez sería el cuarto pico de la cromatografía de la fracción BDE-4, etc.). De estos, los principales son los dos picos denominados BDE-4.4 y BDE-4.5, que eluyen a concentraciones de aproximadamente 360 mM y 570 mM de NaCl, respectivamente. El pico BDE-4.4 se sobrelapa con otro pico en su parte ascendente, formándose un hombro que se trató de manera separada y se denominó BDE-4.3. El primer pico que se observa, BDE-4.1, corresponde a la fracción rica en cGH, y su tamaño varía según el grado de enriquecimiento que haya de esta hormona. Como las muestras utilizadas son fracciones carentes de GH, pues ésta fue

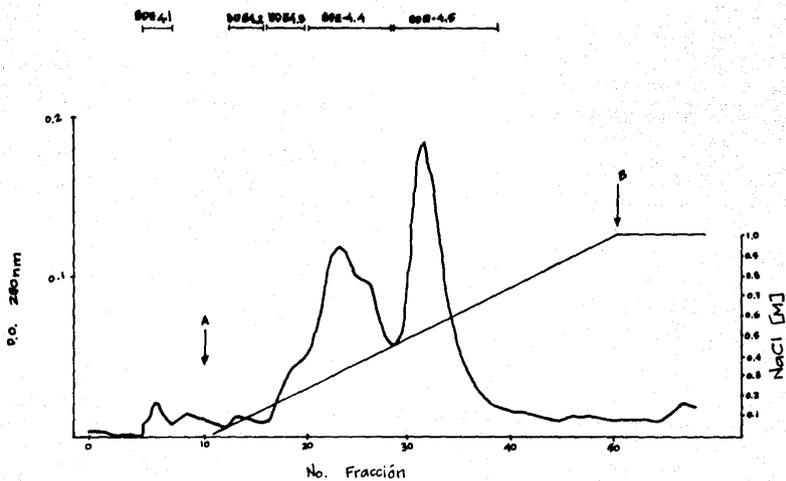


Fig. 5. Cromatografía en NEAE-celulosa de la fracción ME-4. Condiciones: flujo, 0.4 ml/min; fracciones, 3 ml; dimensiones, 20 x 1 cm. As. gradiente de NaCl; B: ME<sub>2</sub>, I H.

removida durante el primer paso cromatográfico (fracción BDE-1), es normal que su tamaño sea usualmente pequeño. Regularmente se obtuvieron otros picos de menor importancia, siendo el más constante el denominado BDE-4.2, que delimitaba la frontera entre las fracciones retenidas y las no retenidas.

Todas las fracciones señaladas en el cromatograma se juntaron para someterlas a diálisis y liofilización, y se analizaron con al menos dos de los sistemas analíticos que se mencionan en la sección de material y métodos. En la figura 6 se presenta una electrotransferencia teñida con anticuerpo de una electroforesis de SDS en condiciones reductoras. Los carriles que están teñidos corresponden a la fracción BDE-4 y a las fracciones BDE-4.4 BDE-4.5. Los demás carriles no muestran ninguna reacción con el anticuerpo. Las 3 bandas principales que se aprecian corresponden a pesos moleculares de aproximadamente 29,500, 27000, y 12,500 d. La figura 7 muestra una electrotransferencia similar a la de la figura 6, pero originada de una electroforesis en condiciones nativas (ND-PAGE). Nuevamente los carriles que muestran algún tipo de reacción son los correspondientes a BDE-4, BDE-4.4 y BDE-4.5. La banda principal detectada tiene un  $R_f$  de 0.71.

Como siguiente paso se procedió a cromatografiar por la misma columna de DEAE-celulosa a varias fracciones BDE-4.4 juntas. Se presenta un cromatograma típico en la figura 8. Se encuentran elementos semejantes a los del primer cromatograma. La fracción no retenida corresponde a restos de cGH (BDE-4.4.1) y nuevamente hay un pico poco importante en la frontera de lo retenido y lo no retenido (BDE-4.4.2). Se aprecia un solo pico principal deformado en sus

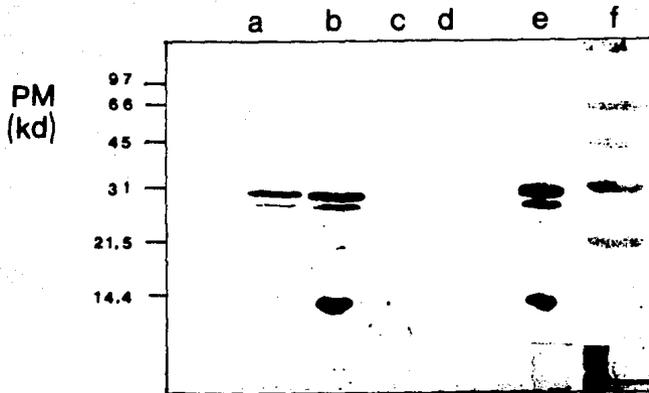


Fig. 6. Electrotransferencia de un SDS-PAGE de las fracciones resultantes de la cromatografía de la fracción BSE-4 por una columna de DEAE-celulosa. Carriles a) BSE-4.3, b) BSE-4.4, c) BSE-4.3, d) BSE-4.1, e) BSE-4, f) marcadores de peso molecular (teñidos con negro anilín).

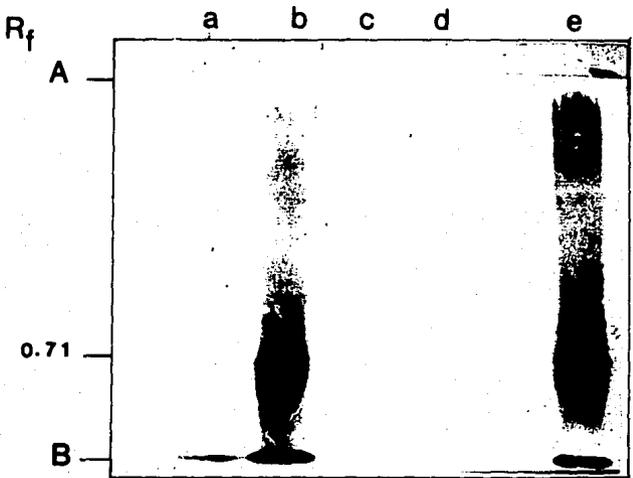


Fig. 7. Electrotransferencia de un MB Tris-PAGE de las fracciones resultantes de la cromatografía de la fracción BSE-4 por una columna de DEAE-celulosa. Carriles a) BSE-4.3, b) BSE-4.4, c) BSE-4.3, d) BSE-4.1, e) BSE-4. A) punto de aplicación; B) frente del colorante.

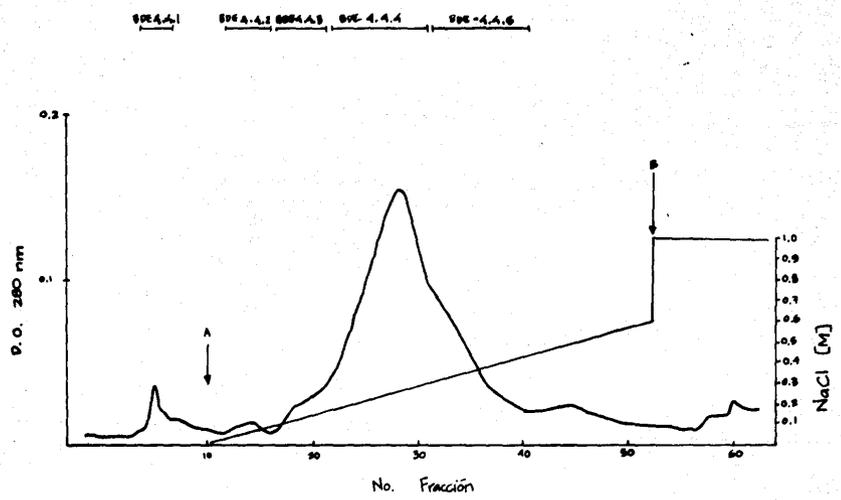
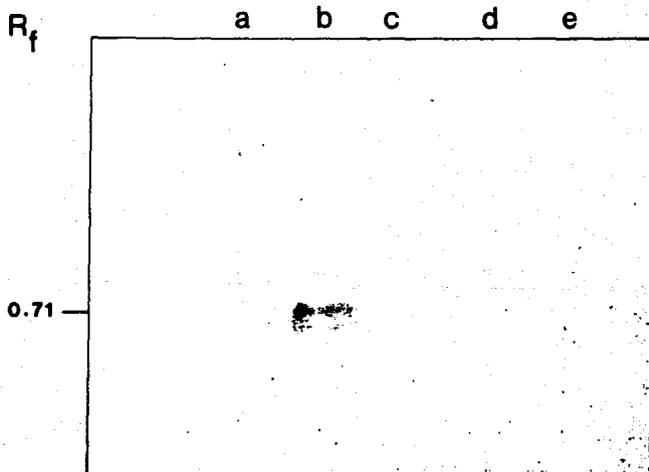
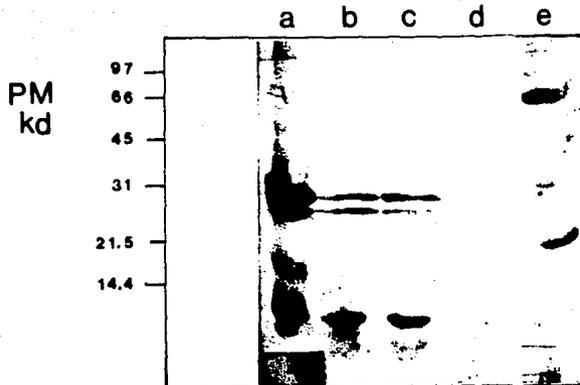


Fig. 9. Cromatografía en DEAE-celulosa de la fracción BPE-4.4. Condiciones: flujo, 0.5 ml/min; fracciones, 3 ml; diámetro, 20 x 1 cm. A: gradiente de NaCl; B:  $MnCl_2$  1 N.

extremos por sobrelaparse con otros picos que no alcanzan a resolverse, aún cuando el gradiente utilizado es más extendido. De manera similar a la primera cromatografía, los hombros se tratan como material aparte y se denominan BDE-4.4.3 al ascendente, y BDE-4.4.5 al descendente. El pico principal es la fracción BDE-4.4.4 y eluye en una molaridad de NaCl algo menor que en la primera cromatografía (280 mM).

Se presentan en las figuras 9 y 10 los resultados de las inmuno-electrotransferencias de geles de SDS-PAGE (fig. 9) y de Tris-PAGE (fig 10). En la primera de ellas se ve reacción en dos carriles, correspondientes a las fracciones BDE-4.4.4 y BDE-4.4.5, y se alcanza a apreciar muy tenue algo de actividad en el carril correspondiente a la fracción BDE-4.4.3. El patrón de bandas es básicamente el mismo que el presentado para el paso anterior: tres bandas inmunorreactivas con pesos moleculares de 29,500, 27,000 y 12,500 d. En la transferencia proveniente del gel de Tris se ve nuevamente reacción en el carril correspondiente a la fracción BDE-4.4.4, y levemente en el de la fracción BDE-4.4.5. También corresponde el  $R_f$  con el presentado en el primer paso de purificación: 0.71.

En este paso la fracción rica en prolactina todavía mostraba una gran cantidad de contaminantes. Para intentar limpiar un poco más se hizo una prueba con una cromatografía en CM-celulosa. El cromatograma presentado en la figura 11 es el resultado del experimento. Se aprecia una fracción no retenida muy grande (CM 1) y dos pequeños picos eluidos con el gradiente (CM 2 y CM 3). Al analizar el contenido de las fracciones obtenidas por medio de un gel de SDS-PAGE transferido y teñido con anticuerpo, se vió que toda la actividad



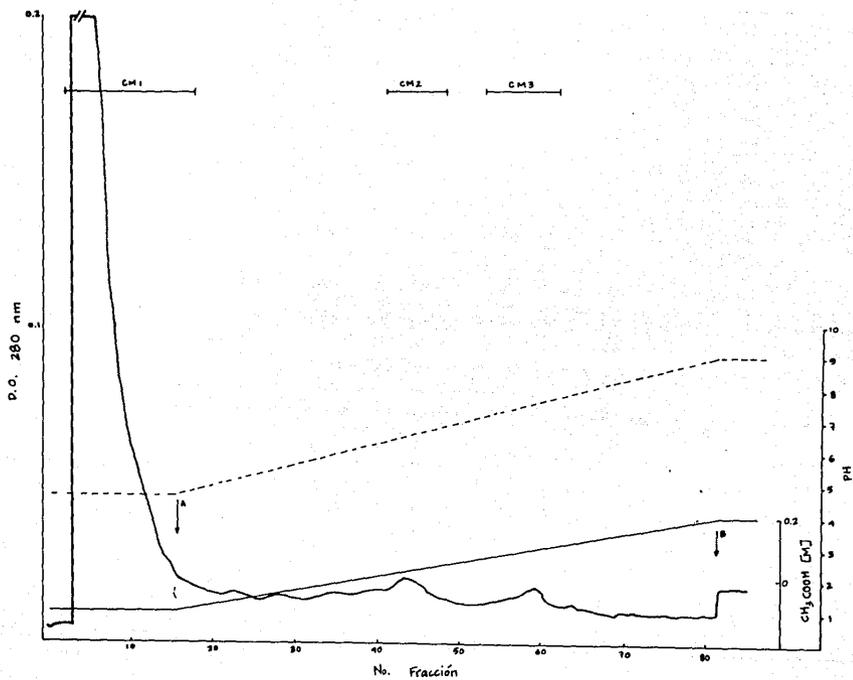


Fig. 11. Cromatografía en CN-celulosa de la fracción BOC-4.4.4. Condiciones: flujo, 0.62 ml/min; fracciones, 3 ml; dimensiones, 20 x 1 cm. A) gradiente de acetato de amonio; B) acetato de amonio 200 mM, pH 7.0.

estaba concentrada en la fracción no retenida, tal como se aprecia en la figura 12.

#### Cromatografías de filtración en gel.

Se procedió entonces a cromatografiar a la fracción BDE-4.4.4 por una columna de filtración en gel utilizando Sephadex G-100 en un amortiguador de  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$  50 mM, tal como está reportado en la literatura.

La columna fué previamente calibrada con azul dextrán y NaCl, y también con una combinación de albúmina, hemoglobina y azul de bromofenol. Se muestra el resultado en la figura 13, en donde se marcan las fracciones correspondientes a los volúmenes vacío y de sal.

Ya con la columna calibrada se cromatografió la fracción antes mencionada. La resolución que se obtuvo no fué la esperada. Se presenta en la figura 14 el cromatograma de este paso en el que es notoria esta situación. La prolactina, según está reportado, debería esperarse en la zona con  $V_e/V_o$  cercano a 2. El pico principal que se ve corresponde prácticamente con el volumen vacío, y como se mencionó antes, no hay una separación completa de las distintas fracciones. La separación que se hizo de ellas se basó, además del cromatograma, en el resultado de un rastreo por dot-blot de todas las fracciones recogidas de la columna. Se muestra en la figura 15 una electrotransferencia teñida con anticuerpo de un SDS-PAGE de las fracciones resultantes de esta cromatografía. A diferencia de los otros pasos, la actividad está distribuida por todas las fracciones,

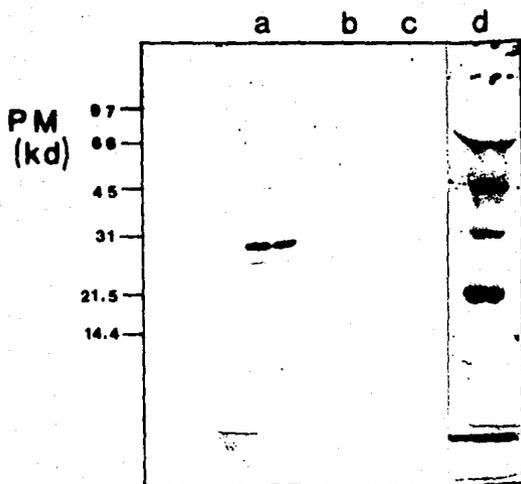


Fig. 12. Electrotransferencia de un gel de SDS-PAGE teñido con anticuerpo de las fracciones resultantes de la cromatografía de la fracción DE-4.4 por una columna de CH-celulosa. Carriles a) CH-1, b) CH-2, c) CH-3, d) marcadores de peso molecular (teñidos con negro azido).

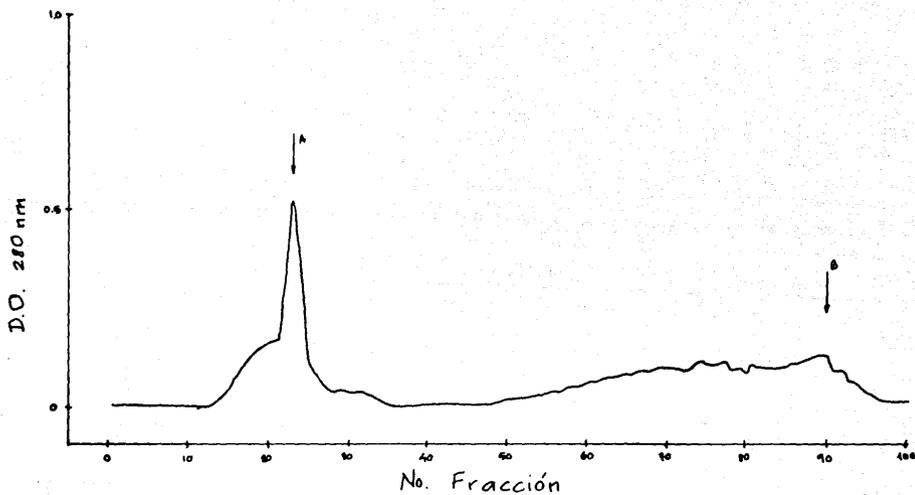


Fig. 13. Cromatografía de la calibración de una columna de filtración en gel (Sephader G-100) con azul de metileno y azul de bromotol. Condiciones flujo, 0.5 ml/min; fracciones, 3 ml; dimensiones, 25 x 1.5 cm. A: volumen vacío (69 ml); B: volumen de sal (270 ml).

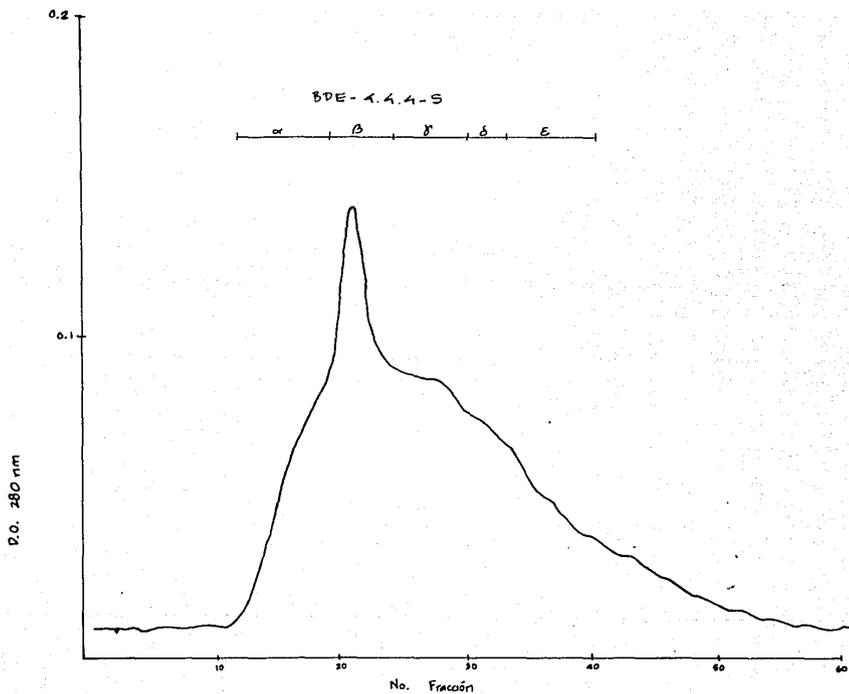


Fig. 14. Cromatografía en Sephadex G-100 de la fracción BDE-4,4,4.  
 Condiciones: flujo, 0.4 ml/min; fracciones, 3 ml; dimensiones, 85 x 1.6 cm.

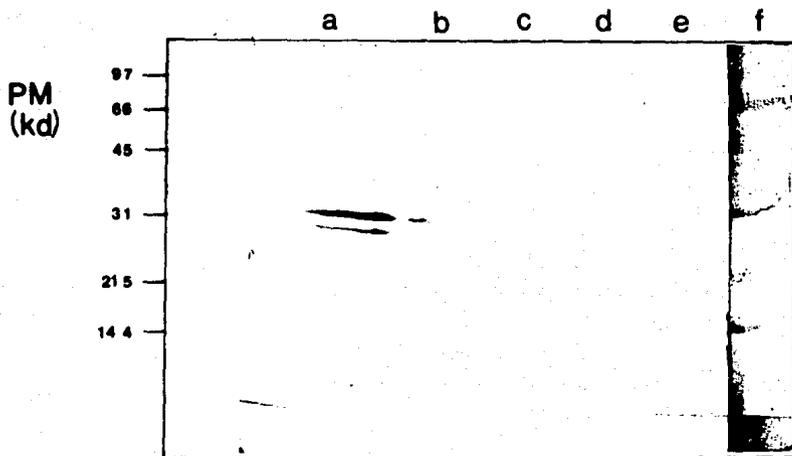


Fig. 15. Electrotransferencia teñida con anticuerpo de un gel de SDS-PAGE de las fracciones resultantes de la cromatografía de la fracción SBE-4.4.4 por una columna de Sephadex G-100. Carriles a) SBE-4.4.4-Sr, b) SBE-4.4.4-Ss, c) SBE-4.4.4-Sr, d) SBE-4.4.4-Sr, e) SBE-4.4.4-Sx, f) marcadores de peso molecular (teñidos con negro azúl).

aunque no en la misma proporción. La mayor parte de ella se concentra en la fracción EDE-4.4.4.S $\epsilon$ , misma en la que ya no es detectable la banda de menor peso molecular, aunque sí las de 29,500 y 27,000. Ninguna de las fracciones presentó un patrón de bandeo en el gel correspondiente con el de una proteína pura.

Se hizo una prueba semejante a la realizada con CM-celulosa para intentar limpiar la muestra pasándola por otra columna de filtración en gel pero esta vez con un amortiguador ácido. Aunque se puede apreciar un pico en la región esperada ( $V_e/V_o = 2$ ) en el cromatograma correspondiente a la figura 16, la mayor parte de la muestra no se mantiene en solución en este amortiguador, y consecuentemente la mayor parte de la inmunoadividad está concentrada en la fracción precipitada, tal y como se puede apreciar en la figura 17, que muestra una electrotransferencia teñida con anticuerpo de un gel de SDS-PAGE de las fracciones originadas por la cromatografía y de la fracción que precipita.

#### Cromatografías de inmunoadinidad.

Dado que con este sistema no se resolvería el problema, se decidió intentar una separación por inmunoadinidad. Esto no se había intentado con anterioridad debido a las cantidades limitadas de anticuerpo con que se contaba. Para no desperdiciarlo, se hizo primero una prueba con materiales semejantes de los que en el laboratorio hay mayor cantidad. Se utilizó suero de conejo dirigido contra cGH, mismo que se diluyó 1:40 para simular las condiciones del anticuerpo contra prolactina, y se hizo reaccionar con una fracción

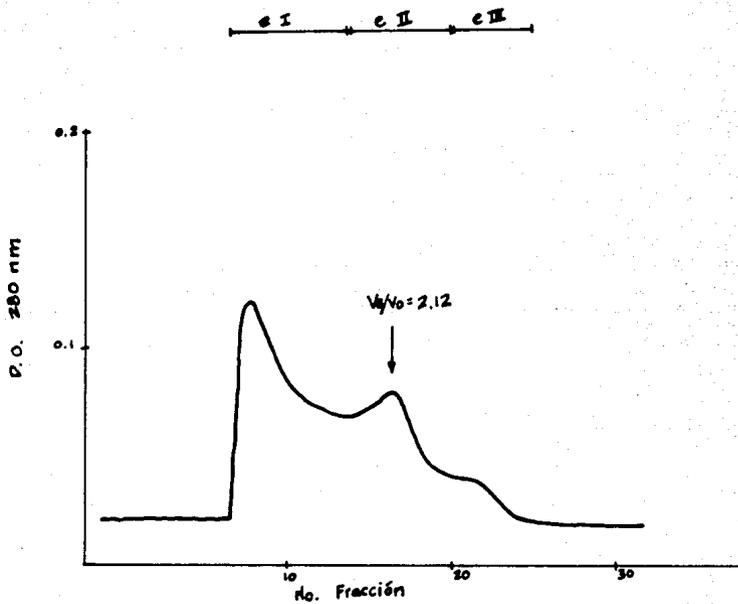


Fig. 16. Cromatografía de filtración en gel de la fracción BPC-4.4.4 utilizando un amortiguador ácido. Condiciones: flujo, 0.14 ml/min; fracciones, 2 ml; dimensiones, 45 x 1 cm. El pico en el tiene un  $V_p/V_o$  de 2.12, semejante al que se reporta en la literatura para la PM.

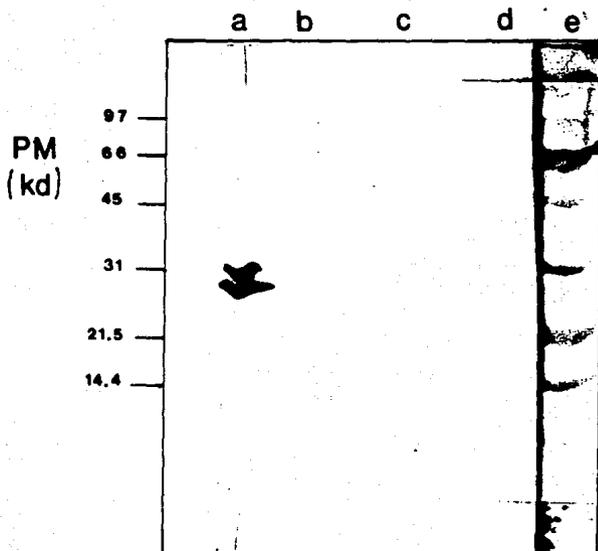
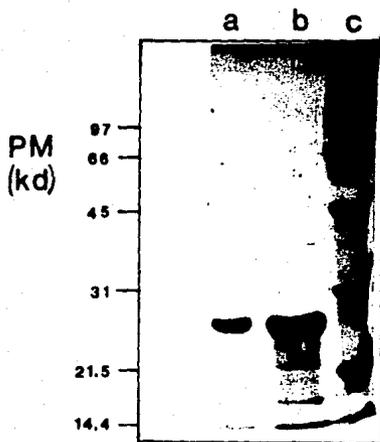


Fig. 17. Electrotransferencia de un gel de SDS-PAGE teñida con anti-cuerpo de las fracciones resultantes de la cromatografía de la fracción MDE-4.4.4 por una columna de Sephadex G-100 utilizando un sustrato ácido. Carriles a) fracción precipitada, b) el, c) elII, d) elIII, e) marcadores de peso molecular (teñidos con negro anilino).

rica en cGH, denominada BDE-1, que se origina durante la purificación de cGH (Ver material y métodos). Para optimizar el sistema, se hicieron dos pruebas paralelas en tubos diferentes para ver en cual de ellos las restricciones físicas eran menores, y se simularon al máximo las condiciones que se utilizarían para intentar purificar a la prolactina, es decir, se utilizaron 4.3 mg de Sepharosa 4B, a los que se acoplaron 50 ul del anticuerpo contra cGH, y se hicieron reaccionar con 0.5 mg de fracción BDE-1. El resultado de la cromatografía se muestra en la figura 18. En el gel de SDS-PAGE se corrieron la fracción retenida, la fracción no retenida, y los amortiguadores, tanto de aplicación como de elución. Se puede apreciar que los carriles que corresponden a los amortiguadores están limpios, el correspondiente a la fracción no retenida muestra una banda muy intensa correspondiente a cGH, y en la fracción retenida se ve únicamente una sola banda que corresponde a cGH en peso molecular, aunque de menor intensidad que la de la fracción no retenida, que tenía un exceso de proteína, y que en una transferencia teñida con anticuerpo dió una reacción positiva.

Con estos antecedentes se procedió a realizar la cromatografía con anticuerpo contra prolactina de pollo acoplado a Sepharosa 4B, de la misma manera que se describe arriba y con el sistema que dió mejores resultados. Se hizo reaccionar a la resina con la fracción BDE-4.4.4.S<sub>2</sub>, disuelta en 200 ul de buffer de aplicación. La fracción no retenida se volvió a aplicar a la resina varias veces (5 en total), hasta que no se obtuvo lectura de la fracción retenida en el espectrofotómetro. En la figura 19 se muestra un gel de SDS-PAGE en el que se ve en un carril la fracción no retenida, en el cual se



**Fig. 18.** Gel de SDS-PAGE teñido con azul de Coomassie mostrando los resultados de la cromatografía de inmovilización de la fracción BDE-1 con anticuerpo contra cGR diluido 40x y acoplado a Sepharosa 4B. Carriles a) fracción retenida, b) fracción no retenida, c) marcadores de peso molecular.

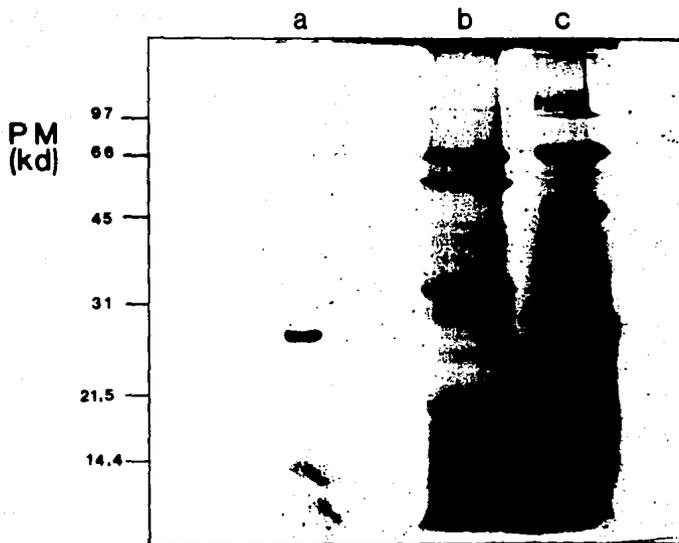


Fig. 19. Gel de la cromatografía de inunoafinidad de la fracción BDC-4.4.4-S<sub>6</sub> con anticuerpo anti prolactina de pollo acoplado a Sepharosa 4B. Electroforesis con SDS teñida con azul de Coomassie. Carriles a) fracción retenida, b) fracción no retenida, c) marcadores de peso molecular.

pueden apreciar varias bandas, y en el carril correspondiente a la fracción retenida se observa una sola banda. En la figura 20 se muestra la inmunotinción de la electrotransferencia de un gel idéntico, y se ve una banda muy intensa en el carril correspondiente a la fracción retenida, y una banda tenue en la posición equivalente del carril correspondiente a la fracción no retenida.

### Isoelectroenfoque.

Ya purificada al menos una banda de prolactina, se le hizo un isoelectroenfoque analítico para determinar su punto isoeléctrico. El gel fué electrotransferido y teñido con anticuerpo, y el resultado se aprecia en la figura 21, en la que se ve que hay dos bandas que migran hacia el polo positivo y cuyos puntos isoeléctricos corresponden a 5.5 y 5.65, como se muestra en la gráfica de la figura 22, que corresponde al gradiente que se formó medido con un electrodo de superficie inmediatamente después de terminada la corrida, en el cual están marcados los puntos correspondientes a las bandas de prolactina.

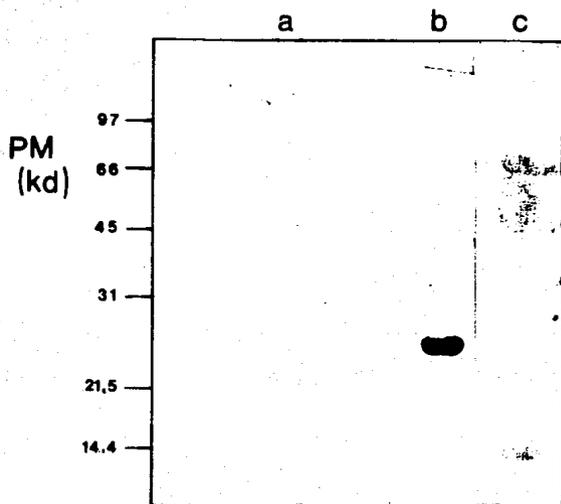
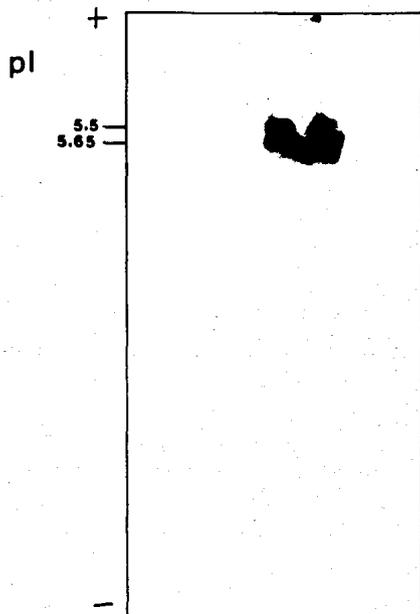


Fig. 20. Electrotransferencia de un gel similar al de la Fig. 19, teñida con anticuerpo. Carriles a) fracción no retenida, b) fracción retenida, c) marcadores de peso molecular (teñidos con negro amido).



**Fig. 21. Isoelectrofoque analítico de la proteína purificada por inmunoprecipitación. El gel fue transferido a una membrana de nitrocelulosa y teñido con anticuerpo. Las bandas corresponden a pI de 5.5 y 5.65.**

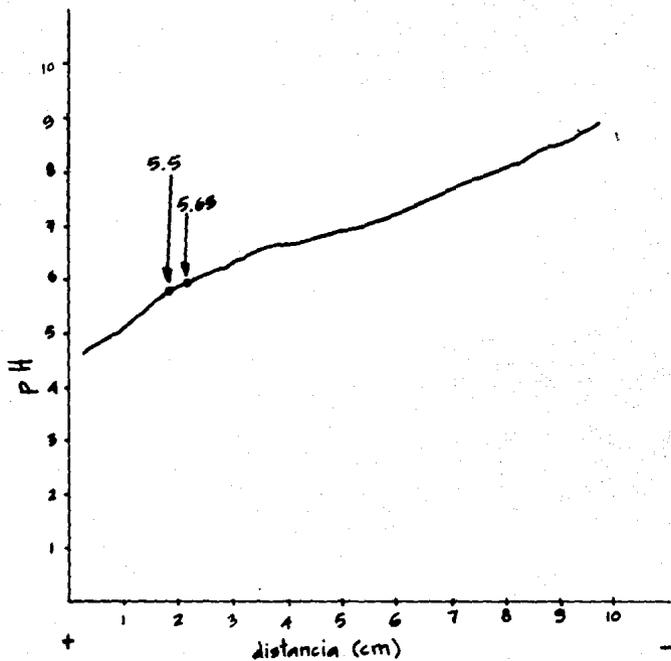


Fig. 22. Gradiente de pH del gel de isoelectroforesis de acuerdo a las medidas registradas cada 0.5 cm con un electrodo de superficie. Se señalan los puntos correspondientes a la migración de las bandas de prolectina de pollo.

## DISCUSION

Los métodos cromatográficos tradicionales han probado ser una buena herramienta para purificar prolactinas de diversas especies (16,23,26,27,42,43,45,52,59-62,65-67,76,77,79). El esquema seleccionado originalmente es el mismo con el que se purificaron las prolactinas de pavo y avestruz (63,64), y muy semejante al utilizado por Scanes para purificar prolactina de pollo (62).

Resulta importante, desde el punto de vista del laboratorio, haber demostrado que las fracciones BDE-4 que se suponía que tenían prolactina efectivamente son fracciones ricas en esta hormona. De esta manera podrán ser utilizadas rutinariamente una vez que se establezca un método eficiente para su purificación, de manera similar a lo que se hace con la fracción BDE-1 para purificar cGH (52-54).

El hecho de contar con un anticuerpo muy específico para la prolactina de pollo permitió una identificación rápida y confiable de la molécula a lo largo de la purificación, sin tener que recurrir al montaje y optimización de los bioensayos para detectar actividad prolactinoide.

Con las preparaciones utilizadas en el laboratorio la cromatografía de intercambio iónico en DEAE-celulosa resulta menos eficiente de lo reportado por otros estudios (23,62), pues hay muchos contaminantes que no se lograron quitar aún después de la tercera cromatografía. Como primer paso de purificación parece haber sido una buena selección, pues permite separar perfectamente la prolactina de la cGH, además de quitar cierta cantidad de contaminantes. El

problema principal quizá sea el hecho de que no se haya logrado una completa resolución de todos los picos de la cromatografía, pues al estar sobrelapados lo que se consigue es reducir la cantidad de contaminantes al excluir a los hombros, pero no eliminarlos del todo. Aún utilizando un gradiente más extendido el problema persistió y nunca se consiguió la óptima resolución de los picos que se esperaba. Por otra parte, el método parece ser bastante confiable, pues la reproducibilidad de los datos en las tres cromatografías es altísima (Por ejemplo, el pico BDE-4.4 comenzó a eluir casi invariablemente cuando habían pasado 42 ml (14 fracciones) de gradiente de NaCl por la columna. Las molaridades de elución de las fracciones BDE-4.4 y BDE-4.5,  $360 \pm 30$  mM y  $570 \pm 32$  mM, para 13 cromatografías, son bastante constantes).

Muchos de los contaminantes que persistieron a lo largo de los pasos de purificación eran glucoproteínas, según se vió en un gel transferido a nitrocelulosa y que se tñó con Concanavalina A acoplada a peroxidasa (No se muestran los datos). Para intentar limpiar al menos parcialmente la fracción enriquecida con prolactina de estos contaminantes fué que se hizo la prueba con la columna de CM-celulosa. Hay reportes de purificaciones de prolactina utilizando resinas catiónicas, aunque hay que mencionar que éstas han sido realizasas con extractos hipofisiarios provenientes de teleósteos (23,24). En realidad no se esperaba que la prolactina de pollo, dada su naturaleza acídica (62), se adsorbiera a la resina, pero se esperaba que algunos contaminantes al cambiar de amortiguador si lo hicieran. Como no resultó así, el resto de la fracción enriquecida con prolactina no se pasó por esta columna, pues la ganancia era

demasiado poca comparada con la pérdida de material que acarrearía semejante paso, pues los rendimientos nunca son del 100% .

De las cromatografías de filtración en gel se puede decir que no funcionaron como se esperaba y esto se convirtió en un problema, pues los rendimientos de las columnas fueron bajos (apenas cerca del 30%) y tras haber pasado los extractos por el Sephadex se recuperó muy poca muestra. Hay que tener en cuenta que la resina es bastante más reactiva de lo que anuncian los fabricantes, pero esto no explica completamente la pérdida de material. Para prevenir la reactividad de los extractos con la resina se tuvo la precaución de correr previamente alguna otra proteína, albúmina o hemoglobina, antes de pasar cualquier extracto hipofisiario por la columna. Sin embargo, y pese a esta medida, como ya se mencionó, los rendimientos fueron bajos.

Nuevamente los extractos utilizados se comportaron de una manera completamente diferente a lo que se reporta. En realidad es este paso de purificación el que se podría considerar como clave en la separación de esta hormona si uno se basa en la literatura, pues hay varios grupos que han logrado purificar diferentes prolactinas después de pasar sus extractos por columnas de filtración en gel, generalmente Sephadex G-100 (22,60,67,79). El cromatograma induce a pensar que las proteínas se agregaron, pues una buena parte salió en el denominado volumen vacío, y prácticamente todas salieron en una zona que corresponde a proteínas de un peso molecular más alto que el de la prolactina. Se ha reportado que la prolactina se agrega al almacenarse a temperaturas bajo cero, y hay incluso quien propone que se acopla con otras proteínas; parece haber un consenso en cuanto a

que es una proteína "mañosa", de difícil manejo para su purificación (16,38,42,43,65).

Para contender con el problema de la agregación se montó la columna de Sephadex G-100 con un amortiguador ácido, de manera que se disociaran las moléculas que habían interaccionado entre sí. Según los resultados obtenidos el rendimiento fué mayor (aproximadamente 60%) que el de la columna con la misma resina pero con amortiguador alcalino (aproximadamente 30%). Como se dijo en la sección de resultados, el problema con este esquema fué el hecho de que la mayor parte de las proteínas (95 %) se precipitaran por las condiciones tan ácidas. Si bien en la fracción que quedó en solución se alcanzó a detectar inmunoreactividad de prolactina por dot-blot, la mayor parte quedó concentrada en la fracción que se precipitó.

En la literatura se reporta que prolactina eluye en forma altamente pura en un pico con un  $V_e/V_0$  alrededor de 2 (24,26,42,45,59,61,63,64,67,76-79). En esta columna se obtuvo un pico de elución en esta zona con cierta inmunoreactividad. Aún en el caso de que este pico correspondiera efectivamente a prolactina pura, visto en función de la implementación de un método para obtener esta hormona rutinariamente no resulta un sistema muy eficiente, pues se desperdicia gran cantidad de material.

Al concluir este paso ya se habían intentado todos los sistemas ordinarios de cromatografía reportados sin haber conseguido nuestro objetivo de purificar la hormona. Se buscó entonces una alternativa diferente. Se sabe que la cromatografía por inmunoadfinidad es un método altamente selectivo y específico, que permite en un solo paso la purificación y concentración de una proteína (80,81). En el

laboratorio se contaba con todos los elementos para intentar montar este sistema. La única limitante era que se disponía de una cantidad muy limitada de anticuerpo contra prolactina de pollo. Es por esto que se decidió efectuar una prueba piloto con materiales que son relativamente abundantes en el laboratorio. Ya se ha mencionado varias veces que el anticuerpo contra prolactina era el reactivo limitante. Para aprovecharlo al máximo se utilizó dos veces cada alícuota tomada para las tinciones de las electrotransferencias y los dot-blot. Para decidirse a utilizar los 50 ul de anticuerpo que se requirieron se necesitaba probar que el sistema era viable. La principal preocupación era determinar si las condiciones físicas que se dan al manejar volúmenes tan pequeños, donde factores como la capilaridad y la viscosidad juegan papeles muy importantes que, en grandes volúmenes, en muchas ocasiones no es necesario tomar en cuenta, no serían un impedimento al desarrollo de la química del sistema, y hubo que implementar soluciones a problemas "triviales" como leer 200 ul en el espectrofotómetro y lavar la resina. Por eso fué que se decidió que la mejor alternativa era utilizar el sistema en "batch".

Los resultados de la prueba piloto fueron suficientemente claros como para permitir que se montara la técnica con el anticuerpo contra prolactina de pollo, a la vez que permitió la familiarización con el método sin arriesgarse a perder materiales escasos. Con este anticuerpo acoplado a la resina (Sepharosa 4B) se logró purificar una pequeña cantidad de prolactina de pollo, suficiente para hacer un isoelectroenfoque, además del gel de SDS.

De las tres bandas que originalmente se ven en los geles de SDS-PAGE, únicamente se aisló la banda correspondiente a 27,000 d. Esto puede deberse a que las proteínas hayan perdido capacidad de ser reconocidas por el anticuerpo después de los diversos tratamientos a que han sido sometidas durante la purificación, pues ya en la electrotransferencia de las fracciones resultantes de la filtración en gel (fig. 15) se ve una disminución en la reactividad de la banda de menor peso molecular, aunque en este caso puede deberse a la agregación de las moléculas que impida la exposición de los epitopes correspondientes. Otra alternativa sería justamente lo contrario, es decir, que la afinidad del anticuerpo por estas variantes sea tan alta que con las condiciones utilizadas no eluyen. La figura 3 muestra que el anticuerpo es altamente afín por la prolactina de pollo, pues se ve reacción con 100 ng de fracción BDE-4 y el anticuerpo diluido 800,000 veces.

Paralelamente a los intentos de purificación se hizo una caracterización inicial de la hormona. Como se aprecia en la sección de resultados la hormona presenta algunas variantes tanto de carga como de masa. Por los geles de SDS-PAGE se determinó que la prolactina de pollo presenta 3 variantes principales reconocidas por el anticuerpo, con pesos moleculares correspondientes a 29,500, 27,000 y 12,500 d. También se alcanzaron a detectar algunas otras bandas, aunque de manera esporádica, con pesos correspondientes a 70,000, 19,000 y 11,000 d. En cuanto a su carga eléctrica, las electroforesis nativas en los geles de Tris indican que existe un componente principal cuyo  $R_f$  es de 0.71, y se detectaron bandas con  $R_f$  de 0.67 y 0.8 pero no en todos los geles que se hicieron.

Finalmente, la banda de 27,000 presentó, por isoelectroenfoco, dos componentes con puntos isoeléctricos correspondientes a 5.5 y 5.65. A modo de comparación se reportan pesos moleculares de 22,000-26,000 para la prolactina de pavo (43,63), y de 19,000 para la de avestruz (64); un  $R_f$  de 0.83-0.85 para la prolactina de pavo (63), y un  $pI$  de 5.6 para la prolactina de pollo (62).

Es interesante que desde un principio se hayan podido detectar variantes de esta hormona, si bien es cierto que habría que someter a las distintas moléculas a bioensayos para demostrar que poseen al menos alguna de las actividades que se asocian con la prolactina, pues todas las detecciones que se hicieron a lo largo del estudio fueron inmunoquímicas. De cualquier forma, y en base a resultados obtenidos tanto en el laboratorio como por otros grupos con GHs y con prolactinas (38,39,50,51-57), no es sorprendente que la prolactina de pollo presente isoformas moleculares y sea en realidad una familia de proteínas que comparte una serie de características y actividades. Comparando con la cGH, quizá la banda correspondiente a un peso de 29,500 sea una forma de prolactina glucosilada (54,58), mientras que la banda de 12,500 pudiera ser una forma procesada con alguna actividad particular. Se conoce que en los mamíferos la prolactina puede procesarse para dar origen a un fragmento de 16,000 d que muestra características funcionales particulares (41). Las variantes de carga pudieran deberse a la adquisición de distintos grupos funcionales, o a la ausencia de ellos (formas desamidadas, por ejemplo).

Debido a la línea de investigación que se sigue en el laboratorio, encontrar un método eficiente para purificar prolactina

es un problema prioritario que resolver. Ya se ha mencionado en múltiples ocasiones a lo largo de este trabajo, y de igual manera en muchos otros, la semejanza que existe entre la GH y la prolactina. Estudios comparativos entre las dos hormonas resultan fundamentales para comprender sus mecanismos de acción, así como su desarrollo evolutivo, sobre todo si se dispone de una colección amplia de estas hormonas procedentes de diversas especies. Si bien en el presente trabajo se llegó a la obtención de prolactina de pollo purificada, es evidente que aún falta optimizar muchas cosas antes de que se llegue a un método sencillo y confiable, que proporcione un alto rendimiento, semejante al que se tiene implementado para la purificación de cGH. Hay reportes que indican que el contenido de prolactina de los extractos puede ser aumentado grandemente según el tratamiento que se siga para obtenerlos (82). Habría que estudiar si estos tratamientos son resistidos por la cGH, y en caso afirmativo quizá se podría aumentar el rendimiento del método. Otra cosa que quizá podría resultar es la cromatografía en condiciones ácidas, suavizando las condiciones para que permanezcan más proteínas solubles. Quizá también se podría intentar incorporar métodos que permiten mayor resolución, como es la HPLC. Lo ideal sería montar un método rápido y sencillo, que involucre el menor número de pasos para llegar al aislamiento de la proteína, y este método podría ser la inmunoadsorción. Si bien es cierto que se trabajó con cantidades limitantes de anticuerpo, el método parece ser funcional, y con la prolactina que se puede obtener con la microtécnica se podría intentar la producción de anticuerpos contra esta molécula inyectando conejos, de manera que se dispusiera de suficientes cantidades como

para purificar a la molécula a mayor escala. Una vez que se tenga un método optimizado, la cantidad de estudios que se pueden emprender es enorme. Primeramente habría que caracterizar de una manera mucho más completa a la hormona, y después se podrían hacer estudios de estructura-función. Por un lado aislar a las variantes y correlacionarlas con funciones particulares; por otro, intentar hacer lo mismo con dominios restringidos. Podrían hacerse comparaciones bastante precisas entre las estructuras de la prolactina y la cGH que quizá arrojen más luz acerca del origen común que se supone tuvieron estas dos proteínas.

## CONCLUSIONES

1- Se desarrolló un método que permite la purificación tanto de cGH como de prolactina a partir de glándulas hipofisiarias de pollo.

2- La prolactina de pollo es susceptible de agregarse bajo las condiciones normales de purificación de proteínas, lo que puede dificultar su aislamiento.

3- Se desarrolló una microtécnica que permite la purificación de proteínas por inmunoadsorción con cantidades muy pequeñas de anticuerpo.

4- Se hizo una caracterización parcial inicial de la prolactina de pollo, de la que resultó:

a) En geles de SDS en condiciones reductoras, la prolactina de pollo dió tres bandas principales cuyos pesos moleculares corresponden aproximadamente a 29,500, 27,000 y 12,500 d.

b) En geles de Tris en placa, en condiciones nativas, la hormona dió una banda principal con un  $R_f$  de 0.71

c) La banda correspondiente a 27,000 d se descompone, por isoelectroenfoque, en dos bandas con puntos isoelectríficos de 5.5 y 5.65.

d) Existen otros componentes menos abundantes, tanto de peso molecular como de carga.

5- Se demostró la heterogeneidad de la prolactina de pollo.

## APENDICE 1

### Determinación de la concentración de proteína.

Se siguió el método de Lowry y cols. (71) modificado por Waterborg y Mattheus (72).

#### Soluciones:

- A. Albúmina sérica bovina (BSA) 0.5 ug/ul para la curva patrón.
- B. NaOH 1 N.
- C.  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  al 2% .
- D. Tartrato de sodio y potasio al 2% .
- E.  $\text{CuSO}_4$  al 1% .
- F. Mezclar 9.8 ml de solución C con 0.1 ml de solución D y 0.1 ml de solución E.
- G. Reactivo de Folin-Ciocalteu diluido 1:1 con agua.

#### Método:

- Se colocan las muestras (1-30 ug) en tubos de ensayo en un volumen no mayor a 100 ul.
- Aforar todas las muestras a 100 ul con agua.
- Preparar la curva patrón de acuerdo a la siguiente tabla:

Tubo	BSA(ug)	Sol. A(ul)	Aqua(ul)	Sol. B(ul)	Sol. F(ul)	Sol. G(ul)
A	0	0	100	100	900	100
B	3	6	94	100	900	100
C	6	12	88	100	900	100
D	9	18	82	100	900	100

- Agregar 100 ul de solución B a cada tubo y agitar. Dejar por 10 min a temperatura ambiente.
- Agregar 900 ul de la solución F a cada tubo y agitar.
- Añadir 100 ul de la solución G a cada tubo agitando inmediatamente. Dejar los tubos incubando durante 30 min a temperatura ambiente.
- Leer los tubos en el espectrofotómetro a 750 nm.
- Interpolar los valores de las muestras en la curva patrón.

## APENDICE 2

### Métodos cromatográficos.

#### DEAE-celulosa.

- Se pesa la resina y se suspende en 15 volúmenes de HCl 0.5 N durante 30 min agitando ocasionalmente con una varilla de vidrio.
- Se lava con agua en un Büchner hasta que el filtrado tenga pH 4.0.
- Se suspende la resina en 15 volúmenes de NaOH 0.5 N por 30 min con agitación ocasional utilizando para ello una varilla de vidrio.
- Se decanta el sobrenadante y se repite la operación.
- Se lava con agua en un Büchner hasta que el filtrado tenga pH 8.0.
- Se suspende la resina en el amortiguador que se vaya a utilizar y se quitan los "finos" aspirando el sobrenadante con una pipeta Pasteur conectada a una bomba de vacío.
- Se monta la columna vertiendo la resina por las paredes para evitar que se formen burbujas y aplicando presión con nitrógeno hasta que esté bien empacada.
- Se conecta la bomba peristáltica y se regula el flujo.

#### CM-celulosa

- Se procede de la misma manera que con la resina de DEAE-celulosa, pero invirtiendo los lavados, es decir, se lava primero con NaOH y después dos veces con HCl.

#### Sephadex G-100

- Se pesa la resina y se resuspende directamente en el amortiguador a emplear con agitación ocasional usando una varilla de vidrio.
- Se quitan los "finos" exhaustivamente. (Ver DEAE-celulosa).
- Se monta la columna agregando toda la resina de una vez para que no haya discontinuidades. Para esto se prolonga la columna con un matraz de Mariotte y se tapa la salida.
- Una vez asentada la resina se agrega amortiguador a la parte superior y se deja fluir. Como la presión puede deformar los gránulos de resina, la salida de la columna se pone a una altura tal que la presión hidrostática no sea un factor a considerar.
- Al terminar de empacarse la resina se quita el matraz de Mariotte y se conecta la columna a una bomba peristáltica. Se regula el flujo.

### APENDICE 3

#### Electroforesis en geles de poli(acrilamida) (SDS-PAGE).

Se siguió el método de Laemmli (73) en geles al 12.5% de poli(acrilamida).

##### Soluciones:

- A. Acrilamida 30% y metilén-bis-acrilamida 0.8% .
- B. Tris 1.5 M y SDS 0.4%, pH 8.8.
- C. Tris 0.5 M y SDS 0.4%, pH 6.8.
- D. Amortiguador de corrida. Tris 0.025 M y glicina 0.19 M, pH 8.6.
- E. Amortiguador de muestra. 1.25 ml de solución C se mezclan con 100  $\mu$ l de SDS 10%, 1 ml de glicerol y 0.4 ml de azul de bromofenol al 0.05%. Se afora con agua a 10 ml. Si se utilizan condiciones reductoras hay que añadir mercaptoetanol de tal manera que su concentración final sea del 5% .
- F. Persulfato de amonio al 10% . Hay que prepararlo fresco cada vez.

Para hacer los geles se mezclan las siguientes cantidades:

Resolvidor	Sol. A	2.5 ml	Concentrador	Sol. A	0.66 ml
(12.5%)	Sol. B	1.5 ml	(4%)	Sol. C	1.26 ml
	Agua	2.0 ml		Agua	3.10 ml
	TEMED	5 $\mu$ l		TEMED	5 $\mu$ l
	Sol. F	20 $\mu$ l		Sol. F	25 $\mu$ l

##### Método:

- Para hacer el gel resolvidor se mezclan Sol. A + Sol. B + Agua y se desgasifican con agitación y vacío.
- Se añaden los catalizadores (TEMED y Sol. F) y se vierte la mezcla al molde.
- Se adiciona una capa de agua sobre el gel para lograr una superficie homogénea. Se deja polimerizando unos 15-20 min.
- Para hacer el gel concentrador se mezclan Sol. A + Sol. C + Agua y se desgasifican con agitación y vacío.
- Se quita la capa de agua del gel resolvidor y se coloca un peine sobre este.
- Se añaden los catalizadores a la mezcla y se vierte sobre el molde. Se deja polimerizar unos 15-20 min.
- Las muestras se diluyen 1:1 (vol/vol) en el amortiguador de muestra y se hierven durante 8 minutos si se utilizan condiciones reductoras. Luego se colocan en los carriles.
- Se corre el gel a 100 V en la zona concentradora y a 200 V en la zona resolvidora.
- Al terminar la corrida los geles se tñen con azul de Coomassie, plata, o se transfieren a una membrana de nitrocelulosa para tñirse con anticuerpo.

## APENDICE 4

### Electroforesis en condiciones nativas (Tris-PAGE).

Se realizaron geles en placa siguiendo el sistema de Nicoll y Licht (74).

#### Soluciones:

- A1.** Disolver 18.15 g de Tris con 24 ml de HCl 1 N, 115 ul de TEMED y aforar a 100 ml con agua ajustando previamente el pH a 9.4.  
**A2.** Disolver 28 g de acrilamida y 0.735 de bis-acrilamida en 100 ml de agua. Filtrar por una membrana de Millipore con poro de 0.45 um.  
**A3.** Disolver 140 mg de persulfato de amonio en 100 ml de agua.  
**B1.** Disolver 6 g de Tris con 48 ml de HCl 1 N y 460 ul de TEMED. Aforar a 100 ml con agua ajustando previamente el pH a 7.2.  
**B2.** Disolver 10 g de acrilamida y 2.5 de bis-acrilamida en 100 ml de agua y filtrarlos por una membrana de Millipore con poro de 0.45 um.  
**B3.** Disolver 120 ug de riboflavina en 3 ml de agua y proteger la solución de la luz.  
**Amortiguador superior.** Tris (3 g/l), glicina (14.5 g/l) y azul de bromofenol (0.005%), pH 8.35.  
**Amortiguador inferior.** Igual al superior pero sin azul de bromofenol.

#### Método:

- Se mezclan las siguientes proporciones de reactivos para hacer los geles:

Resolvedor: Sol. A1 - 1	Concentrador: Sol. B1 - 1
Sol. A2 - 1	Sol. B2 - 2
Sol. A3 - 2	Sol. B3 - 1

- Para hacer el gel resolvedor se mezclan A1 + A2 y se desgasifican. Se añade luego A3 y se vierte la mezcla al molde. Se añade una capa de agua para homogeneizar la superficie y se deja polimerizando 15-20 min.

- Para hacer el gel concentrador se mezclan B1 + B2 y se desgasifican. Se quita la capa de agua del gel resolvedor y se coloca un peine. Se añade B3 a la mezcla y se vierte esta al molde. La solución que sobra se protege de la luz, y el molde se coloca bajo luz blanca durante 15-20 min para que polimerice.

- Las muestras se disuelven con la mezcla sobrante y se colocan en los carriles. Se colocan bajo luz blanca para que polimericen, igual que se hizo con el gel concentrador.

- Se corre el gel a 50 V en la región concentradora y a 100 V en la resolvedora. Al terminar los geles se tifen con azul de Coomassie, plata, o se electrotransfieren para tefirse con anticuerpo.

## APENDICE 5

### Isoelectroenfoque analítico (IEF)

#### Soluciones:

1. Acrilamida 24.25% (p/v) y metilén-bis-acrilamida 0.75% (p/v). Disolver las cantidades apropiadas de cada una en 100 ml de agua y filtrar por una membrana de Millipore con poro de 0.45  $\mu$ m. Refrigerar y proteger de la luz.
2. 5'-fosfato de riboflavina al 0.1% (p/v) en agua. Refrigerar y proteger de la luz.
3. Persulfato de amonio al 10% en agua. Prepararlo fresco.
4. Glicerol al 25% (v/v)

**Amortiguador del cátodo:** etilendiamina 2 M, lisina 20 mM y arginina 20 mM.

**Amortiguador del ánodo:** Acido glutámico 20 mM y ácido aspártico 20 mM.

También se requieren TEMED y anfolinas del intervalo de pH que se deseen.

#### Método:

- Se ponen tiras de Dymo (110 x 8 mm) en los carriles laterales del molde y se sujetan con cinta adhesiva transparente. Se pegan tiras pequeñas (10 x 8 mm) sobre el molde. Estos cortes forman pequeños pozos sobre el gel, y en ellos se aplica la muestra.

- Se coloca la placa de vidrio, limpia, sobre las tiras largas de Dymo.

- Se preparan la solución de monómeros y la catalizadora:

Monómeros:	Agua	8.5 ml	Catalizadora:	Sol. 2	75.0 ul
	Sol. 1	3.0 ml		Sol. 3	22.5 ul
	Sol. 4	3.0 ml		TEMED	4.5 ul
	Anfolitos	0.75 ml			

- Se desgasifica la solución de monómeros al menos 5 min con agitación y vacío.

- Se añade la solución catalizadora a la solución de monómeros y se agita ligeramente. Con una pipeta se aplica la mezcla entre la placa de vidrio y el molde. Primero se eliminan las burbujas de aire de la punta de la pipeta, entonces se deja fluir la solución formando un frente a lo ancho de la placa.

- Se coloca el molde bajo una lámpara de luz blanca y se irradia por 1 hora.

- Con ayuda de una espátula se levanta y se voltea la placa de vidrio y se irradia otra vez durante 15 min para que polimerice bien la cara del gel que estuvo en contacto con el acrílico.

- Se remueven las esquinas del gel con cortes diagonales y cualquier otra parte del gel que alcance los bordes de la placa de vidrio.

- Se coloca la placa en la cámara sobre la plataforma de cerámica que previamente se ha enfriado a 4°C y mojado con glicerol 5%, procurando que no haya burbujas entre el vidrio y la cerámica.

- Se mojan 2 tiras de papel secante de tamaño ligeramente menor que el gel, cada una con alguno de los amortiguadores, el del ánodo o el del cátodo, y se les quita el exceso de líquido. Luego se colocan de manera que hagan contacto con el gel y se ajustan los electrodos para que hagan contacto con cada papel.

- Se aplican las muestras a los pozos con una jeringa Hamilton de 10 ul. Las muestras deben estar libres de precipitados y de sales, y tener anfolinas al 2% .

- Se inicia la corrida primeramente a 5 W (potencia constante). Luego se incrementa gradualmente la potencia hasta llegar a 12 W y un total de aproximadamente 4000 V x h. La temperatura se mantiene a 4°C en una atmósfera saturada de nitrógeno.

- Al terminar la corrida el gel se pone sobre hielo frappé y se le determina el gradiente de pH cada 0.5 cm con un electrodo de superficie. Después se electrotransfiere como se indica en el apéndice 8.

## APENDICE 6

### Tinciones para geles.

#### Azul de Coomassie

Normalmente los geles, tanto de Tris-PAGE como de SDS-PAGE, se tifieron con la siguiente solución de azul de Coomassie:

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

Para destefirlos se utilizaron indistintamente una solución de metanol 40% - ácido acético 10%, o, si el proceso se llevaba a cabo en el destefidor de geles, metanol 10% - ácido acético 7.5% .

#### Tinción de plata

Para aumentar la sensibilidad de detección se utilizó en ocasiones una tinción de plata según el siguiente protocolo de incubaciones, basado en el método descrito por Bio-Rad:

Metanol 40% - ácido acético 10%	30 min.
Etanol 10% - ácido acético 5% (2 veces)	15 min.
Sol. oxidante ( $K_2Cr_2O_7$ ), 1:10 (vol/vol)	5 min.
Agua (2 veces)	5 min.
Reactivo de plata ( $AgNO_3$ ), 1:10 (vol/vol)	20 min.
Agua	1 min.
Sol. reveladora ( $Na_2CO_3$ y paraformaldehído, 32 g/l) (Revelar hasta que la solución se torne color humo)	30 seg.
Sol. reveladora (2 veces)	5 min.
Acido acético 5%	5 min.
Agua	

Estos tiempos de incubación son aproximados, sobre todo los del revelado, que varían según como se vaya viendo el gel.

## APENDICE 7

### Dot-blot.

Esta técnica se utilizó siguiendo el protocolo recomendado por Bio-Rad.

#### Soluciones:

**PBS:** Fosfatos 15 mM y NaCl 0.15%, pH 7.6

**TPBS:** PBS + Tween-20 0.05% .

**Sol. bloqueadora:** PBS + Gelatina 3% .

**Amortiguador de anticuerpo:** TPBS + Gelatina 1% .

**1. anticuerpo:** diluirlo al título requerido con amortiguador de anticuerpo.

**2. anticuerpo:** diluirlo 1:3000 con el amortiguador de anticuerpo.

**Sol. reveladora:** disolver 60 mg de cloronaftol (4'-cloro-1-naftol) en 20 ml de metanol frío, protegido de la luz. Inmediatamente antes de usarse se añaden 60 ul de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> al 30%, fría, a 100 ml de PBS y se mezclan con la solución de cloronaftol-metanol. Se prepara fresca.

#### Método:

- Se cortan las tiras de nitrocelulosa, sin tocarlas con las manos, y se saturan con PBS. Se secan perfectamente.

- Se aplican las muestras a las tiras con una micropipeta y se dejan secar.

- Se meten las tiras a la solución bloqueadora por lo menos durante 30 min.

- Transcurrido el tiempo se dan 2 lavados con TPBS, de 5 min. cada uno.

- Se incuban las tiras con el primer anticuerpo durante al menos 1.5 hrs, con agitación continua.

- Se hacen 2 lavados con TPBS.

- Se incuban las tiras con el segundo anticuerpo durante 45-60 min., con agitación.

- Se dan 2 lavados con TPBS y otro con PBS.

- Se revelan las tiras durante unos 30 min y después se detiene la reacción con agua.

Si la cantidad de dot-blot a realizarse era grande se utilizaba un aparato Bio-Dot, de Bio-Rad, aplicando en cada pozo hasta 300 ul de muestra. Se satura una membrana de nitrocelulosa con PBS y se coloca en el aparato. Se aplican las muestras y se dejan filtrar por gravedad. Después se dan 2 lavados con TPBS y se retira la membrana del aparato para meterla a la solución bloqueadora y proseguir con el método.

**DONADO POR D. G. B. - B. C.**

## APENDICE 8

### Electrotransferencia.

Se utilizó esta técnica para transferir proteínas de los geles a membranas de nitrocelulosa para después tefir con anticuerpo según la técnica seguida por Towbin y cols (75).

#### Soluciones:

**Amortiguador de transferencia:** Tris 25 mM, glicina 192 mM y metanol 20%, pH 8.3. Es importante no ajustar el pH, sino dejarlo como quede al hacer la solución.

Para revelar se utilizan las mismas soluciones que para dot-blot (Apéndice 7).

#### Método:

- Terminada la electroforesis o el isoelectroenfoque se deja el gel equilibrándose durante 30-45 min. en la solución de transferencia.

- Se prepara el cassette de transferencia de la siguiente manera: En una palangana llena con amortiguador de transferencia se abre el cassette con la hoja negra (lado catódico) en el fondo. Sobre ésta se coloca una esponja empapada de solución. Luego se coloca papel filtro y sobre éste el gel. Sobre el gel se pone la membrana de nitrocelulosa, previamente empapada en la solución de transferencia, y nuevamente papel filtro. Se pasa entonces un tubo de ensayo a modo de rodillo para excluir cualquier burbuja. Luego se coloca otra esponja empapada encima de todo esto y se cierra el cassette.

- Se coloca el cassette en la cámara de transferencia con la orientación adecuada y con una barra magnética para agitar a lo largo de todo el proceso.

- Se transfiere durante 30 min. a 200 mA.

## APENDICE 9

### Inmunoadsorción

Se utilizó esta técnica para efectuar una purificación altamente selectiva. Se hizo una adaptación para manejar volúmenes pequeños basándose en el protocolo de Berghman (70).

#### Soluciones:

Amortiguador de acoplamiento: Fosfatos 50 mM y NaCl 0.5 M, pH 7.8.  
Amortiguador de aplicación: Fosfatos 50 mM y NaCl 0.9%, pH 7.6.  
Amortiguador de elución: Glicina-HCl 50 mM, NaCl 0.9%, pH 3.0.  
HCl 1 mM, pH 3.0  
Etanolamina 1 M, pH 8.0.

#### Método:

- Se pesa la resina (Sephacosa 4B activada con CNBr) considerando que 1 g de resina al hincharse ocupa un volumen de 3.5 ml.
- Se suspende por 15 min en HCl 1mM con agitación .
- Se lava con la misma solución de HCl 1 mM, utilizando unos 200 ml de solución/g de resina.
- Se hace un lavado\* con amortiguador de acoplamiento.
- Se suspende el anticuerpo en amortiguador de acoplamiento y se lee su densidad óptica a 280 nm. Después se mezcla con la resina y se deja agitando unas 4 hrs. a temperatura ambiente.
- Transcurrido el tiempo se lee nuevamente la densidad óptica y se obtiene la eficiencia de acoplamiento. Si esta es baja se puede prolongar el tiempo de agitación.
- Se bloquean los sitios de acoplamiento sobrantes con la etanolamina 1 M durante toda la noche a temperatura ambiente y con agitación .
- Se lava la resina con 3 volúmenes de amortiguador de aplicación y otro tanto de amortiguador de elución antes de pasar la primera muestra.
- La muestra se disuelve en un volumen adecuado de amortiguador de aplicación (200 ul), y se deja reaccionando con la resina durante al menos 30 min con agitación. Antes de ponerla a reaccionar se lee su densidad óptica.
- Para recoger la fracción no reactiva, se centrifuga el tubo y se toma el sobrenadante, al cual se le lee la densidad óptica.
- La fracción reactiva se eluye aplicando un volumen adecuado (200 ul) de amortiguador de elución a la resina y dejándolos reaccionar al menos 30 min. con agitación. Pasado el tiempo se centrifuga y se toma el sobrenadante, al cual se le lee su densidad óptica. Se neutraliza con 20 ul de Tris-HCl 0,5 N, pH 8.0 y se almacena en el congelador.
- Para cromatografiar otra muestra se debe lavar la resina antes con al menos 200 ul de amortiguador de aplicación.
- La resina se almacena a 4°C.

\* Para hacer los lavados, dado el pequeño volumen que se usó (unos 15 ul) se centrifugó la resina en la microfuga y se extrajo el sobrenadante con una pipeta Pasteur alargada en la flama. Luego se resuspendió en 200 ul de la solución correspondiente.

## BIBLIOGRAFIA

- 1- Frantz, A. 1979. "Prolactin". En: Endocrinology, vol. 1 (L. De Groot, et al., eds.) Grune and Stratton, USA. pp. 153-178.
- 2- Ezrin, C., Horvath, E., Kovacs, K. 1979. "Anatomy and cytology of the normal and abnormal pituitary gland". En: Endocrinology, vol. 1 (L. De Groot, et al., eds.) Grune and Stratton, USA. pp. 103-121.
- 3- Pira, F., Motta, M., Martini, L. 1979. "Regulation of hipothalamic and pituitary function: long, short and ultrashort feedback loops". En: Endocrinology, vol. 1 (L. De Groot, et al., eds.) Grune and Stratton, USA. pp 21-33.
- 4- Olsson., R. 1990. "Evolution of chordate endocrine organs". Proc. Clin. Biol. Res. 342: 272-281.
- 5- Daughaday, W. 1985. "Prolactin and growth hormone in health and disease". En Contemporary endocrinology, vol 2 (S. Ingbar, ed.), Plenum Medical, USA.
- 6- Russell, S. y Nicoll, C. 1990. "Evolution of growth hormone and prolactin receptors and effectors". Proc. Clin. Biol. Res. 342: 168-173.
- 7- Nicoll, C.S., Hebert, N.J., Delidow, B.C., English, D.E., Russell, S.M. 1990. "Prolactin and synlactin: comparative aspects". Proc. Clin. Biol. Res. 342:211-218.
- 8- Ensor, D.M. 1978. "Comparative endocrinology of prolactin". Chapman and Hall, Londres. 309 pp.
- 9- Scanes, C.G. 1986. "The pituitary gland". En: Avian physiology (P.D. Sturkie, ed.) Springer Verlag, USA. pp. 383-402.
- 10- McCann, S. y Ojeda, S. 1979. "The role of brain monoamines, acetylcholine and prostaglandins in the control of pituitary function". En: Endocrinology, vol.1 (L. De Groot, et al., eds.) Grune and Stratton, USA. pp. 55-63.
- 11- McKeown, B.A. 1989. Prolactin/growth hormone family workshop. XI simposio internacional de endocrinología comparada, Málaga.
- 12- Prunet, P., Avella, M., Fostier, A., Thrandur, B., Boef, G., Haux, H. 1990. "Roles of prolactin in salmonids". Proc. Clin. Biol. Res. 342: 547-552.
- 13- El Halawani, M.E., Mauro, J.L., Phillips, R.R., Youngren, D.M. 1990. "Neuroendocrine control of prolactin and incubation behavior in gallinaceous birds". Proc. Clin. Biol. Res. 342: 678-684.

- 14- Nicoll, C.S. y Nichols, C.W. 1971. "Evolutionary biology of prolactins and somatotropins. I. Electrophoretic comparison of tetrapod prolactins". *Gen. Comp. Endocrinol.* 17: 300-310.
- 15- Nicoll, C.S. 1974. "Physiological actions of prolactin". En: *Handbook of physiology, Vol. 4 The pituitary gland and its neuroendocrine control* (E. Knobil and W. Sawyer, eds.), sección 7, parte 2, pp 253-292. Amer. Physiol. Soc. Washington, D.C.
- 16- Vinik, A. I., Kaplan, S.L., Grumbach, M.M. 1973. "Purification, characterization and comparison of immunological properties of monkey chorionic somatomammotropin with human and monkey growth hormone, human chorionic somatomammotropin and ovine prolactin". *Endocrinology.* 92: 1051-1064.
- 17- Nicoll, C. S., Mayer, G.L., Russell, S.M. 1986. "Structural features of prolactins and growth hormones that can be related to their biological properties". *Endocr. Rev.* 7: 169-203.
- 18- Kawauchi, H. 1989. "Evolution of prolactin and growth hormone family. Memorias del XI simposio internacional de endocrinología comparada, Málaga, p. L51.
- 19- Bern, H. y Nicoll, C.S. 1968. "The comparative endocrinology of prolactin". *Rec. Prog. Horm. Res.* 24: 681-720.
- 20- Cooke, N. Coit, D., Shine, J., Baxter, J., Martial, J. 1981. "Human prolactin". *J. Biol. Chem.* 256(8): 4007-4016.
- 21- Kawauchi, H. Yasuda. A., Rand-Weaver, M. 1990. "Evolution of prolactin and growth hormone family". *Prog. Clin. Biol. Res.* 342: 47-53.
- 22- Suzuki, R. Yasuda, A., Kawauchi, H., Hirano, T. 1989. Memorias del XI simposio internacional de endocrinología comparada. Málaga, pp. 329.
- 23- Andersen, O., Skibeli, V., Gautvik, K. 1989. "Purification and characterization of atlantic salmon prolactin". *Gen. Comp. Endocrinol.* 73: 354-360.
- 24- Kawauchi, H., Abe, K., Takahashi, A., Hirano, T., Hasegawa, S., Naito, N., Nakai, Y. 1983. Isolation and properties of chum salmon prolactin". *Gen. Comp. Endocrinol.* 49: 446-458.
- 25- Miyajima, K., Yasuda, A., Swanson, P., Kawauchi, H., Cook, H., Kaneko, T., Peter, R.E., Suzuki, R., Hasegawa, S., Hirano, T. 1988. "Isolation and characterization of carp prolactin". *Gen. Comp. Endocrinol.* 70: 407-417.
- 26- Farmer, S., Papkoff, H., Bewlwy, T., Hayashida, T., Nishioka, R., Bern, H., Li, C. 1977. "Isolation and properties of teleost prolactin". *Gen. Comp. Endocrinol.* 31: 60-71.

- 27- Prunet, P. y Houdebine, L.M. 1984. "Furification and biological characterization of chinook salmon prolactin". Gen. Comp. Endocrinol. 53: 49-57.
- 28- Nicoll, C.S. 1967. "Bioassay of PRL: Analysis of the pigeon crop sac response to local PRL injection by an objective and quantitative method". Endocrinology. 80: 641-655.
- 29- Ensor, D.M. y Phillips, J.G. 1970. "The effect of salt loading on the pituitary prolactin levels of the domestic duck (*Anas platyrhynchos*) and the juvenile herring or lesser black-backed gulls (*Larus argentatus* or *Larus fuscus*). J. Endocr. 48: 167-172.
- 30- Ensor, D.M., Phillips, J.G., O'Halloran, M.J. 1976. "The effect of extreme cold stress on nasal gland secretion in the domestic duck, *Anas platyrhynchos*. Gen. Comp. Endocrinol. 30: 223-227.
- 31- Berger, A. et al. 1987. Seminars in ornithology. (Olin Sewall, ed.) Laboratory of Ornithology at Cornell University, USA.
- 32- El Halawani, M.E. 1989. Prolactin/growth hormone family workshop. XI simposio internacional de endocrinología comparada, Málaga.
- 33- Nicoll, C.S., Pfeiffer, E.W., Fevold, H.R. 1967. "Prolactin and nesting behavior in phalaropes". Gen. Comp. Endocrinol. 8: 61-65.
- 34- Jones, R. 1871. "The incubation patch of birds". Biol Rev. 46: 315-339.
- 35- Meier, A.H. y Martin, D. 1971. "Temporal synergism of corticosterone and prolactin controlling fat storage in the white-throated sparrow, *Zonotrichia albicollis*. Gen. Comp. Endocrinol. 17: 311-318.
- 36- Ensor, D.M. y Phillips, J.G. 1970. "The effect of environmental stimuli on the circadian rhythm of prolactin production in the duck (*Anas platyrhynchos*). J. Endocr. 48: suppl. lxxi.
- 37- Silverin, B., Viebke, P.A., Westin, J. 1989. "Hormonal correlates of migration and territorial behavior in juvenile willow tits during autumn". Gen. Comp. Endocrinol. 75: 148-156.
- 38- Suh, H., y Frantz, A. 1974. "Size heterogeneity of human prolactin in plasma and pituitary extracts". J. Clin. Endocrinol. Metab. 39: 928-935.
- 39- Nyberg, F., Roos, P., Wide, L. 1980. Human pituitary prolactin. Isolation and characterization of three isohormones with different bioassay and radioimmunoassay activities". Biochem. Biophys. Acta 625: 255-265.

- 40- Yasuda, A., Itoh, H., Kawauchi, H. 1986. "Primary structure of chum salmon prolactins: occurrence of highly conserved regions". Arch. Biochem. Biophys. 244: 528-541.
- 41- Clapp, C. 1987. "Analysis of the proteolytic cleavage of prolactin by the mammary gland and liver of the rat: characterization of the cleaved and 16K forms". Endocrinology. 121: 2055- 2064.
- 42- Shoer, L., Shine, N., Talamantes, F. 1978. "Isolation and partial characterization of secreted mouse pituitary prolactin". Biochem. Biophys. Acta. 537: 336-347.
- 43- Proudman, J.A., Corcoran, D.H. 1981. "Turkey prolactin: purification by isotachopheresis and partial characterization". Biol. Reprod. 25: 375-384.
- 44- Paladini, A., Peña, C., Foskus, E. 1983. "Molecular biology of growth hormone". CRC Critical Rev. Biochem. 15: 25-56.
- 45- Li, C. y Chung, D. 1983. "Studies on prolactin 48: isolation and properties of the hormone from horse pituitary glands". Arch. Biochem. Biophys. 220: 208-213.
- 46- Ng, F. y Bornstein, J. 1978. "Hyperglycemic action of synthetic C-terminal fragments of human growth hormone". Am. J. Physiol. 234: E521-E526.
- 47- Salem, M. 1988. "Effects of the amino-terminal portion of human growth hormone on glucose clearance and metabolism in normal, diabetic hipophysectomized and diabetic-hipophysectomized rats". Endocrinology 123: 1565-1576.
- 48- Stevenson, R., Stebbing, N., Rudman, C., Williams, P. Cherrington, A. 1987. "The synthetic 32-46 fragment of hGH increases insulin and glucagon levels in the conscious dog". Metabolism 36: 400-404.
- 49- Mondon, C., Reaven, G., Ling, C., Lewis, U.J., Frigeri, L. 1988. "An amino-terminal peptide of growth hormone enhances insulin action in normal rats". Endocrinology 123: 827-833.
- 50- Chawla, R., Parks, J., Rudman, D. 1983. "Structural variants of human growth hormone: biochemical, genetic and clinical aspects". Annu. Rev. Med. 34: 519-547.
- 51- Lewis, U.J. 1984. "Variants of growth hormone and prolactin and their postranslational modifications". Annu. Rev. Physiol. 46: 33-42.
- 52- Carranza, M. 1987. "Purificación y caracterización parcial de la hormona de crecimiento (GH) hipofisiaria de pollo. Tesis de Lic. de Biología. Fac. de Ciencias, UNAM.

- 53- Montiel, J.L. 1989. "Isoformas moleculares de la hormona de crecimiento de pollo (cGH)". Tesis de Lic. de Biología. Fac de Ciencias, UNAM.
- 54- Navarrete, S. 1990. "Identificación, purificación y caracterización parcial de una variante glucosilada de la hormona de crecimiento de pollo". Tesis de Lic. de I.B.B. Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM.
- 55- Arámburo, C., Carranza, M., Sánchez, R., Ferera, 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.
- 56- Arámburo, C., Montiel, J.L., Navarrete, S., Ferera, G., Sánchez, R. 1990. "Molecular isoforms of chicken growth hormone (cGH). Different bioactivities of cGH charge variants". Gen. Comp. Endocrinol. 79 (en prensa).
- 57- Arámburo, C., Campbell, R., Scanes, C.G. 1989. "Heterogeneity of chicken growth hormone (cGH). Identification of lyplitic and non-lyplitic variants". Life Sci. 45: 2201-2207.
- 58- Berghman, L., Lens, P., Decuypere, E., Kuhn, E., Vandesaede, F. 1987. "Glycosylated chicken growth hormone". Gen. Comp. Endocrinol. 68: 408-414.
- 59- Yamamoto, K., Kobayashi, T., Kikuyama, S. 1986. "Purification and characterization of toad prolactin". Gen. Comp. Endocrinol. 63: 104-109.
- 60- Yamamoto, K. y Kikuyama, S. 1981. "Purification and properties of bullfrog prolactin". Endocrinol. Jap. 28: 59-64.
- 61- Chang, Y. y Papkoff, H. 1985. "Isolation and properties of sea turtle (*Chelonia mydas*) pituitary prolactin". Gen. Comp. Endocrinol. 60: 372-379.
- 62- Scanes, C.G., Bolton, N.J., Chadwick, A. 1975. "Purification and properties of an avian prolactin". Gen. Comp. Endocrinol. 27: 371-379.
- 63- Burke, W.H. y Papkoff, H. 1980. "Purification of turkey prolactin and the development of a homologous radioimmunoassay for its measurement". Gen. Comp. Endocrinol. 40: 297-307.
- 64- Papkoff, H. et al. 1982. "Biochemical and immunological characterization of pituitary hormones from the ostrich (*Struthio camelus*). Gen. Comp. Endocrinol. 48: 181-195.
- 65- McNeilly, A.S. y Andrews, P. 1974. "Purification and characterization of caprine prolactin". J. Endocr. 60: 359-367.

- 66- Kawauchi, H., y Tubokawa, M. 1979. "Isolation and characterization of fin whale prolactin". Int. J. Pept. Protein Res. 13: 229-234.
- 67- Papkoff, H. 1976. "Canine pituitary prolactin: isolation and partial characterization". Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 153: 498-500.
- 68- Chen, C.L., Neilson, J.T., Kumar, M.S., Estes, K.S. 1979. "Isolation and partial characterization of prolactin from equine pituitary gland (hypophysis)". Am. J. Vet. Res. 40: 1303-1306.
- 69- Matsuda, K., Yamamoto, K., Kikuyama, S. 1990. "Purification and properties of newt prolactin". Gen. Comp. Endocrinol. 77: 63-69.
- 70- Bergman, L. 1989. Comunicación personal.
- 71- Lowry, D., Rosenbrough, N., Farr, A., Randall, R. 1951. "Protein measurement with the Folin-phenol reagent". J. Biol. Chem. 193: 265-275.
- 72- Waterborg, J.H. y Mattheus, H.R. 1984. "The Lowry method for protein quantitation". En: Methods in molecular biology, vol. 1, Proteins. (J.M. Walker, ed.) Humana Press, U.S.A.
- 73- Laemmli, U.K. 1970. "Cleavage of structural proteins during assembly of the head of bacteriophage T4". Nature. 227: 682-685.
- 74- Nicoll, C. y Licht, R. 1971. "Evolutionary biology of PRLs and somatotrophins. II. Electrophoretic comparison of tetrapod somatotrophins". Gen. Comp. Endocrinol. 17: 490-507.
- 75- Towbin, H., Staehelin, T., Gordon, J. 1978. "Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gel to nitrocellulose sheets: procedure and some applications". Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 76: 4350-4354.
- 76- Colosi, P., Markoff, L., Ogren, L., Shine, N., Talamantes, F. 1981. "Isolation and partial characterization of secreted hamster pituitary prolactin". Endocrinology. 108: 850-854.
- 77- Ellis, S., Grindeland, R., Nuenke, J.M., Callahan, P.X. 1969. "Purification and properties of rat prolactin". Endocrinology 85: 886-894.
- 78- Colosi, P., Bewley, T., Talamantes, F. 1983. "Isolation, purification, and characterization of deer mouse (*Peromyscus maniculatus bairdii*) prolactin". Arch. Biochem. Biophys. 222: 621-627.
- 79- Jibson, M. y Talamantes, F. 1978. Gen. Comp. Endocrinol. 34: 402-407.

- 80- Cooper, T.G. 1977. The tools of biochemistry. John Wiley and Sons, Nueva York. 423 pp.
- 81- Scopes, R. 1982. Protein purification. Principles and practice. Springer-Verlag, Nueva York. 282 pp.
- 82- Haggi, E. y Aoki, A. 1981. "Prolactin content in rat pituitary gland. RIA of prolactin after different extraction procedures". Acta Endocrinologica. 97: 338-342.
- 83- Scott. A., y Lowry, P.J. 1974. "An efficient method for the purification of human prolactin avoiding the use of alkaline pH". J. Endocr. 63: 43P.
- 84- Lewis, U.J., Singh, R., Peterson, S. y Vanderlaan, W. 1980. "Human growth hormone: a complex of proteins". Rec. Prog. Horm. Res. 36: 447-508.
- 85- Gordon Grau, E. y Helms, L.M.H. 1990. "The tilapia prolactin cell-twenty-five years of investigation". Proc. Clin. Biol. Res. 342: 534-540.
- 86- Wingfield, J. 1990 "Hormonal control of territorial behavior in birds - field and laboratory investigations". Proc. Clin. Biol. Res. 342: 697-703.
- 87- Pickering, A.D. 1990. "Stress and the supression of somatic growth in teleost fish". Proc. Clin. Biol. Res. 342: 473-479.
- 88- Aler, G., Bage, G., y Fernholm, B. 1971. "On the existence of prolactin in Cyclostomes". Gen. Comp. Endocrinol. 16: 489-503.