



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE QUÍMICA

**CARACTERIZACIÓN DE LAS VARIANTES
MOLECULARES DE LA HORMONA DE
CRECIMIENTO EN LA BOLSA DE FABRICIO
DEL POLLO**

T E S I S

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
QUÍMICA FARMACÉUTICA BIÓLOGA**

P R E S E N T A

NOHEMÍ BARRAZA PAREDES



**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**

**EXAMENES PROFESIONALES
FACULTAD DE QUÍMICA**

MÉXICO, D.F.

2002.





Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

Jurado asignado

Presidente	García Ramírez Elpidio
Vocal	Plascencia de la Parra Francisco Javier
Secretario	Luna Muñoz Maricela
Primer Suplente	Nájera Martínez María Manuela
Segundo suplente	Sánchez Jiménez María de la Paz

Sitio donde se desarrolló el tema

Laboratorio de Bioquímica de Hormonas, Centro de Neurobiología, UNAM, Campus UNAM –UAQ Juriquilla Querétaro

Asesor del Tema: Dra. Maricela Luna Muñoz



Supervisor Técnico: Dr. Carlos Arámburo de la Hoz



Sustentante: Nohemi Barraza Paredes



Para Realizar esta tesis Nohemi Barraza contó con una beca del CONACyT.
Proyecto No.31817-N.
Esta tesis fué apoyada parcialmente por el proyecto IN227399 de PAPIIT.

Agradecimientos para:

Lic. Pilar Galarza Barrios responsable de la biblioteca por el apoyo en la búsqueda y recuperación de artículos.

Alberto Lara y Omar Hernández de la Unidad de cómputo del Centro.

Martín García Servín el jefe del Bioterio

Gerardo Courtois Torres Auxiliar de laboratorio D-01 (Bioquímica de Hormonas)

Pilgrim's Pride de México por la donación del material biológico para realizar esta tesis.

Al Dr. Enrique Pedernera por su apoyo y asesoría para la obtención del material biológico en los embriones de pollo

**“Lo más importante en este mundo
no es saber donde estás,
sino hacia donde vas”**

Johann Wolfgang Goethe (1749-1832)

AGRADECIMIENTOS

A mi madre por serlo, por siempre haber estado ahí, por apoyarme en mis locas aventuras de manera incondicional y por muchas veces tener la razón aunque a veces no me guste admitirlo. Te amo mamá.

A mi hermano porque hemos compartido la vida juntos, tanto en los momentos buenos y malos, pase lo que pase siempre voy a estar ahí para tí. Te quiero mucho Felipe aunque me cueste trabajo decirlo.

A mis super tías y tíos porque siempre me ayudaron, apoyaron y salvaron en múltiples ocasiones Carmen , Catita y Martín.

Al Dr. Carlos Arámburo de la Hoz por ser mi ejemplo a seguir y por haberme enseñado que la investigación significa " hacer un poco de luz donde antes no la había" usted puso esa luz en mi futuro académico.

A la Dra. Maricela Luna por todo el apoyo recibido y por su amistad.

A mis amigos y compañeros de laboratorio Martha, Hilda, Héctor, Javier, Laura y Gerardo sin ustedes creo que no hubiera sobrevivido muchas gracias por todo y al niño Rafa por las peleas y toda la ayuda.

A los güeros, de todo corazón les agradezco mucho que sean mis amigos y todo lo que hicieron por mí.

A la comunidad Colombiana de Querétaro que tan bien me trató: Zulma, Edgar, Moca y Constanza. Hubiera sido más difícil pasar esos fines de semana sin ustedes. Son una Berraquera!!!!!! Y por supuesto a los miembros de la comunidad villista Azu y Pilar.

A mis amigos de siempre, no existen palabras para decirles cuanto les agradezco su amistad y su apoyo Mayté, Nelly, Iván y Gibrán los quiero.

A mis nuevos amigos que estuvieron conmigo en la última parte de esta tesis: Melchor y Paty.

A Poncho Salgado (que puedo decir que no sepas ya Poke ???) y a su linda familia por aguantarme las horas de trabajo y las de no trabajo en su casa. Muchas Gracias.

Al Centro de Neurobiología de la UNAM en Querétaro por abrirme sus puertas para trabajar en esta tesis.

Por último , pero no menos importante a la UNAM (mi universidad) y a la Facultad de Química a las que les debo mucho más que la formación académica que recibí.

INDICE

Agradecimientos	4
Introducción	6
Hormona de Crecimiento (GH)	6
Estructura	7
Variantes Moleculares	9
Efectos	12
Heterogeneidad Funcional y Molecular	13
Mecanismo de Acción	14
Regulación de la Secreción	16
GH extrahipofisiaria	17
Comunicación entre sistema Neuroendocrino y Sistema Inmune.....	18
Papel de la GH en el sistema Inmune	19
Sistema Inmune de las Aves	24
La Bolsa de Fabricio	25
Planteamiento del Problema	29
Hipótesis	29
Objetivos	30
Materiales y Métodos	31
Material Biológico.....	31
Procedimientos.....	31
Preparación de Extractos de Bolsa de Fabricio	31
Cuantificación de Proteínas por el Método de Bradford	31
Electroforesis Desnaturalizante (SDS-PAGE)	32
Western Blot de Extractos de Bolsa de Fabricio	32
Cuantificación de GH total por ELISA	33
Inmunoprecipitación	34
Diseño Experimental	36
Resultados	37
Discusión	68
Conclusiones	80
Referencias	81
Anexos	97

INTRODUCCION

El crecimiento y desarrollo de los animales es un proceso multifactorial cuyo control y regulación depende de la compleja interacción del sistema neuroendocrino con diversos factores ambientales y genéticos (Arámburo et al 1993).

Estos factores obligan al organismo a generar acciones que le permitan mantener el equilibrio de todos sus sistemas y funciones, por lo que de manera habitual las diferentes células que lo constituyen se comunican a través de mecanismos químicos y/ o eléctricos empleando diversos mensajeros.

En la comunicación endocrina, los mensajeros utilizados son las hormonas. Estas son moléculas con actividad biológica que son secretadas por las glándulas endocrinas hacia la sangre, que se encarga de transportarlas hasta sus órganos blanco, en donde producen diversos efectos bioquímicos.

La naturaleza química de las hormonas es diversa, hay hormonas de tipo esteroideas, polipeptídicas, aminas o glicoproteínas entre otras. Del mismo modo las funciones que realizan estas hormonas en el organismo son variadas, entre estas funciones se pueden mencionar: crecimiento, maduración y funcionamiento del sistema nervioso central, reproducción y el metabolismo y control de los niveles de energía, además juegan un papel importante en la respuesta a los estímulos ambientales tales como los cambios de temperatura, la disponibilidad de alimento, retos inmunológicos y respuesta hacia agentes infecciosos.

El sistema neuroendocrino integra todas estas respuestas de manera que tengan un valor máximo de adaptación y de supervivencia (Arámburo, 1993).

El proceso de crecimiento y desarrollo es quizá uno de los ejemplos más evidentes de la comunicación y coordinación entre las células, uno de los mensajeros protagonistas en este proceso es la hormona de crecimiento (GH, por sus siglas en inglés Growth Hormone)

Hormona de Crecimiento (GH)

La GH pertenece a una familia de hormonas peptídicas que se producen principalmente en la glándula hipófisis de todos los vertebrados estudiados hasta el momento y por las placentas de los mamíferos, aunque recientemente se ha encontrado que la GH se sintetiza en otros tejidos extrahipofisarios, incluso en algunos que se consideraban órganos blanco.

Entre los miembros de esta familia se encuentra también la prolactina, la somatolactina y el lactógeno placentario, todas estas hormonas se encuentran relacionadas tanto estructural como funcionalmente (Arámburo, 1993), por lo que se ha propuesto que provienen de un único gen ancestral (Arámburo, 1997) común.

Además de los efectos sobre el crecimiento y desarrollo de los organismos, la GH interviene en diversos procesos metabólicos de varios órganos y sistemas diferentes, y tiene actividad sobre la proliferación y diferenciación celular, estos efectos pueden ser directos por acción de la hormona sobre el órgano blanco o mediados por el factor de crecimiento insulinoide tipo I o IGF-I.

A continuación se presentan las principales características sobre la estructura, mecanismo de acción y funciones que tiene la GH.

Estructura de la Hormona de Crecimiento

La GH se sintetiza como prehormona de 225 aminoácidos, la forma madura se compone de una cadena de aproximadamente 191 aminoácidos (dependiendo de la especie), tiene dos asas, una grande central y una pequeña próxima al extremo carboxilo terminal, las dos están formadas por puentes disulfuro localizados en los residuos 57-165 y 182-189.

La forma más abundante de la hormona en la mayoría de las especies tiene un peso molecular (PM) aproximado de 21 a 22 kiloDaltones (kDa). Su estructura tridimensional obtenida por cristalografía de rayos X de la GH porcina y la humana, (Goffin, 1996), está constituida por 4 α -hélices antiparalelas, en los segmentos 7-34, 75-87, 106-127 y 152-183, cada una tiene diferente carácter hidrofóbico, la número 4 es la más hidrofóbica de todas (Scanes, 1995; Abdel-Meguid, 1987). En los segmentos que constituyen las 4 α -hélices se han encontrado 4 dominios altamente conservados (A_{GH} , B_{GH} , C_{GH} y D_{GH}), en todos los vertebrados y que corresponden a las posiciones 13-33, 54-94, 113-132 y 157-187, y se encuentran separados por dominios variables o deleciones. Los dominios A_{GH} , B_{GH} y C_{GH} corresponden a α -hélices con un arreglo hacia el exterior de la molécula de GH, mientras que el dominio D_{GH} se encuentra localizado en el interior de la molécula. Este arreglo se ha observado en todas las GHs estudiadas hasta ahora (Chen199 ; Scanes, 1995).

En las aves se conoce la estructura primaria de la proteína y del ARNm que la codifica en el pollo, pavo y pato, estas son casi homólogas con una diferencia de solo 3 aminoácidos y una deleción en la secuencia en el caso de la del pato comparada con la de pollo (Chen, 1988; Hull,1997).

En el pollo la GH representa aproximadamente el 10% de la proteína hipofisiaria total (Sturkie,1986), la prehormona tiene 216 aminoácidos y la hormona madura 191 residuos.

Los puentes disulfuro se encuentran en las posiciones 53-164 y 181-189. Su peso molecular aproximado es de 22kDa y su punto isoeléctrico (pI) es de 5.1 (Arámburo,1993; Hull,1997a) .

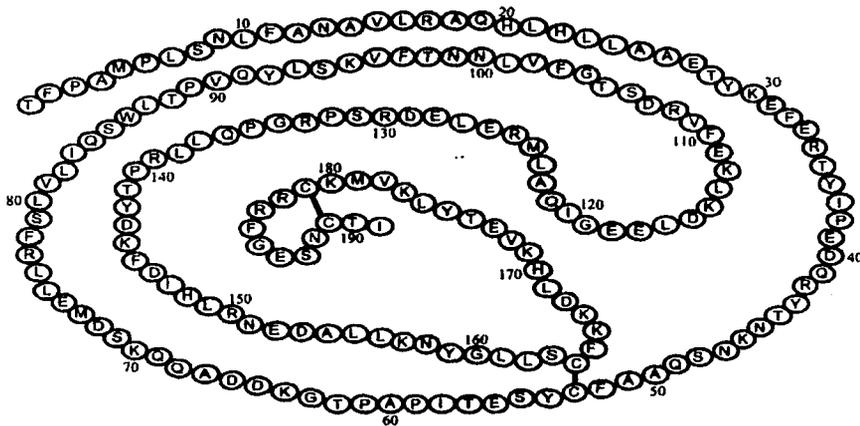


Fig. 1. Estructura Primaria de la cGH

La GH presenta dos sitios de unión a su receptor: el sitio 1 está constituido por la región del centro hacia el extremo carboxilo de la hélice 4, los residuos 54-74 de un asa y parte de la hélice 1; el sitio 2 lo constituyen la parte del extremo aminoterminal de la hélice 1, la hélice 3 y los residuos 12, 16 y 19 (Cunningham, 1991). (Fig. 2)

Se sabe que una molécula del receptor se une al sitio 1 de la GH y después, una segunda molécula de receptor se une al sitio 2 con menor afinidad, la dimerización del receptor es aparentemente indispensable para iniciar la transducción de la señal, este mecanismo ocurre cuando la GH se une a receptores somatotónicos y a lactogénicos (Goffin, 1996).

Hay evidencia sobre la importancia de la hélice 3 en la actividad biológica de la GH. Existe un segmento anfifílico entre los residuos 109-126 que contiene una glicina (Gly) en la posición 119, que está conservada en todos los vertebrados y es determinante en algunos de los efectos estudiados de la GH como: secreción del factor de crecimiento insulinoide tipo I (IGF-I) hepático, el efecto tipo insulina y la lipólisis (Scanes, 1995; Chen, 1995).

Además ratones transgénicos que expresan una mutante de la GH bovina con las sustituciones de aminoácidos Glu-117 por leucina, Gly-119 por arginina y alanina-122 por aspartato, muestran una disminución en el crecimiento y las concentraciones de IGF-I circulante, lo que sugiere que este análogo de la GH actúa como un antagonista de la hormona (Kopchik, 1995)

Al parecer la participación de esta Gly-119 consiste en mantener una hendidura entre la hélice 1 y 3 después de la interacción con la primera molécula de receptor y permitir así la interacción con la segunda molécula de receptor.

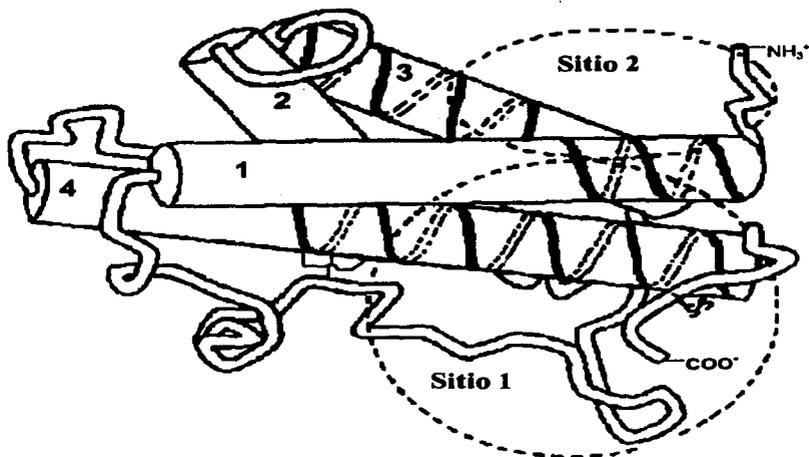


Fig. 2. Sitios de unión al receptor de la GH

Variantes moleculares de la Hormona de Crecimiento

La GH está constituida por una familia de proteínas homólogas pero no idénticas entre sí (Arámburo, 1993; Houston, 1988). Este patrón de variación estructural ha sido descrito en mamíferos (Hart, 1984; Lewis, 1984), aves (Arámburo 1989a, 1989b; Berghman, 1987; Houston, 1988), reptiles (Yasuda, 1989), anfibios (Martens, 1989) y peces (Kawauchi, 1986), y se ha postulado que puede contribuir a la diversidad funcional de la hormona.

La evidencia sobre la caracterización bioquímica de las variantes moleculares se encuentra dispersa, pero hay varios datos que señalan su importancia funcional. Por ejemplo, se han descrito algunos de los mecanismos por los cuales se sintetizan ciertas variantes y se ha observado que estas son secretadas en diferentes proporciones dependiendo del estado fisiológico del animal. Además existen algunos datos sobre su actividad biológica y se conocen ejemplos de funciones específicas o de la diferente potencia de sus efectos. (Scanes, 1995)

La fuente de la heterogeneidad molecular de la GH puede estar relacionada con:

- a) Multiplicidad génica, b) procesamiento diferencial del ARN mensajero; c) modificaciones postraduccionales y d) modificaciones postsecreción.

- *Multiplicidad Génica*

En principio se pensó que solamente existía un gen que codificaba para la GH, sin embargo, ahora se sabe que en el caso del humano existen 2 genes que codifican para 2 proteínas muy similares. Al primero se le denomina normal (hGH-N) y se expresa en la hipófisis; al segundo se le llama variable o hGH-V y se expresa en el sincitiotrofoblasto de la placenta y en el testículo (Frankenne, 1987; Liebhaber, 1989; Untergasser, 1998). La proteína resultante de la expresión del hGH-V difiere de la hGH-N por 13 aminoácidos y presentan un 92% de homología, está constituida por 191 aminoácidos, su peso molecular es de aproximadamente 22kDa, tiene un carácter más básico que la proteína codificada por hGH-N, se encuentra glicosilada y tiene un sitio único de glicosilación tipo N, se une a los receptores de PRL y a los de GH y se ha observado que es biológicamente activa (Hennen, 1988; Ray, 1990; Baumann, 1991).

También en la hipófisis de humanos se ha encontrado un péptido glicosilado de aproximadamente 12 kDa relacionado con la GH y por su secuencia se piensa que es producto de un gen diferente al de la hGH-N y la hGH-V (Díaz, 1993).

En algunos peces óseos (esturión, salmón y anguila) (Kawauchi, 1986, Yasuda, 1992; Yamaguchi, 1987) y anfibios (rana) (Martens, 1989) se han identificado dos genes que codifican para la GH y son expresados en la hipófisis, la estructura primaria de los productos de ambos genes es muy similar a la GH de otros vertebrados y se conocen como GH-I y GH-II. En los esturiones, ambas contienen 191 aminoácidos, dos puentes disulfuro en los residuos 52-163 y 180-188, difieren entre sí por 3 aminoácidos y al comparar la secuencia con otros vertebrados presentan mayor homología con los tetrápodos (63-76%) que con los teleosteos (salmón y anguilas entre otros) (42-63%) (Yasuda, 1992).

- *Procesamiento diferencial del ARN mensajero*

En roedores y humanos se han identificado diferentes RNA mensajeros (ARNm) producto del gen de GH. El gen de la hGH-N produce tres ARNm y las proteínas resultantes son las hGH de 22 kDa con 191 aminoácidos; una de 20 kDa, que presenta una delección en el exón 3 de 45 nucleótidos (15 aminoácidos correspondientes al segmento 32-46 de la secuencia) y representa del 5 al 10 % del monómero sintetizado en la hipófisis; y finalmente una variante de 17.5 kDa (Lewis, 1978, 1992, 2000; Masuda 1988; Palmethofer, 1995). La forma de 20 kDa también se ha identificado en ratones y una variante de 17.5 kDa en la hipófisis (Sinha, 1984; Lecomte, 1987).

Otras formas moleculares de la GH identificadas son producto de la hGH-V, un ARNm con 800pb que produce una proteína de 22 kDa, otro de 1250pb que mantiene el intrón D (hGH-V2), aunque no se ha identificado la proteína, podría codificar para una proteína de 220 aminoácidos, y otro más reconocido en el testículo que mantiene también parte del intrón D y codifica para una posible proteína de 25kDa con 219 aminoácidos, la cual pierde el sitio de glicosilación presente en la

hGH-V en los residuos Asn₁₄₀ y adquiere otro en la posición 148, a esta forma molecular se le conoce como GH-Vdelta4 (Ray,1989; Untergasser, 1998).

- **Modificaciones Postraduccionales**

Las modificaciones postraduccionales de la GH que se han identificado incluyen: la agregación u oligomerización, desamidación, proteólisis con o sin reducción, glicosilación, fosforilación y acetilación.

Hasta ahora todas las formas moleculares de la GH que se han descrito en aves parecen derivar de modificaciones postraduccionales y existen evidencias suficientes de la presencia de una serie de variantes de masa tanto en la adenohipófisis (Arámburo,1990; Houston, 1988) cómo en el plasma (Montiel, 1992). En la glándula de todas las especies estudiadas, el análisis mediante electroforesis desnaturalizante (SDS-PAGE) bajo condiciones no reductoras revela que predomina la forma monomérica de 22 kDa (Arámburo,1990; Baumann, 2000). Sin embargo, las formas díméricas y otros oligómeros pueden representar hasta el 40% de la GH secretada al plasma en humanos. La degradación de los dímeros de la forma de 22 kDa y 20 kDa es más lenta (5 y 2 veces menor) que la de sus respectivos monómeros. Por esta razón es comprensible que la proporción de oligómeros sea mucho más elevada en el plasma que en la hipófisis (Baumann, 1986). Se piensa que los dímeros de GH identificados en mamíferos y aves se unen por puentes disulfuro intercatenarios o por uniones no covalentes; sin embargo, aunque no se conoce la naturaleza de la unión, se ha observado en pollos y humanos la presencia de dímeros posiblemente unidos covalentemente (Arámburo C y Scanes CG datos no publicados). Cuando la electroforesis se hace en condiciones reductoras desaparece la mayor parte de las formas de alto peso molecular, incrementa la proporción del monómero y permanece una pequeña cantidad de dímero resistente a la reducción.

De modo adicional, se han encontrado variantes de masa que probablemente sean producto de un proceso proteolítico: una forma de 25kDa observada en condiciones no reductoras y un fragmento de 15 kDa observada en condiciones reductoras en pollo (Arámburo,1993). La presencia de la variante de 25 kDa que posiblemente sea producto de un procesamiento proteolítico sugiere una forma cortada de dos cadenas. Esta forma, al analizarse en condiciones reductoras desaparece e incrementa la proporción del fragmento de 15 kDa. Por estudios *in vitro*, se ha sugerido que enzimas del tipo de la trombina y/o colagenasa podrían estar involucradas en la generación de la cGH cortada *in vivo* (Arámburo, 1991; 1993, 2001).

La GH glicosilada se ha identificado en la hipófisis y en el plasma de varias especies de mamíferos, en algunos peces óseos, en el tiburón y en el pollo (Sinha, 1987; Berghman, 1987; Arámburo, 1991; Montiel, 1992). Esta forma glicosilada en humanos, representa aproximadamente el 1% de la hGH-N total (Scanes, 1995). Sin embargo existen evidencias –en humanos y ratas- de que la tasa de glicosilación de la GH hipofisiaria cambia en algunas situaciones fisiológicas relacionadas con la etapa reproductiva y el desarrollo fetal (Sinha, 1987; 1990_a, 1990_b). Por otro lado la hGH-V presenta un sitio de glicosilación potencial tipo N, codificado por el exón 5 en la región comprendida entre los residuos Asn₁₄₀-Gln₁₄₁-Thr₁₄₂ de su secuencia.

Otra forma encontrada en la hipófisis de humanos es la variante de 12 kDa que también contiene un sitio consenso N de unión a carbohidratos (Díaz, 1993).

Aunque son escasos los reportes sobre la forma glicosilada de GH de vertebrados no mamíferos, estos sitios de glicosilación potencial se pueden observar en la región Asn₁₈₈-Cys₁₈₉-Thr₁₉₀ en la mayoría de las secuencias de las GHs de aves, reptiles, anfibios y peces estudiadas y en la región Asn₄₆-Lys₄₇-Thr₄₈ en el caso del tiburón. Sin embargo se ha identificado una forma glicosilada de 24 kDa de la hGH-N que no contiene ese sitio consenso, por lo que cabe la posibilidad que en los mamíferos una parte de la GH hipofisiaria se encuentre asociada a carbohidratos a través de uniones de tipo O (Haro, 1996).

En el pollo se identificó una forma glicosilada de la GH (G-cGH) que tiene un peso molecular aparente de 29kDa en condiciones reductoras, esta forma se ha medido en el plasma y muestra variaciones de acuerdo con la etapa reproductiva (Arámburo, 1991).

Cuando se analizó la GH de pollo (cGH) por electroforesis no desnaturizante, se identificaron tres variantes de carga (0.23, 0.3 y 0.35) (Arámburo, 1989). Cuando se incrementa la resolución usando isoelectroenfoque y western blot es posible identificar de ocho a diez variantes de carga (Arámburo, 1990; Houston, 1988).

Otra modificación postraduccional que contribuye a la heterogeneidad molecular de la proteína es la fosforilación, esta modificación le confiere características más ácidas a la molécula (Arámburo, 1993). Existen evidencias sobre la existencia de formas fosforiladas de la GH en humanos, ratas, ovinos y pollos. Se ha observado que la GH humana puede ser fosforilada por tirosina cinasas en las Tyr₂₈, Tyr₃₅ y Tyr₄₂ (Baldwin, 1983). En el pollo una proporción significativa de la hormona parece estar fosforilada (Arámburo, 1989) y, además las células de la hipófisis del pollo en cultivo primario pueden incorporar fosfato radioactivo a la banda inmunorreactiva a cGH cuya liberación es estimulada por la hormona liberadora de GH (GHRH) (Arámburo, 1990). Estudios *in vitro* demuestran que la hormona también puede ser fosforilada por la proteína cinasa A, dependiente de AMPc (Arámburo, 1990). En el salmón la incubación de la hormona con fosfatasa alcalina resulta en un cambio de carga, lo que sugiere la presencia de GH fosforilada (Skibeli, 1990).

Efectos de la GH

La heterogeneidad molecular puede contribuir a explicar la diversidad funcional de la hormona. Así, se han descrito efectos metabólicos directos que facilitan el crecimiento muscular y la conservación de la glucosa, y efectos sobre el crecimiento esquelético que son parcialmente directos y parcialmente mediados por el factor de crecimiento insulinoide tipo I (IGF-I).

Entre los primeros efectos se incluyen: la estimulación de la lipólisis, captura y transporte de aminoácidos, síntesis de proteínas, inhibición de la lipólisis estimulada por adrenalina o por glucagon, inhibición de la lipogénesis (efecto diabético) y participación de la regulación de la absorción tubular de algunos iones. Por otra parte, estimula el crecimiento lineal del esqueleto participando en la diferenciación de los precondrocitos, y promueve la diferenciación de preadipocitos,

mioblastos y posiblemente de gran variedad de tejidos, incluyendo la placa cartilaginosa de la epífisis (Arámburo,1993) . En la tabla 1 se enlistan algunos de los efectos que se le han atribuido a esta hormona.

Tabla 1. Funciones conocidas de la hormona de crecimiento

Efectos	Referencias
Crecimiento corporal directo e indirecto	Scanes C.G 1995 (a)
Liberación de IGF-I	Scanes C.G 1995 (a)
Mitogénesis en osteoblastos	Scanes C.G 1986
Adipogénesis (diferenciación)	Scanes C.G 1995 (b)
Angiogénesis	Gould, J. 1995
Diabetógeno	Scanes C.G 1995 (c)
Mantenimiento de la población celular en tejido linfático	Scanes C.G 1995 (d)
Estimulación del transporte de glucosa	Scanes C.G 1995(c)
Lipólisis	Arámburo, C. 1989 (a)
Antilipolítico inducido por glucagon	Arámburo, C. 1989 (a)
Antilipogénico	Scanes C.G 1995 (b)
Transporte de aminoácidos y síntesis de proteínas en músculo.	Scanes C.G 1995 (e) Lombardi, G. 1997
Modulación en la función reproductiva y maduración sexual	Scanes C.G 1995 (f)
Osmorregulación	Scanes C.G 1995 (g)
Estimulador en la liberación de insulina	Scanes C.G 1995 (h)
Influencia en la tasa de producción de T3 circulante (inhibición de la actividad de la 5-D-III hepática en pollos)	Scanes C.G 1995 (h) Darras, V. M. 1993
Efecto neuroendocrino (autorregulación a través del hipotálamo)	Harvey, S. 1995 (a)
Neuromodulador y proliferación de neuronas y células gliales	Harvey, S. 1995 (b)

Heterogeneidad molecular y funcional de la GH

Se ha reportado especificidad de funciones para los distintos miembros de la familia de la GH. En humanos, se ha visto que la isoforma de 20kDa presenta actividad biológica. Sin embargo, existe controversia en cuanto a la actividad biológica de esta variante de la GH, por un lado porque las dosis utilizadas en los experimentos son farmacológicas y no fisiológicas y por otro porque la GH de 20kDa utilizada para los estudios es de origen biosintético y hay que considerar que las pruebas no son homólogas (Lewis, 2000) .

Aunque se propone que la variante de 20 kDa presenta menor afinidad por el sitio 1 de unión al receptor que el monómero de 22kDa (Wada,1998) , la afinidad por el sitio 2 es mayor por lo que se considera que son igualmente efectivas en estudios realizados por proteínas de unión (Uchida, 1999) . Esto es consistente con el hallazgo de afinidades equivalentes para ambas formas moleculares de la hormona utilizando células de ovario de hamster (CHO) transfectadas con el receptor para la hGH (Wada 1997) o incluso una mayor potencia para la variante de 20 kDa en experimentos *in vitro* con células Ba/F3-hGHR en las que se midió la expresión del ARNm del IGF-I (Yoshizato, 2000). En cuanto a sus efectos somatogénicos existen algunas

contradicciones, en estudios en ratas hipofisectomizadas parece ser menos activa que la forma de 22 kDa (Kostyo, 1987), sin embargo en ratas con enanismo espontáneo y normales tratadas con ambas formas moleculares no se observan cambios significativos en la ganancia de peso (Ishikawa, 2000). Además en un estudio *in vitro* utilizando células tumorales de glándula mamaria (T-47D) se observó que la variante de 20 kDa y la GH de 22 kDa mostraron efectos contrarios sobre la proliferación celular y síntesis de DNA (Fujikawa, 1998). Reportes sobre los efectos metabólicos de la GH de 20 kDa muestran que presenta efectos diabéticos, tipo insulina y lipolíticos en ratones e *in vitro*, utilizando la línea celular de adipocitos 3T3-1-hGHR, en la que se observó que la estimulación es mayor que con la GH de 22 kDa y que es un efecto dependiente de la expresión de genes posiblemente a través de la activación de la vía de las proteínas STAT (Asada, 2000).

Por otro lado se ha identificado que algunos fragmentos de la GH humana que contienen el extremo amino terminal poseen efecto hipoglucemiante, incrementando el efecto de la insulina, a diferencia del fragmento 172-191 de GH humana, que tiene un efecto hiperglucemiante y antilipogénico (Scanes, 1995).

La hGH-V es secretada a la circulación durante la gestación. En bioensayos sobre ganancia de peso en ratas hipofisectomizadas se ha observado que presenta la misma actividad que la hGH-N (McLeod, 1991), y se sugiere que pueden unirse con la misma afinidad a los receptores somatotónicos porque las diferencias entre sus secuencias no afecta a los sitios de unión, por lo tanto la interacción se lleva a cabo utilizando el mismo mecanismo molecular (Goffin, 1996). Esta variante también se une a receptores de PRL y en algunos bioensayos se ha determinado su actividad mitogénica en células Nb2. Sin embargo, sus efectos metabólicos parecen ser equivalentes de acuerdo con estudios *in vitro* sobre la oxidación de glucosa y la lipólisis en tejido adiposo de rata (Nickel, 1990; McLeod, 1991; Goodman, 1991). Se piensa que es la responsable en parte de los efectos anabólicos y somatotrópicos en la unidad feto-placentaria y en el anabolismo materno de la segunda mitad de la gestación de la mujer (Hennen, 1987).

En el pollo, al menos dos variantes de carga ($R_f = 0.23$ y 0.3) presentan diferente bioactividad en el metabolismo de lípidos: la 0.23 es esencialmente lipolítica mientras que la 0.3, manifiesta una actividad antilipolítica (Arámburo, 1989; 1993). Además, también se ha identificado una variante de masa de 15kDa, que corresponde a la porción aminoterminal de la secuencia que ha mostrado actividad biológica, esta resultó ser angiogénica en un ensayo de angiogénesis en células endoteliales de cerebro bovino, y también es capaz de inhibir la actividad de la desyodasa tipo III en el hígado embrionario del pollo (Arámburo, 2001).

Mecanismo de acción de la GH

El receptor de GH (GHR) pertenece a la superfamilia de receptores hematopoyetina/citocinas, en la que se encuentran también los receptores de la PRL, citocinas, interferón e interleucinas entre otros. Se caracteriza por contener un dominio extracelular, un dominio membranal y uno intracelular (Harvey, 1995; Carter Su,

1996). Los GHR muestran heterogeneidad molecular que también puede contribuir con la diversidad funcional de la GH. El GHR presenta modificaciones postraduccionales tejido-específicas como la glicosilación y ubiquitinación. Además, por edición alternativa se producen transcritos y proteínas de diferentes tamaños. A través de estudios con anticuerpos monoclonales se han identificado subtipos de GHR en algunos tejidos como el hígado y el tejido adiposo, y comparando la unión de estos receptores en dichos órganos con las formas 22 y 20 kDa de GH humana, se encontraron diferencias en su capacidad de unión (Harvey, 1995).

La GH se une secuencialmente a dos moléculas de su receptor, causando su dimerización y cambios estructurales importantes para la función de la hormona (Coffin, 1996). Estos cambios generan la unión del GHR y una tirosina cinasa de la familia Janus (JAK2), promoviendo la fosforilación de ambos por la misma JAK2.

Esto produce la asociación y activación de una cascada de proteínas, como SHC, Grb2, posiblemente Sos, Ras, Raf y después las proteínas cinasas asociadas a microtúbulos, activadoras de la mitosis o reguladas por una señal extracelular (cinasas MAP/ERK).

La GH también induce la expresión de genes que codifican factores de transcripción involucrados en la proliferación celular como por ejemplo c-myc.

La regulación de eventos metabólicos por GH refleja la expresión de genes específicos para cada tipo celular. En los adipocitos la GH participa en la expresión de enzimas lipogénicas y lipoproteínas a través de fos. Asimismo, interfiere en la expresión de algunos de los transportadores de glucosa (GLUT1) (Tai, 1990; Carter Su, 1996) y, en el hígado, en la manifestación del gen que codifica para IGF-I (Carter Su, 1996).

Se sugiere que a través de una vía directa y dependiente del tipo celular, en la que participa JAK2, la GH activa proteínas de la familia STAT, que son transductoras de señal y activadoras de la transcripción. Estas se unen a otras proteínas formando homodímeros y heterodímeros que se translocan al núcleo y se unen con el DNA, activando la transcripción de genes blanco.

Una tercera vía de transducción de GH interviene en el efecto tipo insulina, es decir, en el aumento del transporte de glucosa por reclutamiento de GLUT1 y 4 en la membrana (Yocota, 2000), en esta vía la GH y la insulina comparten moléculas señal como las llamadas "sustrato principal del receptor de insulina" (IRS).

En respuesta a GH se fosforilan IRS-1 e IRS-2, y se piensa que esto se lleva a cabo a través de JAK2. En consecuencia, se activa la cascada de fosfatidilinositol, que se sabe que aumenta el transporte de glucosa, la síntesis del DNA y la actividad de una enzima implicada en el ciclo celular, p70 15kDa. También se conoce que esta cinasa interviene en la síntesis de lípidos dependiente de GH y en la lipólisis inducida por noradrenalina (Carter Su, 1996).

En la señalización de respuesta a GH, se ha reconocido una cuarta vía, en esta se activa una proteína cinasa C (PKC) que se requiere en efectos como lipogénesis, expresión de c-fos, unión de proteínas nucleares a oligonucleótidos, incremento de Ca^{2+} intracelular y activación de otras cinasas.

La activación de PKC ocurre mediante la unión del GHR a una proteína G, que a su vez se une a la fosfolipasa C y, en consecuencia, se produce diacilglicerol (DAG), que es un activador de PKC. El incremento de Ca^{2+} intracelular se produce por un aumento en los canales tipo L activados por voltaje, y es importante en algunos efectos de la GH, como los tipo insulina.

Otro efecto de GH que requiere el efecto permisivo de PKC es la expresión de enzimas como el citocromo p450, que está involucrado en el metabolismo de esteroides en ambos sexos e influido por las diferencias sexuales en la secreción de GH (Scanes, 1995; Carter Su, 1996).

Regulación de la secreción de GH

Se sabe que la GH se sintetiza y almacena en los somatotropos de la adenohipófisis y sus niveles circulantes se modifican ante situaciones fisiológicas como: el crecimiento y desarrollo, la privación de alimento, la exposición al frío, el ejercicio y durante el sueño de ondas lentas (Devesa, 1992).

La regulación de la liberación de la GH es un proceso multifactorial y dinámico que difiere entre las distintas especies y se modifica de acuerdo con el estado fisiológico del animal. Este complejo sistema que controla la síntesis y la secreción de la GH ha sido reportado a partir de estudios realizados principalmente en mamíferos, y se sabe que su patrón de liberación está influenciado por factores metabólicos, endocrinos, inmunes y nerviosos que participan a diferentes niveles de esta red tan complicada.

Los neuropéptidos hipotalámicos como la hormona liberadora de la hormona de crecimiento (GHRH) y la somatostatina (SRIF) constituyen –en la mayoría de las especies estudiadas– las principales señales, estimulante e inhibitoria respectivamente, de la secreción de GH. Muchos de los factores reguladores de GH ejercen su efecto en forma indirecta a nivel del hipotálamo controlando la liberación de estas dos hormonas hipofisiotrópicas.

Los somatotropos son las células más abundantes en la hipófisis, en los mamíferos se encuentran distribuidos ampliamente por toda la glándula, mientras que en los vertebrados no mamíferos se encuentran distribuidos en regiones específicas. En particular, en las aves se encuentran localizados en un 90% en el lóbulo caudal de la adenohipófisis. Se ha demostrado que el tamaño y número de los somatotropos así como el de los gránulos de secreción están regulados por factores endocrinos y ambientales. Existe evidencia acerca de que cambian durante la ontogenia; durante la etapa fetal se pueden identificar a partir de los 12 días embrionarios en el pollo, conforme se acerca el día de la eclosión aumenta el número de somatotropos y el tamaño de los gránulos de secreción, posteriormente se observan en gran número en las primeras etapas de desarrollo, con un incremento máximo entre la 5ª y 11ª semana de edad, y se reduce en animales viejos (Malamed, 1993; Malamed, 1997). Por otro lado también se piensa que las variaciones detectadas por el dimorfismo sexual (los machos presentan mayor número de células que las hembras) y durante el proceso reproductivo están relacionados con los cambios de las hormonas sexuales e hipotalámicas de la vida fetal y postnatal (Harvey, 1995).

Además de los somatotropos la GH se sintetiza también en células secretoras de prolactina o en los llamados somatolactotropos o mammosomatotropos y lactotropos. Estas células comparten características morfológicas semejantes a los somatotropos y lactotropos. En la regulación de la proliferación de estas células participan las hormonas esteroides, como la testosterona que inhibe la proliferación mientras que los estrógenos la estimulan (Boockfor, 1986).

Otras células hipofisarias en las que se sintetiza la GH son los llamados tiosomatotropos que también sintetizan TSH, recientemente identificados en la región ventral de la adenohipofisis de pollos (Stirling, 1997).

GH extrahipofisaria

El descubrimiento de la presencia GH en otros sitios diferentes a la hipófisis es algo relativamente reciente. En 1981 Kyle y colaboradores identificaron moléculas parecidas a la GH en varios tejidos extrahipofisarios, como hígado, riñón, pulmón, músculo estriado, colon, estómago y cerebro de humanos, a partir de ensayos de paralelismo por radioinmunoensayo e inmunocitoquímica. Desde este trabajo se propuso como una posibilidad que la GH fuera sintetizada localmente y pudiera ejercer un efecto parácrino, autócrino o intracrino.

Tanto la GH como su ARN mensajero han sido encontrados en: sistema nervioso (Yoshizato, 1998; Harvey, 2001; Render, 1995a), sistema inmune (Hull, 2000; Recher, 2001), sistema esquelético (Harvey, 2000), sistema cardiovascular (Costa, 1993; Wu, 1996), sistema digestivo (Tresguerras, 1999; Kyle, 1981) y sistema reproductor (Hu, 2000; Untergasser, 1997; Berg, 1999).

La presencia de GH en estos tejidos se ha determinado por la identificación del ARNm en extractos de tejidos y por hibridación *in situ*. Se sugiere que la producción local de GH es regulada por mecanismos independientes a los de la GH hipofisaria, y que responden a necesidades propias del tejido que la produce (Weiget, 1991; Lantinga-VanLeeuwen, 1999). Además, se ha observado que la GH inmunorreactiva no se modifica por efecto de la hipofisectomía en algunos extractos de tejido como el cerebro (Ramesh, 2000).

Existen evidencias de que la hormona sintetizada en tejidos como el cerebro, bazo, timo y bolsa de Fabricio en pollos es similar en tamaño y antigenicidad a la hormona hipofisaria, así como el ARNm que presenta una alta homología y sitios de corte por las enzimas Bam HI y RsaI equivalentes al de la hipófisis (Render, 1995 ^{a,b}).

Además se han observado algunas variantes de masa con inmunorreactividad semejante a cGH en extractos de tejidos reproductores, y la forma molecular predominante es un fragmento de 17kDa (Luna, 2000 datos no publicados).

El papel de esta hormona sintetizada en tejidos extrahipofisarios todavía no se define con certeza. En el caso de los embriones de pollo -donde se encontró GH parecida en antigenicidad y peso a la que se encuentra comúnmente en hipófisis- se presume que el desarrollo es independiente de la GH hipofisaria, y que esta actúa como un factor de crecimiento durante el desarrollo embrionario; además por su distribución en diferentes núcleos del hipotálamo y regiones adyacentes se plantea que podría influenciar el comportamiento social del animal, el consumo de

alimento, funciones del sistema nervioso autónomo y la reproducción (Ramesh, 2000). En el caso de animales maduros (rata, pollo) en donde se ha encontrado que se produce también en varios otros sitios fuera del cerebro el papel específico de la GH en esos tejidos y la población celular que se encarga de producirla aún no está claro.

Lo único que sí sabemos hasta ahora es que la cantidad de GH en estos tejidos extrahipofisarios es menor en comparación con la que se encuentra en los somatotropos de la hipófisis. Así por ejemplo, la inmunoreactividad a GH en cerebro, timo y Bolsa de Fabricio en pollos representa menos del 10% de la GH existente en la hipófisis (Render, 1995 b).

Comunicación entre el sistema neuroendocrino y el sistema inmune

Durante muchos años el sistema inmune y el sistema neuroendocrino se habían visto como un par de redes autónomas que se encargaban de mantener el balance entre el organismo y el medio ambiente (Gilbert, 1991).

El sistema neuroendocrino se encargaba de responder hacia los estímulos externos, como la temperatura, dolor y stress, mientras que el sistema inmune se encargaba de hacerle frente a agentes patógenos como bacterias y virus o a lesiones.

Sin embargo a lo largo de estos últimos años, se ha presentado una gran cantidad de evidencia que revela que no son dos entidades totalmente diferentes y aisladas, sino que existe una compleja red de comunicación entre estos dos sistemas y que ésta es mediada por una gran cantidad de mensajeros provenientes de uno u otro sistema.

Dicha interacción bidireccional se ha propuesto con base en hallazgos como: La caracterización de receptores para diferentes neuropéptidos en células inmunocompetentes (Gilbert, 1991); los efectos moduladores en la respuesta inmune de varias hormonas, como la hormona adrenocorticotrópica (ACTH), la tirotropina (TSH), la GH y la gonadotropina coriónica humana (hCG); y el efecto sobre la actividad neuroendócrina, (principalmente a nivel de hipotálamo o hipófisis) es capaz de inhibir o estimular la liberación de hormonas hipofisarias que presentan diversas moléculas secretadas por las células del sistema inmune (IL-1, IL-6, TNF α) (Marsh, 1992). Toda esta evidencia confirma únicamente que no es posible hablar de sistemas separados, sino de una red integrada completamente que tiene como objetivo conservar la homeostasis del organismo.

Además de que se propone que las diferentes moléculas secretadas en uno u otro sistema intervienen en el funcionamiento del otro, ahora se conoce que en algunos órganos que originalmente se consideraban órganos blanco únicamente, también se producen y potencialmente se secretan muchas moléculas clásicas del sistema endocrino, como la GH, la PRL y factores liberadores como SRIF (Marsh, 1992). Esto nos habla sobre los efectos paracrinos y/o autocrinos que pueden tener estas moléculas ya que son producidas y utilizadas en el mismo sitio donde se están generando o en células vecinas.

Papel de la GH en el sistema Inmune

Actualmente se sabe bien que la GH está involucrada de manera integral en el mantenimiento, control y modulación del sistema inmune de mamíferos (Scanes,1995).

Deficiencias en la secreción de GH, ya sea por causas genéticas (enanismo), fisiológicas (envejecimiento) y experimentales (hipofisectomía), han sido asociadas en mayor o menor manera con deficiencias en la función inmune (Hull,1997^a). Las acciones que se le han atribuido a la GH pueden ser realizadas por ella misma o también a través del IGF-I, que ha sido propuesto como el principal mediador en varios órganos blanco (Rechler, 1990 ; Baxter, 1986)

Función inmune en modelos con deficiencia de GH

Se ha investigado el papel de la GH en animales hipofisectomizados, en donde se observó que los órganos linfoides primarios sufren atrofia: en ratas el timo principalmente (Smith,1930) y en aves la bolsa de Fabricio y el timo (Hull 1997^a). Además se caracterizó la capacidad de la GH exógena para promover el crecimiento de la bolsa de Fabricio, el bazo y el timo y para incrementar la actividad de algunas células del sistema inmune como las células NK (por sus siglas en inglés Natural Killer) (Haddad, 1990), así como el efecto de la administración de GH/PRL para restaurar la función inmune en animales hipofisectomizados (Rapaport,1997).

Otros investigadores, utilizando el modelo de ratas hipofisectomizadas, demostraron que la GH puede aumentar la síntesis de anticuerpos y las reacciones de sensibilidad por contacto (Gelato, 1993). En ratones Snell (enanos), la administración de GH estimula la proliferación de células inmunes, en el timo y nódulos linfáticos mediante la incorporación de ³H- timidina (Scanes, 1995). Además, en este mismo modelo, la administración de GH mejora el título de anticuerpos en respuesta a un reto antigénico con eritrocitos de carnero (Scanes, 1995).

La administración de antisueros contra GH bovina en ratones, induce una disminución en el peso de los órganos del sistema inmune (timo y bazo), los efectos del antisuero parecen ser específicos debido a la neutralización de la GH endógena, ya que el efecto de un suero autoinmune no modifica el peso de estos tejidos. Sin embargo, los efectos del antisuero pudieron ser contrarrestados al administrar GH. (Scanes, 1995).

Observaciones en animales con un defecto genético que produce una secreción disminuida de GH y otras hormonas hipofisarias no sólo presentan defectos en el crecimiento, sino que tienen severas inmunodeficiencias y periodos cortos de vida (Rapaport, 1997). En estudios realizados con los ratones enanos Snell y con perros enanos Weimaraner, que por un defecto genético tienen atrofia del timo y un número reducido de granulocitos y linfocitos T y B periféricos, las inyecciones de GH revierten la atrofia en el timo y pueden estimular la producción de anticuerpos para antígenos particulares (Kelley, 1990).

En humanos, los datos han sido colectados de casos clínicos de pacientes con deficiencia de GH. Estos pacientes no presentan un estado inmunodeficiente, y la mayoría de sus parámetros inmunes son normales. Sin embargo, se han notado alteraciones específicas en su respuesta inmune como una hipoplasia tímica (Sipponen,

1978), niveles bajos de timulina en plasma (Mocchegiani, 1990); baja actividad de las células asesinas naturales (NK por sus siglas en inglés Natural Killer) (Bozzola, 1990); inhabilidad para sintetizar anticuerpos en respuesta a antígenos importantes clínicamente (toxoides tetánico o el lipopolisacárido de pneumococos), una deficiente inmunidad mediada por anticuerpos (Fleisher, 1980); y una producción disminuida de algunas citocinas importantes como IL-1 o IL-2 (Casanova, 1990). Algunas de estas deficiencias pueden ser contrarrestadas al suministrar GH a los pacientes, por ejemplo se puede restituir la actividad de las células NK (Rapaport, 1997), hay cambios en la proliferación de los linfocitos B periféricos y normalización en la secreción de inmunoglobulinas *in vitro* después de un tratamiento prolongado (Rapaport R, 1986, 1987).

Por otro lado, también se observan deficiencias en la función del sistema inmune en el envejecimiento, y ello podría correlacionarse con una insuficiente producción de GH. Existen algunas evidencias en animales (ratas y perros envejecidos) a los que se trató con GH bovina (bGH) y se pudo restaurar, al menos parcialmente, alteraciones como el tamaño y peso del timo y los niveles circulantes de timulina. En el caso de las ratas se observó una mejoría en la función inmune, sin embargo no hubo un efecto positivo en la secreción de citocinas como la IL-2.

En humanos el envejecimiento reduce la función inmune, pero no hay evidencia suficiente para relacionarlo por completo a la falta de producción normal de GH. Las mujeres de mediana edad tienen una actividad de células NK y T citotóxicas menor que mujeres jóvenes, y se ha observado que la administración crónica de GH pudo aumentar la actividad de estas células en las mujeres mayores. (Scanes, 1995).

Acerca de los efectos específicos que tiene la GH en células del sistema inmune se tiene evidencia de algunos ensayos *in vitro* donde se puede ver que la hormona tiene acciones sobre la diferenciación de células, sobre la proliferación y en su activación. Como ejemplo de estas acciones específicas podemos mencionar que la GH:

incrementa la cantidad de células T citotóxicas en un cultivo mixto de linfocitos (Scanes, 1995); activa o magnifica la función de los macrófagos (Scanes, 1995); estimula la producción de células epiteliales tímicas y su producción de timulina (Auerhammer, 1995); dentro de la activación se pudo observar un incremento en la producción de citocinas, la fagocitosis y la migración intravascular de células inmunes (Auerhammer, 1995).

En la siguiente tabla se resumen las acciones conocidas de la GH como modulador del sistema inmune:

Tabla 2. Efectos caracterizados de la GH en el Sistema Inmune

Efectos de la GH	Especie	Referencia
Induce la producción de IGF-I que puede actuar como mediador de sus efectos en células inmunes.	Humano	<i>Gelato, 1993</i>
Estimula la síntesis de DNA en linfocitos T en cultivo a una dosis de 0.1 ng/ml	Humano	<i>Kelley, 1990</i>
Aumenta la actividad metabólica de células fagocíticas (monocitos, macrófagos y leucocitos polimorfonucleares)	Humano	<i>Kelley, 1990</i>
Induce la proliferación de linfocitos de sangre periférica y células leucémicas (IM-9) en cultivo a concentraciones de 500-100 ng/ml	Humano	<i>Mercola, 1981</i>
Aumenta la actividad de células NK a dosis de 100-250 ng/ml en cultivo. Administración <i>in vivo</i> tiene también este efecto en pollos inmaduros y en pollos con hipotiroiditis autoinmune (obesos)	Humano y pollo	<i>Bozzola, 1990</i> <i>Haddad, 1990</i> <i>Marsh, 1992</i>
Estimula la producción del ion superóxido en macrófagos	Humano	<i>Fu, 1992</i>
Involucrada en la hematopoyesis, estimula la diferenciación a neutrófilos y aumenta la eritropoyesis.	Humano	<i>Kelley, 1990</i>
Estimula la producción de timulina y restaura la arquitectura del timo	Ratas y perros envejecidos	<i>Kelley, 1988</i>
Estimula la producción de IL-2 e IL-6, tiene efectos variables sobre la IL-1 y el TNF- α	Humanos	<i>Rapaport, 1997</i>
Incrementa la producción de inmunoglobulinas	Humanos, aves	<i>Kimata, 1994</i>
Estimula el crecimiento de los tejidos linfoides primarios médula ósea y timo (mamíferos), timo, médula ósea y bolsa de Fabricio (aves) además de órganos secundarios como el bazo.	Aves Diferentes mamíferos	<i>Marsh, 1992</i> <i>Villanua, 1992</i>
Efecto inmunoestimulador, incrementa la producción de inmunoglobulinas, citocinas y otros factores inmunes.	Humano Aves Ratón	<i>Kimata, 1994</i> <i>Chandratilleke, 1994</i> <i>Murphy, 1992</i>
Restaura la producción de anticuerpos en ratas tratadas con bromocriptina (brc) o ACTH (inmunosupresores)	Ratas	<i>Nagy, 1983</i>
Tratamiento con hormona recombinante estimula la proliferación de linfocitos B y la síntesis de inmunoglobulinas en cultivo libre de suero.	Humano	<i>Yoshida, 1992</i>
Al estimular con GH linfocitos humanos transformados con el virus de Epstein Barr en cultivo, producen IGF-I en cantidades significativas y aumenta su proliferación.	Humano	<i>Morimee, 1989</i>
Estimula la proliferación de timocitos y la expresión de la proteína de unión al DNA c-myc	Humano	<i>Berczi, 1991</i>

Las diferentes acciones de la GH sobre estas células se llevan a cabo gracias a que las células del sistema inmune poseen receptores para GH, aunque también se ha propuesto que puede interactuar con el receptor de PRL presente en algunas

células, y en las acciones mediadas por IGF-I, también hay interacción de esta molécula con su receptor.

Se han realizado una gran cantidad de estudios para determinar a las poblaciones de células que expresan los receptores para GH en varias especies. Por ejemplo, con estudios de inmunocitoquímica y morfología en tejidos del sistema inmune en pollos, se determinó cuáles células tenían receptores para GH (Hull, 1996), pero éstos no han sido los únicos. En resumen las células y tejidos donde se han encontrado receptores para GH se muestran en la siguiente tabla:

Tabla 3. Tejidos o células del sistema inmune donde se ha identificado al receptor para GH

Tejido o Célula	Referencia
Timocitos bovinos y murinos y linfocitos provenientes de nódulo linfático	Arrenbrecht, 1974
Linfocitos humanos (específico solo para GH humana de acuerdo con ensayos de unión a ligando)	Lesniak, 1974
Bazo, bolsa de Fabricio y timo de pollo (macrófagos principalmente)	Hull, 1996
Membrana de células mononucleares humanas en cultivo	Kover, 1984 Kiess, 1985
Linfocitos de sangre periférica (humanos)	Badolato, 1994 Rapaport, 1995
Subpoblaciones de linfocitos T y B y células NK (expresados más abundantemente en los linfocitos B)	Badolato, 1994 Rapaport, 1995
Células epiteliales del timo de ratón en cultivo	Hull, 1996
Monocitos y macrófagos de peces (en muy pequeña cantidad) Abundantes en linfocitos de peces y de mamíferos	Calduch-Giner, 1995 Rapaport, 1995
Algunas líneas de linfocitos inmortalizados	Hull, 1996
Corteza tímica de ratas	Hull, 1997 ^a
En aves: macrófagos y otras células mononucleares no linfoides	Hull, 1997 ^a
Células mononucleares humanas	Kiess, 1985

Es importante resaltar que las poblaciones celulares que tiene receptores para GH en mayor cantidad son diferentes entre especies. Por ejemplo, en el caso de las aves los macrófagos son las células que tienen mayor inmunorreactividad según los estudios de inmunocitoquímica (Hull, 1996); sin embargo los linfocitos son escasamente inmunorreactivos, por lo que podemos decir que la cantidad de receptores que tienen para GH es mínima. En contraste, en el caso de mamíferos los linfocitos -particularmente los tipo B- son los que poseen el grueso de receptores para GH mientras que en el caso de algunos peces los monocitos y macrófagos son células que casi no poseen receptores para GH.

El receptor encontrado en las células de pollo es idéntico al que se encuentra en el hígado (que es el receptor mejor caracterizado) al compararlos con estudios de RT-PCR (Hull, 1996).

En este punto, se podría pensar que dado que existen receptores para GH en todas estas células, los efectos que se observan son debidos únicamente por la GH que proviene de la hipófisis (efecto endocrino), pero no es así; desde hace ya un tiempo se han identificado a varios órganos y células del sistema inmune que son capaces de sintetizar GH. Estos datos se han obtenido a través de PCR, para detectar al ARN mensajero y en algunos casos por western blot para identificar a la proteína presente en estos tejidos y determinar si es o no diferente a la proteína secretada por la hipófisis.

La producción local de GH ha permitido sugerir que los efectos de esta proteína en el sistema inmune no son del todo endocrinos, sino que pueden ser paracrinos, autocrinos e incluso intracrinos.

A continuación se muestran algunos de los tejidos y células del sistema inmune de diferentes especies que se han propuesto como sitios de síntesis de GH

Tabla No 4. Tejidos y células del sistema inmune que se han caracterizado como sitios de síntesis de GH

Tejido o Células	Especie	Referencia
Leucocitos mononucleares de sangre periférica	Humano y Rata	Weigent, 1988
Leucocitos en médula ósea, bazo y timo	Rata	Weigent, 1988, 1991
Bolsa de Fabricio, timo y bazo	Pollo	Render, 1995
Timo, amígdalas, bazo y nódulo linfático, (sugiriendo que pueden ser principalmente linfocitos)	Humano	Wu, 1996
Linfomas de células B y T, timoma	Humanos	Wu, 1996
Linfocitos T y B en cultivo	Humano	Wu, 1996
Linfocitos y leucocitos de sangre periférica	Rata	Harvey, 1997
Monocitos, linfocitos y granulocitos	Peces	Harvey, 1997
Bazo	Cerdo, Peces y Vaca	Harvey, 1997
Timo	Ratón, Cerdo, vaca, conejo	Harvey, 1997

La síntesis de GH por las células del sistema inmune, al igual que en la hipófisis, podría ser inducida por factores solubles y durante la activación del sistema inmune. Se cree que al igual que en la hipófisis, la síntesis esté regulada por GHRH, SRIF o IGFs, sin embargo parece ser que todos estos componentes del eje hipotálamo- hipófisis- hígado se producen localmente. Parecería entonces que hay

dos circuitos destinados a modular la respuesta inmune: el eje hipotálamo-hipófisis que lo hace de manera normal y un eje inmune-somatotrópico que puede ser responsable de la modulación más aguda y puede funcionar como un circuito de "emergencia". Entonces, cambios en la producción local de GH podrían ser más importantes que los cambios en la GH circulante para la regulación de la inmunidad humoral y celular (Hull, 1997^o).

Sistema inmune de las aves

El sistema inmune de las aves está compuesto por órganos linfoides primarios y secundarios. Los órganos primarios son microambientes en donde los precursores pluripotenciales se diferencian y dan lugar a diferentes clonas de linfocitos capaces de reaccionar frente a antígenos no propios. Posteriormente, en los órganos secundarios los linfocitos pueden iniciar una respuesta contra algún antígeno y expandirse con ayuda de señales proporcionadas por diferentes células accesorias.

Los órganos linfoides primarios son el timo y la bolsa de Fabricio, y los secundarios son la glándula pineal, la glándula de Harder, el bazo y los bazos accesorios, nódulos linfáticos y la amígdala cecal.

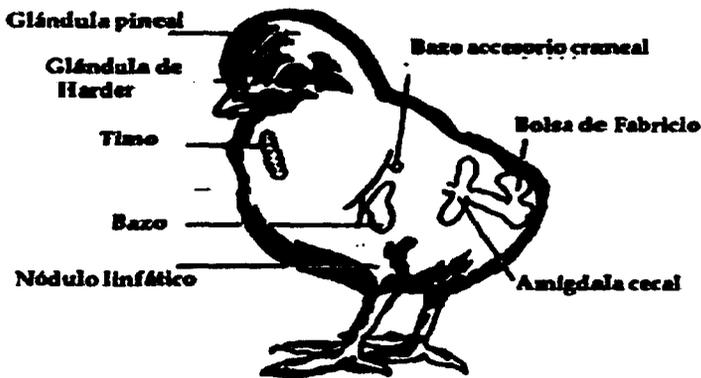


Figura 3. Órganos linfoides primarios y secundarios del pollo

La bolsa de Fabricio

La bolsa de Fabricio (BF) es un órgano específico de las aves en donde los linfocitos B (que deben su nombre gracias a que se localizaron por primera vez en este tejido) se diferencian y maduran para después migrar hacia otros tejidos linfoides periféricos como el bazo y los centros germinales.

Este tejido es de vital importancia para que se desarrolle una adecuada respuesta humoral frente a un antígeno. Animales tratados con fármacos que inhiben el desarrollo de la BF, como la ciclofosfamida, tienen una marcada deficiencia en las inmunoglobulinas presentes en el suero y una deficiente producción de anticuerpos (Payne, 1984). Los animales que han sido bursectomizados durante la etapa fetal son incapaces de montar una respuesta inmune adecuada, ya que carecen de clonas de linfocitos B capaces de reconocer a los antígenos y producir anticuerpos, además no desarrollan una respuesta celular eficiente ya que no se presenta la cooperación entre células B y T.

La BF no solo juega un papel importante durante el desarrollo del sistema inmune, sino que existe evidencia acerca de su papel como órgano endocrino y la interacción que podría desempeñar en el adecuado funcionamiento del eje neuroendocrino-inmune.

La BF se localiza en la cloaca del pollo justo detrás de la última porción del tracto intestinal, es parte integral de la mucosa de la cloaca y su forma puede ser oval como la de los pollos o elongada como en el caso de los patos o avestruces. El lumen de la bolsa tiene varios pliegues en donde se encuentran los folículos bursales, que son el sitio de desarrollo y diferenciación de las células B.

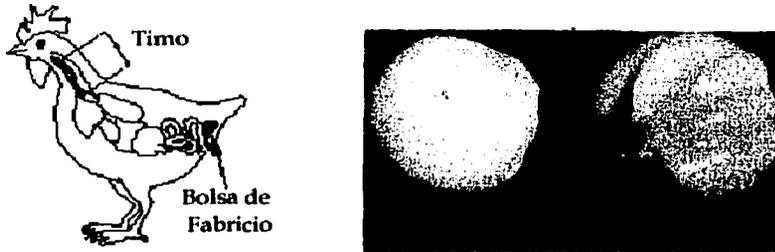


Figura 4. Localización y apariencia de la Bolsa de Fabricio

Debido a la importancia que este órgano tiene para el desarrollo y supervivencia del animal, se desarrolla desde los primeros días de embriogénesis. En este punto se comienza a generar el repertorio de linfocitos B; posteriormente la BF termina de desarrollarse en los primeros días posteclosión, en la mayoría de los

animales se observa un rápido crecimiento desde la eclosión hasta las 3 ó 4 semanas de edad. Luego existe un periodo estacionario de 5 ó 6 semanas (desde las 5 hasta las 10 semanas de edad) y finalmente el tejido involucre antes de la madurez sexual (después de 10-12 semanas de edad) (Glick, 2000).

Los primordios de la BF aparecen desde el 5° día de desarrollo embrionario (dE); desde ese momento se comienzan a formar los "brotes" que van a dar origen a los folículos bursales, cada BF contiene entre 8,000 y 12,000 folículos. Cada folículo Bursal tiene una región medular y una corteza. En la región medular se localizan linfocitos, células dendríticas y células epiteliales; existen dos tipos de epitelios en la superficie, el epitelio asociado al folículo (que se encuentra asociado a la médula) y el epitelio interfolicular (que se encuentra entre los folículos).

El epitelio asociado al folículo es relevante para el funcionamiento del órgano ya que tiene actividad pinocítica, de manera que los fluidos que entran por el orificio cloacal son succionados hacia la mucosa de la cloaca, la BF y la parte baja del tracto intestinal, y ya en el lumen de la BF pueden pasar a la médula y a la corteza de los folículos (gracias a la capacidad pinocítica del epitelio asociado) donde entra en contacto con las células B. Se piensa incluso que ésta es una manera en la cual los pollos ganan parte de su inmunidad contra antígenos presentes en el medio ambiente.

Estos epitelios que se encuentran en la bolsa se desarrollan entre los días 13-15 dE pero su capacidad pinocítica no es evidente sino hasta el día 19 dE.

Las células troncales que dan origen a los linfocitos B presentes en la BF no son generadas en este tejido, sino que son llevadas a él a través de la circulación. En el caso del pollo, la llegada de estas células a la BF se lleva a cabo en los días 8-15 dE. Se comenta incluso que las células que llegan a poblar la BF no son células troncales sino que ya vienen comprometidas para dar origen a linfocitos, por lo que en ocasiones se les denomina como "células troncales prebursales". Estas células ya comprometidas se clasificaron así gracias a la presencia de determinantes características de los linfocitos de la bolsa como Bu-1 que pueden detectarse utilizando anticuerpos monoclonales (Otsubo, 2001). De este mismo modo se observó que los linfocitos Bu-1+ se encuentran en la corteza y en la médula de los folículos bursales pero no en los epitelios (Glick, 2000).

Las células B en la BF alcanzan un alto grado de madurez, por lo que se encuentran células que ya realizaron el rearrreglo de los genes que codifican para las inmunoglobulinas y las expresan en su superficie, pero es muy importante remarcar que el microambiente de la BF y los productos que esta secreta son muy importantes para que estos procesos se lleven a cabo. Se sabe que los contactos entre las células prebursales y la BF son indispensables para que éstas se diferencien a células B. En experimentos realizados con pollos recién nacidos tratados con ciclofosfamida (donde la BF no se desarrolló bien), se pudo reconstituir la integridad del tejido y hubo diferenciación a linfocitos al transplantar células extraídas de otros animales (embriones de 18-19 días), pero en el caso de animales bursectomizados no se consiguió por lo que se concluyó que era necesario el microambiente de la BF para

que se llevara a cabo la diferenciación de las células prebursales a linfocitos B (Toivanen, 1972,a,b,c).

Como es sabido, la BF es la responsable de liberar a los linfocitos competentes hacia la circulación o hacia otros órganos como el bazo; por lo que es necesario que los linfocitos que se encontraban antes interaccionando directamente con la bolsa dejen de hacerlo cuando se ha completado su proceso de maduración. Para tratar de explicar de manera molecular como es que esto sucede se ha comenzado a estudiar el papel de moléculas de adhesión como intermediarias de tal interacción.

Recientemente se ha descubierto que las células ya comprometidas a linfocitos bursales (que tienen el antígeno Bu-1 en la membrana) expresan en su superficie al antígeno Sialyl Lewis X, que es una molécula que se sabe que media la adhesión entre células; este antígeno se ha detectado en los linfocitos de la bolsa (Bu-1 +) en los días 10-12 dE (Otsubo, 2001).

Se cree entonces que una vez que los linfocitos ya han completado su maduración y que ya se ha realizado el rearrreglo de los genes para expresar la inmunoglobulina de superficie (aproximadamente a los 15-18 dE) dejan de expresar el Sialyl Lewis X, perdiendo así la capacidad de ser adheridos a las células de la bolsa, por lo que son liberados. Aquí queda señalado que el microambiente de la BF es determinante no solo para la maduración de los linfocitos, sino también para su liberación al medio.

La interacción de las células prebursales con la BF está mediada por diferentes factores que son secretados por las células que constituyen a la BF. Uno de estos factores es la bursina, que es un tripéptido (Lys-His-Gly-NH₂), y que en un principio se le denominó "bursopoyetina". Entre sus actividades biológicas se observó que podía elevar AMP cíclico y las respuestas mediadas por GMP. Entre las pruebas que se tienen al respecto de la acción de este tripéptido se encuentra que diferentes células B, líneas humanas y murinas, responden al ser estimuladas con bursina purificada; de aquí se desprende que la actividad de este producto para estimular la función de células B no sólo es en especies de aves, sino también en algunas especies de mamíferos. Esto ha llevado a los investigadores a pensar que puede existir algún producto que actúe de manera similar en los mamíferos (Marsh, 1993).

Se ha investigado más al respecto de la interacción de los productos secretados por la BF con la actividad endocrina del ave. En experimentos con aves a las que se les ha removido la BF se encontró una actividad alterada del eje hipófisis-suprarrenal, y esta actividad fue restaurada utilizando inyecciones de bursina *in ovo*. Esta interacción también se da en un sentido inverso, ya que animales hipofisectomizados tienen muy poco crecimiento de la BF (Marsh, 1993). Se propone entonces que existe una comunicación linfo-neuroendocrina en los embriones de pollo, y que estas interacciones son esenciales para un adecuado desarrollo de los microambientes que constituyen el sistema inmune (como la BF y el timo) y tal vez tengan influencia en actividades de retroalimentación con el sistema neuroendocrino. (Marsh, 1993)

De este modo se postula que la BF no solo actúa como un órgano del sistema inmune sino como un órgano con capacidad endocrina. En los primeros reportes

sobre las características de la BF se determinó que existen células con capacidades secretoras, pero no se ha investigado si son éstas las responsables de la producción de bursina.

Otro de los productos secretados por la BF es el péptido antiesteroideogénico (BASP), el cual se denominó de este modo debido a que interfiere con la producción de esteroides en células de la granulosa de ovario de gallinas, pero además se sabe que afecta de manera negativa la síntesis de DNA inducida por mitógenos en linfocitos aislados de rata, pollo y humano. (Caldwell, 1999)

Partiendo de que los productos secretados por la BF pueden afectar en cierta medida al sistema neuroendocrino, se realizó un experimento en donde se observó la capacidad del BASP para afectar la secreción de hormonas hipofisarias. En este experimento se colocaron somatotropos y lactotropos en cultivo y se estimularon con diferentes concentraciones de BASP, además se colocaron como controles diferentes secretagogos de la GH y la PRL. El BASP mostró actividad de secretagogo de GH y PRL *in vitro*, ya que se detectó que podía estimular la síntesis de GH y PRL de las células en cultivo. Esto apoya la teoría de que una de sus funciones es estimular la síntesis de estas hormonas, para que a su vez actúen sobre el sistema inmune.

Con estas evidencias se ha puesto en claro que la BF es productora de diferentes factores y que además estos pueden interaccionar con el sistema neuroendocrino. No obstante se tiene evidencia de que la BF no afecta únicamente la secreción de hormonas hipofisarias, sino que también es un sitio de síntesis extrahipofisario de estas hormonas. Render y colaboradores en 1995, descubrieron la presencia del ARNm de la GH en la BF y en el timo y este ARN mensajero tiene las mismas características del que existe en la hipófisis (Render, 1995); esto sugiere que el efecto de la GH en la BF no es solamente por acción endocrina sino que puede ser local (parácrina y/o autocrina).

Planteamiento del problema

La hormona de crecimiento es una hormona multifuncional que interviene en procesos diferentes en todas las células del organismo y es posible que sea gracias a la presencia de sus diferentes variantes moleculares que la GH es capaz de realizar todas estas funciones en varios tipos celulares.

Además, sabemos que la GH se sintetiza en diferentes tejidos fuera de la hipófisis en varias especies incluyendo al pollo, y se ha encontrado la presencia del ARN mensajero en tejidos del sistema inmune de pollo (bolsa de Fabricio, bazo y timo) y en humanos.

Hay evidencia sobre las acciones que la GH desempeña en el sistema inmune, tanto en aves como en seres humanos, la manera en que actúa en cada uno de los elementos celulares que intervienen en la respuesta inmune es diferente. Se pueden encontrar receptores para la hormona en algunas estirpes como macrófagos y no así en linfocitos para el caso del pollo, pero en el caso de algunos peces, son las poblaciones linfoides las que poseen el mayor número de receptores para GH, por lo cual se habla de que sus acciones sobre las células del sistema inmune podrían ser especie específicas.

En el caso del pollo se ha determinado que existe un patrón de variantes moleculares en plasma e hipófisis y que éste cambia durante la ontogenia. Dado esto, es importante investigar entonces si en los tejidos del sistema inmune donde se ha encontrado al ARNm de la hormona existe un patrón de variantes moleculares, que como se propone para sus efectos sistémicos, pudiese explicar las diferentes acciones que ésta tiene en el sistema inmune de las aves y si dicho patrón cambia durante el desarrollo.

Hasta ahora no existe evidencia experimental que nos señale si en los tejidos extrahipofisiarios en donde se produce la hormona de crecimiento existe un patrón de variantes moleculares, y de existir qué tan diferentes o similares son éstas con respecto a las encontradas en la hipófisis y el plasma de pollo.

Por lo tanto en este trabajo, la hipótesis que planteamos es la siguiente:

Hipótesis General

La expresión de GH en diversos tejidos extrahipofisiarios presenta, como en la hipófisis, un patrón de heterogeneidad molecular. Este patrón puede variar a lo largo del desarrollo y contribuir a la diversidad funcional de la proteína.

Hipótesis particular

La GH presente en la bolsa de Fabricio de pollo debe tener en forma semejante a la hipófisis un patrón característico de heterogeneidad molecular y éste puede variar durante la ontogenia.

Objetivos

- ∞ **Cuantificar los niveles de GH total en la bolsa de Fabricio durante el desarrollo.**
- ∞ **Identificar a las variantes moleculares de la hormona de crecimiento en la bolsa de Fabricio.**
- ∞ **Determinar si este patrón varía durante la ontogenia de este tejido.**
- ∞ **Identificar si el patrón de variantes presente en este tejido es diferente o similar al encontrado en la hipófisis.**

MATERIALES Y MÉTODOS.

Material Biológico

Se utilizaron bolsas de Fabricio de pollos machos de diferentes edades: embriones de 13, 15, y 18 días, animales de 1 día de nacido, 1, 2, 3, 4, 5, 9, 15 y 66 semanas de edad. Los animales fueron donados por Pilgrim's Pride de México, S.A. de C.V. en Querétaro. La bolsa de Fabricio se obtuvo haciendo un corte por la línea media en el abdomen, y se realizó la disección de la zona de la cloaca para extraer el órgano, el cual se colocó de inmediato en tubos eppendorf o frascos sobre hielo seco para posteriormente almacenarlos a -70°C .

Procedimientos utilizados

Las bandas inmunorreactivas a cGH en la bolsa de Fabricio se identificaron por SDS-PAGE y western blot y la cuantificación de la cGH total se realizó a través de un ELISA de competencia. Todos los procedimientos fueron estandarizados previamente en el laboratorio del doctor Carlos Arámburo.

- Preparación de los extractos de bolsa de Fabricio (Anexo 1)

Se prepararon homogeneizados de los tejidos. Para cada edad se hicieron 3-5 pools de 2 ó 3 bolsas de Fabricio respectivamente. El tejido se homogeneizó en presencia de un coctel de inhibidores de proteasas disueltos en agua a pH 9 (Complete, Roche) en una proporción de 1g de tejido/5 ml de coctel, más PMSF (100 mM) utilizando un homogeneizador de aspas (Polytrón), un homogeneizador pequeño de teflón o uno de vidrio dependiendo del tamaño de la muestra. El homogeneizado se agitó con una barra magnética para extraer a la GH en un baño de hielo durante dos horas. Posteriormente se colectó la suspensión y se centrifugó a 12,500 rpm (12077 x g) en una microcentrífuga (Sorvall RMC-14) durante media hora. Se colectó el sobrenadante y se procedió a determinar la cantidad de proteínas.

- Cuantificación de Proteínas por el método de Bradford (Anexo 2)

La curva patrón se preparó por duplicado con albúmina sérica bovina utilizando 5 concentraciones de proteína (1, 5, 10, 15 y 20 μg) en un volumen de 800 μl de agua desionizada y se adicionaron 200 μl de Reactivo de Bradford. Después de 15 minutos se leyó la absorbencia a 595nm y los valores fueron graficados.

Las muestras se prepararon de la manera siguiente: Entre 0.5-5 μl del homogeneizado se diluyó en un volumen de 800 μl de agua desionizada y se adicionaron 200 μl de reactivo de Bradford, por duplicado. Transcurridos 15

minutos se leyó la absorbencia a 595nm y las lecturas obtenidas para cada muestra se interpolaron en la curva patrón.

Una vez que se cuantificaron las proteínas totales presentes en cada muestra se prepararon alícuotas con 20 µg de proteína total de cada edad para realizar la electroforesis y western blot.

Para el caso del ELISA las alícuotas de los extractos de diferentes edades se prepararon con 60 µg de proteína total. En cada alícuota se colocó la cantidad de proteína necesaria para un duplicado más un 10% de exceso, es decir 132 µg de proteína total en cada alícuota.

Además de los extractos de las muestras de bolsa de Fabricio se preparó un extracto de hipófisis de pollos de engorda de 7-8 semanas de edad, (de la procesadora de Pilgrim's Pride de México, S.A. de C.V., Los Cues, Querétaro), para utilizarlo como un control interno en los experimentos. Se prepararon alícuotas con diferente cantidad de proteína para ser utilizada en el ELISA y en SDS-PAGE. Todas las alícuotas fueron almacenadas para su posterior uso a -70 °C en un ultracongelador (Forma Scientific, modelo 8416).

- Electroforesis en condiciones desnaturalizantes (SDS-PAGE) (Anexo 3)

La separación y el análisis de las proteínas presentes en los extractos se realizó por electroforesis de acuerdo al método de Laemmli (*Laemmli U, 1970*). Se prepararon geles de 10 carriles, de 1mm de espesor con una concentración de acrilamida al 12.5%. Las muestras se prepararon en presencia de β-mercaptoetanol (condiciones reductoras) o sin éste (condiciones no reductoras). Se colocó entonces en cada carril un volumen final de 20µl de la muestra. En cada uno de los geles se colocaron además de la muestra, dos controles internos, hormona de crecimiento de pollo recombinante (rcGH 100ng) y una muestra de extracto de hipófisis de animales de 7-8 semanas de edad, con 1µg de proteína total. En otro de los carriles se colocaron marcadores de peso molecular preteñidos de bajo rango (*Bio Rad prestained SDS-PAGE standards low range*) (8µl de marcadores más 12µl de amortiguador de muestra). Los geles se corrieron a un voltaje constante de 100V en el gel concentrador y 150V en el gel separador hasta que el frente llegara a la parte inferior del gel (aproximadamente 1 hora). Debido a la cantidad de muestras y de estándares fue necesario colocarlas en los dos geles de una misma cámara en cada ocasión.

- Western blot de los extractos de bolsa de Fabricio (Anexo 4)

Después de la electroforesis los geles se dejaron equilibrar en amortiguador de transferencia (Tris-Glicina-Metanol, pH 8.3) durante 10 minutos. Las membranas de nitrocelulosa de 0.45µm de poro (*Bio-Rad*) de 7 x 9 cm, se dejaron equilibrar en amortiguador de transferencia durante 10 minutos. La transferencia se llevó a cabo aplicando corriente constante de 200 mA, durante una hora con agitación y en frío.

Después de la transferencia las membranas se lavaron en amortiguador TBS (Tris, NaCl, pH 7.5) durante 10 minutos. Posteriormente se bloquearon con una solución de leche descremada (*Bio Rad non fat dry milk*) al 5% en TBS durante 2 horas. Después del bloqueo, las membranas se lavaron con TTBS (Tween 20, Tris, NaCl, pH 7.5), 3 veces durante 10 min. y se dejaron incubando toda la noche con una solución de anticuerpo policlonal contra cGH (α cGH) generado en conejo; a una dilución de 1:10,000 en TTBS + leche 1%. Al siguiente día las membranas se lavaron con TTBS (3 veces 10 min.) y se les adicionó una solución de anticuerpo secundario unido a peroxidasa (goat anti rabbit α -IgG-HRP, *Bio Rad*) a una dilución de 1:3,000 en TTBS + leche 1% durante 2 horas. Después de la incubación con el anticuerpo secundario se lavaron con TTBS, 4 veces 15 min. y 3 veces 15 min. con TBS. Al terminar los lavados se agregó el sustrato para quimioluminiscencia. Cada membrana se expuso a 6 ml de sustrato (ECL, Amersham Pharmacia Biotech) durante 5 minutos, pasado el tiempo se introdujeron en una bolsa plástica (Ziploc). En la oscuridad se pusieron en contacto las membranas y una placa radiográfica (Kodak Biomax) durante 30 segundos y posteriormente se revelaron utilizando un equipo automatizado (Hyper Processor, Amersham Lifesciences Mod. AM4).

Posteriormente el luminograma se analizó en un scanner, la imagen digitalizada se analizó densitométricamente utilizando el programa IPLab Gel (Gel Analysis and Densitometry for Macintosh, Scanalytics, Inc.) para identificar el peso molecular y los porcentajes relativos del área bajo la curva de las bandas inmunorreactivas encontradas en cada edad.

- Cuantificación de la GH total presente en los tejidos por medio de ELISA (Anexo 6)

Las muestras se prepararon con 60 μ g de proteína/pozo en 100 μ l y se adicionaron 100 μ l de anticuerpo policlonal contra cGH (1:50,000) en TPBS +leche 1%, para obtener una dilución final de 1:100,000. Se dejaron incubando durante 16 horas a 4 °C.

Para preparar la curva patrón de rcGH se realizaron diluciones seriadas de hormona para obtener concentraciones de: 1024ng, 512ng, 256ng, 128ng, 64ng, 32ng, 16ng, 8ng, 4ng, 2ng, 1ng, 0.5ng, 0.25ng y 0.125 ng. Por cada 100 μ l/pozo, se adicionaron 100 μ l de solución de anticuerpo 1:50,000 y se dejaron incubando durante 16 horas a 4 °C.

Se prepararon controles que contenían la misma cantidad de GH que el primer punto de la curva patrón, pero sin anticuerpo y uno que representa el 100% de unión del anticuerpo a la cGH de la placa, que contenía solamente la misma cantidad de solución de anticuerpo que los demás puntos pero sin hormona.

Las placas de inmunoanálisis (Dynatech-Immulon de 96 pozos) se forraron con una solución de rcGH 12ng/100 μ l/pozo. Se dejó incubando a una temperatura de 4°C durante 16 horas para que la hormona se pegara a las paredes del pozo.

Los lavados de las placas entre cada paso se realizaron con amortiguador TPBS (Fosfatos, NaCl, pH 7.6 + Tween 20).

Los posibles sitios de interacción inespecífica se bloquearon con una solución de leche descremada 3% en PBS y se dejaron incubando a temperatura ambiente durante una hora. Las muestras se colocaron en la placa (100µl por pozo) y se dejaron incubar a temperatura ambiente durante dos horas. Transcurrido el tiempo, las placas se sometieron a 3 ciclos de lavado con TPBS

La solución de anticuerpo secundario unido a peroxidasa a una dilución de 1:3,000 (100µl por pozo) (goat anti-rabbit α -IgG-HRP *Bio Rad*) se dejó durante 2 horas. Después de la incubación con el anticuerpo secundario se les adicionó el sustrato ABTS (Boehringer Mannheim GmbH) 100µl por cada pozo, se dejaron incubando con éste durante una hora a temperatura ambiente y posteriormente se leyeron en un lector de placas (*Bio Rad*, Microplate Reader modelo 3550-UV) a una longitud de onda de 405 nm.

- Inmunoprecipitación con anticuerpo policlonal (Anexo 7)

Los extractos totales de bolsa de Fabricio e hipófisis de pollos de 4 semanas (ver anexo 1) se prepararon en un volumen final de 1 ml con amortiguador Net Gel (anexo 7) y se les adicionó 2.5µl de anticuerpo policlonal (α cGH) (ver tabla 5) y se dejaron incubar toda la noche con agitación a temperatura ambiente.

Tabla 5. Preparación de las muestras y los controles para inmunoprecipitación.

Muestras	Cantidad de Proteína	Cantidad de (α cGH) adicionada	Amortiguador Net Gel
Bolsa de Fabricio	2.5 mg	2.5µl	Necesario para 1ml
Hipófisis	400 µg	2.5µl	Necesario para 1ml
Control 1	****	2.5µl	1ml
Control 2	*****	*****	1ml

Posteriormente se les adicionaron a cada uno 50µl de una suspensión de proteína A sefarosa (Amersham Pharmacia Biotech., Protein A sepharose CL-4B) (100 mg/ml) y se dejó incubar con agitación a temperatura ambiente durante 3 horas.

Los tubos se centrifugaron a 12,500 RPM (12077g) en una microcentrífuga (Sorvall RMC-14) durante 10 minutos. La fracción no absorbida a la resina se separó en otro tubo eppendorf. La resina se lavó (10 minutos en agitación y

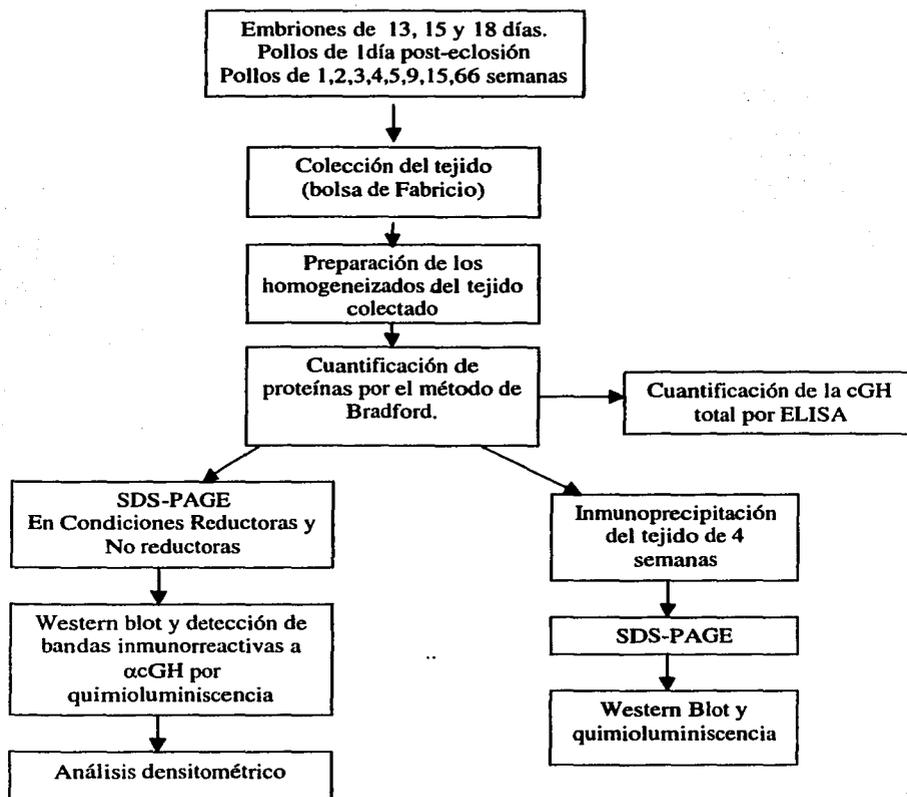
después centrifugar 10 minutos), 3 veces con el amortiguador de lavado A, 2 veces con el amortiguador de lavado B y 1 vez con el amortiguador de lavado C.

Después de los lavados se le adicionó a la resina 60 μ l del amortiguador de muestra para electroforesis (Laemmli) en condiciones reductoras. Se hirvieron las muestras durante 5 minutos y se centrifugaron de nuevo, 10 min a 12,500 rpm para obtener la fracción absorbida No. 1. Posteriormente con la primera fracción no absorbida se repitió el procedimiento hasta obtener la fracción absorbida No 2. Las fracciones absorbidas 1 y 2 y las no absorbidas 1 y 2 se analizaron por SDS-PAGE y Western Blot.

Análisis Estadístico

Una vez realizado el análisis densitométrico se utilizó el dato de proporción relativa de cada una de las bandas inmunorreactivas para construir gráficas. Los datos fueron analizados utilizando una prueba ANOVA de 1 vía ocupando la prueba de múltiples comparaciones de Tukey.

DISEÑO EXPERIMENTAL



RESULTADOS

➤ Estandarización de las Técnicas

Se realizaron curvas patrón de las siguientes técnicas:

- 1) Cuantificación de proteínas por el método de Bradford
- 2) Cuantificación de GH total en los homogeneizados de bolsa de Fabricio por ELISA
- 3) WB y densitometría utilizando diferentes concentraciones de rcGH

A continuación se presentan las curvas patrón obtenidas para cada una de las técnicas.

Cuantificación de proteínas por el método de Bradford

La cuantificación de proteínas por el método de Bradford se utilizó para determinar la cantidad de proteínas totales en cada uno de los extractos de los diferentes tejidos. Para cada curva se utilizaron diferentes concentraciones de albúmina sérica bovina (BSA): 1, 5, 10 y 15 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$.

Se realizaron 10 curvas bajo las mismas condiciones, y posteriormente los resultados de cada uno de los puntos se promediaron para obtener una curva patrón de todos los ensayos y obtener los datos de coeficiente de variación interensayo y el coeficiente de correlación de la recta. Los resultados se presentan en la figura 5.

Curva Patrón Cuantificación de proteínas

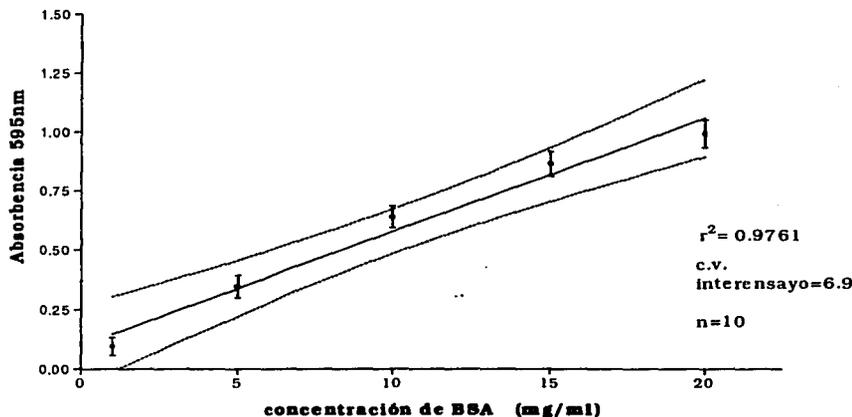


Fig. 5. Curva Patrón de Cuantificación de proteínas totales por el método de Bradford

La curva tiene un coeficiente de correlación de 0.9761, y el coeficiente de variación entre cada una de las curvas realizadas es de 6.9, por lo que la técnica se considera confiable para determinar la cantidad de proteínas presentes en los extractos cada vez que se realice.

Cuantificación de GH total en los homogeneizados de BF por ELISA

En la técnica de ELISA se evaluaron dos diferentes diluciones de anticuerpo primario (acGH), estas diluciones se probaron primero utilizando hormona de crecimiento recombinante (rcGH). Una vez realizado lo anterior se determinó que la dilución de anticuerpo primario a utilizar era de 1:100,000 dado que el desplazamiento entre los puntos y el intervalo de medición útil en la curva dosis respuesta era el mejor.

Se realizaron 15 curvas de rcGH, todas en las mismas condiciones, utilizando una dilución de anticuerpo primario de 1:100,000 y de secundario 1:3,000. Las concentraciones de hormona utilizada en cada curva fueron desde 1,024ng/100µl hasta 0.25ng/100µl. En total fueron 13 puntos y cada uno se colocó por triplicado, el resultado de porcentaje de unión (% Bo) para cada concentración se calculó haciendo un promedio de las 3 repeticiones de cada punto.

Para graficar todos los datos en una curva patrón (Fig. 6) se utilizaron los promedios de cada concentración en las 15 curvas. Además se calcularon los datos de 50% de unión para la curva patrón, las desviaciones estándar de cada uno de los puntos y los coeficientes de variación intra e interensayo.

Curva Patrón rcGH obtenida por la técnica de ELISA Ab 1:100,000

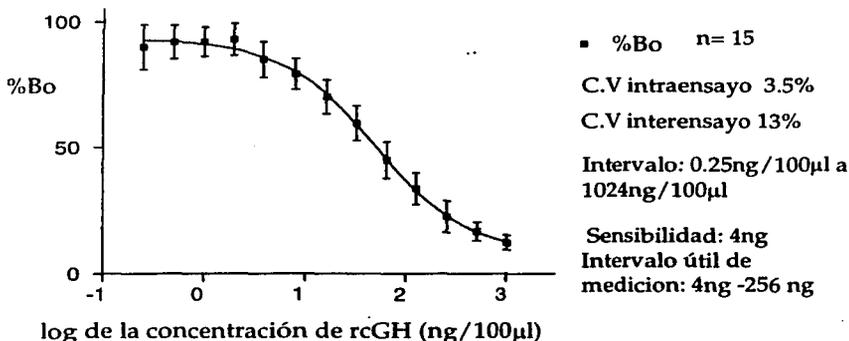


Figura 6. Curva patrón para la determinación de rcGH mediante la técnica de ELISA indirecto por competencia.

Una vez obtenida la curva patrón de esta técnica, el siguiente paso era conocer la cantidad de muestra que se debía colocar para que las lecturas de %Bo obtenidas en las muestras de tejido estuvieran dentro de la parte sensible de la curva.

Se determinó la cantidad de proteína total de los extractos de bolsa de Fabricio y de hipófisis, ésta se utilizó como control interno en cada una de las determinaciones.

Una vez que se conocía la cantidad de proteínas presente en cada uno de los extractos se procedió a diseñar un experimento en donde se colocaron cantidades crecientes de proteína para observar como se comportaba el ensayo y determinar cual de ellas estaba dentro de la parte sensible de la curva dosis-respuesta de rCGH y así conocer qué cantidad se tenía que colocar para cuantificar la cGH total presente en cada muestra.

Se realizaron dos diferentes ensayos de ELISA en donde se colocaron en placas separadas un extracto de hipófisis de pollo de 4 semanas y uno de BF de pollo de 4 semanas de edad.

Se utilizó tejido de esta edad para hacer el experimento debido a la disponibilidad de las muestras y a que la cantidad de proteína total presente en el extracto permitía utilizar volúmenes pequeños, evitando así tener que concentrar las muestras o diluirlas demasiado.

**Curva dosis-respuesta obtenida por ELISA
utiizando un extracto de BF de 4 semanas**

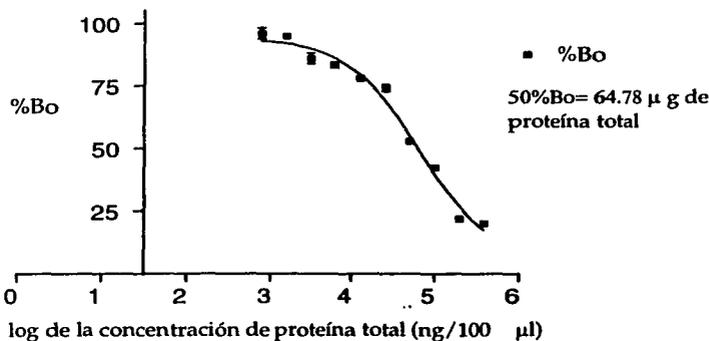


Fig 7. Curva dosis-respuesta, (ELISA) utilizando diferentes cantidades de proteína total de un extracto de BF de pollo de 4 semanas.(Intervalo: de 0.780µg a 400µg) para determinar la cantidad de proteína total de extracto de bolsa de Fabricio a colocar en cada determinación.

Las cantidades de proteína total utilizada en este ELISA fueron: 0.780, 1.56, 3.125, 6.25, 12.5, 25, 50, 100, 200 y 400 μg ,

De acuerdo con la curva dosis respuesta el 50% de unión (punto en la parte sensible de la curva) se encuentra en 64.7 μg de proteína total por lo que a partir de este experimento se determinó utilizar 60 μg de proteína total de cada uno de los extractos de BF para cuantificar a GH total presente.

En el caso de la hipófisis las cantidades de proteína total utilizadas fueron: 0.0003, 0.0006, 0.0012, 0.0024, 0.0048, 0.009, 0.017, 0.034, 0.078, 0.156, 0.312, 0.625 μg , 1.25, 2.5, 5, 10, 20 y 40 μg .

Las cantidades de proteína utilizada en el caso de la hipófisis son mucho más pequeñas que las de la BF debido a que la cantidad de GH presente en este tejido es mucho mayor (10 % de la proteína total es GH).

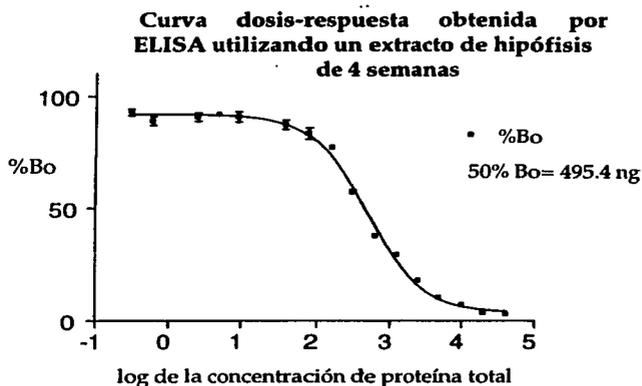


Fig 8. Curva dosis-respuesta, (ELISA) utilizando diferentes cantidades de proteína total de un extracto de hipófisis de pollo de 4 semanas.(Intervalo: de 0.0003 μg a 40 μg) para determinar la cantidad de proteína total del extracto hipofisiario a colocar en cada determinación.

De acuerdo con la curva dosis respuesta obtenida, el 50% de unión es de 495.4ng por lo que en los subsecuentes experimentos se utilizaron 500 ng de proteína total de extracto hipofisiario para utilizarse como control interno en cada determinación de GH total presente en el tejido.

SDS-PAGE y Western Blot (WB)

Las técnicas de SDS-PAGE y WB fueron la herramienta principal para separar las proteínas presentes en la BF y para analizar posteriormente las bandas inmunorreactivas (IR) a GH utilizando un anticuerpo (α GH) policlonal específico.

En un principio se propuso realizar una curva patrón de rcGH utilizando esta técnica, para que al analizar las bandas IR (con concentraciones conocidas de la hormona) por densitometría, se pudiera estimar la cantidad relativa de cada una de las variantes presentes en la BF utilizando la curva como referencia.

Otro de los objetivos principales era determinar la cantidad de rcGH y extracto hipofisiario a colocar en cada uno de los geles para poder observar bandas bien definidas en el luminograma y compararlas con las bandas IR de la BF.

Como primer paso se corrieron varios geles de poli(acrilamida) al 12.5%, en condiciones reductoras y no reductoras en donde se colocaron diferentes muestras de rcGH y muestras de extracto hipofisiario, para identificar a las bandas características de la cGH bajo diferentes condiciones.

Las razones para analizar las muestras en dos diferentes condiciones; reductoras y no reductoras son las siguientes:

- En condiciones no reductoras se puede conocer la cantidad y proporción de variantes de masa endógenas (oligómeros), formadas por diversas isoformas de la molécula presentes en las muestras. Estas formas agregadas pueden estar unidas por puentes disulfuro intercatenarios o por interacciones no covalentes débiles, del tipo de Van der Waals
- Posteriormente en condiciones reductoras al adicionar β -mercaptoetanol a las muestras y reducir los puentes disulfuro, los oligómeros se separan y es posible apreciar un aumento en las bandas que corresponden a las variantes moleculares que los estaban formando, por ejemplo la forma monomérica, o bien formas submonoméricas.

Al desnaturalizar la proteína y desagregarla se va a observar que corre de diferente manera al someterla a electroforesis en condiciones reductoras y en condiciones no reductoras.

Al analizar a la cGH bajo condiciones no reductoras esta tiene todavía formados los puentes disulfuro intracatenarios, por lo que el peso molecular aparente del monómero y dímero es diferente al que presentan al ser analizadas bajo condiciones reductoras, ya que en estas condiciones los puentes disulfuro se reducen, la proteína se lineariza, y al variar su radio de Stoke migra de diferente manera en el gel.

La rcGH permite observar a las dos bandas características de la cGH, estas son la forma monomérica y un dímero resistente a la reducción por acción de β -mercaptoetanol.

En la siguiente tabla se colocan los diferentes pesos moleculares de estas dos variantes al analizarlas bajo estas dos diferentes condiciones.

Tabla 6. Pesos moleculares de las bandas características de cGH bajo condiciones reductoras y no reductoras

Bandas	Peso molecular en kiloDaltones (kDa)	
	Condiciones reductoras	Condiciones no reductoras
Monómero	26	22
Dímero	52	45

Se realizaron los ensayos de Western Blot utilizando diferentes cantidades de rcGH para observar el patrón de bandas en condiciones reductoras y no reductoras. Se construyeron dos curvas diferentes, debido a que en la primera curva el punto de 500ng daba una señal muy intensa que no podía ser analizada por densitometría, ya en la curva 2 se utilizaron concentraciones más pequeñas.

Las diferentes cantidades de cGH que se utilizaron en cada una de las curvas se muestran en la siguiente tabla:

Tabla 7. Cantidades de rcGH utilizadas en la construcción de una curva patrón utilizando la técnica de WB.

Curva 1 rcGH	Curva 2 RcGH
500 ng	250 ng
250 ng	100 ng
100 ng	75 ng
50 ng	50 ng
25 ng	25 ng
10 ng	15 ng
5 ng	10 ng
	5 ng

Se utilizaron 5 geles en condiciones reductoras (CR) y 5 en condiciones no reductoras (CNR), para construir la curva patrón, en los luminogramas se aprecia que las bandas de 10ng y 5 ng no se observaban con claridad y no podían ser analizadas por densitometría, la banda correspondiente a 15ng era visible solo en algunos geles; de manera que el análisis se realizó solamente a partir de la banda de 25 ng en adelante.

A continuación se muestran los luminogramas utilizados para la construcción de la curva patrón número 2 de rcGH (Fig 9).

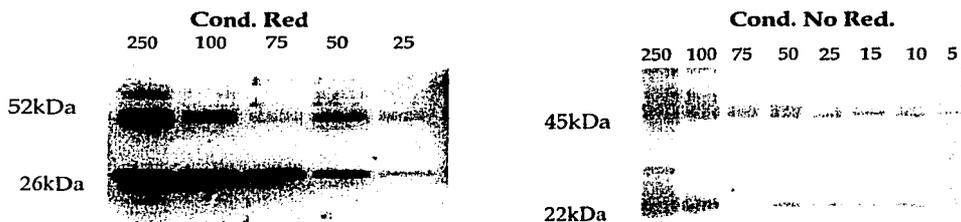


Fig 9. Luminogramas utilizados para definir la curva patrón para la cuantificación de las bandas inmunorreactivas a cGH por WB y densitometría. Utilizando de 250 a 5 ng del estándar (rcGH). De estos experimentos se determinó que la cantidad a colocar de rcGH en cada uno de los subsecuentes WB como estándar interno era de 100ng.

Al analizar las bandas por densitometría utilizando el programa IPL-GEL se construye un espectro para cada una de las bandas, en donde cada una aparece como un pico por encima de la línea basal, (que se define como la parte más clara del luminograma) los datos que se obtienen para cada una de las bandas son:

- Peso molecular de la banda (como referencia se utilizan los marcadores de peso molecular utilizados en el gel)
- Rf
- área bajo la curva de cada uno de los picos (bandas) en pixeles.
- Proporción relativa de esa área con respecto al total del área en ese carril en porcentajes.

Después de analizar cada uno de los luminogramas, se utilizan los datos de área bajo la curva de cada banda ó la proporción relativa de ésta con respecto a la inmunoreactividad total para elaborar una curva patrón. Esta curva puede servir para semicuantificar la cantidad de hormona presente en cada una de las bandas inmunorreactivas presentes en el gel.

En la figura 10 se muestra la curva realizada utilizando el área bajo la curva para el monómero de cGH en condiciones reductoras y no reductoras.

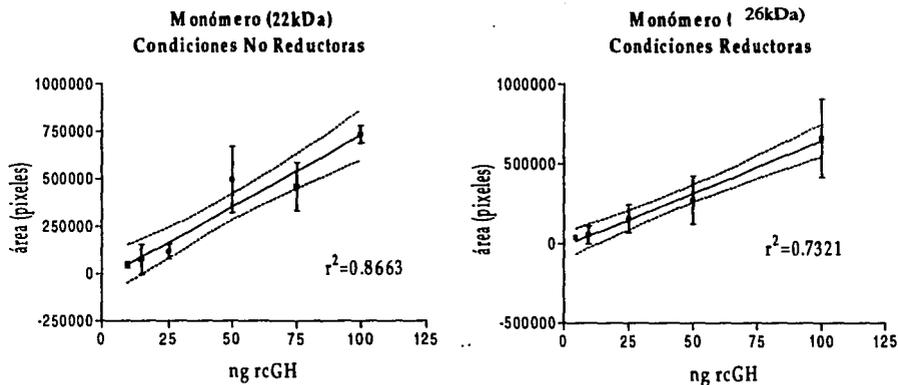


Fig. 10. Curvas rcGH obtenidas después de analizar los luminogramas obtenidos por WB y analizados por densitometría (IPL-GEL). Se graficó el área bajo la curva en píxeles de la banda inmunorreactiva, contra cantidad de rcGH. Para cada curva n=5 luminogramas.

☛ Cuantificación de cGH total en la BF por ELISA

En primer lugar se cuantificó la cGH total en las muestras de BF obtenidas de pollos de diferentes edades. Para esto se utilizaron 60µg de proteína total de cada uno de los extractos y se midieron por duplicado. Se realizaron en total 5 diferentes mediciones de las muestras, en cada una de éstas se colocó una curva de rcGH en la que se interpolaron los valores promedio de %Bo de las muestras para obtener la cantidad de cGH total.

Como la cantidad de proteína a utilizar es considerable y debido a que se tenía muy poca muestra disponible de los embriones de 13 y 15 días, la cuantificación de hormona total no se realizó en las muestras correspondientes a estas edades y sólo se ocuparon para identificar por WB las variantes moleculares presentes en estas edades.

Los valores obtenidos en cada una de las 5 cuantificaciones de los extractos de BF se promediaron y se calculó el error estándar de muestra.

Tabla 8. Valores obtenidos en la determinación de cGH total por ELISA

Edades Analizadas	Datos presentados en ng/mg de proteína total. Media \pm EEM n = 5
18dE	71.7 \pm 16.61
1día	44.5 \pm 20.83
1S	1231 \pm 76.12
2S	225.1 \pm 47.98
3S	198.2 \pm 23.50
4S	193.2 \pm 72.18
5S	163 \pm 11.18
9S	485.6 \pm 65.72
15S	318.6 \pm 53.50
66S	374.6 \pm 129.12

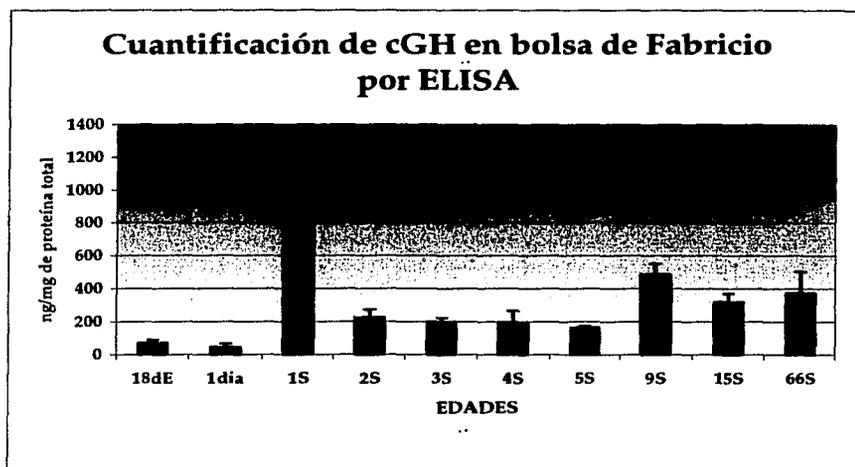


Fig. 11. Determinación de cGH total por ELISA en extractos de bolsa de Fabricio proveniente de pollos de diferentes edades n= 5 \pm EEM.

Como puede verse de acuerdo a los datos y la gráfica (tabla 8 y Fig. 11) en la determinación se observaron 3 diferentes patrones, en muy pequeña cantidad (menos de 200ng/mg) en los embriones de 18 días y los pollos de 1 día; un pico a la semana (aproximadamente 1200ng/mg); posteriormente la cantidad disminuye una vez más entre las 2 y 5 semanas (entre 100-200ng/mg) y por último el valor de GH se incrementa un poco más entre las 9 y las 66 semanas (300-400 ng/mg) sin alcanzar el pico observado a la semana.

➤ Identificación de las variantes moleculares de cGH presentes en la BF de pollo por WB.

Se utilizaron 20 µg de proteína total de cada uno de los extractos, se corrieron geles en CR y CNR; en cada uno de estos se corrieron 100ng de rcGH y 500ng de proteína de extracto hipofisiario como controles internos. En todos los experimentos se utilizó el mismo anticuerpo que en el ELISA, solo que a una dilución de 1:10,000.

Debido a que se utilizaron peines de 10 carriles, se corrieron todas las muestras en dos geles diferentes cada vez, pero dentro de una misma cámara de electroforesis, y se transfirieron en la misma cámara de electrotransferencia. Las membranas de nitrocelulosa se trataron con las mismas soluciones de lavado y anticuerpo a los mismos tiempos y en las mismas condiciones de temperatura y agitación cada vez.

En estos experimentos se colocaron los extractos de todas las edades incluyendo a los de BF de embriones de 13 y 15 días, que no se utilizaron en el ensayo de ELISA.

A continuación se presenta un luminograma representativo de los 5 obtenidos para CR.

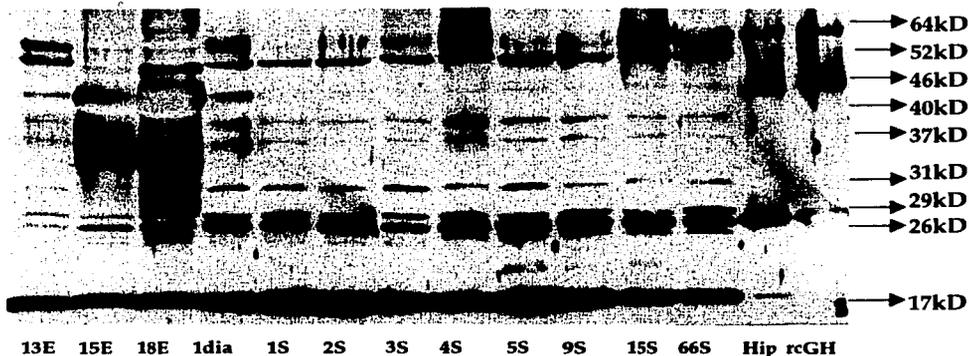


Fig.12 Western Blot representativo donde se muestran las variantes de masa de cGH en la bolsa de Fabricio durante la ontogenia en condiciones reductoras (CR). Los extractos de BF de pollo de diferentes edades se analizaron por SDS-PAGE en condiciones reductoras y las bandas inmunorreactivas a cGH se detectaron por un ensayo de quimioluminiscencia empleando un anticuerpo policlonal (α cGH). En los últimos carriles se presentan como controles rcGH (100ng) y 500ng de proteína total de extracto hipofisiario de pollo de 4 semanas.

Tabla 9. Bandas IR a cGH presentes en cada edad.

Edades	13dE	15dE	18dE	1dfa	1S	2S	3S	4S	5S	9S	15S	66S
64	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*
52	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*
46	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*
40	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*
37	*	*	*	*	*	---	*	*	*	*	*	*
31	---	---	---	*	*	*	*	*	*	*	*	*
29	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*
26	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*
17	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*

En la mayoría de las edades se aprecian las mismas bandas, con excepción de las bandas de 31 y 37 kDa que no se encuentran en algunas edades.

Estos geles se analizaron por densitometría y se utilizó el dato de proporción relativa del área bajo la curva en porcentaje que representaba cada una de las bandas en las diferentes edades, para construir gráficas.

La proporción relativa de cada banda, es un dato proporcionado por el programa IPL-GEL al realizar el análisis densitométrico. Se calcula tomando como 100% de la inmunorreactividad la suma del área bajo la curva de todas las bandas detectadas en un carril, por lo tanto cada una de esas bandas representa un porcentaje dependiendo la magnitud del área bajo la curva de la misma.

En las gráficas se aprecia como cambia el porcentaje de cada una de las bandas IR analizadas bajo condiciones reductoras durante el desarrollo.

Los datos graficados corresponden a 5 geles diferentes y para cada columna se calculó el error estándar de muestra.

A continuación se muestran todas las gráficas de las diferentes bandas inmunorreactivas detectadas en condiciones reductoras (fig. 13) , y posteriormente cada una de ellas por separado.(fig 14 a 22).

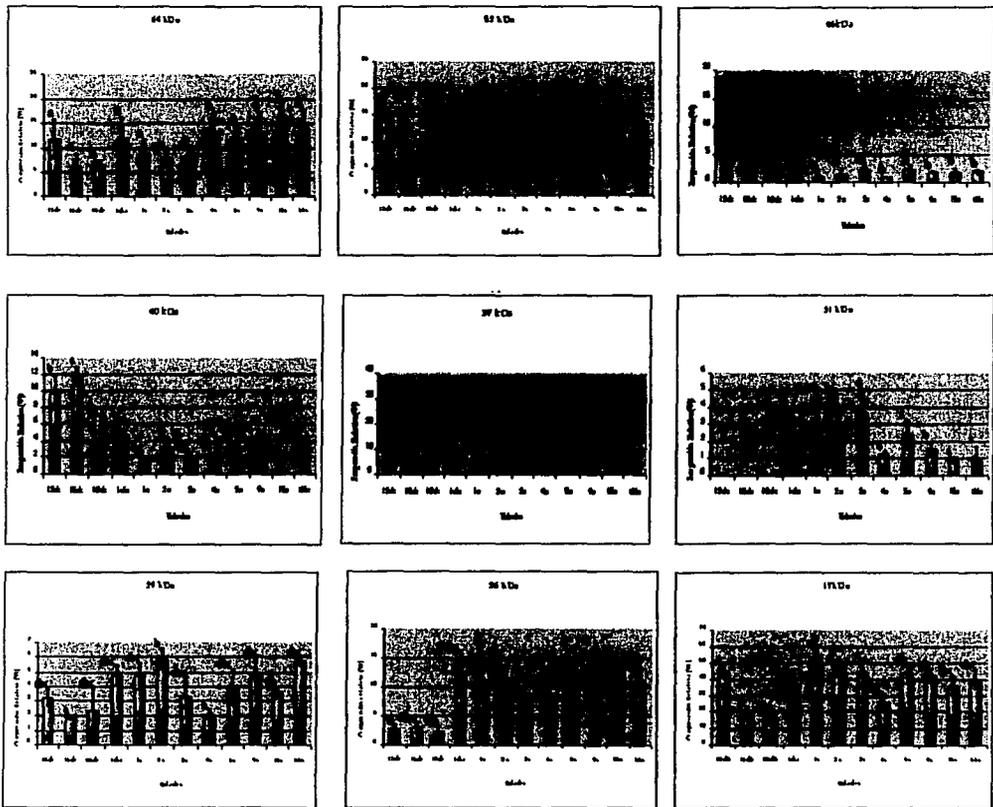


Fig.13 Cambios en la proporción de las variantes de GH (separadas por SDS-PAGE en CR y cuantificadas por un ensayo de quimioluminiscencia) en la bolsa de Fabricio. Después del western blot se realizó un análisis densitométrico (IP-Lab Gel) . La proporción relativa de cada variante está expresada como porcentaje de la inmunorreactividad total (n=5). Las letras en las barras representan diferencia significativa ($p < 0.05$).

En la figura 14 se muestra la proporción relativa de la variante de 64 kDa, en este caso no hay diferencias significativas, a pesar de que se observa una tendencia a aumentar en proporción con la edad.

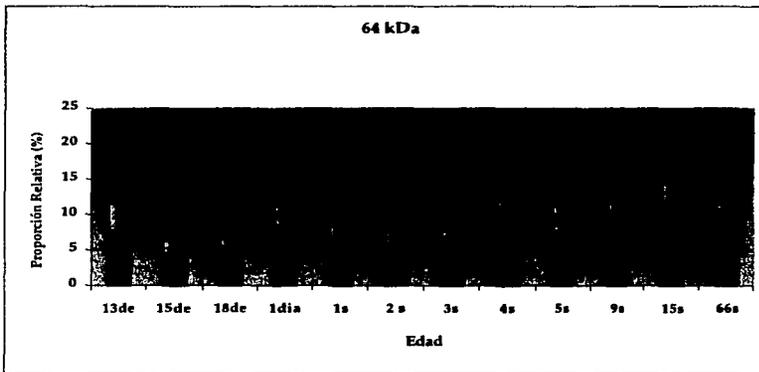


Fig. 14 Cambios en la proporción relativa de la variante de 64 kDa en la bolsa de Fabricio con respecto a la edad. Después de separarla por SDS-PAGE en CR y hacer el western blot se cuantificó por quimioluminiscencia. La proporción relativa está expresada como porcentaje de la inmunoreactividad total ($n=5$) \pm EEM. En esta variante no se observaron diferencias significativas en la proporción relativa con respecto a la edad.

La variante de 52 kDa detectada en CR corresponde en peso molecular, al dímero de la GH, se encuentra presente en todas las edades analizadas y solamente hay diferencia significativa entre la proporción de 18de y 5 semanas de edad.

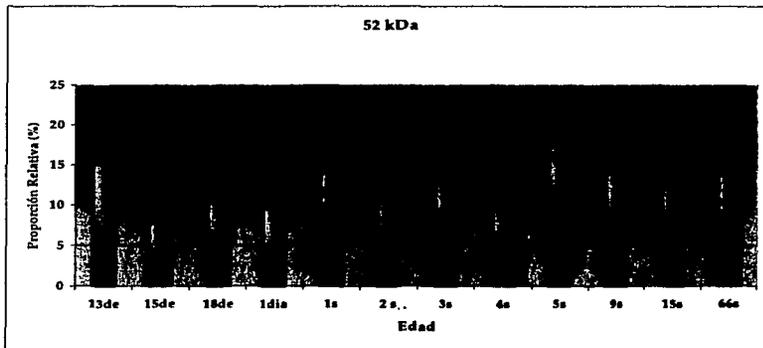


Fig. 15 Cambios en la proporción relativa de la variante de 52 kDa en la bolsa de Fabricio con respecto a la edad. Después de separarla por SDS-PAGE en CR y hacer el western blot se cuantificó por quimioluminiscencia. La proporción relativa

está expresada como porcentaje de la inmunorreactividad total ($n=5$) \pm EEM. Diferente letra en cada barra representa diferencia significativa ($p<0.05$)

En las figuras 16, 17 y 18 respectivamente se muestra el patrón de proporción relativa de las variantes de 46, 40 y 37 kDa respectivamente. Estas variantes mostraron un comportamiento similar, ya que se observó una correlación negativa con respecto a la edad.

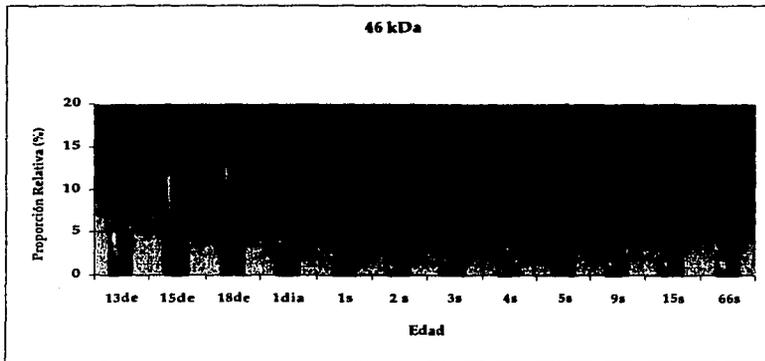


Fig 16 Cambios en la proporción relativa de la variante de 46 kDa en la bolsa de Fabricio con respecto a la edad. Después de separarla por SDS-PAGE en CR y hacer el western blot se cuantificó por quimioluminiscencia. La proporción relativa está expresada como porcentaje de la inmunorreactividad total ($n=5$) \pm EEM. Diferente letra en cada barra representa diferencia significativa ($p<0.05$)

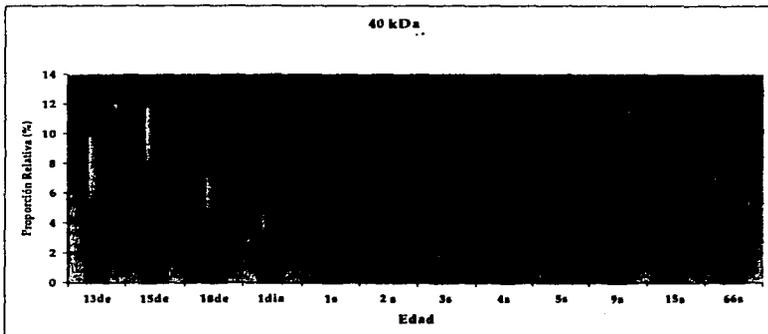


Fig 17 Cambios en la proporción relativa de la variante de 40 kDa en la bolsa de Fabricio con respecto a la edad. Después de separarla por SDS-PAGE en CR y

hacer el western blot se cuantificó por quimioluminiscencia. La proporción relativa está expresada como porcentaje de la inmunorreactividad total ($n=5$) \pm EEM. Diferente letra en cada barra representa diferencia significativa ($p<0.01$)

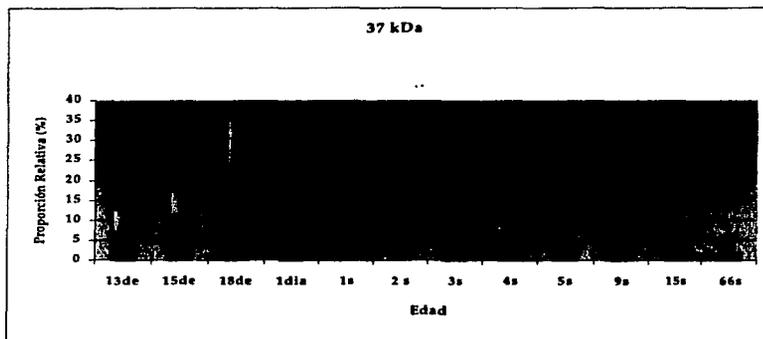


Fig 18 Cambios en la proporción relativa de la variante de 37 kDa en la bolsa de Fabricio con respecto a la edad. Después de separarla por SDS-PAGE en CR y hacer el western blot se cuantificó por quimioluminiscencia. La proporción relativa está expresada como porcentaje de la inmunorreactividad total ($n=5$) \pm EEM. Diferente letra en cada barra representa diferencia significativa ($p<0.05$)

De manera particular la variante de 31 kDa representada en la figura 19 muestra una mucho mayor proporción después de la eclosión a comparación de la edad de 13dE en donde apenas es visible.

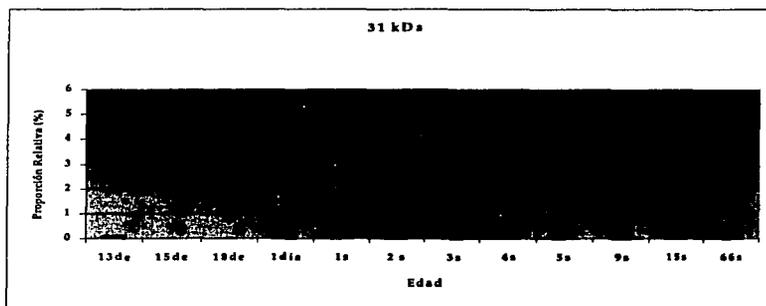


Fig 19 Cambios en la proporción relativa de la variante de 31 kDa en la bolsa de Fabricio con respecto a la edad. Después de separarla por SDS-PAGE en CR y hacer el western blot se cuantificó por quimioluminiscencia. La proporción relativa

está expresada como porcentaje de la inmunorreactividad total ($n=5$) \pm EEM. Diferente letra en cada bara representa diferencia significativa ($p<0.05$)

La variante de 29 kDa encontrada en la bolsa, podría corresponder a la variante glicosilada de la GH, está presente en todas las edades analizadas y se observa un pico alrededor de dos semanas.

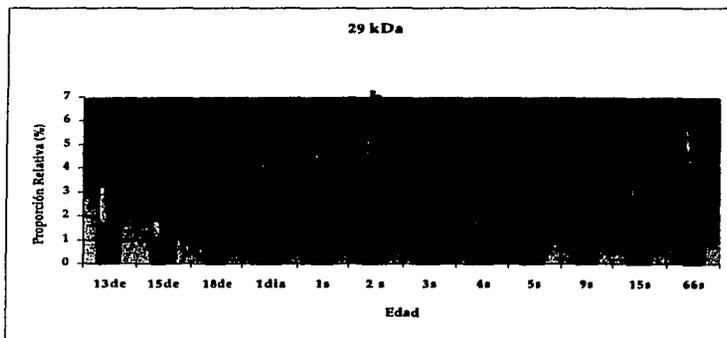


Fig 20 Cambios en la proporción relativa de la variante de 29 kDa en la bolsa de Fabricio con respecto a la edad. Después de separarla por SDS-PAGE en CR y hacer el western blot se cuantificó por quimioluminiscencia. La proporción relativa está expresada como porcentaje de la inmunorreactividad total ($n=5$) \pm EEM. Diferente letra en cada bara representa diferencia significativa ($p<0.05$)

A continuación en la figura 21 se observa la proporción relativa de la banda de 26kDa, que corresponde a la forma monomérica de la GH, se puede observar que hay una tendencia a aumentar a partir del primer día post eclosión, a pesar de que las diferencias no son significativas.

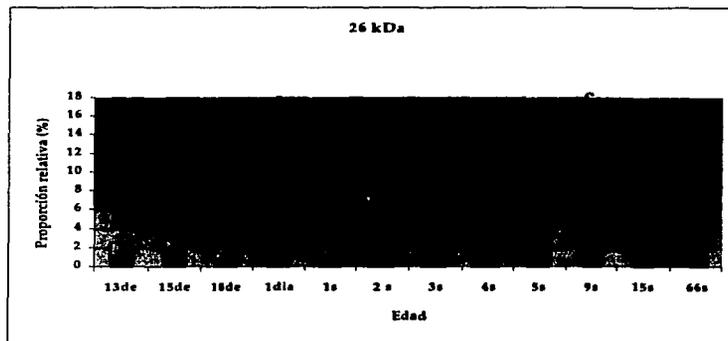


Fig 21 Cambios en la proporción relativa de la variante de 26 kDa en la bolsa de Fabricio con respecto a la edad. Después de separarla por SDS-PAGE en CR y hacer el western blot se cuantificó por quimioluminiscencia. La proporción relativa está expresada como porcentaje de la inmunorreactividad total ($n=5$) \pm EEM. Diferente letra en cada bara representa diferencia significativa ($p<0.05$)

La variante con proporción más abundante es una banda submonomérica de 17kDa que muestra un incremento entre el primer día post eclosión y la tercera semana de vida (fig. 22).

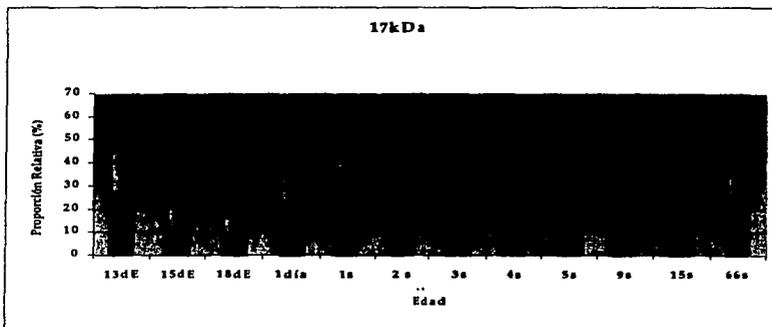


Fig 22 Cambios en la proporción relativa de la variante de 17 kDa en la bolsa de Fabricio con respecto a la edad. Después de separarla por SDS-PAGE en CR y hacer el western blot se cuantificó por quimioluminiscencia. La proporción relativa está expresada como porcentaje de la inmunorreactividad total ($n=5$) \pm EEM. Diferente letra en cada bara y los asteriscos entre las 3 bandas representan diferencia significativa ($p<0.05$).

Al graficar y comparar cada una de las bandas en condiciones reductoras (CR) se observa que hay algunas bandas de alto peso molecular que son resistentes a la reducción (64kDa, 52kDa, 46kD, 40kDa) y que aparecen en todas las edades.

Además existen otras bandas por encima del monómero de 26 kDa, como la de 29kDa que podría corresponder al monómero modificado por glicosilación.

La banda de 31 kDa no aparece en los embriones, pero si en los animales de 1día a 66 semanas, no así la banda de 29kDa que si aparece en todas las edades analizadas. En las gráficas es posible apreciar como se modifica la proporción de cada una de las variantes con respecto a la edad, aunque en algunos casos (64kDa, 52kDa, 29 kDa, 26kDa) esta variación no sea tan contundente debido a la magnitud del error entre cada uno de los luminogramas analizados es posible observar tendencias.

A continuación se presentan un luminograma representativo de los 4 obtenidos para condiciones no reductoras.

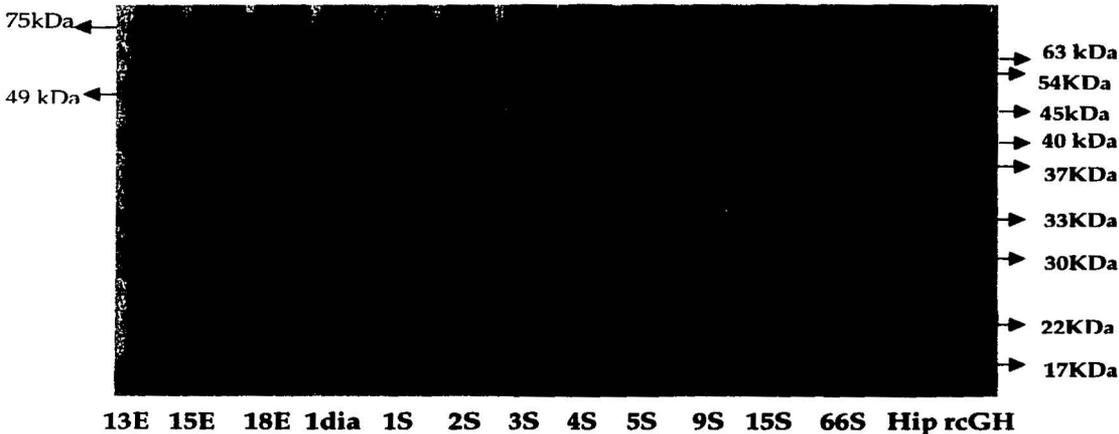


Fig. 23 Western Blot representativo donde se muestran las variantes de masa de cGH en la bolsa de Fabricio durante la ontogenia en condiciones no reductoras (CNR). Los extractos de BF de pollo de diferentes edades se analizaron por SDS-PAGE en condiciones no reductoras y las bandas inmunorreactivas a cGH se detectaron por un ensayo de quimioluminiscencia empleando un anticuerpo policlonal (α cGH). En los últimos carriles se presentan como controles rcGH (100ng) y 500ng de proteína total de extracto hipofisiario de pollo de 4 semanas.

Tabla 10. Bandas IR a cGH presentes en cada edad

Edades PM Kda	13dE	15dE	18dE	1dia	1S	2S	3S	4S	5S	9S	15S	66S
75	*	*	*	---	---	---	---	---	---	---	---	---
63	*	---	*	*	*	---	---	*	*	*	*	*
54	---	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*
49	*	*	*	---	---	---	---	---	---	---	---	---
45	*	*	---	*	*	*	*	---	*	*	*	*
40	---	*	*	*	---	*	---	---	*	*	*	*
37	*	---	---	*	*	*	*	*	*	*	*	*
33	*	---	---	*	*	*	*	*	*	*	*	*
30	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*
22	---	---	---	*	---	---	---	*	*	*	*	*
17	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*

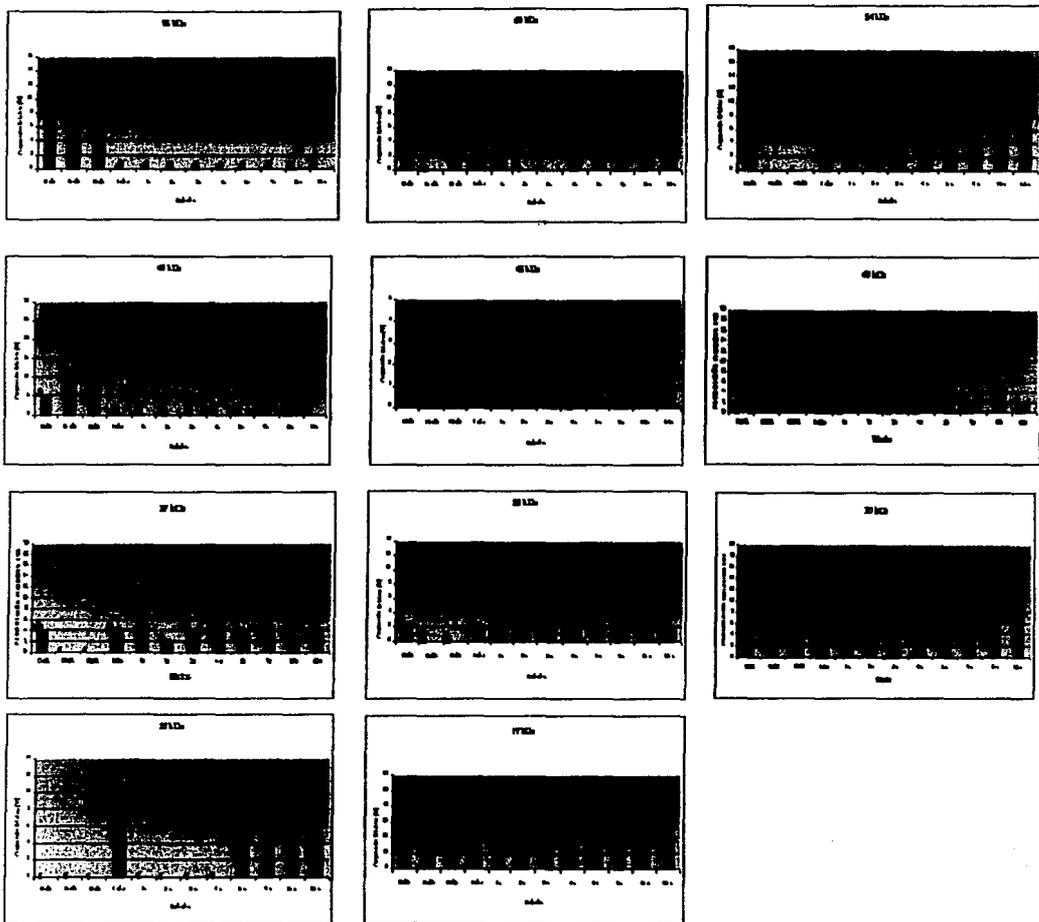


Fig.24 Cambios en la proporción de las variantes de GH (separadas por SDS-PAGE en CNR y cuantificadas por un ensayo de quimioluminiscencia) en la bolsa de Fabricio. Después del western blot se realizó un análisis densitométrico (IP-LabGel). La proporción relativa de cada variante está expresada como porcentaje de la inmunorreactividad total (n=4). Las letras en las barras representan diferencia significativa ($p < 0.05$).

A continuación se presentan las gráficas de las bandas inmunorreactivas analizadas en condiciones no reductoras. Al igual que en condiciones reductoras el dato que se utilizó fue proporción relativa del área bajo la curva de cada una de las bandas.

La figura 25 muestra la proporción relativa de la variante de mayor peso molecular encontrada en la BF, 75kDa esta variante únicamente fué encontrada en los embriones y se observaron diferencias significativas en la proporción relativa de esta entre las tres edades analizadas.

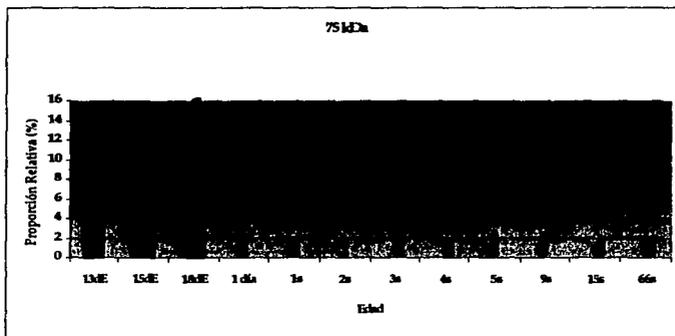


Fig. 25 Cambios en la proporción relativa de la variante de 75 kDa en la bolsa de Fabricio con respecto a la edad. Después de separarla por SDS-PAGE en CNR y hacer el western blot se cuantificó por quimioluminiscencia. La proporción relativa está expresada como porcentaje de la inmunorreactividad total ($n=4$) \pm EEM. La proporción relativa está expresada como porcentaje de la inmunorreactividad total ($n=5$) \pm EEM. Diferente letra en cada barra representa diferencia significativa ($p<0.05$).

La siguiente variante presenta un patrón oscilante, una pequeña proporción a los 13dE, posteriormente no se detecta, y aparece hasta los 18dE, no se observó a las dos y tres semanas y posteriormente a partir de a cuarta aparece en las demás edades, pero en estas edades no hay una diferencia significativa.

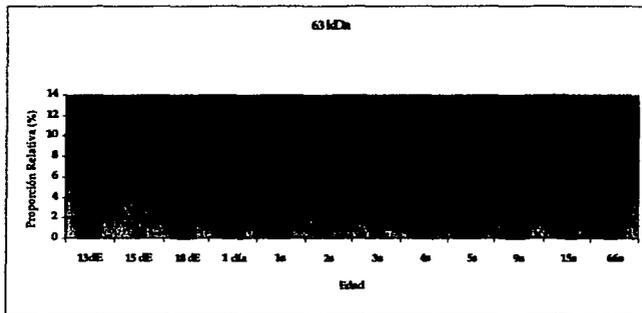


Fig. 26 Cambios en la proporción relativa de la variante de 63 kDa en la bolsa de Fabricio con respecto a la edad. Después de separarla por SDS-PAGE en CNR y hacer el western blot se cuantificó por quimioluminiscencia. La proporción relativa está expresada como porcentaje de la inmunoreactividad total ($n=4$) \pm EEM. La proporción relativa está expresada como porcentaje de la inmunoreactividad total ($n=5$) \pm EEM. En esta variante no se observaron diferencias significativas en la proporción relativa en las edades en las que se detectó.

La variante de 54 fué detectada a los 13dE, no así en las otras edades embrionarias, posteriormente a partir de un día post eclosión se detectó en las demás edades analizadas y con diferencias significativas.

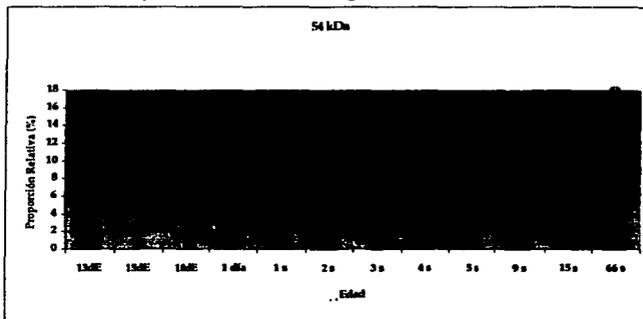


Fig.27 Cambios en la proporción relativa de la variante de 54 kDa en la bolsa de Fabricio con respecto a la edad. Después de separarla por SDS-PAGE en CNR y

hacer el western blot se cuantificó por quimioluminiscencia. La proporción relativa está expresada como porcentaje de la inmunorreactividad total ($n=4$) \pm EEM. Diferente letra en cada barra representa diferencia significativa ($p<0.05$)

La variante de 49 kDa (fig.28) presentó el mismo comportamiento que la de 75kDa, solamente está presente en los embriones y hay diferencia significativa en la proporción relativa de las tres diferentes edades analizadas.

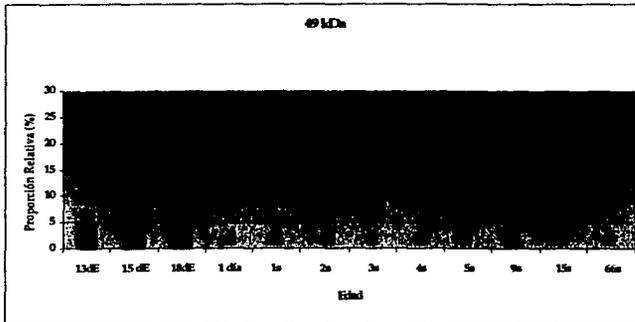


Fig.28 Cambios en la proporción relativa de la variante de 49 kDa en la bolsa de Fabricio con respecto a la edad. Después de separarla por SDS-PAGE en CNR y hacer el western blot se cuantificó por quimioluminiscencia. La proporción relativa está expresada como porcentaje de la inmunorreactividad total ($n=4$) \pm EEM. Diferente letra en cada barra representa diferencia significativa ($p<0.05$)

En las variantes de 45, 40, 37 y 33 kDa (Figuras 29, 30, 31 y 32) comienza a observarse un fenómeno que es todavía más evidente en la variante de 22 kDa (Figura 34) , esto es que en algunas de las edades no está presente la variante que se analizó, esto puede ser debido a que la GH puede estar formando oligómeros de alto peso molecular a través de puentes disulfuro, pero dado que el análisis esta hecho en condiciones no reductoras, los puentes no se reducen y las variantes quedan secuestradas en el agregado.

Curiosamente esto no fué lo mismo que sucedió con la variante de 30 kDa (Figura 33) que si aparece en todas la edades analizadas y mostrando diferencias significativas.

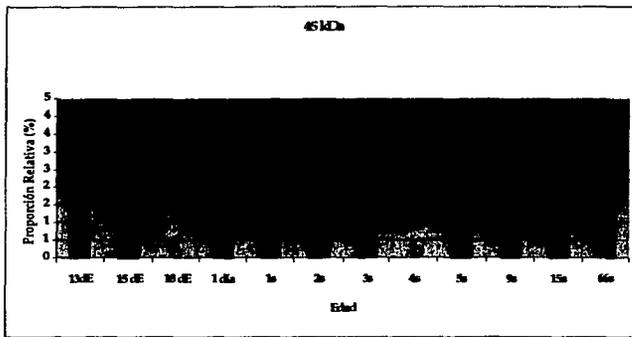


Fig.29 Cambios en la proporción relativa de la variante de 45 kDa en la bolsa de Fabricio con respecto a la edad. Después de separarla por SDS-PAGE en CNR y hacer el western blot se cuantificó por quimioluminiscencia. La proporción relativa está expresada como porcentaje de la inmunorreactividad total ($n=4$) \pm EEM. En esta variante no se observaron diferencias significativas en la proporción relativa en las edades en las que se detectó.

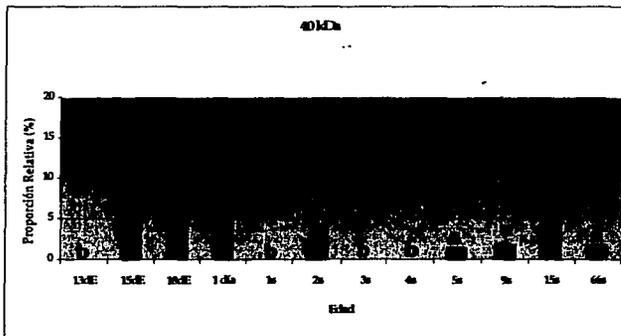


Fig.30 Cambios en la proporción relativa de la variante de 40 kDa en la bolsa de Fabricio con respecto a la edad. Después de separarla por SDS-PAGE en CNR y hacer el western blot se cuantificó por quimioluminiscencia. La proporción relativa está expresada como porcentaje de la inmunorreactividad total ($n=4$) \pm EEM. En esta variante no se observaron diferencias significativas en la proporción relativa en las edades en las que se detectó

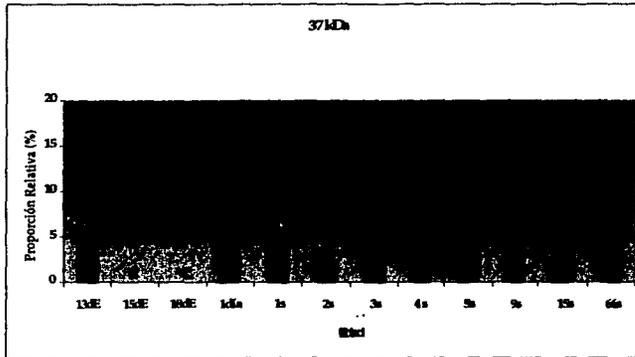


Fig.31 Cambios en la proporción relativa de la variante de 37kDa en la bolsa de Fabricio con respecto a la edad. Después de separarla por SDS-PAGE en CNR y hacer el western blot se cuantificó por quimioluminiscencia. La proporción relativa está expresada como porcentaje de la inmunorreactividad total ($n=4$) \pm EEM. Diferente letra en cada barra representa diferencia significativa ($p<0.05$).

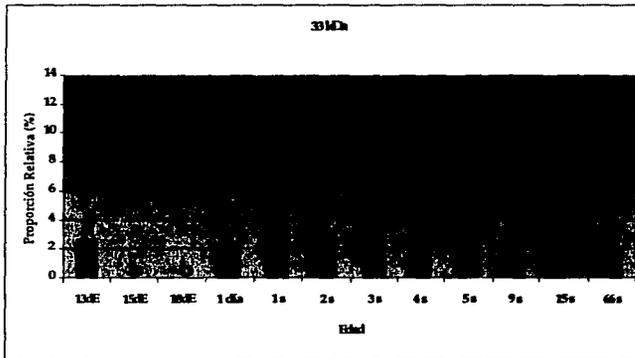


Fig.32 Cambios en la proporción relativa de la variante de 33 kDa en la bolsa de Fabricio con respecto a la edad. Después de separarla por SDS-PAGE en CNR y hacer el western blot se cuantificó por quimioluminiscencia. La proporción relativa está expresada como porcentaje de la inmunorreactividad total ($n=4$) \pm EEM. En esta variante no se observaron diferencias significativas en la proporción relativa en las edades en las que se detectó.

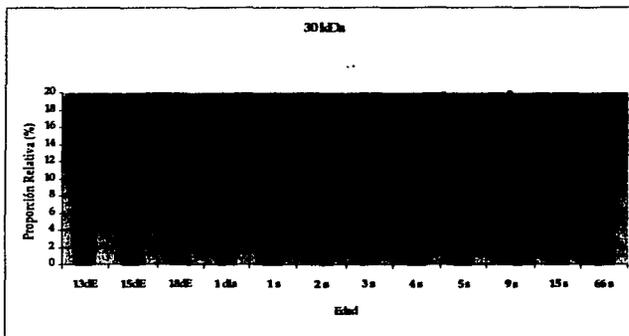


Fig.33 Cambios en la proporción relativa de la variante de 30kDa en la bolsa de Fabricio con respecto a la edad. Después de separarla por SDS-PAGE en CNR y hacer el western blot se cuantificó por quimioluminiscencia. La proporción relativa está expresada como porcentaje de la inmunorreactividad total (n=4) \pm EEM. Diferente letra en cada barra representa diferencia significativa ($p < 0.05$).

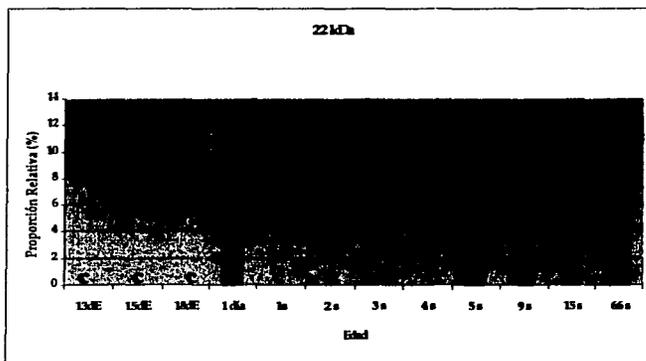


Fig.34 Cambios en la proporción relativa de la variante de 22kDa en la bolsa de Fabricio con respecto a la edad. Después de separarla por SDS-PAGE en CNR y hacer el western blot se cuantificó por quimioluminiscencia. La proporción relativa está expresada como porcentaje de la inmunorreactividad total (n=4) \pm EEM. Diferente letra en cada barra representa diferencia significativa ($p < 0.05$).

Al igual que en condiciones reductoras la variante mayoritaria fué el fragmento de 17kDa, que se encontró en todas las edades analizadas, pero no presentó diferencias significativas en su proporción relativa con respecto a la edad.

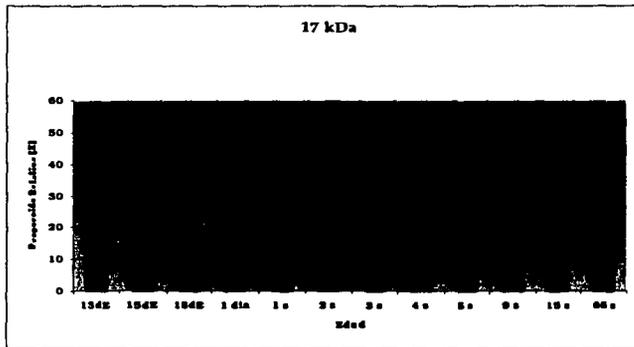


Fig.35 Cambios en la proporción relativa de la variante de 17 kDa en la bolsa de Fabricio con respecto a la edad. Después de separarla por SDS-PAGE en CNR y hacer el western blot se cuantificó por quimioluminiscencia. La proporción relativa está expresada como porcentaje de la inmunoreactividad total (n=4) \pm EEM. En esta variante no se observaron diferencias significativas en la proporción relativa en las edades en las que se detectó.

En principio se aprecia que hay un mayor número de bandas inmunorreactivas en condiciones no reductoras que en reductoras.

Al graficar y comparar cada una de las bandas se observa que hay tanto bandas de alto peso molecular (75kDa, 63Kda, 54kDa, 49 kDa, 45 kDa y 37 kDa) y bandas con peso molecular mayor al monómero de 22 como (30kDa y 33 kDa). Hay bandas que no se observan en todas las edades (22kda, 33 kDa, 40 kDa, 45 kDa, 54 kDa y 63 kda) y hay dos bandas que solo aparecen en los embriones (75 kDa y 49 kDa).

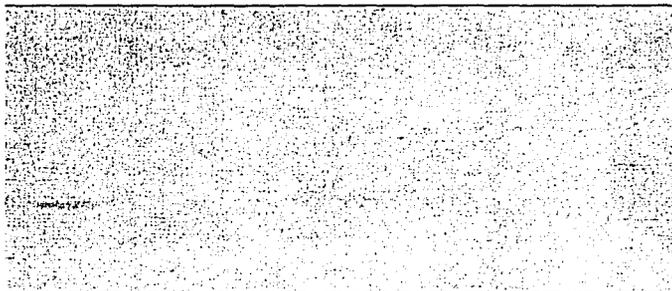
En el caso del monómero de 22 kDa esta variante no se aprecia en todas las edades y en las que se observa tenga una intensidad menor debido a la formación de agregados en el caso de las edades tempranas, ya que solo fué posible verla al final del periodo analizado.

Aquí al igual que en el caso de condiciones reductoras es posible apreciar como cambia la proporción relativa de cada una de las variantes a lo largo del desarrollo.

Para comprobar que todas estas bandas representaban inmunorreactividad específica a cGH y no se trataban de reactividad cruzada o de alguna peroxidasa endógena se realizaron dos experimentos:

- a) en el primero se hizo un WB igual a los anteriores pero no se incubó con anticuerpo primario (ácGH) sino solamente con el anticuerpo secundario. No se observó ninguna señal al momento de revelar el luminograma (datos no mostrados).
- b) En este caso el anticuerpo primario (ácGH) se preincubó con rcGH toda una noche a temperatura ambiente y después se incubó la membrana con este anticuerpo a la misma dilución utilizada en todos los experimentos, se corrieron dos geles en ambas condiciones CR y CNR (datos no mostrados) y en los dos se observa lo mismo, no hay una señal evidente, en la figura 36 se muestra el luminograma de condiciones reductoras, en donde apenas se aprecia una banda muy tenue en el carril del estándar (rcGH ,100ng).

Luminograma utilizando anticuerpo primario (GH) preabsorbido con rcGH



rcGH Hio 66S 15S 9S 5S 4S 3S 2S

Fig. 36 Luminograma obtenido al preadsorber el anticuerpo policlonal (ácGH) con un exceso de hormona recombinante (rcGH) en condiciones reductoras. En el gel se colocaron las mismas muestras de extractos de bolsa de Fabricio e hipofisis utilizadas en los experimentos anteriores.

Una vez que se realizaron los controles y las gráficas de cada una de las bandas era evidente que la banda más abundante es la 17kDa que representa de 40 a 50 % de IR total en cada una de las edades. Por lo que los siguientes experimentos estuvieron enfocados a inmunoprecipitar esta variante con la intención de secuenciarla.

Inmunoprecipitación de la variante de 17kDa

La inmunoprecipitación se realizó utilizando un anticuerpo policlonal α GH (el mismo utilizado para el WB y ELISA) y proteína A sefarosa. Se utilizaron extractos de bolsa de Fabricio de animales de 4 semanas de edad y muestras de extracto hipofisiario de animales de 4 semanas para tratar de separarlo también en este tejido.

En primer lugar de acuerdo a la técnica, las muestras se incubaron con suero preinmune de conejo, para limpiar las muestras, posteriormente se realizó otro experimento similar en donde la muestra no se incubó con el suero.

En estos experimentos se observó que la adición del suero de conejo no modificaba el patrón de bandas obtenido en ninguna de las dos muestras; pero el fragmento de 17 kDa se encontraba en la fracción no adsorbida (FNA) en vez de la fracción adsorbida (FA) que era lo que se esperaba.

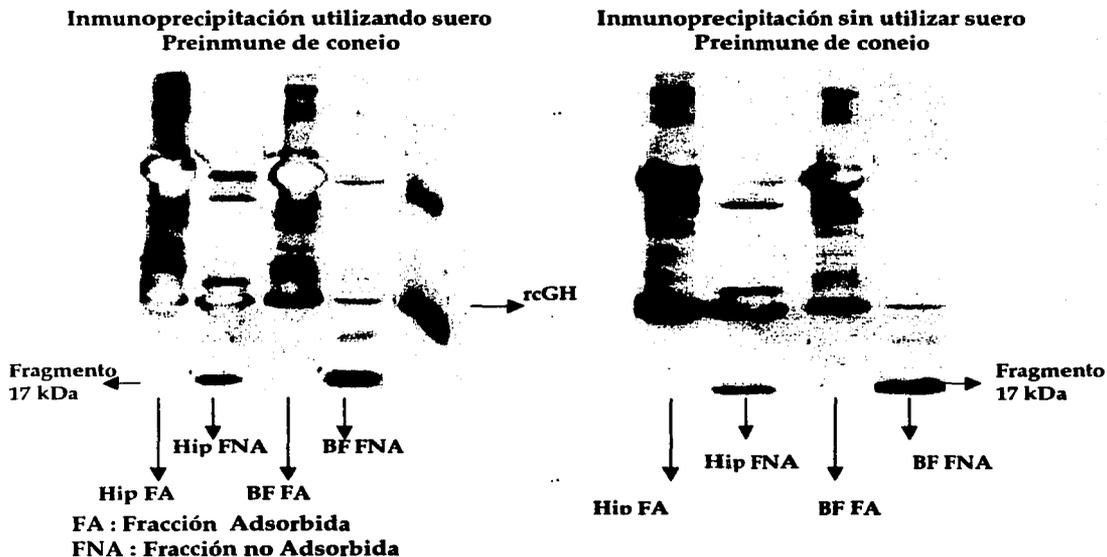
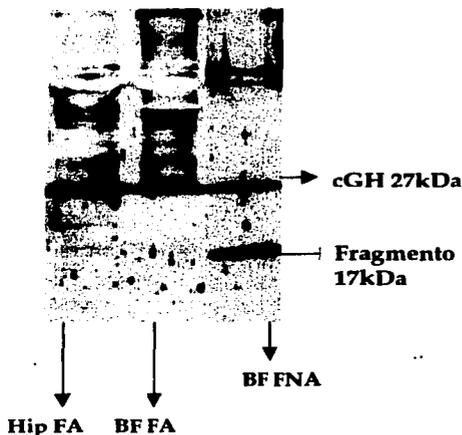


Fig. 37 Luminogramas obtenidos después de inmunoprecipitar los extractos de bolsa de Fabricio e hipófisis con anticuerpo policlonal α GH en CR. Las membranas se revelaron con el mismo anticuerpo que se utilizó para inmunoprecipitar. La inmunoprecipitación se realizó preincubando las muestras con suero no inmune de conejo (izquierda) y sin adicionar el suero (derecha).

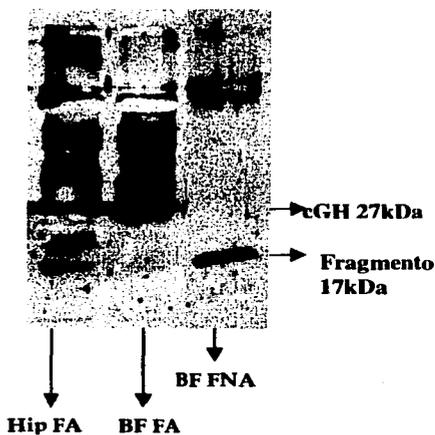
Al obtener estos resultados, se decidió no utilizar el suero preinmune de conejo para inmunoprecipitar las muestras, además se hizo otra modificación a la técnica, que fue re-inmunoprecipitar la FNA obtenida en la primera inmunoprecipitación, con el fin de obtener esta vez al fragmento de 17 kDa en la segunda FA.

Después de inmunoprecipitar las muestras, se tomó una alícuota de la FNA y se procedió a reinmunoprecipitar esta fracción utilizando la misma técnica, los resultados se muestran en la figura 38 en donde se observa que una vez más el fragmento no fue retenido y aparece en la FNA de la reinmunoprecipitación.

Primera inmunoprecipitación



Reinmunoprecipitación



FA : Fracción Adsorbida
FNA : Fracción no Adsorbida

Fig. 38 Luminogramas obtenidos después de inmunoprecipitar los extractos de bolsa de Fabricio e hipófisis en CR. Las membranas se revelaron con el mismo anticuerpo con el que se inmunoprecipitaron. A la derecha está el luminograma al realizar el proceso de inmunoprecipitación por primera vez, a la izquierda se observa el luminograma de la reinmunoprecipitación de las fracciones no adsorbidas de ambos extractos (FNA).

Aún después de reinmunoprecipitar las muestras el fragmento de 17 kDa permanece en la fracción no adsorbida; pero en este punto es posible separarlo, ya que es la banda que se visualiza con mayor facilidad y la más abundante

El siguiente paso para separar esta banda puede ser realizar una electroforesis preparativa y posteriormente electroeluir la proteína para poder secuenciarla.

El hecho de que el fragmento de 17 kDa no fuera retenido en la FA, implica que el anticuerpo policlonal utilizado tiene una afinidad diferente por esa banda en solución que en fase sólida o bien que se trata de una proteína que se une de manera inespecífica al anticuerpo cuando se encuentra desnaturalizada en la membrana de nitrocelulosa en el Western Blot.

DISCUSION

Los resultados obtenidos en este trabajo proporcionan elementos para la caracterización parcial de una proteína semejante a la cGH que es expresada en tejidos extrahipofisarios, en este caso específicamente en la bolsa de Fabricio del pollo.

Era conocido, gracias a los trabajos previos de Render y colaboradores, que órganos del sistema inmune (bazo, timo y bolsa de Fabricio) eran un sitio de síntesis de cGH en los pollos, pero no se habían caracterizado la(s) variantes moleculares de la hormona presentes y mucho menos determinado la proporción de cada una de éstas durante el desarrollo del animal.

Por ello en este trabajo se hizo un análisis a lo largo de la ontogenia del pollo, que incluyó la colección de muestras de bolsa de Fabricio desde la etapa de embriogénesis (13, 15 y 18 dE), inmediatamente después de la eclosión (1 día) y a lo largo del desarrollo hasta la edad adulta (1, 2, 3, 4, 5, 9, 15 y 66 semanas); para analizar si existía un patrón de variantes de GH en este tejido, como era este a lo largo del desarrollo y eventualmente comparar si existía alguna relación con el encontrado en la hipófisis durante la ontogenia (Arámburo, 2000).

A fin de realizar esto inicialmente se estandarizaron las técnicas de cuantificación de proteínas por el método de Bradford, cuantificación de GH total por ELISA (definir la cantidad de proteína total extractos de BF y de hipófisis) y western blot a fin de realizar determinaciones confiables y utilizar siempre la misma cantidad de proteína en ellas.

Tanto en el ELISA como en el WB, se utilizaron como estándares internos hormona recombinante (rcGH) y extracto hipofisiario (de animales de 4 semanas de edad).

En el caso del western blot se realizó una curva con rcGH para conocer el intervalo lineal de detección de inmunoreactividad por quimioluminiscencia, con esto se determinó que la cantidad de estándar interno (rcGH) era de 100ng. En el caso de los extractos de hipófisis se colocó 1µg de proteína dado que la señal obtenida era suficiente para realizar el análisis densitométrico.

En el caso del ELISA a fin de determinar las cantidades óptimas de proteína de extractos de BF y de hipófisis se realizaron dos curvas dosis-respuesta con cantidades crecientes de proteína para cada tejido y de aquí se seleccionó utilizar 60µg (BF) y 500ng (hipófisis) de proteína total. Lo cual es coherente con el señalamiento de Render de que la concentración de GH es mucho menor en la BF que en la hipófisis (Render, 1995 b).

Cuantificación de cGH total por ELISA

Debido a la disponibilidad de las muestras la cuantificación de la GH total en los extractos de BF se realizó partir de los 18dE ya que la cantidad de proteína en las edades tempranas era muy pequeña, de modo que estas solo se utilizaron para el análisis de heterogeneidad.

En este experimento se obtuvieron valores de alrededor de 40 a 480 ng cGH/mg de proteína total (Tabla 8 y figura 11 de resultados), con excepción de las muestras de 1 semana en la que la cantidad fue de 1.23 µg cGH/mg de proteína. los valores determinados para la mayoría de la edades coinciden en el orden de magnitud con lo reportado por Render y colaboradores (*Render, 1995b*) quienes midieron la cantidad de cGH presente en la BF por RIA y encontraron un valor de 320 ng cGH/mg, en bolsas de animales machos inmaduros sexualmente (antes de llegar a las 20 semanas de edad).

Desafortunadamente en ese estudio no se evaluaron diferentes edades, por lo que no se tienen más datos contra los cuales comparar los valores obtenidos en las diferentes edades analizadas en esta tesis.

Los datos de cGH total tienen un comportamiento interesante, que puede ser dividido en tres etapas, en 18dE y 1 día, los valores van de 44 a 70 ng/mg, posteriormente hay un pico a la semana de edad (1231ng/mg), después desde dos semanas hasta 5 semanas el valor es de alrededor de 160-200 ng/mg y finalmente desde 9 hasta 66 semanas se observa un valor mayor de aproximadamente 350-480ng/mg que es aproximadamente la edad en la que se realizó la determinación de Render.

Respecto al pico de cGH encontrado en la primera semana, es evidente que el valor está disparado con respecto a los demás, este comportamiento es por demás interesante, ya que la diferencia con respecto a las edades más cercanas (1día y 1 semana) es considerable, desafortunadamente, debido a que este se trataba de un primer análisis las edades antes y después del pico son muy lejanas, es necesario hacer más pequeña la ventana de tiempo en la que se realizó el análisis para definir la cantidad de hormona en edades más próximas, quizá día tras día desde un día posteclosión hasta llegar a las dos semanas, con el fin de determinar si ese aumento de la hormona se presente de manera gradual en tiempos muy cortos.

Es necesario señalar que también podría darse el caso de que alguno de los animales que componían la muestra de 1 semana analizada, se encontrara uno con alguna alteración, de manera que es necesario incrementar el número de muestras (pools) y realizar más determinaciones siguiendo el mismo procedimiento.

Los valores obtenidos en la determinación en las diferentes etapas son a su vez bastante diferentes entre sí; por ejemplo el resultado encontrado en la edad embrionaria (18dE) comparado con el de 1 día posteclosión, se observó que la

cantidad de hormona presente en la BF del embrión es aparentemente mayor que la que hay en el pollo de 1 día de edad pero debido a la variabilidad en la dispersión de las determinaciones en la muestra de un día esto no puede ser concluyente. En el caso de los animales de 15 semanas, que ya están alcanzando la madurez sexual y en los adultos de 66 semanas, el valor de hormona total es muy similar al de los animales de 9 semanas, en un principio esto indicaría que no hay una gran diferencia en la cantidad de hormona total presente en estas diferentes etapas.

Sería muy interesante en trabajos subsecuentes tratar de correlacionar la cantidad de GH presente con alguno de los eventos fisiológicos relevantes que ocurren en la BF en las diferentes etapas analizadas. Se sabe que a los 18dE la bolsa de Fabricio se encuentra en proceso de diferenciación, hay proliferación de las células del epitelio bursal, y hay linfocitos no diferenciados, quizá la GH sintetizada en esa edad pudiese estar involucrada en los procesos de maduración y diferenciación de estas células.

En el caso de etapas posteriores se sabe que la BF involucrena antes de la madurez sexual (aproximadamente 20 semanas) y ya no desempeña las mismas funciones de maduración y liberación de linfocitos, pero después de la involución el tejido no desaparece, y se cree que pudiera estar actuando como un órgano linfoide secundario donde se pueda montar una respuesta inmune, por último no se sabe nada acerca de si desaparecen o no sus funciones pinocíticas.

De modo que no es posible saber si en alguna de las etapas del desarrollo y diferenciación de la bolsa ó en las funciones que esta realiza después de la involución hay alguna que sea mediada por GH, pero esto no descarta que la hormona pudiera estar jugando un papel relevante de manera autocrina o paracrina.

Podemos ver entonces, que los resultados obtenidos en la cuantificación de cGH en la BF por ELISA todavía son preliminares y que es necesario realizar más experimentos incrementando el número de muestras para cada una de las diferentes edades y cerrando la ventana de tiempo entre las edades a analizar.

Al realizar estos experimentos pudimos observar lo que sucede con la GH total, pero no es posible saber si existen en esa GH total variantes moleculares de la hormona, si son las mismas las que se producen en cada una de las edades analizadas y si alguna de estas variantes contribuye en mayor o menor proporción a la cantidad de hormona total cuantificada, en una edad determinada por ejemplo en la edad de 1 semana.

Para determinar cuales son las variantes de cGH presentes en cada edad es necesario hacer otro tipo de análisis como la electroforesis o WB.

Análisis de Variantes moleculares de cGH por WB y densitometría

El análisis por WB para determinar a las variantes, aunado con el análisis por densitometría, constituyen un método muy útil, ya que no solo te permiten determinar la presencia de variantes de masa, sino que al realizar la densitometría es posible semicuantificar la cantidad de cada una de estas (al compararla con una curva patrón de un estándar) y por lo tanto hacer comparaciones.

En el caso de este trabajo no fué posible obtener una curva con una correlación aceptable para realizar la semicuantificación, pero si fué posible determinar aspectos muy importantes de la GH en este tejido como:

- la existencia de un patrón de heterogeneidad
- cuales son las diferentes bandas inmunorreactivas presentes en condiciones reductoras y no reductoras y cual es la proporción relativa (calculada como porcentaje de la inmunoreactividad total) de cada una de estas bandas con respecto a la edad. (Figuras 13 y 22 de resultados.)

Dados estos resultados podemos decir que se identificaron variantes moleculares de cGH en la bolsa de Fabricio de pollo y que cambia la proporción relativa de esas variantes durante la ontogenia.

Las muestras se analizaron en condiciones no reductoras para observar en a todas las variantes de alto peso molecular presentes en la muestra. Posteriormente en condiciones reductoras, se pudo ver cuales de estas variantes no resisten la reducción de los puentes disulfuro y se desagregan, dando como resultado un aumento en la proporción de las variantes más pequeñas que estaban formando esos agregados de proteínas, como sucedió con el monómero de 22 Kda y algunas otras formas submonoméricas.

Para comprobar que las bandas inmunorreactivas observadas en los luminogramas eran específicas se realizaron dos controles.

En el primero el anticuerpo policlonal (α cGH) se preincubó con un exceso de rcGH y este anticuerpo fue con el que se incubó la membrana donde estaban las muestras. Al revelar, en el luminograma no se observó ninguna banda en las muestras de bolsas de Fabricio. Al saturarse el anticuerpo con un exceso de hormona recombinante ya no reaccionó con las variantes de la membrana, es por esto que no se observó ninguna señal (fig. 36).

En el segundo, la membrana se incubó solamente con anticuerpo secundario, al revelar el luminograma tampoco se observó ninguna señal, con esto se descartó la presencia de alguna peroxidasa endógena en las muestras que pudiera estar dando un falso positivo (datos no mostrados).

Análisis en condiciones no reductoras

Después de analizar densitométricamente cada uno de los luminogramas, se pudo obtener información importante de cada una de las variantes. Se determinó el peso molecular de cada banda inmunoreactiva (al compararla con los estándares en cada gel) y el valor de proporción relativa, este valor expresado en porcentaje se graficó para cada una de las edades (figuras 25-35 de resultados).

Es importante señalar aquí que aunque según la tabla hay bandas que no se aprecian en todas las edades (tal es el caso del monómero en los embriones) era posible visualizarlas como bandas muy tenues a simple vista. Esto sucede porque al momento de analizar con el programa (IPL-GEL) es necesario definir la línea basal de todos los picos (la sección más clara en el luminograma), y en ocasiones las bandas eran tan tenues que quedaban fuera de esta línea y no se tomaba en cuenta su contribución a la inmunoreactividad total.

Las variantes obtenidas en condiciones no reductoras y su presencia o ausencia en cada edad se enlistan en la tabla 10 de la sección de resultados. En general se encontraron bandas de: 63, 54, 45, 40, 37, 33, 30, 22 y 17 kDa en todas las edades y dos bandas de 75 y 49 kDa solamente en los embriones de 13,15 y 18 dE.

En el caso de las bandas de 49 y 75 kDa (que solo se encontraron en los embriones) se observó que su proporción aumentaba con respecto a la edad, y de manera significativa, sería interesante correlacionar una vez más la acción de alguna de estas variantes con el evento de la eclosión, ya que inmediatamente después de esta ya no es posible observarlas (1 día). En varias de las bandas puede haber agregados que ocasionan que estas desaparezcan de algunas edades, pero es posible también que la secreción de estas variantes en el tejido tenga ese comportamiento, y que estas correlaciones con algún evento en la respuesta inmune, pero con los datos que se tienen hasta este momento no es posible concluir al respecto.

La variante de mayor proporción en todas las edades fué el fragmento de 17kDa, que se encontraba presente en todas las edades.

Análisis en condiciones reductoras

En condiciones reductoras el número de bandas IR detectadas fue menor que en el caso de condiciones no reductoras, y algunas de las bandas de alto peso molecular desaparecieron. Como las bandas de 75kDa y 49 kDa que solo se observaban en los embriones.

Las bandas que se encontraron en condiciones reductoras fueron de 64, 52, 46, 40, 37, 31, 29, 26 y 17 kDa (enlistadas en la tabla 9 de resultados).

En el análisis en condiciones reductoras se observó una vez más que la variante de mayor proporción y presente en todas las edades era la de 17 kDa que en este caso presenta una ligera elevación alrededor de las dos o tres semanas.

Además existen otras variantes, como las de 46, 40 y 37 kDa que presentan un comportamiento diferente al de 17kDa pero similar entre sí, tienen una proporción más elevada en edades tempranas y después una disminución en el resto de las edades analizadas. A diferencia de la variante de 31 kDa cuyo comportamiento es a la inversa, no es posible detectarla en los embriones y su proporción aumenta con la edad, aunque su proporción en las edades adultas es menor en comparación con la que presenta entre 1 y 3 semanas. Desafortunadamente, en algunos casos la desviación es considerable y la diferencia no es contundente, por lo que una vez más se confirma que es necesario realizar el análisis una vez más con más muestras.

Dado que se encontró un patrón heterogéneo de la GH en la BF, similar a lo que se ha descrito en la hipófisis por Arámburo y colaboradores (Arámburo, 2000), se utilizaron estos datos para comparar algunas de las variantes detectadas en la BF con las ahí presentes.

Comparación del patrón de variantes de la BF con la hipófisis

a) Condiciones no reductoras (CNR).

En la hipófisis en estas condiciones, en la hipófisis se encontraron 9 bandas inmunorreactivas a cGH y algunas de ellas coinciden en peso molecular con las detectadas en la BF.

Tabla 11. Variantes moleculares de cGH detectadas en la bolsa de Fabricio e hipófisis en condiciones no reductoras.

Peso molecular kDa	BF Variantes kDa	Hipófisis Variantes kDa
110		105 +
100		
90		98 +
80		80 +
70	75*	
60	63	66 +
50	54 49*	50 +
40	45 40	44 +
30	37 33 30	
20		25 + 22 +
10	17	15 +

*Bandas encontradas solamente en embriones de 13, 15, 18 dE
+ Datos extraídos de Arámburo et al. 2000.

Al comparar las bandas de la bolsa de Fabricio y la hipófisis se observa que la banda de 22kDa de BF corresponde con la forma monomérica de la cGH detectada en hipófisis.

La proporción de esta banda es muy pequeña y en algunos casos imperceptible (embriones) . Los valores de proporción relativa de esta banda en bolsa de Fabricio van de 6% (1 s) hasta el más alto de 15 % en 1 día. En el caso de la hipófisis el porcentaje de esta banda es mucho mayor, van de 10% en embriones de 18dE, hasta el 40% en embriones de 20dE.

La banda de 45 kDa en la bolsa coincide con la forma dimérica de la cGH detectada en la hipófisis con un peso de 44kDa.

En la hipófisis esta banda tiene un valor máximo de proporción relativa de 32% en embriones de 18dE, en todas las demás edades analizadas en hipófisis (20dE hasta 14 semanas) el valor de proporción se mantiene casi constante alrededor de 15 %. En la bolsa de Fabricio, la proporción máxima de esta forma es de casi 4% en la edad de 1 día, las demás están en valores de 2.5% a 3.5 %.

A diferencia del fragmento de 15 kDa que se encuentra en la hipófisis en la bolsa se detectó la presencia de un fragmento de 17kDa. El fragmento de 15 kDa en hipófisis se encuentra en menor proporción que el fragmento de la bolsa de Fabricio. Los valores para la variante de 15 kDa hipofisiaria van de casi 6% en edades embrionarias y alrededor de 1% en las demás edades analizadas, en la bolsa el fragmento de 17kDa representa casi el 30-40 % de la inmunorreactividad total en todas las edades analizadas, y esta proporción se mantiene casi constante a lo largo de todo el desarrollo.

b) Condiciones reductoras (CR) .

En condiciones reductoras no hay una gran coincidencia en los pesos, pero nuevamente se observa el monómero (26kDa) en ambos tejidos. En esta ocasión en la hipófisis al igual que en la bolsa se observó que desaparecían las formas de alto peso molecular y que se incrementaba la proporción del fragmento de 26 kDa y de algunas formas submonoméricas como 15kDa y 13kDa. Arámburo y col. (2000) determinaron que existía un patrón diferente en el desarrollo y que observaban varias bandas que no se encontraban en los embriones y sí en edades posteclosión como se muestra en la tabla 12. En el caso de la bolsa además se detectó una banda de 31 kDa que solo aparecía en las edades posteclosión.

En la siguiente tabla se observa el patrón de bandas detectado en la hipófisis (Arámburo, 2000) y en la bolsa de Fabricio en condiciones no reductoras.

Tabla 12. Variantes moleculares de cGH detectadas en la bolsa de Fabricio e hipófisis en condiciones reductoras.

Peso molecular kDa	BF Variantes kDa	Hipófisis Variantes kDa
80		
70		72*
60	64	
50	52	59**
40	46 40	48** 44*-
30	37 31**	39- 36- 32-
20	29 26	26 + 23**
10	17 ..	18- 15*- 13 +

*Bandas encontradas solamente en embriones de 13, 15, 18 dE

** Banda encontrada solamente en edades posteclosión.

- Datos extraídos de Arámburo et al. 2000.

Nuevamente se observa que hay bandas similares en ambos tejidos, tal es el caso de la banda del monómero 26kDa.

A pesar de que en esta ocasión se encuentra en la hipófisis una banda de 18 kDa no es posible asegurar que sea esta la que es homóloga al fragmento de la bolsa, ya que la banda de 18kDa en hipófisis sólo aparece en condiciones reductoras, y el fragmento de la bolsa (17kDa) aparece tanto en condiciones reductoras como no reductoras. Este fragmento podría tratarse de una forma cortada similar a la que existe en la hipófisis, el fragmento de 15kDa.

Además de estas bandas se propone que hay otras bandas que coinciden en peso molecular y que se pudiera tratar de las mismas, tal es el caso de la banda de 37kDa de la BF y la de 36kDa en hipófisis. Además la banda de 29kDa de la bolsa podría ser una forma glicosilada de la cGH que se ha detectado en la hipófisis con un peso similar.

Dado que existen bandas detectadas en la BF que no coinciden con ninguna de las encontradas en la hipófisis, como 64, 40, 31 y 46kDa es posible que estas solo sean sintetizadas en este tejido y que sus efectos sean locales. No se puede determinar si solamente se sintetizan en la bolsa de Fabricio o si tienen algún homólogo en otros tejidos extrahipofisarios, pues en el testículo de pollo se ha observado un patrón heterogéneo de bandas inmunorreactivas como en la bolsa de

Fabricio (*Luna, 2001 datos no publicados*); pero no se han comparado exactamente los pesos de cada una de las bandas detectadas con las de la bolsa.

Un inconveniente para tener bases más firmes sobre el origen de estas variantes es que no existen reportes hasta ahora de estudios del patrón de variantes moleculares de la cGH en otros tejidos extrahipofisarios con respecto a la edad, que nos pudiera apoyar en la hipótesis de que estas variantes son propias de este tejido o si son características de todos los tejidos extrahipofisarios.

De las bandas encontradas solamente en la bolsa se puede mencionar que:

- la banda de 64KDa representa aproximadamente entre el 10 y 15 % de la IR total, y no se aprecia un incremento muy elevado en ninguna de las edades analizadas, pero si está presente a lo largo de toda la ontogenia.

-la banda de 40 KDa y la de 46 KDa muestran un patrón similar, son más abundantes en edades tempranas (embriones y un día de nacido) que en las demás edades, y los porcentajes en el caso de las dos son de aproximadamente 10-13%, ligeramente menor que la banda de 64 KDa.

-la banda de 31 KDa no está presente en las edades embrionarias, y solo se aprecia en un porcentaje de 1.5-2% hasta la edad de 1día, posteriormente se incrementa hasta las 3 semanas y a partir de ahí se observa un decremento en las demás edades.

Inmunoprecipitación de la variante de 17 kDa

La banda más abundante en la bolsa es la de 17 KDa, representa desde el 15 y 20 % para las edades de 18 y 15 dE hasta el 40% aproximadamente en los embriones de 15 días en CR, para 1 día el valor es de 35%, alcanza un pequeño pico a la semana y de ahí decae lentamente en las demás edades, pero todos son valores altos comparados con la proporción de las demás bandas incluyendo al monómero y al dímero de cGH.

Ya se había discutido que este fragmento puede ser parecido al de 15KDa encontrado en la hipófisis, pero en la hipófisis la proporción de este es mayor en embriones y después decrece con la edad, y las proporciones relativas son muy pequeñas incluso en las edades en las que hay más en donde los valores son de 2 ó 3% cuando mucho.

La proporción del fragmento de 17kDa en la bolsa parece ser más abundante entre la primera y tercera semana de vida, pero los valores de proporción siguen siendo elevadas en edades adultas, incluso después de que ya se ha iniciado la involución.

Una vez que ya se había comprobado que esta variante era reconocida por el anticuerpo policlonal α cGH con los controles utilizados y además estaba presente en todas las edades en mayor proporción que otras bandas, el siguiente objetivo tenía como fin tratar de caracterizarla más a fondo.

Era de particular interés ver si correspondía a la porción aminoterminal de la proteína. Esto porque en el laboratorio es posible generar un fragmento de 15 kDa similar al de la hipófisis haciendo un corte con trombina en cGH que corresponde a la porción aminoterminal de la cGH. Este fragmento aminoterminal es activo en bioensayos de angiogénesis (Arámburo, 2001) y proliferación celular medido por la incorporación de timidina tritiada; es entonces de gran interés saber si el fragmento de 17kDa de la bolsa de Fabricio corresponde a la porción amino terminal (al igual que el de 15kDa de la hipófisis) o a la porción carboxilo terminal de la cGH y si presenta bioactividad.

La técnica a utilizar fue la inmunoprecipitación utilizando anticuerpo policlonal, por lo tanto se usó el mismo que para el ELISA y el WB.

En un primer experimento se procedió a utilizar suero normal de conejo para incubar las muestras antes de adicionarles el anticuerpo, para ver si este procedimiento afectaba los resultados obtenidos durante la inmunoprecipitación.

De acuerdo con la figura 37 de resultados se observó que el utilizar o no el suero no modificó las bandas inmunoprecipitadas y las presentes en la fracción no adsorbida (FNA). Además no influyó en la calidad del luminograma, ya que la intensidad de la señal y el fondo fue el mismo para las dos condiciones.

En este punto se observó que el fragmento de 17kD no era retenido en la fracción adsorbida (FA) sino que estaba, junto con una porción de la banda de 22 kDa en la fracción no adsorbida (FNA).

Después de repetir este experimento se observaron los mismos resultados, por lo que se procedió a modificar el procedimiento con el objeto de inmunoprecipitar la banda de 17kDa.

La alternativa a utilizar fue volver a inmunoprecipitar la FNA del primer experimento de inmunoprecipitación, como esto consistía en realizar el procedimiento una vez más se le denominó reinmunoprecipitación. En esta reinmunoprecipitación, la FNA del primer experimento se utilizaba como extracto inicial, esto se realizó de esta manera porque inicialmente se pensaba que la cantidad del fragmento y de la banda de 22 kDa era demasiada para adsorberla con esa cantidad de anticuerpo y de proteína A sefarosa.

Se esperaba entonces que en la reinmunoprecipitación el anticuerpo reconociera al fragmento de 17kDa y se encontrara en la FA. Al contrario de esto, el fragmento quedó nuevamente en la FNA, pero esta vez toda la variante de 22 kDa quedó en la FA y no se observaba ya ninguna banda inmunorreactiva a cGH con el fragmento.

A pesar de que después de este procedimiento de "reinmunoprecipitación" podemos obtener una banda bien definida de la variante de 17 kDa, que podría ser separada después, corriendo esta muestra en una electroforesis semipreparativa, la explicación a porqué el fragmento no fue inmunoprecipitado por el anticuerpo era un punto muy importante.

Este cambio en la reactividad del anticuerpo policlonal en solución, podría explicar en parte las variaciones obtenidas por ELISA para los extracto de bolsa de Fabricio, ya que en ese experimento la incubación también se realiza en solución.

La afinidad del anticuerpo por cGH fue probada saturándolo primero con grandes cantidades de la hormona recombinante, en este caso todas las bandas incluyendo a la banda de 17kDa desaparecieron. La diferencia está en que al realizar el WB, los geles se corren en condiciones desnaturizantes, utilizando el detergente SDS y además hirviendo las muestras, de manera que las proteínas se desnaturizan.

Al desnaturizarse las proteínas y estar en una fase sólida como la membrana de nitrocelulosa es posible que los epítopes de la variante de 17kDa que reconoce el anticuerpo se expongan y la reacción antígeno-anticuerpo proceda sin ningún tipo de impedimento estérico, esto haría entonces que sea muy fácil observar una señal bien definida en los luminogramas después de incubar con el anticuerpo secundario.

Contrario a esto, las proteínas presentes en el extracto, en solución, no se encuentran desnaturizadas y pueden adquirir conformaciones nativas o se pueden agregar, de manera que hacen ahora es más difícil el reconocimiento de los epítopes específicos por el anticuerpo en la variante de 17kDa. Sin embargo otras variantes incluyendo el monómero de 22 kDa (que también se encuentra en la hipófisis) si pueden ser reconocidas, como se observó en el experimento de inmunoprecipitación.

Esto nos lleva a pensar que la afinidad del anticuerpo por la variante de 17kDa es diferente en solución que en fase sólida y que en el ensayo de ELISA podría ocurrir este fenómeno, por lo que al momento de hacer la determinación al incubar el anticuerpo con la muestra en solución, el anticuerpo no se une a toda la proteína de interés. Entonces los valores determinados experimentalmente son generados únicamente por las demás variantes que si se reconocen en solución y no por la de 17kDa.

Otra posibilidad para esta diferente afinidad en solución y en fase sólida, es que esa proteína de 17kDa no sea cGH, sino una proteína constitutiva del tejido que al desnaturizarse, expone algunos epítopes que son reconocidos por el anticuerpo α cGH a pesar de que no se trate de la hormona. Esto explicaría en parte que la cantidad de fragmento no varíe considerablemente a lo largo del desarrollo.

Para identificar qué es lo que sucede con esta variante existen varias posibilidades, una de ellas es realizar un gel en condiciones nativas y ver si el patrón de bandas es similar, particularmente ver si la banda de 17 kDa está presente. Pero es indudable que la única opción certera es secuenciar la proteína y ver si en efecto coincide en secuencia con la cGH.

Pasando a otro punto, otro experimento que contribuiría a caracterizar el patrón de variantes de cGH presentes en la bolsa de Fabricio sería realizar una tinción específica de carbohidratos, para identificar si la banda de 29 KDa

corresponde a la variante glicosilada de cGH presente en la hipófisis. Realizar este tipo de experimentos arrojarían datos que enriquecerían mucho los datos generados en este trabajo, pero debido al tiempo y trabajo que implican no fue posible realizarlos para incluirlos en esta tesis.

De manera que serán incluidos en trabajos posteriores continuando con este modelo de estudio.

En resumen, los resultados generados en el siguiente trabajo confirmaron la presencia de la GH en la BF y describen por primera ocasión la heterogeneidad molecular de esta proteína en dicho tejido, así como los cambios relativos de las diferentes bandas inmunorreactivas a lo largo de la ontogenia en el pollo. También se hizo una comparación con el patrón de variantes de GH que ha sido descrito en la hipófisis.

Todos los resultados presentados aquí son datos preliminares que permitirán avanzar más en la caracterización de la hormona de crecimiento presente en los tejidos extrahipofisarios de pollo, principalmente en el sistema inmune.

ESTA TESIS NO SALE
DE LA BIBLIOTECA

➤ Conclusiones

Detectamos la presencia de cGH en la bolsa de Fabricio en todas las edades analizadas (13dE, 15dE, 18dE, 1día de nacidos, 1S, 2S, 3S, 4S, 5S, 9S, 15S y 66S) utilizando un ELISA específico.

Realizando cuantificación de la hormona total por el método de ELISA se observó que:

-Hay un pico en la BF de pollos de 1 semana de edad y que esto correlaciona con el hecho de que la BF crece rápidamente durante las tres primeras semanas de vida.

-La cantidad de hormona presente en la BF es menos del 1% de la que existe en la hipófisis por este mismo método.

El análisis por WB reveló que existe un patrón de variantes presentes en la BF, y que interesantemente, la proporción relativa de cada una de las variantes muestra cambios durante el desarrollo

En condiciones No reductoras se encontraron bandas de: 63KDa, 54KDa, 45KDa, 40 KDa, 37 KDa, 33KDa, 30 KDa, 22KDa y 17 KDa, además de dos bandas de 75KDa y 45 KDa que solo aparecen en los embriones.

En condiciones Reductoras se observaron bandas de: 64KDa, 52KDa, 46KDa, 40KDa, 37KDa, 31KDa, 29KDa, 26 KDa y 17 KDa.

Se encontraron las bandas de 22kDa y 45 kDa en condiciones no reductoras y de 26 kDa y 52 kDa en condiciones reductoras, que corresponden a la forma monomérica y dimérica de la cGH detectada en hipófisis.

Las bandas de 37KDa, 17KDa y 29 KDa podrían coincidir con las bandas de 36KDa y 15KDa y 29 KDa presentes en la hipófisis, además esa banda de 29KDa podría ser la forma glicosilada de la hormona que se encuentra en la hipófisis,

Las bandas de 64, 40, 31 y una banda de 46 kDa que sólo se observan en CR son propias de la BF y no tienen alguna variante similar en peso molecular en la hipófisis, es posible que sus efectos sean locales, que sólomente sean sintetizadas en este tejido o en otros tejidos extrahipofisarios o por último que se trate de agregados resistentes a la reducción con β -mercaptoetanol (formas oligoméricas de la hormona).

Se logró separar de las demás bandas IR a cGH la banda de 17KDa utilizando la técnica de inmunoprecipitación con anticuerpo policlonal.

El hecho de que exista cGH en este tejido y la variación que ésta presenta durante la ontogenia sugiere que la cGH es sintetizada *in situ* en la BF y que desempeña algún papel importante en este tejido actuando, probablemente, en forma autócrina o parácrina.

☞ REFERENCIAS

- ☞ Abdel-Meguid, SS., Shieh, HS., Smith WW., Dayringer HE., Violand BN., Bentle LA. 1987. Three-dimensional structure of a genetically engineered variant of porcine growth hormone. *Proceedings of the National Academy of*
- ☞ Arámburo, C., Campbell RC., Scanes, CG., 1989(a). Heterogeneity of chicken growth hormone (cGH). Identification of lipolytic and non lipolytic variants. *Life Sciences* 45: 2201-2207. .
- ☞ Arámburo, C., Carranza, M., Sánchez, R., Perera, G. 1989(b). Partial Biochemical and biological characterization of purified chicken growth hormone (cGH) . Isolation of cGH charge variants and evidence that cGH is phosphorylated. *General and Comparative Endocrinology* 76: 330-339.
- ☞ Arámburo, C., Montiel, JL., Perera, G., Navarete, S., Sánchez, R. 1990(a). Molecular Isoforms of chicken growth hormone (cGH); Different bioactivities of cGH charge variants. *General and Comparative endocrinology* 80: 59-67.
- ☞ Arámburo, C., Donoghue, D., Montiel, JL., Berghman, LR., Scanes, CG. 1990(b). Phosphorylation of growth hormone. *Life Sciences* 47: 945-952.
- ☞ Arámburo, C., Scanes, CG., 1991. Endogenous cleavage of chicken growth hormone. *73rd Annual Meeting of the Endocrine Society* (Abst.232) June 19-22 Washington, D.C.,USA.
- ☞ Arámburo, C., Montiel, JL., Sánchez, R., Perera, G., Navarrete, S., Carranza, M., García-Moreno, J., Fenton, B. 1993. La hormona de crecimiento de pollo: una familia de proteínas con diversidad funcional y molecular. En: *Memorias del congreso conmemorativo del Jubileo del Instituto de Investigaciones Biomédicas de la UNAM, México, UNAM.:483-499.*
- ☞ Arámburo C., Carranza, M., Martínez, H., Luna, M. 1997. A comparative overview of growth hormone: proteins and genes. In: *Proceedings of the XIIIth*

International Congress of comparative Endocrinology, Yokohama, Japan
Monduzzi Editore (Italia) 893-898.

- ☐ Arámburo, C., Carranza, M., Reyes, M., Luna, M., Martinez-Coria, H., Berumen, L., Scanes, CG. 2001. Characterization of a bioactive 15 kDA fragment produced by proteolytic cleavage of chicken growth hormone. *Endocrine* 15 : 231-240.
- ☐ Arrenbrecht, S., 1974, Specific binding of growth hormone to thymocytes. *Nature* 252: 255-257.
- ☐ Asada, N., Takahashi, Y., Wada, M., Naito, N., Uchida, H., Ikeda, M., Honjo, M. 2000. GH induced lipolysis in 3T3-L1 adipocytes stably expressing hGHR: analysis on signaling pathway and activity of 20K hGH *Molecular and Cellular Endocrinology* 162 : 121-129.
- ☐ Auernhammer, CJ., Strasburger, CJ., 1995. Effects of growth hormone and insulin-like growth factor I on the immune system. *European Journal of Endocrinology* 133: 635-645
- ☐ Badolato, R., Bond, HM., Valerio, G., Petrella, A., Morrone, G., Waters, MJ., Venuta, S., Tenore, A. 1994. Differential expression of surface membrane growth hormone receptor on human peripheral blood lymphocytes detected by dual fluorochrome flow cytometry. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 79: 984-990.
- ☐ Baldwin, GS., Grego, B., Hearn, MT., Knesel, JA., Morgan, FJ., Simpson, RJ. 1983. Phosphorylation of human growth hormone by the epidermal growth factor-stimulated tyrosine kinase. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 80: 5276-5280.
- ☐ Baumann, G., Stolar, MW., Buchanan, TA. 1986. The metabolic clearance, distribution, and degradation of dimeric and monomeric growth hormone (GH): implications for the pattern of circulating GH forms. *Endocrinology* 119: 1497-1501.

- ☐ Baxter, JB., Blalock, JE., Weigent, DA. 1991. Characterization of immunoreactive insuline-like growth factor-I from leukocytes and its regulation by growth hormone. *Endocrinology* 129: 1727-1734
- ☐ Berczi, I., Nagy, E., de Toledo, SM., Matusik, RJ., Friesen, HG. 1991. Pituitary hormones regulate c-myc and DNA synthesis in lymphoid tissue. *Journal of Immunology* 146: 2201-2206.
- ☐ Berghman, LR., Lens, P., Decuypere, E., Kühn, ER., Vandersande, F. 1987. Glycosilated chicken growth hormone. *General and Comparative Endocrinology* 68:408-414.
- ☐ Boockfor, FR., Hoeffler, JO., Frawley, LS. 1986. Estradiol induces a shift in cultured cells that release prolactin or growth hormone. *The American Journal of Physiology* 250: E 103-105.
- ☐ Bozzola, M., Valtorta, A., Moretta, A., Cisternino, M., Biscaldi, I., Schimpff, RM. 1990. In vitro and In vivo effects of growth hormone on cytotoxic activity. *The Journal of Pediatrics* 117:596-599
- ☐ Calduch-Giner, JA., Sitja-Bobadilla, A., Alvarez-Pellitero, P., Perez-Sanchez J. 1995. Evidence for a direct action of GH on hematopoietic cells of a marine fish, the gilthead sea bram (*Sparus aurata*). *Journal of Endocrinology* 146: 459-467.
- ☐ Carter Su, C., Schwartz, J., Smith, LS. 1996. Molecular mechanism of growth hormone action. *Annual review of physiology* 58: 180-207.
- ☐ Casanova, S., Repellin, AM., Schimpff, RM. 1990. Production of interleukin 1- α and interleukin-2 by mononuclear cells from children with growth delay in relation to the degree of growth hormone deficiency: effects of substitutive treatment. *Hormone research* 34: 209-214
- ☐ Chandratilleke, D., Scanes, CG., Marsh, JA. 1994. Effect of triiodothyronine and in vitro growth hormone on avian interleukin-2. *Developmental and Comparative Immunology* 18: 353-362.

- ☐ Chen, HT., Pan, FK., Chang, WC. 1988. Purification of the duck growth hormone and cloning of the complementary DNA. *Biochimica et Biophysica Acta* 949: 247-251.
- ☐ Chen, HT., Shablott, M., Tang, LY., Chan, KM., Cheng, CM., Yang, BY., Marsh, A. 1994 Structure and evolution of fish growth hormone and insuline-like growth factor genes. In: *Perspectives in Comparative Endocrinology (National Research Council of Canada)* : 352-364.
- ☐ Chen, WY., Chen, NY., Yun, J., Wight, DC., Wang, XZ., Wagner, TE., Kopchick JJ. 1995. Aminoacid residues in the third alpha-helix of growth hormone involved in growth promoting activity. *Molecular Endocrinology* 9: 292-302.
- ☐ Costa, A., Zopetti, G., Benedetto, C., Bertino, E., Marozio, L., Fabris, C., Arisio, R., Giraudi, GF., Testori, O., Ariano, M. et al. Immunolike growth hormone substance in tissues from human embryos/fetuses and adults. *Journal of Endocrinology Investigation*. 16:625-633.
- ☐ Cunningham, BC., Ultsch, M., De Vos, AM., Mulkerrin, MG., Clauser, KP., Wells, JA. 1991. Dimerization of the extracellular domain of the human growth hormone receptor by single hormone molecule. *Science* 254: 821-825.
- ☐ Darras, VM., Rudas, P., Visser, TJ., Hall, TR., Huybrechts, LM., Vanderpooten, A., Berghman, LR., Decupere, E., Kühn, ER. 1993. Endogenous growth hormone controls high plasma levels of 3,3',5-triiodothyronine (T3) in growing chickens by decreasing the T3-degrading type III deiodinase activity. *Domestic Animal Endocrinology* 10: 55-65.
- ☐ Devesa, J., Lima, L., Tresguerres, JAF. 1992. Neuroendocrine control of growth hormone secretion in humans. *Trends in Endocrinology and Metabolism* 3: 175-183.
- ☐ Diaz, MJ., Dominguez, F., Haro, LS., Ling, N., Devesa, J. 1993. A 12-kilodalton N-glycosylated growth hormone-related peptide is present in

human pituitary extracts. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 77 :134-138

- ☐ Fleisher, TA., White, M., Broder, S., Nissley, SP., Baléese, RM., Mulvihill, JJ., Olive, G., Waldmann, TA. 1980 . X-linked hypogammaglobulinemia and isolated growth hormone deficiency. *New England Journal of Medicine* 302 : 1429- 1434
- ☐ Frankenne, F., Closset, J., Gomez, F., Scippo, ML., Smal J., Hennen, G. 1988. The physiology of growth hormones (GHs) in pregnant women and partial characterization of the placental GH variant. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 66: 1171-1180.
- ☐ Fujikawa, T., Kaneko, H., Hibasami, H., Sakaguchi, K., Alam, KS., Tanaka, M., Nakashima, K. 1998. Inverse effects of 20K and 22K human growth hormone on the growth of T-47D human breast cancer cells in culture and in nude mice. *Biochem. Mol. Biol. Int.* 46: 719-724.
- ☐ Gelato, MC. 1993 Growth Hormone-Insuline like Growth factor I and Immune Function . *Trends in Endocrinology and Metabolism* 4 :106-110
- ☐ Gilbert, MS., Payan, DG. 1991. Interactions Between the Nervous and the Immune Systems. *Frontiers in Neuroendocrinology* 4: 299-322
- ☐ Gilbert, MS., Payan, DG. 1991 Interactions between the Nervous and the Immune system. *Acta Paediatrica Supplementum* 423: 69-75.
- ☐ Glick, B. 2000. "Imunophysiology" In Sturkie's Avian Physiology 5th Edition, Whittow Causey G. Academic Press 657-670
- ☐ Goffin, V., Shiverick, KT., Kelly, P., Martial, JA. 1996. Sequence-function relationships within the expanding family of prolactin, growth hormone, placental lactogen and related proteins in mammals, *Endocrine Reviews* 4: 385-409.
- ☐ Goodman, HM., Tai, LR., Ray, J., Cooke, NE., Liebhaber, SA. 1991. Human growth hormone variants produces insuline-like and lipolytic responses in rat adipose tissue. *Endocrinology* 129: 1779-1783.

- ☐ Gould, J., Arámburo, C., Capdevielle, M., Scanes, CG. 1995. Angiogenic activity of anterior pituitary tissue and growth hormone on the chick embryo chorio-allantoic membrane : a novel action of GH. *Life Sciences* 56: 587-594.
- ☐ Haddad, EE., Marshaly, MM. 1990. Effect of thyrotropin-releasing hormone, triiodothyronine and chicken growth hormone on plasma levels of thyroxine, triiodothyronine, growth hormone and growth of lymphoid organs and leukocyte populations. in immature male chickens. *Poultry Science* 69: 1094-1102.
- ☐ Haddad, EE., Marshaly, MM. 1991. Chicken growth hormone, triiodothyronine and thyrotropine releasing hormone modulation of the levels of chicken natural cell mediated cytotoxicity. *Developmental and comparative Endocrinology* 15 : 65-71
- ☐ Haro, LS., Lewis, UJ., Garcia, M., Bustamante, J., Martinez, AO., Ling, NC. 1996. Glycosylated human growth hormone (hGH): a novel 24 kDa hGH-N variant. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 228: 549-556.
- ☐ Hart, IC., Blake, LA., Chadwick, PME., Payne, GA., Simmonds, AD. 1984 The heterogeneity of bovine growth hormone. *The Biochemical Journal* 218: 573-581.
- ☐ Harvey, S. 1995(a). Growth hormone action: neuroendocrine function In: Harvey, S., Scanes, CG., Daughaday, WH., Growth Hormone 1a Ed. Boca Ratón CRC Press :429-436.
- ☐ Harvey, S. 1995(b). Growth hormone action: neural function In: Harvey, S., Scanes, CG., Daughaday, WH., Growth Hormone 1a Ed. Boca Ratón CRC Press :437-450
- ☐ Harvey, S., Johnson, CD., Sanders, EJ. 1995. Extra-pituitary growth hormone in peripheral tissues of early chick embryos. *Journal of Endocrinology* 166: 489-502.

- ☐ Harvey, S., Hull, KL., 1997. Growth hormone, a paracrine growth factor ?. *Endocrine* 7: 267-269.
- ☐ Harvey, S., Johnson, CDM., Sander, EJ. 2000. Extrahypothalamic growth hormone in peripheral tissues of early chick embryos. *Journal of Endocrinology* 169: 489-502.
- ☐ Harvey, S., Johnson, CDM., Sanders, EJ. 2001. Growth hormone in neural tissues of the chick embryo. *Journal of Endocrinology* 169: 487-498.
- ☐ Hennen, G., Frankenne F. 1987. Influence of placental proteins hormones on maternal physiology. *Annales d'Endocrinologie (Paris)* 48: 278-288.
- ☐ Hennen, G., Frankenne, F., Scipo, ML., Igout, A., Closset, J., Pirens, G., Gomez, F. 1988. Placental growth hormone. Significance relative to growth hormone and lactogen hormone. *Reproduction, Nutrition, Development* 28: 1699-1706.
- ☐ Houston, B., Goddard, C. 1988. Molecular isoforms of growth hormone in the chicken pituitary gland, *Journal of Endocrinology* 116:35-41.
- ☐ Hull, KL., Thiagarajah, A., Harvey S. 1996. Cellular localization of growth hormone receptors/binding proteins. *Cell and Tissue Research*. 286: 69-80.
- ☐ Hull, KL., Janssens, WCJ., Harvey S. 1997(a) Growth hormone: local actions in sites of synthesis, *Perspectives in Avian Endocrinology, Journal of Endocrinology Ltd. Bristol*. Ed. S.Harvey and R. Jephches: 375-386.
- ☐ Hull, KL., Harvey, S., 1997(b). Growth hormone: an immune regulator in vertebrates. In: *Proceedings of the XIIIth International Congress of comparative Endocrinology, Yokohama, Japon* Monduzzi Editore (Italia) 893-898.
- ☐ Hull, KL., Harvey, S. 2000. Growth hormone: a reproductive endocrine paracrine regulator? *Reviews of Reproduction* 5: 175-182.
- ☐ Kawachi, H., Maruyama, S., Yasuda, A., Yamaguchi, K., Shirabata, K., Kubota, J., Hirano, T. 1986. Isolation and characterization of chum salmon growth hormone. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 244: 542-552

- ☐ Kelley, KW. 1990. The role of growth hormone in modulation of the immune response. *Annals of the New York Academy of Science* 594: 95-103.
- ☐ Kiess, W., Butenandt, O. 1985. Specific growth hormone receptors on human peripheral mononuclear cells: reexpression, identification and characterization. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 60: 740-746.
- ☐ Kimata, H., Yoshida, A. 1994. Differential effect of growth hormone and insulin-like growth factor-I, insulin-like growth factor-II, and insulin on Ig production and growth in human plasma cells. *Blood* 83: 1596-1574.
- ☐ Kostyo, JL., Skottner, A., Brostedt, P., Roos, P., Cameron, CM., Forsman, A., Fryklund, L., Adamafio, NA., Skoog, B. 1987. Biological characterization of purified native 20kDa human growth hormone. *Biochimica et Biophysica Acta* 925: 314-324.
- ☐ Kover, K., Moore, WV. 1984. Comparison of hGH binding to isolated rat liver macrophages and hepatocytes. *Hormone and Metabolic Research* 16: 193-197.
- ☐ Laemmli, UK. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227: 680-685.
- ☐ Lantinga-Van Leeuwen, IS., Oudshoorn, M., Mol, JA. 1999. Canine mammary growth hormone gene transcription initiates at the pituitary-specific site in the absence of Pit-1. *Molecular and Cellular Endocrinology* 150: 121-128.
- ☐ Lecomte, CM., Renard, A., Martial, JA. 1987. A new natural hGH variant--17.5 kd--produced by alternative splicing. An additional consensus sequence which might play a role in branchpoint selection. *Nucleic Acids Research* 15: 6331-6348
- ☐ Lesniak, MA., Gorden, P., Roth, J., Gavin, JR 3rd. 1974. Binding of 125I-human growth hormone to specific receptors in human cultured

- lymphocytes. Characterization of the interaction and a sensitive radioreceptor assay. *Journal of Biological Chemistry* 249: 1661-1667
- ☐ Lewis, UJ., Dunn, JT., Bonewald, LF., Seavey, BK., Vanderlaan, WP. 1978. A naturally occurring structural variant of human growth hormone. *The Journal of Biological Chemistry* 253: 2679-2687.
- ☐ Lewis, UJ. 1984. Variants of growth hormone and prolactin and their posttranslational modifications. *Annual Review of Physiology* 46: 33-42.
- ☐ Lewis, UJ. 1992. Growth hormone: what is it what does it do? *Trends in Endocrinology and Metabolism* 3: 117-121.
- ☐ Lewis, UJ., Sinha, YN., Lewis, GP. 2000. Structure and properties of members of the hGH family: a review. *Endocrine Journal*. 47 S 1-8.
- ☐ Liebhaber, SA., Urbanek, M., Ray, J., Tuan, RS., Cooke, EN. 1989. Characterization and histologic localization of human growth hormone variant gene expression in the placenta. *The Journal of Clinical Investigation* 83: 1985-1991.
- ☐ Liu, J., Zheng, D., Deng, J., Xiao, S., Liu, S., Shi, Y. 1997. Immunoreactive growth hormone in human peripheral T lymphocytes: encoding sequence of cDNA identical to that of the pituitary human growth hormone. *Chin Med J* 110: 362-365
- ☐ Lombardi, G., Colao, A., Ferone, D., Marzullo, P., Orio, F., Longobardi, S., Merola, B. 1997. Effect of the growth hormone on cardiac function. *Hormone Research* 48 suppl 4: 38-42.
- ☐ Malamed, S., Gibney, JA., Cain, LD., Perez, MF., Scanes, CG. 1993. Immunocytochemical studies of chicken somatotrophs and somatotroph granules before and after hatching. *Cell and Tissue Research*. 272: 369-374.
- ☐ Marsh, JA. 1992. Neuroendocrine-Immune Interactions in the avian species - A Review-. *Poultry Science* 4 : 129-167
- ☐ Marsh, JA., Johnson, BE., Lilletoi, HS., Scanes, CG. 1992. Effect of thyroxine and chicken growth hormone on immune function in autoimmune

thyroiditis (obese) strain chickens. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine* 1992, 115-122.

- ☐ Martens, GJ., Groenen, PJ., Braks, AA., Baussemakers, MJ. 1989. Expression of two growth hormone genes in the *Xenopus* pituitary gland. *Nucleic Acids Research* 17: 3974 -
- ☐ Masuda, N., Watahiki, M., Tanaka, M., Yamayawa, M., Shimizu, K., Nagai, J., Nakashima, K. 1988. Molecular cloning of cDNA encoding 20 kDa variant human growth hormone and the alternative splicing mechanism *Biochimica et Biophysica Acta* 949: 125-131.
- ☐ McLeod, JN., Worsley, I., Ray, J., Friesen, HG., Liebhaber, SA., Cooke, EN. 1991. Human growth hormone-variant is a biologically active somatogen and lactogen. *Endocrinology* 128: 1298-1302.
- ☐ Mercola, KE., Cline, MJ., Golde, DW. 1981. Growth hormone stimulation of normal and leukemic human T lymphocyte proliferation *in vitro*. *Blood* 58: 337-340.
- ☐ Mocchegiani, E., Fabris, N. 1990. Growth hormone influence on thymic endocrine activity in humans *International Journal of Neuroscience* 51: 253-254
- ☐ Montiel, JL., Berghman, LR., Arámburo, C. 1992. Identification of Growth hormone molecular variants in chicken serum. *General and Comparative Endocrinology* 88: 298-306.
- ☐ Morimee, TJ., Grant, MB., Broder, CM., Cavalli-Sforza, LL. 1989. Insulin-like growth factor secretion by human B- lymphocytes : A comparisson of cells from normal and pygmy subjects. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 69: 978-984.
- ☐ Murphy, WJ., Durum, SK., Longo, DL. 1992. Human growth hormone promotes engraftment of murine or human T cells in severe combined immunodeficient mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 89: 4481-4485.

- ☐ Nagy, E., Berczi, I., Wren, GE., Asa, SL., Kovacs, K. 1983. Immunomodulation by bromocriptine. *Immunopharmacology* 6: 231-243.
- ☐ Nickel, BE., Kardami, E., Cattini, PA. 1990. The human placental growth hormone variant is mitogenic for rat lymphoma Nb2 cells. *Endocrinology* 126: 971-976.
- ☐ Palmethofer, A., Zechner, D., Luger, TA., Barta, A. 1995. Splicing variants of the human growth hormone mRNA: detection in pituitary, mononuclear cells and dermal fibroblast. *Molecular and Cellular Endocrinology* 113: 225-234.
- ☐ Ramesh, R., Kuenzel, WJ., Buntin, JD., Proudman, JA. 2000. Identification of growth hormone and prolactin-containing neurons within the avian brain. *Cell and Tissue Research* 299: 371-383.
- ☐ Rapaport, R., Oleske, J., Ahdieh, H., Solomon, S., Delfaus, C., Denny, T. 1986. Suppression of immune function in growth hormone deficient children during treatment with human growth hormone, *The Journal of Pediatrics* 109: 434-439.
- ☐ Rapaport, R., Oleske, J., Ahdieh, H., Skuzka, K., Holland, BK., Passannante, MR., Denny, T. 1987. Effects of human growth hormone on immune functions: in vitro studies on cells of normal and growth hormone-deficient children. *Life Sciences* 41:2319-2324.
- ☐ Rapaport, R., Sills, IN., Green, L., Barret, P., Labus, J., Souza, KA., Chartoffa, A., Goode, L., Stene, M., Petersen, BH. 1995. Detection of human growth hormone receptors on IM-9 cells and peripheral blood mononuclear subsets by flow cytometry: correlation with growth hormone binding protein levels. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 80: 2612-2619.
- ☐ Rapaport, RG., Bozzola, M. 1997. Growth Hormone, insuline-like growth factor and the immune system. *Acta Paediatrica Supplementum* 423: 69-75.

- ☐ Ray, J., Jones, BK., Liebhaber, SA., Cooke, NE. 1989. Glycosilated human growth hormone variant. *Endocrinology* 125: 566-568.
- ☐ Ray, J., Okamura, H., Kelly, PA., Cooke, NE., Liebhaber, SA. 1990. Human growth hormone-variant demonstrates a receptor binding profile distinct from that of normal pituitary growth hormone. *The Journal of Biological Chemistry* 265: 7939-7944.
- ☐ Recher, S., Raccurt, M., Lambert, A., Lobie, PE., Mertani, HC., Morel, G. 2001. Prenatal and adult growth hormone gene expression in rat lymphoid organs. *Journal of Histochemistry and Cytochemistry*. 49: 347-54.
- ☐ Rechler, MM., Nissley, SP. 1990. Insulin like growth factors In: Peptide Growth factors and their receptors. (Eds.) Sporn, MB. and Roberts, AB. Heidelberg, Springer-Verlag 263-367.
- ☐ Rechler, S., Raccurt, M., Lambert, A., Lobie, PE., Mertani, HC., Morel, G. 2001. Prenatal and adult growth hormone gene expression in rat lymphoid organs. *Journal of Histochemistry and Cytochemistry*. 49: 347-54.
- ☐ Render, CL., Hull, KL., Harvey, S. 1995(a). Neural expression of the pituitary GH gene. *Journal of Endocrinology* 147: 413-422.
- ☐ Render, CL. 1995(b). Expression of the Growth hormone gene in immune tissues. *Endocrine* 3: 129-135.
- ☐ Scanes, CG., Duyka, DR., Lauterio, TJ., Bouen, SJ., Huybrechts, LM., Bacon, WL., King, DB. 1986. Effect of chicken growth hormone, triiodothyronine and hypophysectomy in growing domestic fowl. *Growth* 50: 12-31.
- ☐ Scanes, CG., Daughaday, WH. 1995(a). Growth hormone action: Growth. In: Growth Hormone 1a Ed. (Eds.) Harvey, S., Scanes, CG., Daughaday, WH. USA. Boca Ratón CRC Press.: 351-371.
- ☐ Scanes, CG. 1995(b). Growth hormone action: lipid metabolism. In: Growth Hormone 1a Ed. (Eds.) Harvey, S., Scanes, CG., Daughaday, WH. USA. Boca Ratón CRC Press.: 379-387.

- ☐ Scanes, CG. 1995(c). Growth hormone action: Carbohydrate Metabolism. In: Growth Hormone 1a Ed. (Eds.) Harvey, S., Scanes, CG., Daughaday, WH. USA. Boca Ratón CRC Press.: 371-379.
- ☐ Scanes, CG., 1995(d). Growth hormone action: Immune function. In: Growth Hormone 1a Ed. (Eds.) Harvey, S., Scanes, CG., Daughaday, WH. USA. Boca Ratón CRC Press.: 407-413.
- ☐ Scanes, CG., Harvey, S. 1995(e). Growth hormone action: Protein Metabolism. In: Growth Hormone 1a Ed. (Eds.) Harvey, S., Scanes, CG., Daughaday, WH. USA. Boca Ratón CRC Press.: 389-393.
- ☐ Scanes, CG. 1995(f). Growth hormone action: Reproductive Function. In: Growth Hormone 1a Ed. (Eds.) Harvey, S., Scanes, CG., Daughaday, WH. USA. Boca Ratón CRC Press.: 393-407.
- ☐ Scanes, CG. 1995(g). Growth hormone action: Osmoregulation. In: Growth Hormone 1a Ed. (Eds.) Harvey, S., Scanes, CG., Daughaday, WH. USA. Boca Ratón CRC Press.: 415-423.
- ☐ Scanes, CG. 1995(h). Growth hormone action: Endocrine Function. In: Growth Hormone 1a Ed. (Eds.) Harvey, S., Scanes, CG., Daughaday, WH. USA. Boca Ratón CRC Press.: 423-429.
- ☐ Sinha, YN., Gilligan, TA. 1984. A "20k" form of growth hormone in the murine pituitary gland. *Proc Soc Exp Biol Med* 177: 465-474.
- ☐ Sinha, YN., Ott, K., Vanderlaan, WP. 1987. Detection of multiple PRL- and GH-like proteins in human pituitary by Western blot analysis. *Am J Med Sci*. 294: 15-25
- ☐ Sinha, YN., Jacobsen, BP. 1987. Glycosylated growth hormone: detection in murine pituitary gland and evidence of physiological fluctuations. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 145: 1368-1375.
- ☐ Sinha, YN., Klemcke, HG., Maurer, RR., Jacobsen, BP. 1990. Changes in the glycosylated and nonglycosylated forms of prolactin and growth hormone in lean and obese pigs during pregnancy. *Endocrinology* 127: 410-418.

- ☐ Sipponen, P., Simila, S., Callan, Y., Autere, T., Herva, R. 1978. Familial syndrome with panhypopituitarism, hypoplasia of the hypophysis and poorly developed sella turcica. *Archives of Disease in Childhood* 53: 664-667.
- ☐ Skibeli, V., Anderson, O., Gautvik, KM. 1990. Purification and characterization of Atlantic salmon growth hormone and evidence for charge heterogeneity. *General and Comparative Endocrinology* 80: 333-344.
- ☐ Smith, PE. 1930. The effect of hypophysectomy upon the involution of the thymus in the rat. *The Anatomical Record* 47: 119-129.
- ☐ Tai, PK., Liao, JF., Chen, EH., Dietz, J., Schwartz, J., Carter-Su, C. 1990. Differential regulation of two glucose transporters by chronic growth hormone treatment of cultured 3T3-F442A adipose cells. *The Journal of Biological Chemistry* 265: 21828-21834.
- ☐ Toivanen, P., Toivanen, A., Good, R. 1972. Ontogeny of bursal function in chicken. III. Immunocompetent cell for humoral immunity. *The Journal of Experimental Medicine* 136: 816-831.
- ☐ Toivanen, P., Toivanen, A., Good, R. 1972. Ontogeny of bursal function in chicken. I. Embryonic Stem Cell for Humoral Immunity. *The Journal of Immunology* 109 : 1058-1070.
- ☐ Toivanen, P., Toivanen, A., Linna, J., Good, R. 1972. Ontogeny of bursal function in chicken. II. Postembryonic stem cell for humoral immunity. *The Journal of Immunology* 109: 1071-1080.
- ☐ Towbin, H., Staehelin, T., Gordon, J. 1979. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: Procedure and some applications. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 76: 4350-4354.
- ☐ Uchida, H. Banba, S., Wada, M., Matsumoto, K., Ikeda, M., Naito, N., Tanaka, E., Honjo, M. 1999. Analysis of binding properties between 20 kDa human growth hormone (hGH) and hGH receptor (hGHR): the binding

- affinity for hGHR extracellular domain and mode of receptor dimerization. *Journal of Molecular Endocrinology*. 3: 347-353.
- ☐ Untergasser, G., Herman, M., Rumpold, H., Berger, P. 1998. Complex Alternative splicing of the GH-V gene in the human testis. *European Journal of Endocrinology* 139: 424-427
- ☐ Villanua, MA., Szary, A., Bartke, A., Esquifino, AI. 1992. Changes in lymphoid organs of Ames dwarf mice after treatment with growth hormone, prolactin, or ectopic pituitary transplants. *J Endocrinol Invest*. 15: 587- 595.
- ☐ Wada, M., Ikeda, M., Takahashi, Y., Asada, N., Chang, KT., Takahashi, M., Honjo, M. 1997. The full agonistic effect of recombinant 20kDa human growth hormone (hGH) on CHO cells stably transfected with hGH receptor cDNA. *Molecular and Cellular Endocrinology* 133: 99-107.
- ☐ Wada, M., Uchida, H., Ikeda, M., Tsunekawa, B., Naito, N., Banba, S., Tanaka, E., Hashimoto, Y., Honjo, M. 1998. The 20-kilodalton (kDa) human growth hormone (hGH) differs from the 22-kDa hGH in the complex formation with cell surface hGH receptor and hGH-binding protein circulating in human plasma. *Molecular Endocrinology* 12: 146-156.
- ☐ Weigent, DA., Baxter, JB., Wear, WE., Smith, LR., Bost, KL., Blalock, JE. 1988. Production of immunoreactive growth hormone by mononuclear leukocytes. *The FASEB journal* 2: 2812-2818.
- ☐ Weigent, DA., Blalock, JE. 1991. The production of growth hormone by subpopulations of rat mononuclear leukocytes. *Cellular Immunology*. 135: 55-65.
- ☐ Wu, H., Devi, R., Malarkey, WB. 1996. Localization of growth hormone messenger ribonucleic acid in the human immune system a clinical research center study . *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 81: 1278-1282.

- ☐ Yamaguchi, K., Yasuda, A., Kishida, M., Hirano, T., Sano, H., Kawauchi, H. 1987. Primary structure of eel (*Anguilla japonica*) growth hormone. *General and Comparative Endocrinology* 66: 447-453.
- ☐ Yasuda, A., Yamaguchi, K., Papkoff, H., Hirata, T., Kawauchi, H. 1989. The complete amino acid sequence of growth hormone from the sea turtle (*Chelonia Mydas*). *General and Comparative Endocrinology* 73: 242-251.
- ☐ Yasuda, A., Yamaguchi, K., Noso, T., Papkoff, H., Polenov, AL., Nicoll, CS., Kawauchi, H. 1992. The complete amino acid sequence of growth hormone from sturgeon (*Acipenser guldenstadti*) growth hormone. *Biochimica et Biophysica Acta* 1120: 297-304.
- ☐ Yoshida, A., Ishioka, C., Kimata, H. 1992. Recombinant human growth hormone stimulates B cell immunoglobulin synthesis and proliferation in serum free medium. *Acta Endocrinologica* 126: 524-529.
- ☐ Yoshizato, H., Fujikawa, T., Soya, H., Tanaka, M., Nakashima, K. 1998. The growth hormone (GH) gene is expressed in the lateral hypothalamus: enhancement by GH- releasing hormone and repression by restraint stress. *Endocrinology* 139: 2545-2451.
- ☐ Yoshizato, H., Tanaka, M., Fujikawa, T., Higashimoto, Y., Shimizu, A., Nakashima, K. 2000. 20 kDa human growth hormone (20K hGH) stimulates insulin-like growth factor-I (IGF-I) gene expression at lower concentrations than 22K hGH in hGH receptor-expressing Ba/F3 cells. *Endocrine Journal* 47 Suppl: S37-40.

3 Anexos

Anexo 1

Cuantificación de Proteínas

El ensayo de cuantificación de Proteínas de *Bio-Rad* basado en el método de Bradford (1976), es una metodología simple para determinar la concentración de proteínas en solución. La cuantificación se basa en el cambio diferencial de color de un colorante en respuesta a la cantidad de proteínas presentes en la solución, posterior medición a 595 nm en un espectrofotómetro.

Procedimiento

Microensayo

- Preparar entre 3 y 5 diluciones de la proteína patrón. Intervalo lineal para albúmina sérica bovina (BSA) 1.2 -10 µg/ml. Intervalo lineal para IgG 1.2-25 µg/ml.
- Colocar 800 µl de la solución de patrón o muestra en tubos de vidrio limpios y secos. Normalmente se realizan duplicados o triplicados de cada muestra o dilución del patrón.
- Adicionar a cada tubo 200 µl del reactivo de color y agitar bien cada tubo.
- Incubar a temperatura ambiente cada tubo por al menos 5 minutos y máximo una hora. La absorbencia irá incrementándose con el tiempo.
- Medir la absorbencia a 595 nm.

Preparación de la solución stock para la curva :

Solución requerida: 0.1µg/µl

colocar 93µl de la solución patrón de BSA (1.29µg/µl) mas 1197µl de H₂O DD.

Tubo	Concentración de BSA (µg/µl)	Volumen de la solución de BSA (µl)	H ₂ O DD (µl)	Reactivo de color
1	-	-	800	200
2	1	10	790	200
3	5	50	750	200
4	10	100	700	200
5	15	150	650	200
6	20	200	600	200

Incubar 5 minutos a temperatura ambiente.

Calcular la regresión lineal o realizar la curva para interpolar los valores de absorbencia de las muestras no conocidas en la curva.

Anexo 2

Preparación de los extractos de Bolsa de Fabricio

Se prepararon extractos a partir del tejido colectado, utilizando inhibidores de proteasas (Complete, Roche). Esta mezcla inhibe un amplio espectro de serin y cistein-proteasas.

Preparación de soluciones

Mezcla de inhibidores de proteasas

Se utiliza H₂O ajustada a pH 9

De acuerdo a las instrucciones del fabricante disolver 1 pastilla de inhibidores por cada 10ml de H₂O.

Se mantiene en hielo.

PMSF (para-metil -sulfonil-fluoruro)

Este es otro inhibidor de proteasas que se adiciona al homogenado, se prepara utilizando una concentración de 18.12mg/ml.

Se pesa la cantidad deseada de PMSF (utilizando guantes y tapabocas ya que es muy tóxico) y se disuelve en acetona.

Se mantiene en hielo.

Procedimiento

Descongelar el tejido (se encuentra almacenado a -70°C), colocándolo en hielo, (procurar que no pase demasiado tiempo antes de proseguir) pesarlo y de acuerdo al peso del tejido a utilizar añadir la cantidad adecuada de solución inhibidora de proteasas y de PMSF.

Realizar esto lo más rápido posible.

Proporción utilizada

5ml de solución inhibidora por gramo de tejido

10µl por cada ml de homogenado.

Homogeneizar utilizando un homogeneizador de aspas (Polytron) en el caso de cantidades grandes de tejido y homogenado, si la cantidad es más pequeña puede utilizarse un homogeneizador pequeño de teflón o de vidrio.

Realizar esto en frío y lo más rápido posible.

Una vez homogeneizado, se deja agitando en hielo durante dos horas (pueden utilizarse barras magnéticas pequeñas).

Concluido este tiempo hay que centrifugar el homogenado durante 15 minutos a 12,500rpm. (12077 g)

Colectar el sobrenadante y cuantificar la cantidad de proteínas totales presentes (Método de Bradford) y preparar alicuotas con la cantidad requerida para las muestras de cada ensayo.

Anexo 3

ELECTROFORESIS

SDS-PAGE

Soluciones

Solución A Acrilamida 30 %

30% Acrilamida ; 0.8% bis acrilamida

30 g de Acrilamida

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

para 100 ml de Agua Desionizada

Mezclar con agitador magnético, filtrar con papel Whatman No. 1 y conservar a 4°C cubierta con papel aluminio o en recipiente ámbar porque es sensible a la luz.

Nota: Manejarla con guantes, compuesto muy tóxico.

Solución B Amortiguador para el gel Separador (inferior)

1.5 M Tris -HCl pH 8.8

18.15 g de Tris Base

Mezclar con 50 ml de Agua desionizada , agregar HCl hasta que el pH sea de 8.8

aforar a 100 ml y conservar a 4°C

Solución C Amortiguador del gel concentrador (superior)

0.5 M Tris-HCl pH 6.8

6g de Tris Base

Mezclar con 50 ml de Agua desionizada , agregar HCl hasta que el pH sea de 6.8

aforar a 100 ml y conservar a 4°C.

Solución D SDS 10%

5 gr de SDS

Aforar a 50 ml y conservar a 4°C

Solución F Amortiguador del Electrodo (Buffer de corrida) 5X pH 8.3

Tris base 9g

Glicina 43.2g

SDS 3g

Ajustar a 600 ml mezclar y guardar a 4°.

Solución E Amortiguador de la muestra

Tris -HCl 0.5 M, 10% SDS pH 6.8

H₂O 4 ml

Sln. C 1.0 ml

Sln D 1.6 ml

Glicerol 0.8 M

Azul de Bromofenol 0.2 ml (0.5%)

2 β mercaptoetanol 0.4 ml (solo para condiciones reductoras)

para condiciones no reductoras se colocan inicialmente 4.4 ml de H₂O.

PSA Persulfato de amonio 10 %

100 mg de Persulfato de Amonio en 1 ml de H₂O

Preparar fresco.

Solución para teñir geles

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

Preparación de los geles

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

Limpiar los vidrios con una gasa impregnada con solución amoniaca al 10% o con alcohol con el objeto de quitar la grasa ya que esta no permite polimerizar la acrilamida.

Atemperizar las soluciones sumergiendo los recipientes en un baño de agua.

Colocar el ensamblador en la cuneta de la torre con las pestañas hacia arriba y los tornillos hacia atrás, colocar los vidrios en el ensamblador, (el vidrio más pequeño va hacia el frente) empujar con la placa de plástico los separadores hasta que se encuentren en los extremos del ensamblador totalmente verticales. Con el acrílico transparente presionar el ensamblador y apretar los tornillos superiores. Verificar la alineación y apretar tornillos inferiores.

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

Pesar el persulfato de amonio (solución preparada fresca cada vez).

Preparar la solución del gel separador según la concentración requerida (ver tabla), antes de adicionar el SDS y los catalizadores es necesario desgasificar durante 5 minutos. Una vez desgasificado añadir los catalizadores.

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

Llenar el espacio entre los vidrios hasta 2 cm antes del borde del vidrio más pequeño. Con una jeringa Hamilton cubrir con agua la interfase para evitar la formación de meniscos (también se puede utilizar alcohol isopropílico). Permitir que polimerice (25 min. Aprox).

Preparar la solución del gel concentrador (4%) con las mismas indicaciones, colocar la solución sobre el gel separador ya formado (quitar el agua o permitir que el alcohol isopropílico se evapore) casi hasta el borde. Introducir el peine del grosor y número de pozos deseado (tiene que ser del mismo grosor que los separadores). Aplicar más solución hasta cubrir los bordes.

ELECTROFORESIS

Preparar las muestras a analizar en volúmenes finales adecuados al tipo de peine utilizado (el tamaño del pozo determina la cantidad de muestra que se va a colocar) Para peines de 15 pozos y un mm de grosor se trabaja con volúmenes de 10 μ l de muestra y se adicionan otros 10 μ l de amortiguador de muestra (que contiene glicerol para que por efecto de la densidad se evite la difusión hacia el amortiguador de corrida).

Hervir las muestras por 5 minutos

- Montar la cámara con los geles asegurándose de que el hule selle bien para evitar fugas.
- Retirar el gel no polimerizado, es posible lavar los pozos con agua y después secarla (puede ser con tiras de papel filtro).
- Colocar el amortiguador de corrida en el tanque y colocar la cámara en su interior. Llenar el centro de la cámara con amortiguador.
- Tapar el tanque con la tapa plástica que tiene los electrodos y conectarlos a la fuente de poder.
- Encender la fuente de poder con un voltaje constante : 100v hasta que las muestras pasen del gel concentrador al gel resolverdor (aproximadamente 20 minutos) y después a 150 V hasta el final del gel (evitar que se salga el frente).
- Desconectar la fuente y sacar la cámara; retirar los ensambladores de la base y despegar los vidrios utilizando los separadores (haciendo palanca), despegar el gel del vidrio y colocarlo en un recipiente que tiene solución para teñir geles.
- Teñir al menos 2 horas (hasta que el colorante se difunda por todo el gel , desteñir con Ácido acético hasta que el fondo del gel se aprecie claro.
- Si no se desea teñir el gel, puede prepararse para la transferencia.

Anexo 4

Inmunolectrotransferencia de Proteínas (Western Blot)

Esta basado en el uso de anticuerpos marcados como herramientas de detección y cuantificación de alguna molécula en particular, además de identificar proteínas específicas después de que estas han sido separadas por electroforesis en geles de poliacrilamida

Se realiza la transferencia de la proteína hacia una matriz (nitrocelulosa o PVDF) utilizando un campo eléctrico (Towbin 1979).

Se revela utilizando un sustrato que produce quimioluminiscencia (reacción de formación de ésteres de acridina)

Soluciones utilizadas

Buffer de Transferencia, TRIS 25 mM, Glicina 192mM, Metanol 20%

PH 8.3

TRIS 6.06g

Glicina 28.8g

Metanol 400ml

Aforar a 2 litros con Agua desionizada.

Procedimiento

- Realizar una electroforesis (SDS-PAGE), después equilibrar el gel durante 15 minutos.
Humedecer la membrana que va a ser utilizada como matriz en buffer de transferencia (aproximadamente el mismo tiempo que se equilibra el gel)
 - Nitrocelulosa 0.45µm de poro *Bio-Rad* la membrana se corta en rectángulos de 7cm x 9 cm para quimioluminiscencia.
 - PVDF se coloca primero en metanol , luego agua y por último el amortiguador.
 - Se prepara un "sandwich" dentro de un recipiente o charola con amortiguador de transferencia utilizando un cassette plástico; (el lado negro del cassette se coloca abajo y el transparente arriba) utilizando guantes en todo momento, se coloca sobre el lado negro del cassette una fibra (scotch brite) bien impregnada de la solución de transferencia .
Sobre la fibra se coloca una hoja de papel filtro igualmente impregnada con la solución de transferencia.
- 3) Sobre el papel filtro se coloca el gel procurando que no queden burbujas entre el papel y el gel, sobre el gel se coloca la membrana de PVDF o Nitrocelulosa, evitando también la formación de burbujas, luego un papel filtro prehumedecido y por último otra fibra (scotch brite) humedecida; cerrar entonces el cassette.

- Se coloca entonces el cassette dentro de la cámara orientando los electrodos de modo que el gel quede orientado hacia el lado negativo y la membrana hacia el lado positivo (que coincidan el lado negro del cassette con el lado negro de la cámara). Agregar el buffer suficiente para cubrir los electrodos.
- 5) Colocar dentro de la cámara un agitador magnético (para mantener en agitación durante la corrida) y un refrigerante (hielo) para evitar que se caliente el sistema.
 - 6) Tapar la cámara y conectarla a la fuente de poder. Correr a 200 mA durante una hora.

Transcurrido el tiempo se apaga la fuente de poder se desconecta la cámara y se saca el sandwich con cuidado, al desmontarlo se utilizan guantes para no manchar la membrana.

Anexo 5

Quimioluminiscencia

Soluciones Utilizadas

Amortiguador Salino de Tris (TBS) 5X

Tris 100 mM, NaCl 2.5M, pH 7.5

Tris 121.14 g

NaCl 58.44 g

Adicionar aproximadamente. 900ml de Agua desionizada estéril, mezclar ajustar el pH y aforar a un litro.

Almacenar a 4 °C

Solución Bloqueadora

Leche Descremada en TBS al 5%

Leche Descremada 5g

TBS 100ml

Mezclar hasta que se disuelva

Solución de Lavado

TTBS pH 7.5

Tris 20mM

NaCl 500nM

Tween 20 0.05%

Adicionar a un litro de TBS 1X 500 µl de Tween 20

Solución de Primer Anticuerpo

Amortiguador: TTBS leche descremada al 1%

Leche descremada 1g

TTBS 100ml

Disolver el anticuerpo primario (con un título adecuado) a una dilución de 1:10,000.

10 μ l en 100ml de TTBS leche 1%.

Solución de Segundo Anticuerpo anticuerpo conjugado Bio Rad

(goat anti-rabbit IgG horseradish peroxidase)

Dilución 1:3,000

Diluir 20 μ l del anticuerpo conjugado en 60 ml de TTBS con leche al 1%

Sustrato

El sustrato utilizado es ECL (ECL Western blotting detection reagents Amersham Pharmacia Biotech) y se prepara de acuerdo a las instrucciones del kit mezclando partes iguales de las dos soluciones (según instrucciones del proveedor).

La reacción está basada en la oxidación del compuesto PS-3 Lumigen para generar ésteres de acridina (intermediarios de la reacción) que producen luminiscencia.

Procedimiento

Se colocan las membranas del Western blot en un recipiente con amortiguador TBS pH 7.5 para lavarla durante 10 minutos.

Bloquear la membrana con 30 ml de leche descremada al 5% en TBS pH 7.5% durante 2 horas.

Después del bloqueo lavar las membranas con TTBS durante 10 minutos, repetir este lavado dos veces más.

Incubar con el primer anticuerpo α -cGH en TTBS con leche al 1% durante toda la noche con agitación constante (la dilución del anticuerpo es 1:100,000).

Lavar las membranas con aproximadamente 30 ml de TTBS durante 10 minutos en 3 ocasiones.

Incubar con el segundo anticuerpo α -IgG-HRP (peroxidasa) dilución 1:3000 en TTBS leche al 1% durante dos horas.

Lavar las membranas con TTBS pH 7.5 durante 15 minutos en 4 ocasiones, posteriormente lavar con TBS pH 7.5 (para eliminar el Tween) por 15 minutos en 3 ocasiones.

Para revelar se preparan aproximadamente 2 ml (por cada membrana) de la mezcla de sustrato (de acuerdo con las instrucciones del proveedor).

Se incuba durante 5 minutos sin agitación. Se escurren y se colocan en una bolsa de plástico sacando las burbujas.

Autoradiografía

En un cassette se coloca la bolsa con las membranas y sobre ellas una película Kodak BiomaX light film (Eastman Kodak Company) Y se expone por 15 segundos o un minuto.

Tomar la película con unas pinzas y sumergirla en la solución de revelado por un minuto, lavarla con agua por un minuto, sumergirla en la solución fijadora por un minuto, finalmente se lava una vez más con agua por un minuto. Realizar este proceso en un cuarto oscuro y frío.

Anexo 6

Determinación Inmunoenzimática de cGH (ELISA)

Soluciones

Amortiguador Salino de Fosfato de Sodio (PBS) PBS 0.01M, NaCl 0.15M, pH 7.8

Solución A. PBS 0.5M pH 7.8

Fosfato de Sodio monobásico NaH_2PO_4 (PM 138) 50 ml..... 3.45 g en 50 ml
Fosfato de Sodio dibásico Na_2HPO_4 (PM 142) 0.5M 200ml...14.2 g en 200 ml
Se disuelve el fosfato dibásico en aproximadamente 100 ml con DDH_2O y se ajusta a pH 7.8 con la solución de fosfato monobásico, después se afora a 200 ml.

Solución PBS 0.01M, NaCl 0.15 M, pH 7.8

Se toman 20 ml de la solución A, se agregan 8.76 g de NaCl y se afora a 1000ml con DDH_2O .

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

A un litro de la solución de PBS se le añaden 500 μl de Tween 20 y se mezcla bien con agitación.

Solución Bloqueadora TPBS y leche descremada al 3%

Se solubiliza 3 g de leche descremada en 100 ml de TPBS

Solución para diluir anticuerpos TPBS y leche descremada al 1%

Se solubiliza 1 g de leche descremada en 100 ml de TPBS, en esta solución se coloca la cantidad de anticuerpo necesaria de acuerdo a la dilución deseada.

Amortiguador de Carbonatos 0.1M, pH 10.3

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

Bicarbonato de sodio (PM 64.01) 0.035 M 100ml..... .224 g en 100 ml.

Al preparar la solución el pH resulta cercano a 10.3 (No ajustar).

Solución patrón de rcGH

De acuerdo con la cantidad de Hormona presenta en cada alícuota, se calcula la cantidad de diluyente a utilizar, considerando en este caso en particular que el 80% del polvo en cada alícuota es hormona.

El diluyente utilizado es DDH_2O ajustada para mantener al menos por un tiempo pH de 9 (en el cual la hormona es más soluble).

La concentración final de esta solución es de $1\mu\text{g}/\mu\text{l}$.

Solución para forrar la placa

Se prepara una solución utilizando solución patrón de rcGH y solución de carbonatos, se utilizan 1.2µgrcGH/10 ml de solución de carbonatos por cada placa que se vaya a forrar, si la solución patrón tiene la concentración deseada se colocan 1.2 µl de esta en 10 ml de solución de carbonatos.

La cantidad de hormona presente en cada pozo es de 12ng de rcGH.

Primer anticuerpo [1:100,000]

Anticuerpo policlonal generado en conejo , contra la cGH. El anticuerpo se encuentra diluido 1:10 en PBS y almacenado a -70°C, y para cada ensayo se descongela una alícuota nueva.

Preparación: se colocan 4 µl de la dilución de anticuerpo en 20 ml de solución para preparar anticuerpo (TPBS leche 1%).

Segundo Anticuerpo [1:3,000]

Anticuerpo anti-IgG de conejo generado en cabra y acoplado con peroxidasa de rábano (GAR-HRP, Bio Rad).

Se colocan 6.6 µl de anticuerpo en solución para preparar anticuerpo (TPBS leche 1%).

Procedimiento

Las soluciones de la hormona se mantienen en hielo (4°C) todo el tiempo.

Forrado de la placa

Se utiliza una placa nueva de inmunoanálisis (DYNATECH-IMMUNLON de 96 pozos), en cada uno de los pozos se agregan 100 µl de la solución de forrado (rcGH) , para esto se utiliza una pipeta de 8 canales (Pipet -Lite , RAININ). Se tapa la placa con cinta adhesiva y se deja incubando a una temperatura de 4°C durante 16 horas para que la hormona se pegue a las paredes del pozo.

PREPARACION DE LA CURVA PATRON Y DE LAS MUESTRAS PROBLEMA.

Curva patrón

Para realizar un análisis por triplicado se prepara una solución de hormona en PBS que tenga una concentración inicial de 2048 ng/500µl (equivalente a 1024 ng/100µl) , es decir 20.48 µl de la solución patrón de rcGH más 479.52 µl de PBS, para preparar la siguiente dilución se toman 250µl de esta primera, se adicionan 250µl de PBS y se agita, se quitan otra vez los 250µl de esta nueva y así sucesivamente hasta llegar a una dilución final equivalente a 0.250ng/100 µl.

Curva estándar de rcGH (µl)

[ng/pozo]	A	1024	512	256	128	64	32	16	8	4	2	1	B
PBS	489.76	479.52	250	250	250	250	250	250	250	250	250	250	250
Sol anterior	*10.24	*20.48	250	250	250	250	250	250	250	250	250	250	0
1er Ac.	0	250	250	250	250	250	250	250	250	250	250	250	250
Vol. total	500	500	500	500	500	500	500	500	500	500	500	500	500

*solución patrón de rcGH

A continuación se agrega el primer anticuerpo [1:100,000] (en solución para anticuerpo PBS leche 1%) en cada uno de los tubos de la curva patrón de acuerdo a la tabla anterior.

El anticuerpo se añade a todos los tubos excepto al tubo A (tubo testigo).

Se incuban a 4°C durante 16 horas.

Muestras problema

En tubos eppendorf se adiciona la cantidad de muestra requerida para el número de repeticiones y se agrega el primer anticuerpo. Se adicionó extracto de Bolsa de Fabricio para tener una cantidad de 60µg de proteína total, se adicionó la cantidad de PBS necesaria para llegar a un volumen final de 110µl y posteriormente se añadieron 110µl de la solución de anticuerpo [1:100,000], para tener un volumen final de 240µl.

Transcurrido el tiempo de incubación los pozos se lavan 5 veces con amortiguador TPBS; al final de los lavados la placa se seca con varios golpes firmes sobre papel absorbente.

Se añaden 100µl de solución bloqueadora (TPBS leche 1%) a cada pozo para bloquear la unión inespecífica, se sella la placa con cinta adhesiva y se deja incubando una hora a temperatura ambiente.

Transcurrido el tiempo de incubación se lava 5 veces la placa con TPBS

Se adicionan 100µl por pozo de las diferentes concentraciones de la curva patrón y de las muestras problema. Así las muestras se incuban durante 2 horas a temperatura ambiente.

Transcurrido el tiempo de incubación se lava 5 veces la placa con TPBS

Se añaden a cada pozo 100µl de la solución de segundo anticuerpo [1:3000], se sella la placa con cinta adhesiva y se deja incubando durante 2 horas a temperatura ambiente.

Transcurrido el tiempo de incubación se lava 5 veces la placa con TPBS

Se prepara el sustrato para revelar la placa ABTS (Boehringer Mannheim GmbH), primero se prepara la cantidad de Buffer necesario y posteriormente se disuelve en ese buffer un comprimido, de acuerdo a las instrucciones del fabricante.

Se adicionan 100µl de sustrato a cada pozo, se sella la placa con cinta adhesiva y se incuban 1 hora a temperatura ambiente con el sustrato.

Transcurrido el tiempo de incubación con el sustrato se lee la placa en un lector de placas de ELISA (Bio Rad Microplate Reader modelo 3550-UV)

Inicialmente, de los resultados se obtiene el valor porcentual de cada punto de la curva o muestra problema con respecto a los valores del testigo B (sin hormona), que representa el 100% de unión a la hormona de la placa.

Inmunoprecipitación

Soluciones

Net Gel Buffer para 100ml

Tris 50 mM pH 7.5	0.607g
NaCl 150nM	0.877g
Nonidet P-40 0.1%	100µl
EDTA pH 8 1nM	0.336g
Gelatina 0.25%	0.250g
Azida de Sodio 0.02%	0.02g

Ajustar el PH a 7.5 y almacenar a 4°C.

Notas: Se recomienda preparar por separado el EDTA .

Para preparar la gelatina se pone a hinchar primero el polvo, y antes de preparar el buffer debe de estar bien disuelta.

Proteína A sefarosa

Pesar 100mg de proteína A sefarosa y añadir aproximadamente 900µl de Amortiguador de Fosfatos de Sodio 0.1M pH 8 y añadir 0.17g de Azida de Sodio;

Lavar la proteína A dos veces (añadir 500µl buffer, centrifugar, retirar el Amortiguador y centrifugar otra vez)

Finalmente Resuspender en un volumen final de 0.9 a 1 ml de Amortiguador de Fosfatos.

Amortiguador de Lavado A

Net Gel -NaCl 0.5M

Añadir a 10 ml de Net gel 0.204 g de Sal

Amortiguador de Lavado B

Net Gel -SDS 10%

Añadir a 10 ml de Net Gel 100µl de SDS al 10%

Amortiguador de Lavado C

Tris 0.05M NP-40 0.1% pH 7.5

Para 100 ml:

Tris..... 0.6057 g

Nonidet P-40 100µl

Procedimiento

Colocar a un máximo de 500-600µl de muestra el volumen necesario de amortiguador Net Gel para llegar a un volumen final de 1ml.

Añadir 2.5 ml de anticuerpo policlonal contra cGH (αcGH) , incubar toda la noche con agitación a temperatura ambiente.

Al día siguiente añadir a cada una de las muestras 50µl de la suspensión de Proteína A sefarosa e incubar con agitación a temperatura ambiente durante 3 horas.

Centrifugar 10 minutos a 12,500 Rpm (12077 g) y descartar los sobrenadantes. (en el caso de este trabajo en particular los sobrenadantes fueron reinmunoprecipitados por lo que se colectaron y se guardaron).

Una vez centrifugada se procedió a lavar la resina:

Cada lavado incluye agitación a temperatura ambiente con el amortiguador correspondiente y centrifugación a 12,500 Rpm (12077 g).

3 veces con amortiguador de lavado A

2 veces con amortiguador de lavado B

1 vez con amortiguador de lavado C.

Al final de los lavados hay que resuspender el pellet con 60µl de Amortiguador de la muestra SDS-PAGE (Laemmli).