



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE
MÉXICO
Campus Juriquilla
Instituto de Neurobiología

“Secreción de Isoformas de la Hormona de Crecimiento en
Cultivo de Células Testiculares de Pollo”

Que para obtener el grado de Maestro en Ciencias (Neurobiología)

Presenta:
Biol. Carlos Guillermo Martínez Moreno

Tutor:
Dra. Maricela Luna Muñoz

Agosto 2006



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

Esta tesis fue realizada en el laboratorio de Bioquímica de hormonas del Dr. Carlos Arámburo de la Hoz, en el instituto de Neurobiología de la UNAM (campus Juriquilla, Querétaro) durante el periodo de 2003-2006. La tesis se realizó con apoyo de CONACyT (41218-Q y beca de maestría 185024), PAPITT (IN205406).

Agradecimientos

A mi tutora la Dra. Maricela Luna Muñoz por su paciencia, compromiso y amistad

Al Dr. Carlos Arámburo de la Hoz por su confianza y apoyo

A mi comité tutorial y revisores:

Dr. Alfredo Varela Echevarría

Dr. Jorge LarrivaShad

Dra. Carmen Acéves

Dr. Enrique Pedernera Astegiano

Dr. Gonzalo Martínez de la Escalera

A mis compañeros de laboratorio:

Salvador, Adriana, Marisela, Clara, Lulú, José Luis, Bernardo, Martha, Gerardo, Dra. Flor y Dra. Laurita

A Darenth, Martha y

Mauricio.

A Blanca y Guillermo (aunque ya no puedan darse por enterados)

A Oscar Moreno, al Dr. Andrés Quintanar y al Dr. José Luis Quintanar

A la familia y a mis amigos.

Índice

Resumen	1
Abstract	2
Introducción	3
Antecedentes	4
Hormona de Crecimiento GH	4
Efectos de la GH	5
Estructura de la GH	6
Variantes Moleculares de la GH	9
Regulación de la síntesis y secreción de GH	13
Hormona Liberadora de la Hormona de Crecimiento (GHRH)	14
Acciones Testiculares	15
GHRH en testículo	20
Justificación	21
Hipótesis y Objetivos	22
Diseño Experimental	23
Materiales y Métodos	24
Obtención de tejido	24
Cultivo Celular	25
Cuantificación de la GH por ELISA	26
Inmuno-citoquímica	27
Análisis de Variantes Moleculares de cGH	28
Resultados	30
Cuantificación de la GH por ELISA	30
Inmuno-citoquímica	37
Análisis de Variantes Moleculares	41
Discusión	47
Conclusión	58
Bibliografía	59
Apéndice I (Abreviaturas)	68

Resumen

Una proteína semejante a la hormona de crecimiento (GH) y su ARN mensajero han sido descritos en varios tejidos extrahipofisarios de diversas especies de vertebrados. Se sabe que la GH interviene en procesos de diferenciación, desarrollo y maduración del aparato reproductor. Es también sabido que la hormona de crecimiento presenta una heterogeneidad molecular que podría ser producto de modificaciones postraduccionales. En testículo de rata la GH se ha co-localizado con su secretagogo clásico, la hormona liberadora de la GH (GHRH). En este trabajo se determinó si la GHRH tiene un efecto sobre la liberación y/o secreción de la GH en cultivos primarios de células testiculares así como su patrón de heterogeneidad molecular. Se realizaron cultivos de células testiculares en presencia de GHRH a diferentes concentraciones (1nM, 10nM, 100nM) y se determinó que las variantes más abundantes liberadas al medio son las de 15 y 17 kDa. En el interior de las células las variantes más abundantes fueron las de 35 y 17 kDa. Mediante inmuno-citoquímica se determinó la presencia de células inmuno-positivas para GH. Con base en los resultados anteriores es posible señalar que el GHRH induce la liberación de la hormona de crecimiento pero que esta liberación depende además de otros factores.

Abstract

A growth hormone-like protein and its mRNA has been described in several extrapituitary tissues in different vertebrates. It is known that GH is involved in differentiation, developing and maturation process in the reproductive system. It is also known that GH is comprised by a family of heterogenous molecular variants which could be the product of post-translational modification. The GH has been co-localized with its clasical secretagoge, the growth hormone releasing hormone (GHRH) at the rat testis. In this work we determined if the GHRH had effect on the secretion or release of GH in testicular primary cell cultures as well as in its molecular heterogenity pattern. Testicular primary cell cultures were stimulated with GHRH at diferent concentrations (1nM, 10nM y 100nM). The GH release was detected and the results showed a higher concentration in the cultures treated with the GHRH compared with the control. We determined that 15 and 17 kDa molecular variants are the more abundant isoforms released to the culture medium, where as in the cell the most prominent variants corresponded to the 35 and 17 kDa isoforms. GH immunoreactive cells were determined in testicular primary cell cultures by immunochemistry under all stimulation conditions. In summary, these results showed that GHRH induces the GH release in testicular cell culture but this release may be related with other factors.

Introducción

Los procesos de crecimiento, desarrollo y reproducción en todos los seres vivos se ven afectados por una gran variedad de mecanismos regulatorios que controlan tanto su talla final como la progresión ordenada y su secuencial maduración morfofuncional. El estudio de la forma y mecanismos por los cuales dichos cambios son inducidos constituye una de las áreas principales de investigación en el campo de las ciencias biológicas contemporáneas. Es bien conocido que el crecimiento, desarrollo y reproducción de los animales es un proceso multifuncional cuyo control y regulación depende, primordialmente, de la compleja interacción del sistema neuroendocrino con diversos factores, entre los que destacan los nutricionales, los ambientales y los genéticos. Así, durante las últimas décadas se han realizado grandes esfuerzos para determinar los mecanismos a través de los cuales las hormonas ejercen este control, tanto *in vivo* como a nivel celular en el pollo (Arámburo et al., 1993). La línea de investigación de nuestro grupo de trabajo se inserta en este campo particular de conocimiento, y está dirigida a comprender la manera en que una hormona o mensajero intercelular, en éste caso de naturaleza peptídica, ejerce sus actividades biológicas. Utilizamos como modelo a la hormona de crecimiento y analizamos sus funciones en diferentes tejidos, y para el caso de este estudio empleamos testículo.

Antecedentes

Hormona de Crecimiento (GH)

La GH es una hormona de naturaleza polipeptídica, que se produce principalmente en la glándula hipófisis de todos los vertebrados estudiados hasta ahora y por la placenta de los mamíferos. Sin embargo también se ha encontrado que una proteína semejante a la GH se sintetiza en otros tejidos extrahipofisarios como en el sistema nervioso, reproductor e inmune (Harvey et al., 1995), incluso en algunos que se consideraban órganos blanco. La GH pertenece a una familia de proteínas que están relacionadas estructuralmente, y que presentan gran diversidad de funciones. La familia está constituida por la GH, la prolactina (PRL), el lactógeno placentario (PL) en roedores y ungulados o somatotropina coriónica humana, las proteínas relacionadas (bovino) o parecidas (rata) a la prolactina (PRPs), las proteínas vinculadas con la proliferina (PLF) y las relacionadas con la GH (Rand-Weaver et al., 1993).

Efectos de la GH

Además de los efectos sobre el crecimiento y desarrollo de los organismos, la GH interviene también en el metabolismo de proteínas, lípidos, carbohidratos, ácidos nucleicos y minerales. Además exhibe actividad sobre la proliferación y diferenciación celular; éstos efectos pueden ser directos sobre las células blanco o mediados a través de otros mensajeros regulados por esta hormona como en el caso del factor de crecimiento insulinoide tipo I o IGF-I (Harvey , 1995).

La diversidad funcional de la hormona de crecimiento es muy amplia y puede ser explicada en parte por la heterogeneidad molecular que ésta presenta. 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 inducida por la insulina, inducción de la resistencia periférica a la insulina (efecto diabetógeno) y participación en la regulación de la absorción tubular de algunos iones. La GH a través de IGF-I como ejemplo de efecto indirecto, promueve la diferenciación de pre-adipocitos, mioblastos y posiblemente de gran variedad de tejidos, incluyendo la placa cartilaginosa de la epífisis (Arámburo et al. ,1993). Actualmente está establecido que la GH está involucrada de manera integral en el mantenimiento, control y modulación del sistema inmune de mamíferos (Scanes et al.,1995).

Deficiencias en la secreción de GH, ya sean por causas genéticas (enanismo), fisiológicas (envejecimiento), y experimentales (hipofisectomía); han sido asociadas en mayor o menor manera con deficiencias en la función inmune y reproductiva (Hull et al.,1997).

Estructura de la GH

La hormona de crecimiento se sintetiza como una pre-hormona de 225 residuos de aminoácidos, mientras que la forma madura se compone de una cadena de aproximadamente 191 aminoácidos (dependiendo de la especie); presenta dos asas, una grande central y una pequeña próxima al extremo carboxilo terminal, las dos están formadas por puentes disulfuro localizados en los residuos 53-165 y 182-189 (Figura 1).

Figura 2. Estructura tridimensional de la hormona de crecimiento humana (Goffin et al., 1996).

La hormona de crecimiento contiene 4 dominios (A_{GH} , B_{GH} , C_{GH} y D_{GH}) altamente conservados en la escala filogenética, siendo el segmento 164-187 el más conservado. Los cuatro dominios se han identificado en todos los vertebrados, 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 hormonas de crecimiento estudiadas hasta ahora (Chen et al., 1995; Scanes et al., 1995).

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

En el pollo la GH representa aproximadamente el 10% de la proteína hipofisiaria total (Sturkie et al., 1986), la pre-hormona presenta 216 aminoácidos y la hormona madura se constituye de 191 aminoácidos. Su peso molecular aproximado es de 22kDa (CNR) y el punto isoeléctrico (pI) de la isoforma mayoritaria es de 5.1 (Arámburo et al., 1993; Hull et al., 1997).

La GH presenta dos sitios de unión a su receptor. El sitio 1 de la GH se une a una molécula del receptor para GH. Este sitio está constituido por la región que va del centro hacia el extremo carboxilo de la hélice 4, los residuos 54-74 de un asa y parte de la hélice 1; en el caso del sitio 2, éste se une a otra molécula del receptor para GH, pero con menor afinidad e incluye la parte del extremo amino terminal de la hélice 1, la hélice 3 y los residuos 12, 16 y 19 (Figura 3) (Cunningham et al., 1991). La dimerización del receptor es aparentemente indispensable para iniciar la actividad de la transducción de la

señal intracelular, y este mecanismo de unión ocurre cuando la GH se une tanto a los receptores somatotrópicos como a los lactotrópicos (Goffin et al., 1996).

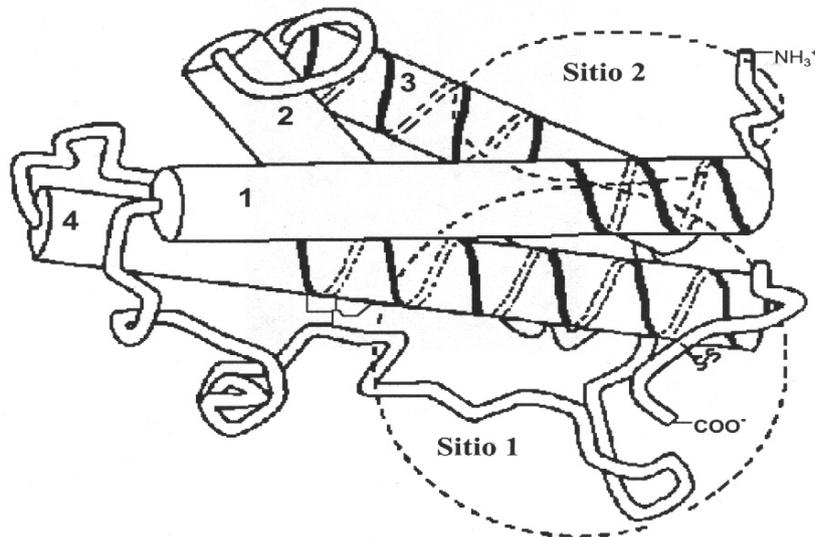


Figura 3. Sitios de unión al receptor de la GH

Variantes moleculares

En la hipófisis de todas las especies estudiadas, el análisis mediante electroforesis desnaturalizante (SDS-PAGE) bajo condiciones no reductoras revela que predomina la forma monomérica de la hormona (22 kDa) (Baumann et al., 1986; Arámburo et al., 1990). Sin embargo, las formas dimericas y otros oligómeros pueden representar hasta el 40% de la GH secretada al plasma en humanos.

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 el pollo (Arámburo et al., 1993).

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 et al., 1987; Arámburo et al., 1991; Montiel et al., 1992). Esta forma

glicosilada en humanos, representa aproximadamente el 1% de la hGH-N total (Scanes et al., 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 et al., 1987; 1990).

En el pollo se identificó una forma glicosilada de la GH (G-cGH) que tiene un peso molecular aparente de 29kDa en condiciones reductoras, cuando esta forma molecular se analizó con diferentes criterios electroforéticos se mostró que presenta heterogeneidad molecular, encontrándose seis variantes glicosiladas con puntos isoeléctricos (PI) entre 6.52-7.17 en las tres formas predominantes y todas ellas con un PM de 29 kDa(Arámburo et al.,1991). Esta variante se ha medido en el plasma y muestra variaciones de acuerdo con la etapa reproductiva. Se ha propuesto que la estructura del oligosacárido unido a la G-cGH es de naturaleza híbrida o bicatenaria. La G-cGH sufre un incremento a partir del día 15 y 18 embrionario, y presentó mayores incrementos entre la novena y decimoquinta semanas de edad. Se sabe también que la G-cGH estimula la proliferación de las células en el ensayo de linfoma Nb2, mientras su contraparte no glicosilada careció de efecto (Berumen et al., 2004).

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 et al., 1989). Mediante isoelectroenfoque y western blot se describieron de ocho a diez variantes de carga (Houston et al., 1988; Arámburo et al.,1990), algunas de las cuales parecían estar reguladas durante el desarrollo de estos animales (Houston et al., 1988; Arámburo et al., 2000)(Figura 4).

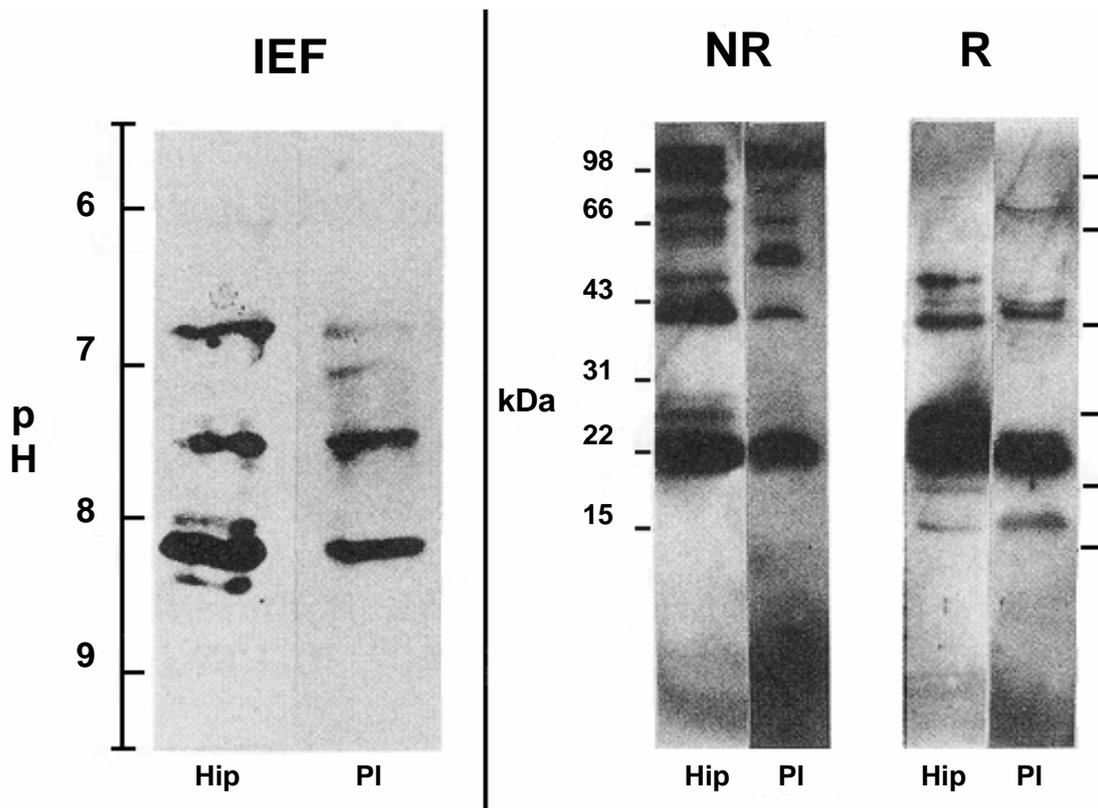


Figura 4. Se muestran bandas inmuno-reactivas en hipófisis (Hip) y plasma (pl) separadas por isoelectroenfoque (IEF) izquierda, y separadas por SDS-PAGE (no reductoras NR y reductoras R), transferidas a membrana de nitrocelulosa, y teñidas con anticuerpo primario anti-cGH generado en conejo y un segundo anticuerpo asociado a peroxidasa de rábano revelado con quimio-luminiscencia.

Existe otra modificación postraduccional que contribuye a la heterogeneidad de carga en una proteína, la fosforilación, la cual le confiere características más ácidas (Arámburo et al., 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 en los residuos Tyr_{28 ó 35} y Tyr₄₂ (Baldwin et al., 1983). En el pollo una proporción significativa de la hormona parece estar fosforilada (Arámburo et al., 1989), y 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 et al., 1990).

En el pollo, al menos dos variantes de carga (Rf= 0.23 y 0.3) presentan diferente bioactividad en el metabolismo de lípidos: la 0.23 fue esencialmente lipolítica mientras que la 0.3, manifestó una actividad antilipolítica (Arámburo et

al.,1989; 1993); sin embargo, ambas mostraron actividad somatotrópica equivalente (Arámburo et al., 1993).

Se determinó en pollo el patrón de heterogeneidad molecular a lo largo de la ontogenia, desde su embriogénesis hasta su estado adulto, y se encontraron bajo condiciones no reductoras bandas cGH-IR de 15, 22, 25, 44, 50, 66, 80, 89, 105 y >110 kDa; mientras que en condiciones reductoras se observaron las bandas de 13, 15, 18, 23, 26, 36, 39, 44, 48, 59 y 72 kDa. Las formas oligoméricas desaparecieron con la reducción con mercaptoetanol. El monómero cambia su peso molecular debido a la pérdida de su tridimensional, modifica su peso a 26 kDa al exponerlo al mercaptoetanol. Durante la ontogenia el patrón de heterogeneidad molecular sufre cambios en la proporción de sus variantes. Se ha descrito una mayor cantidad de fragmento de 15 kDa durante el estado embrionario. El monómero de 22 kDa (NR) sufre un aumento después de la embriogénesis y formas oligoméricas mayores a 66 kDa se encontraron en menor cantidad durante la misma etapa. Se ha mostrado que la forma monomérica de 22kDa tiene una afinidad mayor por el receptor al ponerse a competir con las formas de 44, 66 y 80 kDa. (Arámburo et al., 2000), las cuales prácticamente no se unen al receptor hepático.

La heterogeneidad molecular de la GH puede originarse por diferentes causas, entre las que se encuentran las siguientes:

- **Multiplicidad génica**

Se identificaron dos genes en los humanos que codifican para dos GH 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 et al. , 1987; Liebhaber et al., 1989; Untergasser et al., 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, es más básica 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 et al.,1988; Ray et al., 1990; Baumann et al., 1991). También en la hipófisis de humanos se ha encontrado un péptido glicosilado de 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 et al., 1993).

- **Edición del ARN mensajero**

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

- **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 se han obtenido evidencias suficientes de que existe una serie de variantes de masa tanto en la adenohipófisis (Houston et al., 1988; Arámburo et al.,1990) como en el plasma (Montiel et al., 1992).

Regulación de la Síntesis y 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 et al., 1992), entre otros.

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. 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. En aves TRH estimula también la liberación de GH.

Los factores reguladores de la síntesis y secreción de la GH, actúan a nivel del hipotálamo o de la hipófisis. La secreción de esta hormona tiene un comportamiento pulsátil, observado en todas las especies estudiadas, donde se ha notado que los tejidos blanco son más sensibles a la frecuencia del estímulo hormonal que a una gran cantidad secretada en un periodo similar. Un pulso de secreción de GH está controlado por la rítmica liberación alternada de GHRH y SRIF (Devesa et al., 1992).

La GHRH se produce en neuronas localizadas en el núcleo arqueado, las cuales expresan receptores para somatostatina (SRIF) que inhibe la síntesis de GHRH (Bertherat et al., 1995). Contrariamente, las neuronas del área periventricular del hipotálamo anterior secretan SRIF y son estimuladas por la GHRH (Águila et al., 1987). La SRIF inhibe su propia síntesis por un mecanismo de retroalimentación negativa (Águila et al., 1998). Esta interacción entre los péptidos parece ser la responsable de la secreción episódica de la GH. Sin embargo, estos factores hipotalámicos están sujetos a modulación por otros péptidos hipotalámicos y por una compleja red de neurotransmisores que funcionan como intermediarios entre las influencias metabólicas, endocrinas, neurales e inmunológicas, y la liberación de la GH (Harvey et al., 1995).

A diferencia de lo que ocurre en mamíferos, en pollos las hormonas tiroideas (HT) inhiben la síntesis y liberación de la GH inducida por TRH y GHRH, posiblemente a través de la disminución en la sensibilidad de los somatotropos a GHRH y por la reducción de los niveles de secretagogos de GH (Radecki et al., 1994).

Existen además hormonas que intervienen en el control de la transcripción del gen de GH y su secreción como son los glucocorticoides, los cuales tienen un efecto estimulador. En estudios *in vitro*, se ha demostrado que el efecto de los glucocorticoides sobre la síntesis de GH es dependiente de HT. También afectan la expresión del gen del receptor de GHRH incrementando su ARNm, mientras se observa una disminución en los niveles de ARNm del receptor de SRIF. No obstante, una exposición prolongada a glucocorticoides produce el efecto contrario en la expresión de dichos receptores. (Devesa et al., 1992; Argente et al., 1994; Blue-Pajot et al., 1998).

Un mecanismo propuesto para la regulación por GH es el llamado de asa ultracorta, en el que se supone un efecto inhibitorio de la hormona sobre su propia secreción. También puede estar mediada por factores parácrinos extrasomatotrópicos, por ejemplo, a través del IGF-I que se produce en la hipófisis en respuesta a GH, y que inhibe la liberación de la hormona y la transcripción del gen de GH, tanto en condiciones basales como inducidas por GHRH. La GH sistémica disminuye su propia secreción basal o estimulada independientemente de cambios en otras hormonas o metabolitos inhibitorios, como la glucosa o los ácidos grasos libres. Se piensa que este efecto puede ocurrir por inhibición de los receptores a GHRH y TRH, por aumento de los receptores SRIF, por la combinación de ambos en las membranas somatotrópicas o por daño en la señal de transducción. La GH sistémica también regula su secreción a través de su efecto sobre los niveles de otras hormonas, como los IGF hepáticos (Harvey, 1995; Blue-Pajot et al., 1998).

Acciones Testiculares de la GH

La espermatogénesis es un proceso complicado que involucra una multitud de interacciones celulares que incluyen la transcripción secuencial de genes, la expresión y función del producto de la traducción de los genes, así como el control de la función celular y de las interacciones celulares a través de diversos mensajeros químicos que actúan a través de mecanismos endócrinos, parácrinos y autócrinos (Figura 5).

Estudios recientes muestran una fuerte relación entre la GH y la fertilidad masculina. Por ejemplo, la movilidad espermática se ve afectada en ratones con deficiencia en los niveles de la hormona, y se restaura mediante la administración de GH; también se ha determinado que el número y morfología de espermatozoides, se reduce con la deficiencia de GH, y con una administración de GH exógena se revierte dicho efecto. Se ha observado también un decremento en el número de espermatozoides maduros, pero niveles normales de espermátides en roedores deficientes de GH, lo cual muestra que dicha hormona puede afectar la maduración final y no la espermatogénesis (Kuroda et al., 1989).

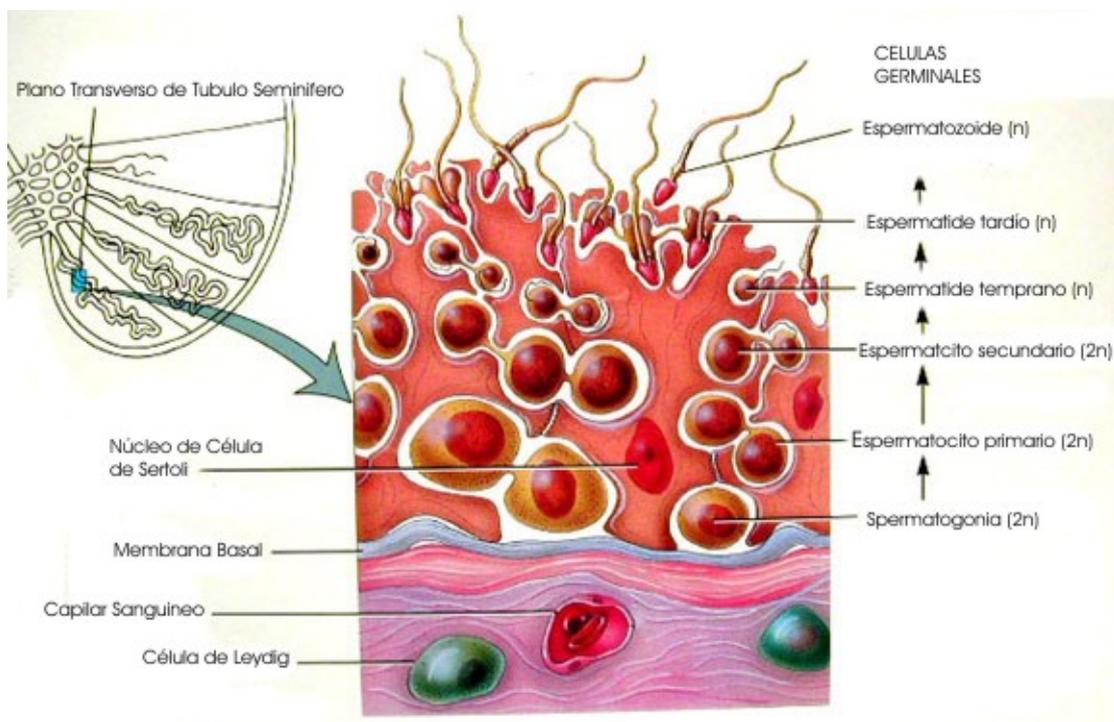


Figura 5. Se muestra un esquema de espermatogénesis. (n)haploides ($2n$) diploides

La GH induce la espermatogénesis en ratas macho infértiles, probablemente por el incremento de la diferenciación de células de Leydig y Sertoli (Shoham et al, 1992).

Las acciones gametogénicas de la GH pueden ser directas o mediadas por IGF. Sin embargo, es poco probable que el IGF-1 hepático cruce la barrera hemato-testicular. Las acciones testiculares de la GH pueden estar mediadas por el IGF-1 gonadal. Hay estudios en los que se ha visto que las concentraciones seminales de IGF-1 se correlacionan con la morfología de los espermatozoides, pero no con su motilidad o concentración, ya que el IGF-1 en contraste con la GH, inhibe la motilidad espermática (Breier et al, 1996; Glander et al, 1996; Breier et al, 1998; Miao et al, 1998; Ovesen et al, 1998).

La GH puede alterar la gametogénesis, afectando la síntesis de testosterona ya que ésta es necesaria para la producción de espermatozoides. La acción esteroideogénica de la hormona de crecimiento, puede también ser mediada a través de IGF-1, ya que concentraciones subfisiológicas de este factor pueden inducir esteroideogénesis en folículos de rata (Handelsman et al, 1985).

Los testículos están altamente vascularizados, y muchas de las acciones testiculares de la GH exógena son probablemente un reflejo de sus acciones endócrinas (GH hipofisiaria), sin embargo, la barrera hemato-testicular, sugiere que muchas de las acciones esteroideogénicas en células Sertoli y su papel en la gametogénesis pueden reflejar acciones de GH producida localmente (Hull & Harvey, 2000, Luna et al, 2004).

La posibilidad de que la GH testicular pueda actuar localmente afectando la función reproductiva directa o indirectamente, se apoya por la distribución del receptor a GH (GHR) en el tracto reproductivo masculino, la inmunoreactividad de GHR se presenta abundantemente en los conductos de Wolff y de Müller, uretra, epidídimo, vasos deferentes, vesícula seminal y gónadas en la rata (Hull & Harvey, 2000).

Expresión de la GH en testículo y heterogeneidad molecular

Aunque la expresión del gen de GH ha sido demostrada en testículos humanos, el gen que principalmente se expresa es el gen variable (hGH-V) expresado en la placenta y no el gen normal (hGH-N) que se traduce en la hipófisis (Untergasser et al., 1997, 1998). En el caso del pollo no se encuentra el gen GH-V, por lo que las proteínas similares a GH encontradas en el testículo son generadas por la expresión del mismo gen que se encuentra expresándose en la hipófisis. (Harvey et al 2004).

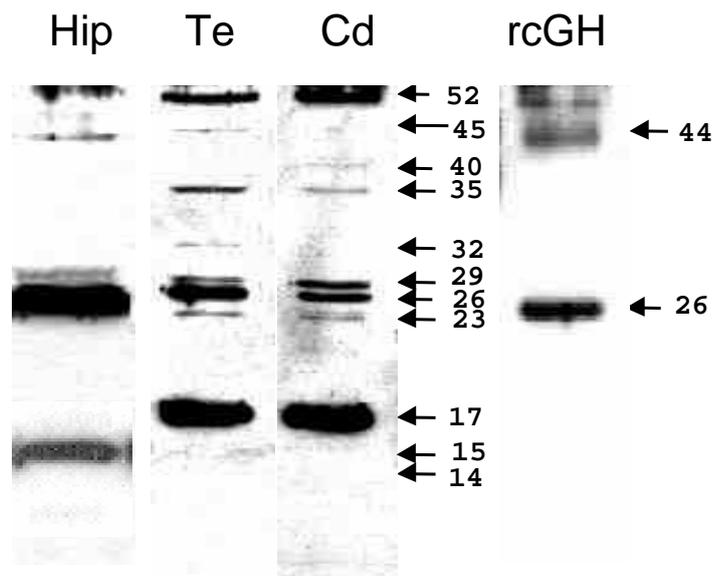


Figura. 6 Luminograma que muestra el patrón de heterogeneidad molecular de la GH-IR en hipófisis (Hip), extracto de testículo (Te), conducto deferente (Cd) y hormona de crecimiento de pollo recombinante (rcGH) separadas por SDS-PAGE, transferidas a membrana de nitrocelulosa, y teñidas con anticuerpo primario anti-cGH generado en conejo y un segundo anticuerpo asociado a peroxidasa de rábano revelado con quimio-luminiscencia.

La GH-IR en los testículos de pollo está asociada a proteínas de diferente peso molecular, con un patrón característico de heterogeneidad

molecular de esta hormona como la que previamente se había reportado en la hipófisis. Se ha planteado que el mecanismo por el cual estas variantes moleculares son generadas es principalmente por modificaciones post-traduccionales (Arámburo et al., 2000, 2001). Aparentemente algunas de las variantes moleculares de la GH identificadas en el testículo también están presentes en la hipófisis, aunque la proporción relativa de éstas varía claramente en los diferentes tejidos (Figura 6).

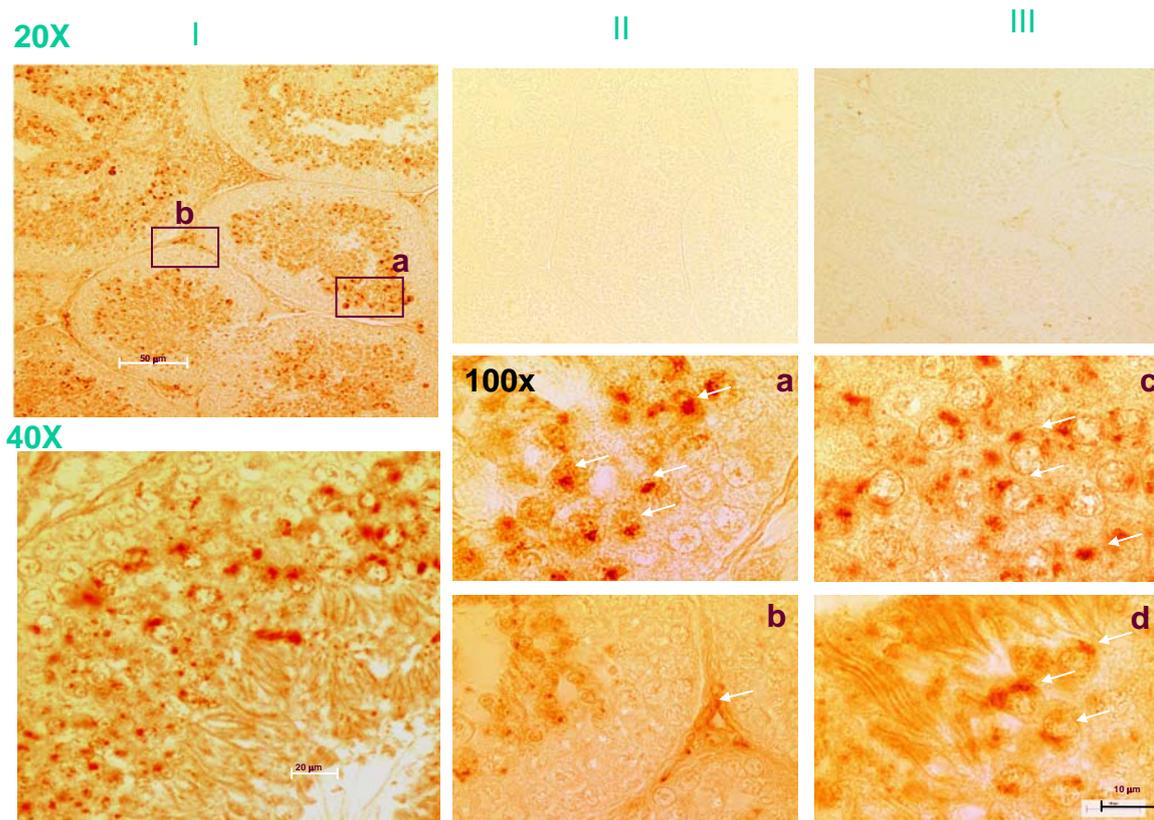


Figura 7. Inmuno-reactividad a GH en cortes de testículo de 6 μ m en pollo. Las micrografías superiores (I) amplificación 20x de cortes incubados con anticuerpo contra cGH recombinante (1:500) (II) Inmuno-reactividad a GH se ve perdida por pre-adsorción del anticuerpo con exceso de rcGH (III) Control negativo sin el primer anticuerpo. Micrografías inferiores 40x y 100x de amplificación mostrando con IR-GH positiva. Las flechas señalan inmuno-positividad en tipos celulares: (a, c y d) células germinales (espermatoцитos primarios/secundarios, espermátides) (b) Células de Leydig (intersticial) y células mioideas. (Luna et al., 2004).

La localización de una proteína parecida a GH mostró estar ampliamente distribuida en los túbulos seminíferos de testículos de pollos adultos (Figura 7). Se encontró abundantemente en la parte luminal del túbulo en espermatoцитos secundarios y espermátides, pero no se observó en espermatoγogonias, ni en

células de Sertoli. También está presente en células intersticiales o de Leydig y miocitos. Estos resultados demostraron la presencia de GH en testículos de pollo de diferentes edades y la inmuno-reactividad se incrementa durante el desarrollo y que está asociada a numerosas variantes moleculares diferentes las que se observan en la hipófisis. Los cambios en la concentración de GH en el tejido pueden ser relacionados a una posible función en la reproducción y reflejar un efecto autócrino o bien parácrino (Luna et al., 2004).

Existen cambios en la abundancia relativa de GH en testículo a lo largo del desarrollo, estos incluyen un marcado decremento en la abundancia de formas de 14 kDa y 40 kDa entre los 18 días embrionarios a las 66 semanas de edad. La abundancia de la forma de 45 kDa se incrementa agudamente entre las 18 días embrionarios hasta las 15 semanas de edad (Luna et al., 2004). Mientras que la variante de 17 kDa es la principal isoforma en el testículo a lo largo de todo el desarrollo.

GHRH en testículo

Es importante destacar la presencia de péptidos como la hormona liberadora de gonadotropinas (GnRH), de la hormona liberadora de tirotrópina (TRH) y de la hormona liberadora de la hormona de crecimiento (GHRH) en testículos de diferentes especies de mamíferos. Además de haber sido reportada la proteína GHRH también existen estudios que revelaron la presencia del receptor en dichas células. Así mismo, se ha demostrado la expresión del secretagogo de GH, Ghrelina y su receptor (GHS-R) en aparato reproductor masculino de rata y humano (Gaytan et al., 2003).

Se ha demostrado la expresión de GHRH en testículo de rata, en células espermátides y espermatogonias. Igualmente se describió la expresión de GHRH en células de Sertoli y Leydig, así como un receptor que une a GHRH (Fabbri et al., 1995, Moretti et al., 2002). La presencia del receptor y su ligando promueve la idea de un mecanismo de activación que involucra a estas dos proteínas en relación con la síntesis y secreción de la hormona de crecimiento en este tejido. Aún se desconocen las posibles funciones autócrinas y/o

parácrinas de la GHRH en el proceso de maduración y diferenciación celular en el sistema reproductor masculino. Es posible plantear que al igual que regula la liberación de GH en la hipófisis podría regular a esta hormona a nivel testicular.

Justificación

Se sabe que la hormona de crecimiento se expresa en tejido testicular, ya que se ha podido identificar tanto su ARN mensajero como inmunoreactividad a cGH en aparato reproductor de pollo.

Harvey y Hull han propuesto una posible función autócrina y/o parácrina a partir de la presencia del receptor a GH (GHR) y ligando en éste tejido, pero no existían datos de su regulación en éste nivel. Además, se encontró en rata la presencia del factor liberador GHRH por lo que se pensó podría estar relacionado en el control de la liberación y/o síntesis de GH en células testiculares (Harvey et al., 2004; Luna et al., 2004).

Se conoce además que existe un patrón de isoformas de cGH específico para testículo de pollo por lo que fue necesario realizar experimentos para determinar el efecto del factor hipotalámico GHRH en el patrón de heterogeneidad molecular de la GH. Se realizaron experimentos en cultivo primario a fin de determinar el efecto de GHRH sobre la cGH testicular.

Hipótesis

La hormona liberadora de la hormona de crecimiento (GHRH) puede inducir la secreción de GH en el testículo de pollo.

Objetivos

General:

Caracterizar el efecto de GHRH sobre la producción y liberación de la GH en cultivos de células testiculares de pollo.

Particulares:

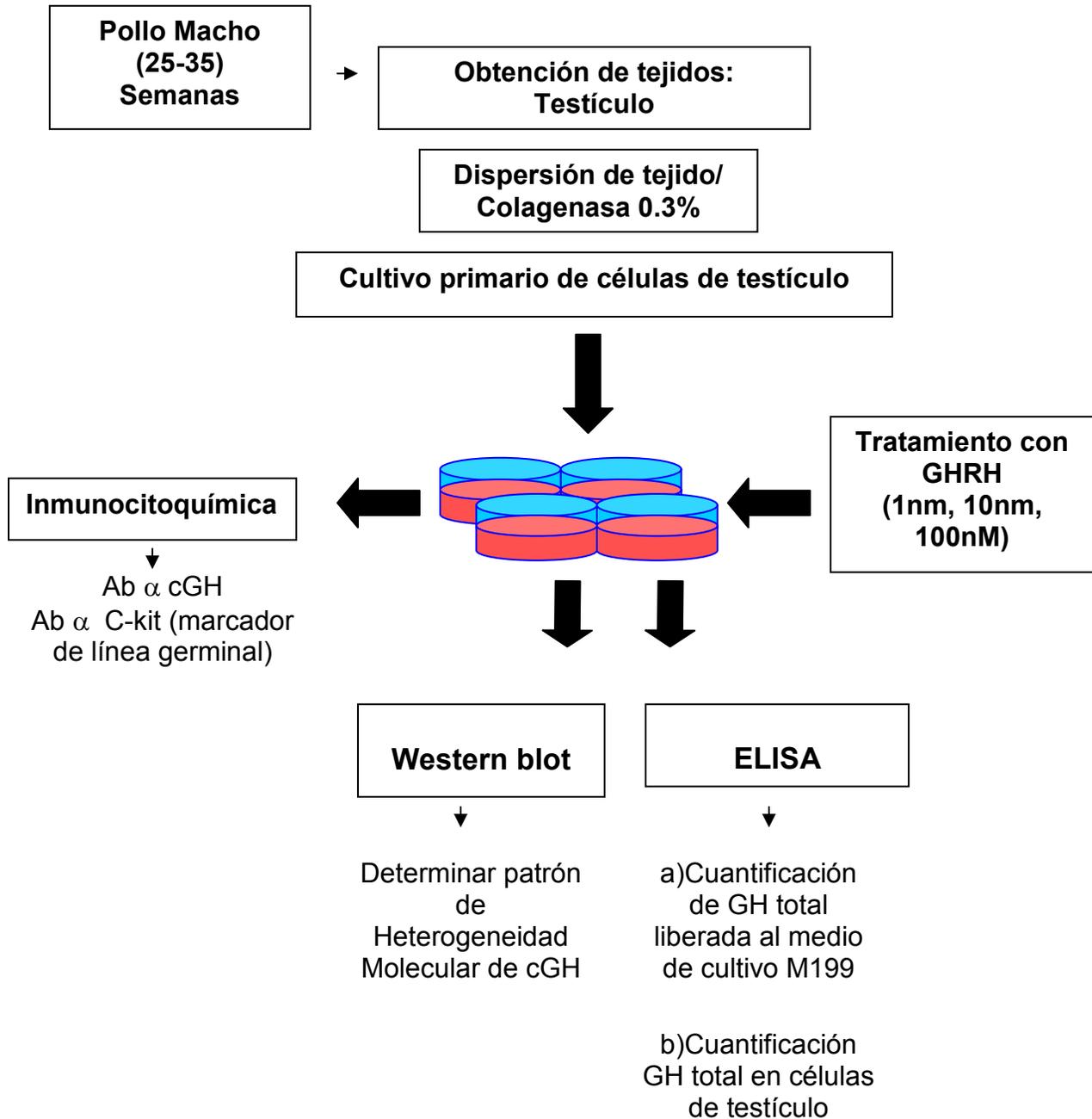
- Optimizar las condiciones para el establecimiento de cultivos primarios de células testiculares de pollo.

- Caracterizar en cultivos primarios de células de testículo, el efecto de GHRH:
 - En la concentración de GH en las células y en medio de cultivo.

 - En la distribución de GH en las células en cultivo por inmunocitoquímica.

 - En el patrón de heterogeneidad molecular de GH tanto en las células como en el medio de cultivo.

Diseño Experimental



Material y Métodos

Material y Métodos

Como material biológico se utilizaron pollos machos de engorda de la línea Ross con edad entre las 25 y 35 semanas, obtenidos de las granjas de producción de Pollos Querétaro S.A. de C.V. de México. Los pollos fueron mantenidos durante 18 semanas en el Instituto de Neurobiología de la UNAM.

Obtención y dispersión de tejido

Los pollos se sacrificaron por dislocación cervical y se disecaron los testículos tratando de obtenerlos completos (encapsulados); los testículos fueron colocados en solución salina balanceada de Hanks' [GIBCO BRL] libre de Ca^{2+} y Mg^{2+} , a 37 °C con 5% de penicilina/estreptomicina, posteriormente se descapsularon y se cortaron lo más finamente posible utilizando un bisturí en condiciones estériles.

A 15 ml de la suspensión celular se le agregaron 15 ml de Medio Eagle Modificado (DMEM) [GIBCO BRL] con 1% de penicilina/estreptomicina y con colagenasa tipo II al 0.3%. Se incubó durante 1 h con agitación moderada a 37 °C, se realizó una centrifugación a 2500 rpm durante 5 min y se descartó el sobrenadante.

Se agregaron 2 ml de DMEM con penicilina/estreptomicina 1% a la suspensión celular previamente digerida con colagenasa II, esto para resuspender la pastilla de células. Se agregaron 5 ml de medio DMEM con 2mg/ml de Tripsina/EDTA + 1% de penicilina/estreptomicina, se incubó durante 15 min a 37 °C con agitación moderada. Se centrifugó la muestra a 2500 rpm durante 3 min y se descartó el sobrenadante.

Las células se resuspendieron con 10 ml DMEM + SFB 10% + penicilina/estreptomicina 1% y se centrifugaron a 2500 rpm durante 5 min; el sobrenadante se descartó y este paso se repitió 2 veces más.

Conteo celular en cámara de Neubauer

Las células fueron pasadas por una malla estéril de 100 μm para dispersar los grumos de tejido que perduren así como los agregados de células. La suspensión celular se homogeneizó y se tomó una alícuota (10 μl) y se agregó azul de tripano al 60% para cuantificar la sobrevivencia. Se realizó el conteo celular en una cámara hematocitométrica.

Cultivo celular

Estabilización y pegado de cultivo celular

Se utilizaron cajas Petri de 60 x 15 mm (Costar) estériles en las cuales se sembraron 4×10^6 células en 5 ml de medio de cultivo enriquecido (Megacell DMEM/F-12) con suero fetal bovino (SFB) 10 % (Gibco) y penicilina/estreptomicina 1% (Sigma). Se incubaron a 37 °C, 5% de CO_2 y 95% aire en una incubadora humidificada (Nuair US Autoflow CO_2 Water-Jacketed) y después de 24 horas se cambió el medio de cultivo. Las células se dejaron estabilizar por 48 h y posteriormente, se trataron con el GHRH a diferentes concentraciones.

Tratamientos dosis-respuesta

Los tratamientos se realizaron en medio mínimo M199 (Gibco) con las diferentes concentraciones GHRH; (2nM, 10nM y 100nM) para el caso de la optimización en tiempos de incubación y (1nM, 10nM y 100nM) para evaluar la liberación. Al cabo de las 48 horas de haber realizado el cultivo se descartó el medio enriquecido y se cambió por el medio con el tratamiento. Se incubaron durante 2 y 8 h. Las células y el medio fueron colectados al final de estos tiempos de incubación para determinar la presencia de GH testicular por ELISA.

Cultivo para Inmunocitoquímica

Con el fin de realizar el análisis inmunocitoquímico se sembraron en placa de 24 pozos (Costar) alícuotas de 1×10^6 células por pozo. Se incubaron con 300 μ l medio enriquecido Megacell (Sigma) para su estabilización; bajo las mismas condiciones de incubación antes descritas.

Las células se estimularon con GHRH en las mismas condiciones anteriores (1nM, 10nM y 100nM) en medio de cultivo mínimo M199 durante 2 h, el medio se descartó y las células fueron fijadas con paraformaldehído al 4% en amortiguador de fosfatos (PBS) durante 30 min.

Cuantificación de la cGH secretada.

Para determinar si la GH se libera al medio por efecto del GHRH, los medios de cultivo (en alícuotas de 1 ml) se concentraron en un concentrador con centrifugación al vacío (Savant) a sequedad y se resuspendió con 50 μ l de agua desionizada. La GH se cuantificó mediante el método de ELISA. Para el caso de la normalización por miligramo de proteína la concentración total de proteína se realizó por el método de Bradford (Bradford, M. M. 1976).

Cuantificación de la cGH

Ensayo inmuno-enzimático indirecto por competencia (ELISA)(Martínez-Coria 2002):

Las placas de inmunoanálisis (Dynatech-Immulon de 96 pozos) fueron forradas con una solución de rcGH 6 ng/100 μ l/pozo. Se dejaron incubando a una temperatura de 4 °C durante 16 h.

Simultáneamente las muestras y las diluciones del estándar para la curva patrón se incubaron con el anticuerpo policlonal contra cGH CAP1 (1:50,000) en TPBS + leche 1 % durante 16 h a 4 °C. Posteriormente las placas fueron lavadas y bloqueadas con leche al 3 % con amortiguador TPBS 0.01 M, NaCl

0.15 M, pH 7.6 + Tween 20, 0.05 %. Se agregó la mezcla incubada previamente con el primer anticuerpo a la placa, para establecer la competencia durante 2 h.

Se lavaron nuevamente las placas y se les adicionó la solución de anticuerpo secundario unido a peroxidasa a una dilución de 1: 3,000 (100 µl por pozo) (goat anti-rabbit -IgG-HRP *Bio Rad*), se incubó durante 2 h y se volvieron a lavar.

Se les agregó 100 µl por cada pozo de la solución de revelado ABTS (Roche) y se incubaron durante una 30 min a temperatura ambiente. Posteriormente se cuantificó el desarrollo de color en un lector de placas (*Bio Rad*, Microplate Reader modelo 3550-UV) a una longitud de onda de 405 nm. Este ensayo tiene una sensibilidad de 10 ng/ml y un coeficiente de variabilidad intra ensayo <5% e inter ensayo menor al 10 %.

Inmunocitoquímica

Las células en las cajas de 24 pozos previamente fijadas con paraformaldehído 4% fueron lavadas con TPBS (amortiguador de fosfato de sodio 0.5 M pH 7.8 con tritón X-100 al 0.5%) tres veces por 5 min. Se les agregó una solución TPBS con H₂O₂ a 1% durante 1 h para inhibir las peroxidases endógenas y se lavaron con TPBS tres veces por 5 min. Se pusieron a bloquear por 2 h con leche descremada (Bio-Rad) al 5% en TPBS y se lavaron con TPBS 3 veces por 5 min.

Se incubaron con un primer anticuerpo anti-GH CAP-1 1:500 en leche descremada al 1% y TPBS toda la noche a 4°C.

Se lavaron con TPBS tres veces por 5 min y se incubaron con un segundo anticuerpo anti-IgG de conejo marcado con peroxidasa (1:200) en leche descremada al 1% y TPBS por 2 h.

Se lavaron con PBS 0.5 M, pH 7.8 tres veces por 5 min y posteriormente se reveló con diaminobencidina (DAB) 0.05% y H₂O₂ 0.01% en PBS 0.5 M pH durante 10 min. Se removió la solución y se agregó PBS 0.5 M pH 7.8 para detener la reacción.

Análisis de Variantes Moleculares de cGH

SDS-PAGE

Se realizó la SDS-PAGE en condiciones reductoras (con mercaptoetanol), utilizando un equipo mini-Protean II de Bio-Rad. Los geles separador y concentrador se prepararon al 12.5% y 4% de poliacrilamida respectivamente. El amortiguador de corrida fue Tris 25mM, glicina 190mM, pH 8.6. Durante la electroforesis se aplicaron 150 mV constantes.

Electrotransferencia de Proteínas

Para la inmunotransferencia los geles se equilibraron en un amortiguador 25mM Tris, 193mM glicina, 20% metanol, pH 8.3 y las bandas de proteína se transfirieron a membranas de nitrocelulosa a 200mA por 1h (kit de Bio-Rad), para ser posteriormente inmunoteñidas y analizadas por quimio-luminiscencia.

Inmunotinción

Al terminar de electro-transferir las proteínas, las membranas se bloquearon con 5% de leche descremada (Bio-Rad) en TBS por 2 h a temperatura ambiente con agitación moderada. Después de lavar las membranas con TBS 3 veces por 10 min, las membranas se incuban con el primer anticuerpo anti-cGH policlonal (1:10000) en 1% de leche descremada en Tween-20 0.05% en TBS a temperatura ambiente durante la noche. Posteriormente, las membranas fueron incubadas con el segundo anticuerpo (de ovino anti-IgG de conejo ZIMED) conjugado con peroxidasa de rábano (HRP).

Revelado y Luminograma

Se incubaron por 4 min en la solución del sustrato quimioluminiscente (2 ml de solución A y 2 ml de solución B, ECL, Pharmacia). Los luminogramas de las bandas inmunoteñidas se obtuvieron exponiendo películas de rayos-X (Kodak Biomax) a las membranas durante 1 min. Los luminogramas fueron expuestos a la solución fijadora (Kodak) durante 1 min y después de ser enjuagadas con agua destilada se colocaron en la solución fijadora (Kodak).

Análisis de las Bandas IR-GH por densitometría

El análisis de la hormona se realizó por medio de densitometría de los luminogramas después de la inmunoelectrotransferencia. Para digitalizar la imagen del luminograma se empleó un Scanner ScanJet de Hewlett Packard. Con ayuda del programa IP-Lab (Scanalytics) se obtuvo la densidad óptica del área total de cada banda. Estos datos fueron graficados comparando las diferencias entre las distintas bandas inmuno-reactivas entre los controles y los tratamientos.

Para normalizar los datos se obtuvo la proporción relativa de cada banda considerando a la suma de todas ellas el 100%, de tal manera que cada banda IR-GH identificada por los anticuerpos representa un porcentaje del total de cGH secretada al medio o contenida en células.

Análisis Estadístico

El análisis estadístico se realizó con una prueba ANOVA de 2 vías que permitió la comparación entre bandas correspondientes entre controles y experimentales. En el caso de la cGH total determinada por ELISA se analizó con una prueba T que permitió la comparación entre los controles y los tratamientos utilizados.

Resultados

Cuantificación de cGH por el Método de ELISA

Los resultados correspondientes a la optimización de la curva estándar para ELISA se muestran en la Figura 8. Se observa una curva patrón característica con un coeficiente de variación intra e inter-ensayo menor del 10 %. La sensibilidad del método permitió evaluar la concentración de cGH total en los medios de cultivo de las células tratadas. La sensibilidad de la prueba de 2 ng/pozo (20ng/ml).

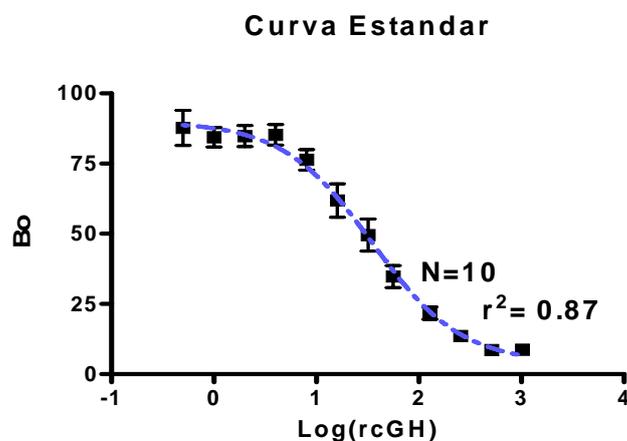


Figura 8. Curva patrón ELISA indirecto por competencia

Optimización de los tiempos de incubación con hormona liberadora de hormona de crecimiento (GHRH)

Se determinó el efecto de GHRH sobre la liberación de GH en cultivos primarios de células testiculares de 3 diferentes individuos juveniles (20-22 semanas) sembrados de manera conjunta (lote) en 7 repeticiones los cuales fueron incubados durante (2 y 8 h) para determinar el tiempo de incubación óptimo para la detección de hormona de crecimiento.

Se analizaron los medios de los cultivos tanto en condiciones control como de las células tratadas con GHRH (2nM, 10nM y 100nM) durante estos tiempos de incubación. Los resultados se muestran en la Figura 9 en donde se observa

un incremento en la concentración de GH a las 2 h al compararse entre las células control (7.44 ± 2.9 ng cGH/ml) y las estimuladas, aunque solo fue significativa la diferencia con 100nM de GHRH (14.59 ± 5.05 ng cGH/ml).

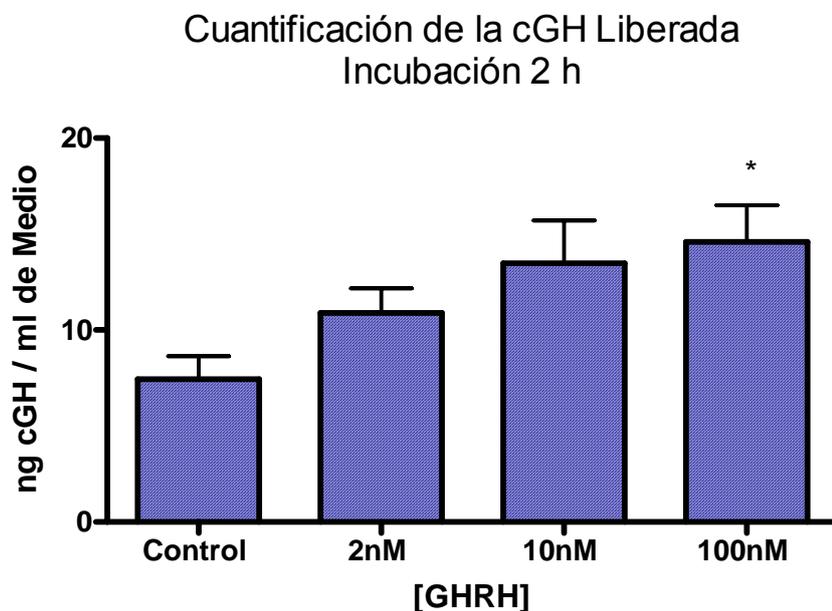


Figura 9. Concentración de cGH en medios de cultivos primarios de células testiculares de pollos de 20-22 semanas incubadas en presencia de diferentes concentraciones de GHRH (2, 10 y 100 nM) durante 2 h determinada por ELISA. Cada barra representa la media \pm desviación estándar de una $n=7$ cultivos de células de diferentes organismos (3) sembradas de manera conjunta (lote). (*) Señala diferencia significativa al compararse con el control con una $p < 0.05$.

Cuando se evaluó el efecto a un tiempo de incubación de 8 h (Figura 10) se observó que al adicionar medio de cultivo mínimo con GHRH (1nM, 10nM y 100nM) fue posible detectar un ligero aumento en la concentración de la GH en el medio, sin embargo éste aumento no fue significativo estadísticamente en ninguna de las concentraciones de los tratamientos.

Al comparar las concentraciones entre las diferentes condiciones experimentales se observa que a las 2 h la GHRH induce la liberación de GH sin embargo el efecto solo fue significativo a la concentración de 100 nM. Cabe señalar que la respuesta ante la estimulación fue muy baja comparada con el control; asimismo cuando se compara con el efecto de este secretagogo en la hipófisis, en donde la dosis óptima es de 2 nM.

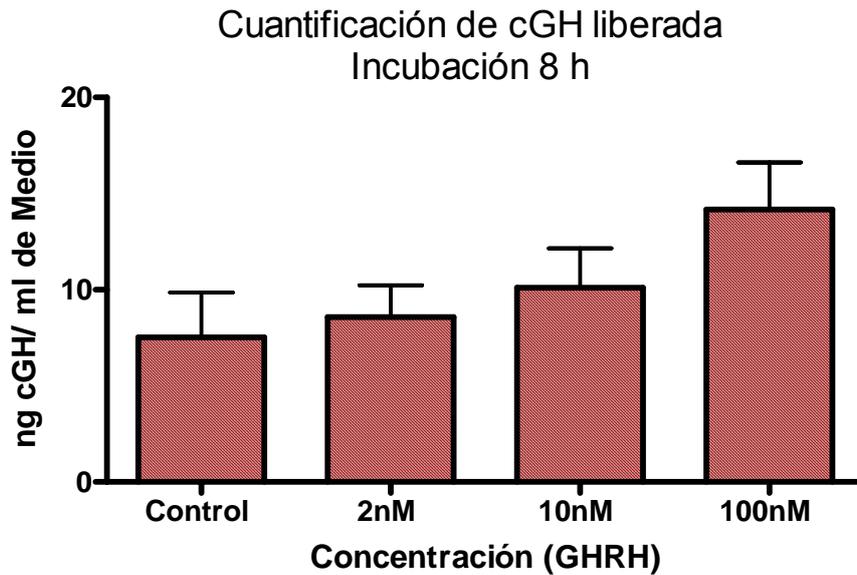


Figura 10. Concentración de cGH en medios cultivos primarios de células testiculares incubadas en presencia de diferentes concentraciones de GHRH (2,10 y 100 nM) durante 8 h de incubación determinadas mediante ELISA. estandar de una n=7 cultivos de células de diferentes organismos (3) sembradas de manera conjunta (lote). Cada barra representa la media \pm desviación estandar $p < 0.05$

Cuantificación de Hormona de Crecimiento Liberada al Medio Cultivo

Se determinó el efecto de GHRH en la liberación de GH en cultivos primarios en células testiculares de pollos de diferentes edades por individuo; 8 pollos con una edad de 26.5 ± 1.0 semanas y 8 pollos con una edad de 31.5 ± 1.0 semanas, ambos grupos fueron estimulados durante 2 h con GHRH (1nM, 10nM y 100nM). Los cultivos fueron realizados de manera individual, es decir, las células testiculares de cada individuo se cultivaron por triplicado en cada condición.

Se observó una respuesta diferencial en la cantidad de la cGH liberada al medio correspondientes al comparar dos poblaciones de diferente edad. Una que mostró una respuesta de alta magnitud > 15 ng de cGH liberada/ ml de medio de cultivo, y la otra con una respuesta de baja magnitud con valores < 15 ng/ml de medio de cultivo.

La respuesta ante la estimulación con GHRH para el caso de los cultivos de células testiculares de animales de menor edad (26.5 ± 1.0 semanas) respecto a la cGH liberada (Figura 11) mostró que la media de la concentración de cGH liberada ante la estimulación de 1nM (63.68 ± 10.56 ng cGH/ ml) fue mayor en comparación con respecto al control (33.5 ± 10.56 ng cGH/ ml) y a los otros tratamientos (10 y 100 nM GHRH, 45.35 ± 25.11 y 49.05 ± 20.80 ng cGH/ml), pero sin exhibir diferencia significativa con esto últimos. Se observaron medias mayores en los otros dos tratamientos con respecto al control pero sin expresar una diferencia estadística significativa.

Cuantificación de cGH liberada

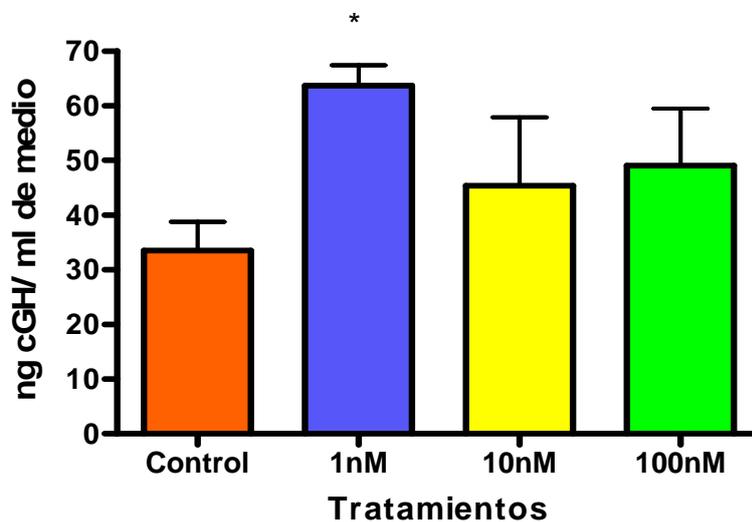


Figura 11. Concentración de cGH en medios de cultivos primarios de células testiculares incubadas de pollos de 26 ± 1.0 semanas de edad en presencia de diferentes concentraciones de GHRH (1, 10 y 100 nM) durante 2 h, determinada por ELISA. Cada barra representa la media \pm error estándar de una $n=8$. (*) Señala diferencia significativa al compararse con el control con una $p < 0.05$.

Se realizó el análisis de la concentración con una normalización por miligramo de proteína en otro grupo de 5 pollos con una edad de 26 semanas (Figura 12). La estimulación con una concentración de 1nM de secretagogo produjo una liberación mayor, no significativamente diferente al compararse con el control. Por lo cual se sugiere que la liberación de GH en cultivos primarios de células testiculares de pollo no es dependiente de la dosis del factor liberador GHRH pero si existe un efecto al estimular la células testiculares.

Cuantificación de cGH liberada

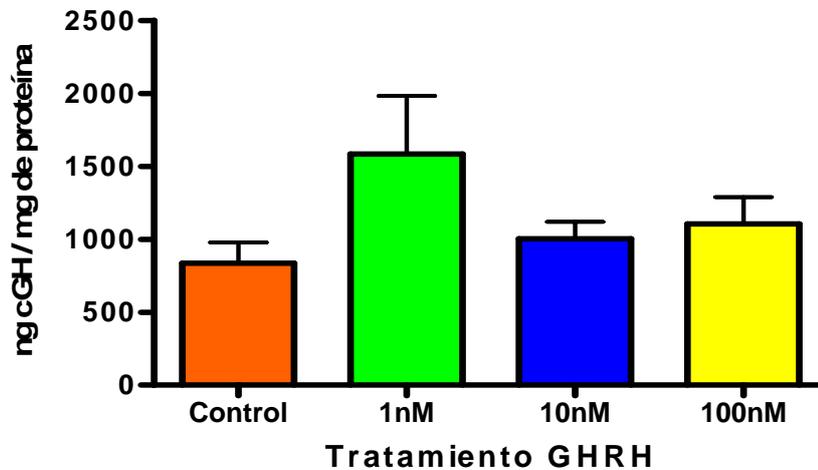


Figura 12. Concentración de cGH total en medios de cultivos primarios de células testiculares de pollos de 26 semanas incubadas en presencia de diferentes concentraciones de GHRH (1, 10 y 100 nM) durante 2 h, determinada por ELISA. Las unidades se expresan en nanogramos (ng de GH) por miligramo (mg) de proteína. Cada barra representa la media \pm error estandar de una n=5 p<0.05. Pollos de 26 semanas.

En el caso del grupo con edad de 31.5 ± 1.0 semanas se determinó una respuesta promedio < 15 ng de GH/ ml de medio de cultivo (Figura 13), se observó una tendencia al incremento con respecto al tratamiento. Se encontró que el control (3.2 ± 0.79 ng cGH/ ml) no tiene diferencias significativa cuando los cultivos se tratan con la menor concentración de GHRH (1nM), mientras que con las de 10 nM (7.62 ± 0.61 ng cGH/ ml) y 100 nM (8.5 ± 2.52 ng cGH/ ml) se observó un incremento significativo de la liberación de ($P < 0.05$) y ($P < 0.01$) respectivamente.

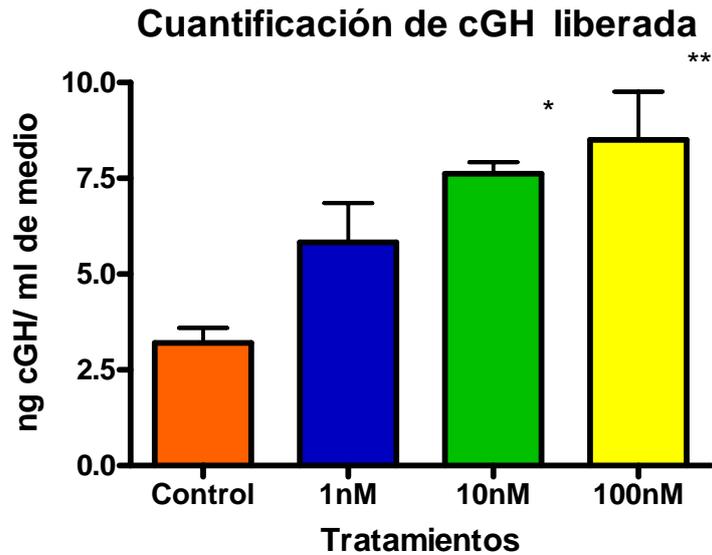


Figura 13. Concentración de cGH en medios de cultivos primarios de células testiculares de pollo de 31.5 ± 1.0 semanas de edad incubadas en presencia de diferentes concentraciones de GHRH (1, 10 y 100 nM) durante 2 h determinada por ELISA. Cada barra representa la media \pm error estándar de una $n=8$. Diferencias significativas con una $p < 0.05$ (*) y $P < 0.01$ (**).

Cuantificación de Hormona de Crecimiento en Células Testiculares en Cultivo

Con respecto a la concentración de cGH cuantificada en 4.5 millones de células en cultivo ésta se encuentra representada en la Figura 14. Los datos muestran que las células en condiciones control mostraron una mayor concentración de la GH con respecto a las cultivadas en presencia de GHRH a las diferentes concentraciones, siendo significativamente menor la concentración de 10 nM con una $p < 0.01$. Se utilizaron animales con una edad (25-32 semanas).

Quantificación de cGH en Células Testiculares

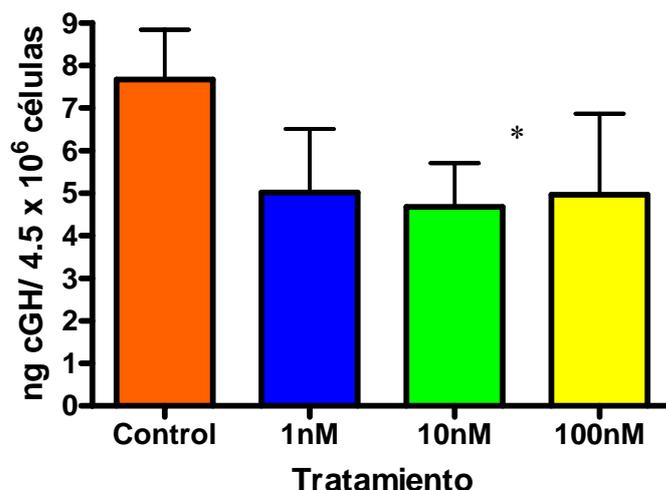


Figura 14. Concentración de cGH en 4.5×10^6 de células testiculares incubadas en presencia de diferentes concentraciones de GHRH (1, 10 y 100 nM) durante 2 h determinada por ELISA. Las unidades se expresan en nanogramos (ng) de cGH por 4.5 millones de células. Cada barra representa la media \pm error estándar de una n=8. (*) señala diferencia significativa. $P < 0.01$.

Quantificación de cGH en células testiculares

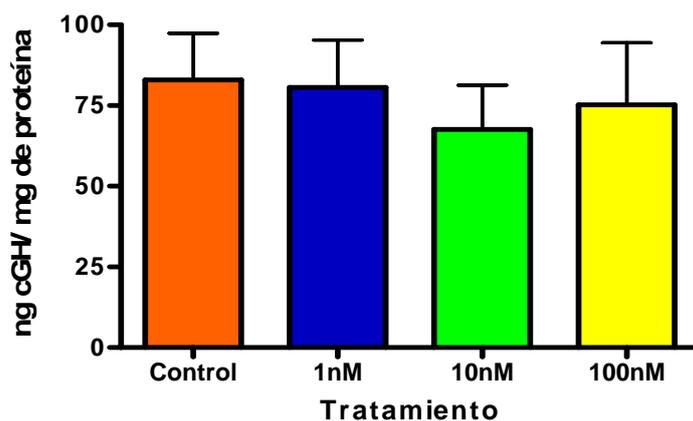


Figura 15. Concentración de cGH en células testiculares en cultivo incubadas en presencia de diferentes concentraciones de GHRH (1, 10 y 100 nM) durante 2 hrs determinada por ELISA. Las unidades se expresan en nanogramos (ng) de cGH por miligramo (mg) de proteína. Cada barra representa la media \pm error estándar de una n=5. No existen diferencias significativas ($P < 0.05$)

Se realizó la cuantificación de cGH en células con una normalización a partir de 1 miligramo (mg) de proteína (Figura 15) se encontró que el comportamiento de secreción se mantiene al ser comparado con el análisis a partir de 1 ml de medio de cultivo. No existen diferencias significativas ($P < 0.05$) entre el control (67.01 ± 14.47 ng cGH) y los tratamientos con GHRH (70.81 ± 12.12 ng 1nM, 56.29 ± 11.93 ng 10nM, 58.06 ± 17.31 ng 100nM), pero se puede observar una disminución en la media de la concentración de la cGH en los tratamientos 10 nM y 100 nM con respecto al control.

Inmunocitoquímica

La inmunocitoquímica de los cultivos primarios de células testiculares mostraron una gran proporción de células inmuno-reactivas (IR) como se muestra en la micrografías panorámicas a 10x de amplificación (Figura 16).

Esta inmuno-reactividad está presente en células de los cultivos mantenidos tanto en condiciones control así como en los diferentes tratamientos con GHRH (1, 10 y 100nM). La especificidad de la tinción se mostró por la ausencia de señal de un control negativo (sin primer anticuerpo contra cGH) y con el uso de un anticuerpo preabsorbido con un exceso de cGH.

A mayor aumento (40x) se muestran en la Figura 17 las mismas condiciones experimentales y se observan con mayor claridad las células IR (señaladas con flechas) que por su morfología y tamaño se presume que son células germinales. A pesar de que la caracterización de estas células no se pudo realizar con precisión debido a que los cultivos mostraron agrupamientos celulares y no una monocapa como en los cultivo clásicos, se uso un marcador para células germinales C-kit , que es un proto-oncogen importante en la migración de células germinales y en maduración, por lo tanto sirve como marcador propio de dichas células (Figura 18).

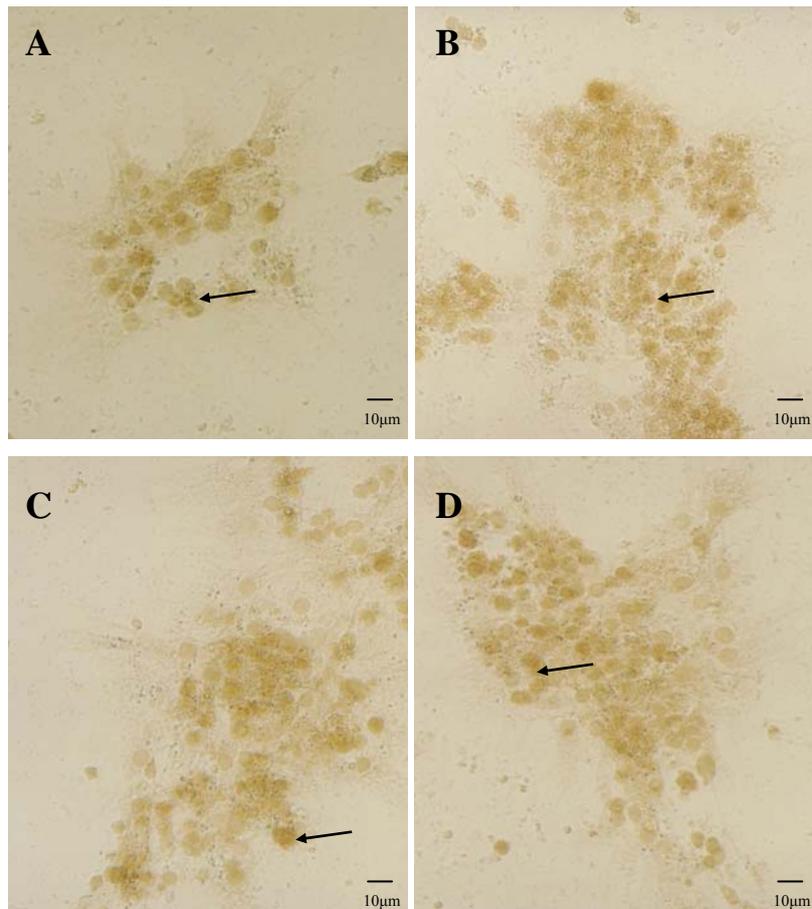


Figura 16. Cultivo primario de células testiculares mantenidas en condiciones control inmunoteñidas con un anticuerpo policlonal contra cGH y reveladas con un anticuerpo secundario marcado con peroxidasa de rábano y diaminobenzidina. **A)** Se muestra un cultivo mantenido en condiciones control (incubación 2hr) (10X) **B)** cultivo estimulado en presencia de GHRH 1nM (10X) y **C)** cultivo estimulado en presencia de GHRH 10nM (10X) y **D)** cultivo estimulado en presencia de GHRH 100nM(10X). Las flechas señalan ejemplos de células inmuno-positivas.

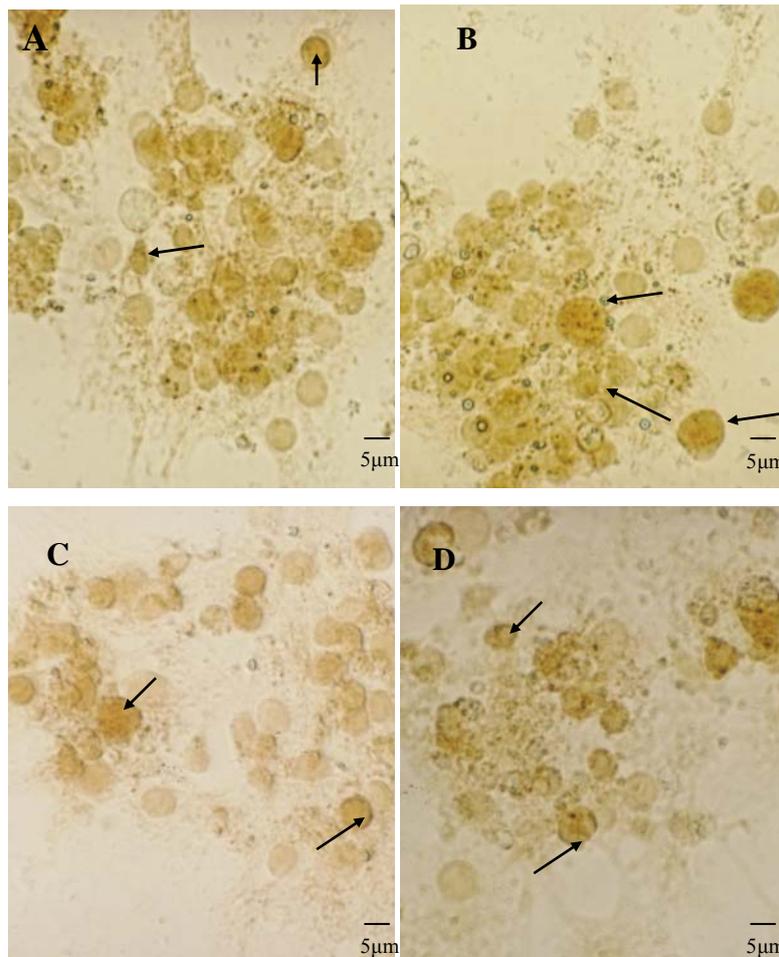


Figura 17. Cultivo primario de células testiculares mantenidas en condiciones control inmunoteñidas con un anticuerpo policlonal contra cGH y reveladas con un anticuerpo secundario marcado con peroxidasa de rábano y diaminobenzidina. **A)** muestra un cultivo mantenido en condiciones control (incubación 2hr) (40X) **B)** cultivo estimulado en presencia de GHRH 1nM (40X). **C)** cultivo estimulado con 10nM de GHRH(40X) y **D)** cultivo estimulado en presencia de GHRH 100nM(40X). Las flechas señalan células con inmuno-positividad

En la Figura 18 (A) Se muestra un control negativo en el que se utilizó un anticuerpo pre-adsorbido y no se observan células teñidas, (B) se observan

células inmuno-reactivas con el anticuerpo policlonal contra C-Kit el cual tiñe específicamente a las células germinales y en (C) observamos inmuno-reactividad con el anticuerpo CAP-1 contra cGH.

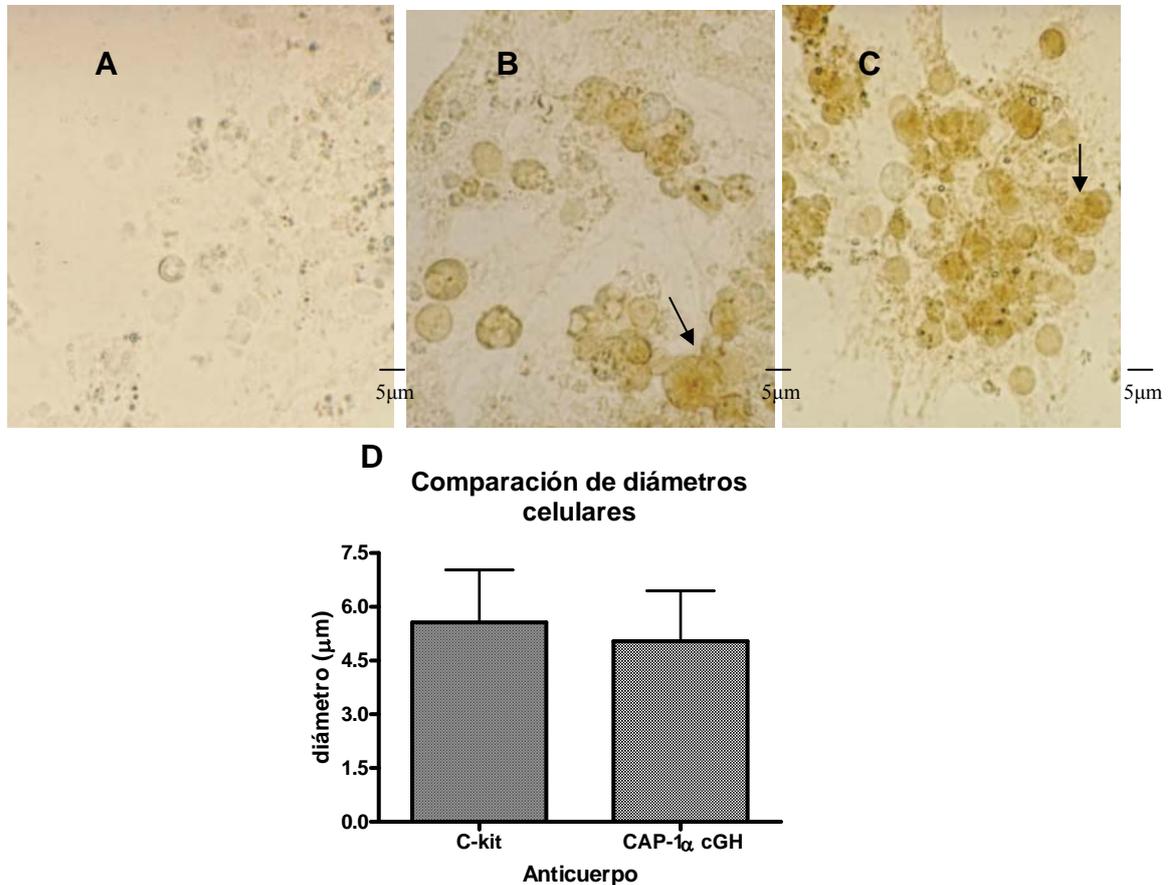


Figura 18. Inmunocitoquímica de células testiculares de pollo en cultivo reveladas con anticuerpo secundario marcado con peroxidasa de rábano y diaminobenzidina. A) Muestra un control negativo pre-adsorbido de células testiculares incubadas en condiciones control (20 X) con contraste de fases. B) Células teñidas con anticuerpo policlonal contra C-Kit (40x) condiciones control. C) Células teñidas con anticuerpo policlonal contra hormona de crecimiento cGH en condiciones control. D) Gráfica de barras donde se muestra la comparación de diámetros celulares. Muestra la media \pm desviación estándar de los diámetros (μm) de células marcadas. Las flechas señalan inmuno-positividad.

Se compararon morfológicamente las células IR al anticuerpo contra cGH (CAP-1) con las IR al anticuerpo contra C-kit para determinar si correlacionan los marcajes con el fin de saber si la línea germinal presenta inmuno-marca. Se utilizó el software image Proplus para realizar el análisis de morfometría. Los resultados mostraron no tener diferencias significativas entre los dos grupo al

presentar una media de diámetro de $5.5 \pm 1.4 \mu\text{m}$, para las células marcadas con el anti-C-kit y de $5.0 \pm 1.4 \mu\text{m}$ para las células marcadas con Cap-1 (Figura 18D). Con base a estos resultados podemos señalar que ambos anticuerpos reconocen células redondas y con núcleo excéntrico las cuales aparentemente son células germinales en sus primeras etapas.

Análisis de Variantes Moleculares a través de SDS-PAGE y Western Blot

La técnica de ELISA implementada en nuestro laboratorio permite cuantificar la mayoría de las isoformas de cGH sin discriminar entre ellas, es decir no permite identificar las variantes moleculares de la hormona de crecimiento para éste caso particular. Este análisis se llevó a cabo por medio de SDS-PAGE en condiciones reductoras y western blot, en el que se utilizó un anticuerpo policlonal contra cGH CAP-1 generado en conejo a una concentración 1:10000. Se realizaron cultivos celulares de testículo de pollo de 26 semanas y se estimularon con concentraciones de 1nM, 10nM y 100nM de GHRH. Se analizó el medio y las células de 5 individuos de manera independiente.

Análisis de variantes moleculares de cGH liberadas al medio de cultivo

Al realizar el análisis densitométrico se determinó que las formas GH-IR liberadas al medio de cultivo fueron las de 50, 44, 26, 17 y 15 kDa; como se muestra en la Figura 20.

Con respecto a otras formas oligoméricas se observó la secreción de una banda de aproximadamente 50 kDa, la cual se secreta con los diferentes tratamientos de GHRH ($17.3 \pm 1.2 \%$ 1nM, $11.9 \pm 0.7 \%$ 10nM y $11.4 \pm 3.4 \%$) así como de manera constitutiva ($14.0 \pm 4.3 \%$) pero no se ve una correlación dependiente de la dosis del secretagogo.

Se observa una tendencia a incrementarse la proporción relativa de la banda de 44 kDa (Tabla 1) no dependiente de la dosis al aplicar el GHRH y se expresa una diferencia significativa ($P < 0.05$) al comparar el control (20.5 ± 4.8 %) con el tratamiento a 10 nM (11.8 ± 3.4).

En los cultivos tratados con GHRH a concentraciones 1nM, 10nM y 100nM la presencia del monómero de 26 kDa (10.0 ± 5.3 %, 9.8 ± 1.2 % y 7.5 ± 2.1 % respectivamente) presenta un decremento con respecto al control (19.5 ± 5.7 %) de manera significativa ($P < 0.05$) cuando se aplican los diferentes tratamientos.

La forma de 15 kDa presentó las siguientes proporciones relativas 27.11 ± 8.2 % para 1nM, 33.86 ± 8.11 % para 10nM, 24.17 ± 6.8 % para 100nM de GHRH y la variante de 17 kDa de 29.87 ± 2.1 % para 1nM, 18.83 ± 5.1 % para 10nM, 20.01 ± 5.2 % para 100nM de GHRH presentan un incremento en su liberación al compararse con las presentes en el grupo control 17.70 ± 8.8 % para la de 15kDa y 20.30 ± 7.7 % para la de 17 kDa (Tabla 1).

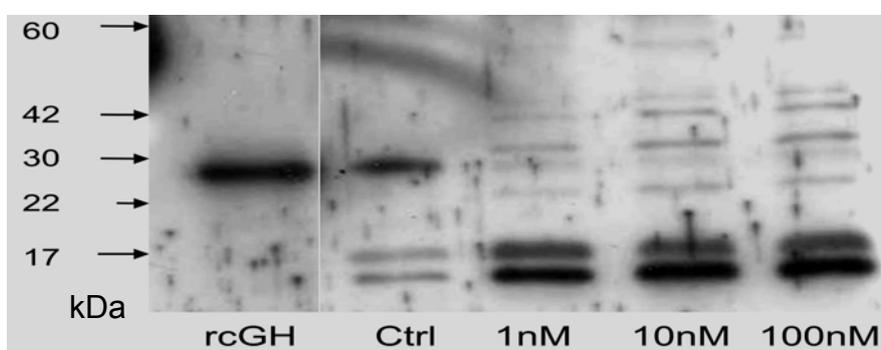


Figura 20. Luminograma representativo de bandas IR-GH en medio de cultivo M199; determinado por SDS-PAGE (Condiciones Reductoras) transferidas a membrana de nitrocelulosa, y teñidas con anticuerpo primario anti-cGH generado en conejo y un segundo anticuerpo asociado a peroxidasa de rábano revelado con quimioluminiscencia (ECL). Análisis densitométrico de bandas GH-IR. hormona de crecimiento recombinante de pollo (rcGH), control sin tratamiento con GHRH (ctrl.) y tratamientos con GHRH, 1nM, 10nM y 100nM respectivamente. Se colocaron 30 μ g de proteína por carril. Escala de valores en kDa. 26 semanas de edad.

Variantes moleculares de cGH en medio de cultivo de células testiculares

	Control	1nM GHRH	10nM GHRH	100nM GHRH
P.M.	%	%	%	%
15 kDa	19.22±8.8	26.88±8.2	39.33±8.11*	31.47±6.8
17 kDa	22.04±7.7	29.66±2.1*	21.81±5.1	26.01±5.2
26 kDa	21.28±5.71	9.92±5.3	11.37±1.2*	9.75±2.1*
44 kDa	22.26±4.8	16.37±4.5	13.69±3.4*	17.95±5.8
50 kDa	15.2±4.3	17.16±1.2	13.81±0.75	14.87±3.4

Tabla 1. Se muestra la media y desviación estándar de la proporción relativa de las principales bandas inmuno-reactivas (IR) (15, 17, 26, 44, 50 kDa) en medio de cultivo en las diferentes condiciones experimentales (tratamientos GHRH 1nM, 10nM y 100nM) con 2 horas de incubación en medio de cultivo M199 a 37 C°. Obtenidas por un análisis densitométrico del luminograma. Animales de 26 semanas de edad. (*) Señala diferencia significativa P<0.05. n=5.

El patrón de variantes moleculares de GH fue semejante entre los pollos con relación a su edad (datos no mostrados) en ésta ventana de tiempo de 25 a 35 semanas.

Análisis de variantes moleculares de cGH en células en cultivo

En lo que concierne al análisis de bandas inmuno-reactivas al anticuerpo policlonal contra cGH en las células cultivadas y tratadas se muestran en el luminograma de la Figura 21, a partir del cual por densitometría se obtuvieron las proporciones relativas de las bandas de 50, 44, 35, 26, 22 y 17 kDa (Tabla 2). Las formas de 50 y 44 kDa no presentan diferencias significativas entre el control y los tratamientos.

La banda de mayor densidad dentro de las células fue la de 35 kDa en todas las condiciones (27.9 ± 7.7 % control, 23.3 ± 10.6 % 1nM, 23.3 ± 10.2 % 10nM y 20.8 ± 7.9 %), que podría ser una formación de dímeros a partir de las variantes de bajo peso molecular o bien el resultado de modificación postraducciona del monómero de 26 kDa.

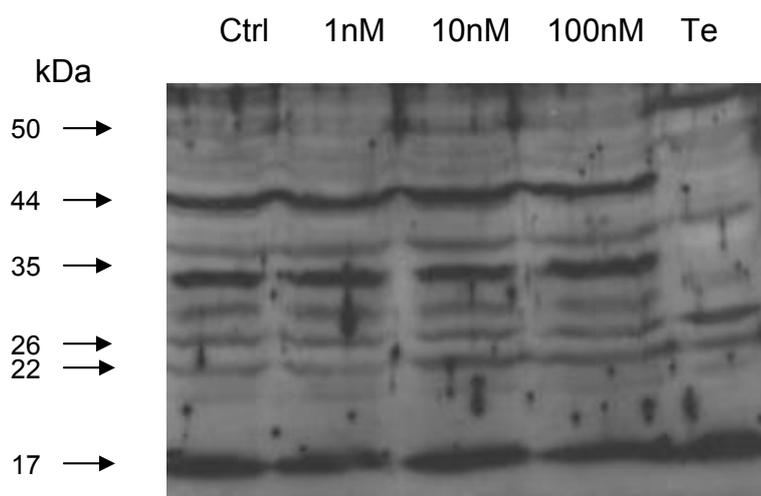


Figura 21. Luminograma representativo de bandas IR-GH de células testiculares cultivadas de pollos de 26 semanas; determinado por SDS-PAGE (R) transferidas a membrana de nitrocelulosa, y teñidas con anticuerpo primario anti-cGH generado en conejo y un segundo anticuerpo asociado a peroxidasa de rábano revelado con quimio-luminiscencia (Western Blot). Análisis Densitométrico de bandas GH-IR., extracto de testículo (Test), control de células sin tratamiento con GHRH (ctrl.) y células tratadas con GHRH, 1nM, 10nM y 100nM respectivamente. Se colocaron 30 μ g de proteína por carril. Escala de valores en kDa a partir de marcadores de peso molecular.

Variantes moleculares de cGH en células testiculares en cultivo

	Control	1nM GHRH	10nM GHRH	100nM GHRH
P.M.	%	%	%	%
17 kDa	24.66 \pm 9.7	30.49 \pm 8.7	35.81 \pm 10.8	34.07 \pm 10.5
22 kDa	12.82 \pm 4.3	6.65 \pm 2.0	6.75 \pm 1.7	6.96 \pm 1.6
26 kDa	7.37 \pm 1.9	7.57 \pm 2	7.88 \pm 2.3	9.62 \pm 0.8
35 kDa	28.55 \pm 7.7	23.7 \pm 10.6	23.84 \pm 10.2	21.28 \pm 7.9
44 kDa	11.36 \pm 4.7	13.4 \pm 3.7	9.31 \pm 2.9	8.6 \pm 2.4
50 kDa	15.25 \pm 5.7	16.17 \pm 4.0	13.61 \pm 3.2	17.39 \pm 2.9

Tabla 2. Se muestra la media y desviación estandar de la proporción relativa de las principales bandas inmuno-reactivas (IR) (17, 22, 26, 35, 44, 50 kDa) en células testiculares cultivadas en las diferentes condiciones experimentales (tratamientos GHRH 1nM, 10nM y 100nM) con 2 horas de incubación en medio de cultivo M199 a 37 °C. Obtenidas por un análisis densitométrico del luminograma. n=5.

La proporción relativa de la banda de 22 kDa disminuyó alrededor del 35 % al compararla entre las células control ($12.5 \pm 4.2 \%$) y las estimuladas con GHRH ($6.49 \pm 1.9 \%$, $6.55 \pm 1.66 \%$, $6.76 \pm 1.64 \%$) (Tabla 2).

La banda de 17 kDa de peso molecular se encuentra presente en todas las condiciones ($24.1 \pm 9.7 \%$, $29.8 \pm 8.7 \%$ 1nM, $35.0 \pm 10.8 \%$ 10nM y $33.3 \pm 10.5 \%$ 100nM) y no se observó un efecto del tratamiento sobre su proporción relativa.

Análisis estadístico de liberación de isoformas de cGH a medio de cultivo

Cuando se lleva a cabo el análisis y comparación de la proporción relativa de cada variante en las diferentes condiciones experimentales como se muestran en la Figura 22, se observa en lo que respecta al monómero de 26 kDa que existe un decremento en la cantidad liberada en todos los tratamientos ($10.01 \pm 5.3 \%$ 1nM, $9.75 \pm 1.23 \%$ 10nM, $7.46 \pm 2.01 \%$ 100nM) con respecto al control ($19.57 \pm 5.71 \%$), lo que sugiere que esta variante molecular no se libera bajo la estimulación de la hormona liberadora de la hormona de crecimiento después de ser incubada durante 2 h.

Para el caso de la banda de 17 kDa se ve un efecto en la concentración de GH al aplicar el tratamiento 1nM ($29.87 \pm 2.13 \%$) expresando una diferencia significativa al compararse con el control ($20.3 \pm 7.79 \%$); en tanto, los otros 2 tratamientos (10 y 100 nM) presentan una media mayor al ser comparados también, pero no se modifican con la dosis.

Se observó que el incremento de GHRH sobre la liberación del fragmento de 15 kDa de cGH en el medio de cultivo solo presenta diferencias significativas al comparar el grupo control ($17.7 \pm 8.89 \%$) y el tratamiento 10nM ($33.86 \pm 8.11 \%$). Esta banda (15 kDa) podría tener origen a partir de proteólisis limitada del monómero de 26 kDa como ocurre en la hipófisis, aunque habría que demostrarlo de forma concluyente.

Efecto de GHRH sobre la liberación de variantes moleculares de cGH en cultivos de células testiculares de pollo.

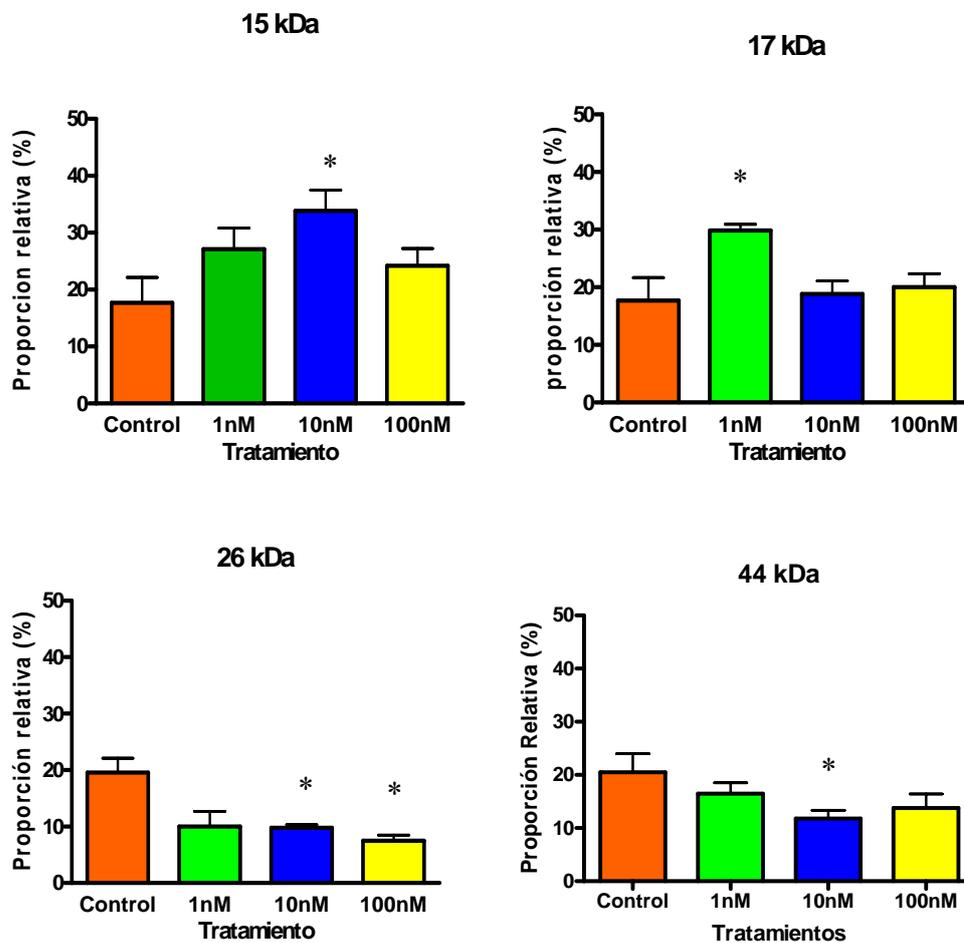


Figura 22. Análisis del efecto de GHRH sobre la liberación de variantes moleculares en medio de cultivo. Se muestran gráficas de barras de proporción relativa de banda IR-GH de 15, 17, 26 y 44 kDa en cada caso experimental (control, 1nM, 10nM y 100nM) con 2 horas de incubación en medio M199. Los resultados representan la media \pm SEM. n=5 (*) señala diferencia significativa al compararse con el control ($P < 0.05$).

Discusión

Datos previos del laboratorio han demostrado claramente la presencia de una proteína con inmuno-reactividad semejante a GH en el testículo y el tracto reproductor masculino de pollos, sugiriendo un papel local de la hormona de crecimiento en la función reproductora de machos.

La GH inmuno-reactiva (GH-IR) en el testículo estuvo claramente asociada con proteínas de múltiples tamaños. Esta heterogeneidad molecular es también característica de la GH hipofisiaria y algunas de estas variantes son generadas por modificaciones postraduccionales. Las diferencias en la proporción relativa de las variantes moleculares encontradas en el testículo comparadas con la hipófisis, pueden sugerir que la traducción del ARN mensajero de GH o el procesamiento de la hormona madura pueda ser órgano-específica y estar relacionada a la edad.

Actualmente está bien establecido que el testículo y el aparato reproductor son sitios blanco para la acción de la GH (Hull y col 2000). Tanto el receptor a GH (GHR) como su ARN mensajero están presentes en testículo de fetos y ratas adultas (Lobie y col., 1990, 1992) y el ARNm de GHR está presente en testículo de pollos adultos (Harvey y col 2004). Esto señala que además de la regulación endocrina que ejerce la GH hipofisiaria, como es su participación en la esteroidogénesis y la gametogénesis, la producida localmente podría tener un efecto autócrino y/o parácrino.

En cuanto a la etapa de madurez sexual se ha señalado que la GH está relacionada al desarrollo de células germinales sin embargo, la proteína no se encuentra presente en espermatogonias, pero sí en espermatocitos, espermátides o células intersticiales por lo que se ha señalado un efecto parácrino o bien indirecto a través del factor de crecimiento parecido a la insulina tipo I (IGF-I). Por otra parte, resultados de Tanaka y col. (1996) sugieren que en el testículo de pollo la GH parece no tener efecto o incluso inhibe la expresión del mensajero para el IGF-I. Por lo que es de gran interés que tanto hormona liberadora de la hormona de crecimiento (GHRH) como su mensajero estén presentes en células germinales y contengan un promotor

espermático específico que promueve la expresión de genes que inducen la espermatogénesis (Srivastava et al., 1995). La GHRH testicular en rata así como la GH-IR en testículo de pollo parecen tener una relación con la etapa de diferenciación en las células germinales y no están presentes en espermatozoides maduros (Fabbri et al., 1995; Luna et al., 2004).

Esta tesis es uno de los primeros trabajos que señalan la implicación funcional de la GHRH en la secreción de isoformas de cGH en células testiculares de pollo en cultivos primarios. Se conoce que la regulación a nivel hipotalámico de la síntesis y liberación de hormona de crecimiento se encuentra modulada por diversos factores como son GHRH, somatostatina, y TRH, destacando la GHRH como el principal actor en lo que respecta a la inducción de la secreción (Devesa et al., 1992).

Estudios recientes ha demostrado la presencia de muchos neuropéptidos (LHRH, GHRH, TRH, PACAP, secretina, somatostatina) y sus receptores en el aparato reproductor masculino sugiriendo que estos péptidos operan como reguladores locales del desarrollo y función de las células germinales e intersticiales de mamíferos. Sin embargo, su preciso papel fisiológico y su mecanismo de acción aun no se conoce (Pescovitz et al., 1990, Zhang et al., 1995, Li M. et al., 2003, Moretti et al., 2002). Estudios ontogénicos revelan que el mensajero de GHRH se incrementa con la edad y la localización inmunohistoquímica de la proteína IR (GHRH-IR) reveló que se encuentra localizada dentro del testículo en células germinales maduras y en las menos diferenciadas (espermatogonias), lo cual les permitió especular sobre su participación en la espermatogénesis (Pescovitz et al., 1990). También demostraron que el GHRH testicular tiene la capacidad de estimular la secreción de GH en cultivos de células hipofisarias sugiriendo que muestran la misma función biológica de la GHRH de origen hipotalámico. Si embargo, esto no implica que ésta sea la principal función de la GHRH testicular (Pescovitz et al., 1990).

La existencia de estos estudios que han mostrado la co-localización extrahipofisaria de la GHRH y su receptor en testículo de rata (Pescovitz et al.,

1990, Moretti et al., 2002) así como estudios de nuestro laboratorio que demostraron la presencia del ARNm de cGH y de la proteína en testículo de pollo (Luna et al, 2004, Harvey et al., 2004), nos permitieron sugerir un posible mecanismo de activación sobre la liberación de hormona de crecimiento testicular de pollo al medio de cultivo celular.

Se decidió instrumentar un modelo *in vitro* para estudiar la regulación a nivel local de la liberación de la hormona de crecimiento en tejido testicular. Mediante la realización de cultivos primarios de células testiculares fue posible la manipulación experimental controlada del factor liberador clásico, el GHRH, para determinar así su posible efecto con respecto a la liberación de GH.

En este trabajo se logró establecer un cultivo viable de células de testículo de pollo adulto con una sobrevivencia del 87.5 % a las 48 h de incubación. Se utilizó este tiempo de incubación, ya que se sabe que el crecimiento de fibroblastos no ocurre hasta 72 h en concordancia con los datos aportados por Nagano y colaboradores en 1998. Por lo tanto los experimentos se realizaron a las 48 h después de la siembra inicial, y una vez estabilizadas las células en cultivo. El método de dispersión y siembra utilizado fue previamente desarrollado por Nagano y su grupo de investigación, y modificado por nosotros específicamente con respecto al medio de cultivo, ya que se usó un nuevo medio de cultivo más enriquecido, Megacell (constituido por la mezcla DMEM y F12 y SFB al 3%) (Sigma) en lugar del DMEM con 10% de SFB.

Para evaluar el tiempo óptimo de incubación con el factor de liberación GHRH las células de diferentes animales fueron cultivadas de manera conjunta (pool o lote) y se incubaron durante 48 horas a 37 °C en un medio enriquecido a fin de permitir que las células se recuperen del proceso de disgregación tisular, reintegrando así proteínas de membrana (receptores), y que las células puedan responder a la activación por factores u hormonas liberadoras como en este modelo el GHRH.

Los tiempos de prueba utilizados fueron 2 y 8 h para la incubación con el secretagogo, se determinó que el tiempo óptimo fue de 2 h. Aunque no existió

una diferencia significativa al comparar cada una de las condiciones entre ambos experimentos, si se observó una media mayor en los tratamientos de 2 h con respecto a las 8 h. Cabe destacar la existencia de una diferencia significativa al comparar el control contra la condición de incubación a 100nM de GHRH a 2 h de incubación, señalando así que existe liberación de GH inducida a través del tratamiento con el factor liberador.

Se realizó la optimización de cultivos primarios en células de pollos de 20-22 semanas de edad, sembradas y cultivadas de manera conjunta (n=3), fue posible determinar un efecto de estimulación ya que como antes se señaló se observaron diferencias significativas al compararse el contenido de GH en el medio de cultivo de células estimuladas con 100 nM de GHRH contra el control ($p < 0.05$). Es posible señalar que no existe una respuesta dependiente de la dosis de GHRH, pero es posible una tendencia de aumento en la media de la concentración de GH en los otros 2 tratamientos (1 y 10 nM) con respecto al control.

Los experimentos tiempo-respuesta mostraron una pérdida de hormona a las 8 horas que podría ser dada por la degradación de la hormona liberada o bien por la internalización celular o procesamiento de la misma, aunque faltan evidencias para poder describir lo que ocurre con la hormona al ser liberada al medio. Existen datos de depleción de hormonas hipofisarias a nivel plasmático donde se ha descrito que factores como el pH, la interacción con grupos tiol y el bicarbonato se han relacionado a éste fenómeno en el cual existe una baja en la detección de PRL (Mena et al., 1986).

Para la cuantificación de la hormona de crecimiento de pollo liberada al medio de cultivo también se realizaron los cultivos de manera independiente, es decir, por individuo. Al analizar el contenido de GH en células en cultivo de animales con un promedio de edad de 26.5 ± 1.0 semanas, encontramos que existen diferencias estadísticamente significativas al comparar el control contra el tratamiento con 10 nM de GHRH ($P < 0.05$) (Figura 12). Estos datos señalan un efecto sobre la concentración de cGH liberada en células en cultivo a esta

dosis. Sin embargo, al normalizar el experimento por mg de proteína y realizar el análisis estadístico no fue posible encontrar diferencia significativa.

Existe concordancia en este grupo de animales (26.5 ± 1.0 semanas de edad) respecto a la dosis óptima de respuesta previamente reportada por Martínez-Coria et al. (2002) en los que se observó que los somatotropos responden óptimamente liberando cGH ante la adición de concentraciones fisiológicas del orden de 2nM de GHRH.

Por otra parte, se observó un efecto dependiente de la dosis sobre la liberación en los cultivos celulares del otro grupo de animales, con una media de 31.5 ± 1.0 semanas de edad, los cuales presentaron una baja respuesta al GHRH para la liberación de cGH al medio (Figura 13). En estos medios de cultivo se detectó una concentración menor a 15 ng de cGH/ml de medio y el comportamiento del efecto de la estimulación de GHRH mostró que todas las medias de la concentración de GH en los medios de cultivo estuvieron por arriba del control, expresando una diferencia significativa para el tratamiento de 10 nM y 100nM con una de $P < 0.05$ y $P < 0.01$ respectivamente. Por otra parte, el tratamiento de 1nM no presentó una diferencia significativa al analizar por medio de una ANOVA de una vía, sin embargo es posible observar una tendencia de la media de la concentración de cGH por arriba del control. Esta tendencia en la liberación de la cGH ante la estimulación con GHRH, así como la cantidad de hormona detectada es concordante entre los cultivos realizados para la optimización de los tiempos y los cultivos del grupo de animales de mayor edad.

Grupo de pollos	[GHRH] nM	significancia
21.0 \pm 1 semanas	100 nM	P<0.05
26.5 \pm 1 semanas	10 nM	P<0.05
31.5 \pm 1 semanas	10nM	P<0.05
31.5 \pm 1 semanas	100nM	P<0.01

Tabla 3. Se muestran los diferentes grupos de pollos por edades y la diferencia significativa al comparar el tratamiento con el control

Con el objeto de determinar cual o cuales son los posibles factores que están influyendo en esa respuesta diferencial al GHRH para inducir la liberación de GH en los cultivos primarios de células testiculares, se puede plantear que uno de ellos es la edad, ya que fue posible observar que los cultivos celulares que respondían con una mayor magnitud en lo que respecta a la cGH liberada al medio provenían del grupo de pollos de menor edad (26.5 ± 1 semanas), en tanto que el promedio de edad del grupo de animales cuyos testículos respondieron liberando una menor concentración fue de 31.5 ± 1 semanas, lo que sugiere que este patrón de secreción es específico de etapa o que se encuentra relacionado a un evento fisiológico en torno a las 25 semanas de edad que se ha asociado a la etapa del inicio de la actividad sexual (Tabla 3). Estudios previos de nuestro laboratorio demostraron que la concentración de cGH medida a través de ELISA en extractos de testículo no sufre cambios significativos entre la semana 15 y 36 de edad (Luna et al., 2004). Aunque se observó una tendencia a disminuir, en éste trabajo fue posible observar una clara diferencia en la liberación de la GH en esta edad intermedia (22, 26.5, 31.5 semanas).

En estos cultivos no fue factible realizar la cuantificación del número total de células IR al anticuerpo contra GH, debido al comportamiento de agregación de las células testiculares en cultivo primario, lo que no permitió realizar la estimación del número de células con marcas positivas tanto en condiciones control como en las estimuladas con el GHRH. Si bien, este método solo nos permitió confirmar la presencia de cGH-IR en células testiculares de pollo en cultivo, no permitió cuantificar las inmuno-positivas así como tampoco determinar el tipo celular que contenía a la GH y el efecto de tratamiento de GHRH sobre estas células. Existen datos recientes de cultivos realizados en 3 dimensiones en geles de colágena en los cuales se ha visto que las células forman agregados celulares en los cuales se expresan específicamente hormonas y proteínas relacionadas a etapas específicas dentro de la espermatogénesis, las cuales comparativamente con la modalidad de cultivos en monocapa tienen una menor expresión (Lee et al., 2006).

La caracterización respecto al linaje celular se realizó con un anticuerpo policlonal contra un antígeno de membrana específico de línea germinal, C-kit (Fleishman et al., 1993) y a través de un análisis citométrico comparativo, con el cual se midieron células con marca positiva contra éste anticuerpo y se compararon a partir de su área y radio con células IR para el anticuerpo contra cGH. Los resultados no mostraron diferencia significativa en el tamaño y forma de las dos poblaciones de células IR al realizarse el análisis estadístico por lo que es posible señalar que ambos anticuerpos reconocen células semejantes en forma y tamaño siendo principalmente células germinales.

Se ha podido detectar inmuno-reactividad para hormona de crecimiento en cortes histológicos de testículo. En estudios anteriores fue posible distinguir un marcaje positivo en células germinales (espermatoцитos y espermátides) y en células intersticiales o de Leydig, (Luna et al., 2004) igualmente por medio de hibridación *in-situ* fue posible detectar el ARNm de cGH en espermatogonias y espermatoцитos primarios (Harvey et al., 2004).

A nivel testicular, la GH-IR se ha asociado con el desarrollo de células germinales, aunque no está presente en espermatogonias. Es por ello, el interés de algunos grupos por estudiar la actividad mitótica de la GH en células germinales (Loir, 1999) y otros estudios sobre la regulación de la longevidad de espermatozoides *in vitro* (Champion et al., 2002). También es de interés que la GHRH y el ARNm de GHRH estén presentes en células germinales de la rata (Fabbri et al., 1995; Pescovitz et al., 1990) y humano (Srivastava et al., 1993). Esta GHRH testicular en la rata, muestra un comportamiento similar a la GH en el pollo ya que aparentemente tienen una regulación específica de etapa, se encuentra presente en etapas tempranas de células germinales y no se encuentra en espermatozoides maduros (Fabbri et al., 1995). Así mismo la GHRH testicular en la rata (Fabbri et al., 1995) como la GH testicular en pollo, parecen estar ausentes en células de Sertoli. En contraste, inmuno-reactividad al receptor (GHR-IR), está presente en células intersticiales (células de Leydig) de rata, en las cuales se ha visto que la adición del monómero exógeno de GH activa la esteroidogénesis (Kanzaki y Morris, 1999).

El análisis de la concentración de cGH a través de ELISA no permite distinguir un efecto modulador específico sobre alguna de las variantes moleculares o isoformas de la hormona de crecimiento en particular es por ello que la instrumentación del análisis de variantes moleculares a través de western blot de hormona de crecimiento fue la metodología seleccionada para el cumplimiento de este objetivo. Existen datos que involucran a la GHRH en la regulación diferencial de la secreción de estas isoformas a nivel hipofisiario así como en procesos de modificaciones postraduccionales que se encuentran correlacionadas con la activación del receptor de GHRH (Martínez-Coria et al., 2002).

La técnica de western blot es una herramienta importante cuando se pretende caracterizar variantes de masa de una proteína mediante la utilización de un anticuerpo policlonal, principalmente en el caso de una familia de proteínas como lo son la hormona de crecimiento de pollo. Se han descrito variantes de masa y de carga a nivel hipofisiario a las cuales se les atribuyen actividades discretas no compartidas por otras (Arámburo et al., 1990) y de igual forma se han descrito variantes moleculares de la hormona de crecimiento a nivel testicular y se observa un patrón específico de heterogeneidad molecular en este tejido (Luna et al., 2002, 2004). Este patrón se mantiene parcialmente en las células en cultivo (Tesis-Domínguez B., 2004).

En este trabajo la caracterización de las variantes moleculares de GH liberadas al medio de cultivo y en células testiculares en cultivo se realizó en condiciones reductoras (CR) con el fin de eliminar parcialmente el fenómeno de agregación y observar isoformas que pudieran agregarse durante el proceso de extracción y purificación de la hormona (Arámburo et al., 1993).

En lo que concierne a las isoformas inmuno-reactivas liberadas al medio de cultivo se encontraron formas oligoméricas de 50, 44 y 35 kDa, que podrían ser el resultado de la asociación entre diferentes variantes o bien de alguna isoforma de GH con alguna otra molécula (ej. proteínas transportadoras, receptor). Ya han sido reportadas en testículo de pollo variantes de alto peso molecular así como su comportamiento durante la ontogenia por nuestro grupo

de investigación, y se pudo observar que las formas oligoméricas se encuentran en mayor cantidad a mayor edad, sin embargo dichos estudios fueron realizados en extractos de tejido y no en cultivo de células testiculares cultivadas y tratadas con GHRH (Luna et al., 2004).

Se encontró en medio de cultivo también una banda de 26 kDa (CR) que podría corresponder al monómero y también fueron detectadas formas de menor peso molecular: 15 y 17 kDa, que coinciden con los descritos previamente en el extracto de testículo (Luna et al., 2004).

En el medio de cultivo se encontraron 2 bandas IR-GH de bajo peso molecular, una de 17 kDa (previamente descrita) y otra de 15 kDa, las cuales podrían ser el resultado de la lisis proteínica del monómero de 26 kDa. Aparentemente el efecto de GHRH se da principalmente liberando variantes de bajo peso molecular a partir de formas de mayor peso molecular. Sin embargo, no existen datos precisos sobre la funcionalidad de estas isoformas a nivel testicular a diferencia de la actividad biológica (angiogénico, lipolítico) determinada del fragmento de 15 kDa presente en hipófisis (Arámburo et al 2001). El patrón de liberación de la isoforma de 17 kDa presentó una tendencia similar al patrón de respuesta a GHRH en la liberación de la cGH total cuantificada a través del método de ELISA, en donde la concentración de 1 nM fue la que mostró una diferencia significativa con respecto al control.

Al analizar las células cultivadas y tratadas con GHRH encontramos isoformas de cGH de alto y bajo peso molecular en todas las condiciones experimentales sin existir un efecto significativo para dichos tratamientos al compararlos con el control. Se detectaron las formas de 50, 44, 35, 26, 22 y 17 kDa lo que correlaciona con los datos aportados por Luna et al 2004 en tejido así como con Domínguez , 2004 en lo que respecta al análisis de variantes moleculares de cGH en células cultivadas de testículo de pollos de 25 semanas. Aparentemente las formas de 35 y 22 kDa no se liberan al medio de cultivo ni de manera constitutiva ni bajo la estimulación con el factor liberador de la GH ya que solamente fueron encontradas en las células.

Resultados previos de nuestro laboratorio en tejidos extrahipofisarios reportan la presencia de una variante de 17 kDa como la variante más abundante en tejidos del sistema inmune, reproductor y nervioso. La variante de 17 kDa (CR) en testículo de pollo se ve incrementada a partir de los días 1 al 7 post-eclosión y permanece constante durante la ontogenia del pollo (Luna et al., 2004). No se ha determinado el papel funcional de esta variante a nivel testicular pero se sugiere que podría tener un papel autócrino o parácrino en la regulación de la gametogénesis y la esteroidogénesis, ya que es la variante que más se libera al medio de cultivo señalando alguna posible implicación fisiológica a partir de su abundancia relativa y de su tendencia a ser liberada bajo tratamiento con GHRH.

Se ha descrito a nivel hipofisario la secreción al plasma de una variante de cGH de bajo peso molecular, la cual pesa aproximadamente 15 kDa y se cree puede ser el resultado de una proteólisis del monómero de 22 kDa (CNR) o 26kDa (CR) (Arámburo et al., 2001).

Es importante señalar que a nivel testicular se han descrito proteasas ácidas como catepsina k (Anway et al., 2004) y catepsina L / aminopeptidasa Lys-Arg (Hook et al., 2004), en rata, a las cuales se les ha relacionado a nivel hipofisario con la generación de fragmentos de hormonas como GH y prolactina y a nivel testicular con procesos asociados con la espermatogénesis y la función reproductiva. Cabe mencionar que se han descrito también a nivel testicular carboxipeptidasas a las cuales se les ha relacionado con la generación de isoformas cortadas de neuropeptidos a nivel hipofisario (Wei et al., 2003). En aves también se han descrito a nivel de líquido seminal enzimas proteolíticas (Thurston et al., 1993).

Es importante denotar que la banda de 15 kDa no se detectó en las células cultivadas y tratadas con GHRH, sin embargo si estuvo presente en los medios de cultivo lo que podría implicar algún proceso activado a través del efecto del GHRH simultáneamente con la liberación de cGH. También es posible señalar que no todas las bandas presentes en el interior de las células se detectan en

el medio de cultivo, lo que puede sugerir una liberación específica sobre algunas isoformas de cGH y ésta no depende de la dosis de GHRH.

Cambios en la proporción relativa de las variantes de la GH testicular asociados al tipo de tejido y ontogenia podrían reflejar cambios en la actividad de la GH en la reproducción. Aunque a nivel testicular y dentro de esta ventana de tiempo de 25 a 31.5 semanas, no fue posible observar cambio significativo en la proporción de isoformas en las células relativo a la edad.

Está bien establecido que el tracto reproductivo y los testículos son sitio de acción de la GH. (Hull & Harvey, 2000). Se ha descrito en ratas proteínas IR contra receptor a GH (GHR) (Garcia-Aragon et al., 1992; Lobie et al., 1990, 1992) y se ha encontrado el ARNm para GHR en testículo de pollos (Harvey et al., 2002; Lobie et al., 1990) por lo que es posible plantear la existencia un efecto autócrino y/o parácrino de la GH.

Es sabido que la mayor parte de los factores que participan en la secreción de GH a nivel hipofisiario (GHRH, Matsubara et al., 1995, Olchovsky et al., 1996; ghrelina, Tanaka et al., 2001, Tena-Sempere et al., 2002; TRH, Wilber and Xu, 1998, Li et al., 2002; somatostatina, Pekary et al., 1984, Zhu et al., 1998; IGF-I, Morera et al., 1987, Baker et al., 1996) se encuentran presentes en testículo de rata, por lo que se puede sugerir con base en los resultados obtenidos del efecto de GHRH que la regulación de la liberación de la hormona de crecimiento en los testículos de aves se encuentra regulada por otros factores además de este péptido.

Al tener cultivos primarios de varias estirpes celulares de testículo, no es posible saber que tipo celular es el que está generando la respuesta sobre la concentración de GH liberada al medio, por lo que sería de gran interés realizar experimentos de estimulación sobre las diferentes líneas (germinales, intersticiales y mioideas) de manera independiente y así generar datos sobre el papel de la GHRH en la regulación de la liberación de GH y sus isoformas producidas localmente.

Conclusiones

Los cultivos primarios de células testiculares liberan al medio de cultivo hormona de crecimiento.

Los cultivos primarios de células testiculares de pollo permitieron determinar el efecto de la GHRH sobre la secreción de la hormona de crecimiento.

El efecto de la GHRH (1nM) en células testiculares en cultivo favoreció la liberación de las formas de 15, 17, y 50 kDa (CR) de cGH en cultivos primarios de células testiculares. Las formas más abundantes liberadas al medio de cultivo son la de 15 kDa y de 17 kDa, donde dicha liberación no correlaciona con la dosis de estimulación.

La forma monomérica de 26 kDa se liberó al medio de cultivo de manera basal en el control con una magnitud de casi doble, en comparación con los cultivos tratados con la hormona liberadora de la hormona de crecimiento

Se detectaron las formas de 17, 22, 26, 35, 44 y 50 kDa (CR) de cGH en las células cultivadas; tanto en los grupos control como en los sometidos a las diferentes concentraciones del factor liberador. Las formas más abundantes contenidas en las células son las de 17 y 35 kDa tanto para los grupos controles como para los diferentes tratamientos.

Se observó inmuno-reactividad positiva en células testiculares tanto con el anticuerpo C-kit como con el anticuerpo policlonal anti-cGH por lo que se puede señalar que son células germinales.

Bibliografía

1. Abdel-Meguid, S. S., Shieh, H. S., Smith, W. W., Dayringer, H. E., Violand, B. N., and Bentle, L. A. (1987) Three-dimensional structure of a genetically engineered variant of porcine growth hormone, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **84**, 6434-6437.
2. Aguila, M. C. and McCann, S. M. (1987) Evidence that growth hormone-releasing factor stimulates somatostatin release in vitro via beta-endorphin, *Endocrinology* **120**, 341-344.
3. Aguila, M. C. (1988) Somatostatin decreases somatostatin messenger ribonucleic acid levels in the rat periventricular nucleus, *Peptides* **19**, 1573-1579.
4. Anway, M. D., Wright, W. W., Zirkin, B. R., Korah, N., Mort, J. S., and Hermo, L. (2004) Expression and localization of cathepsin k in adult rat sertoli cells, *Biol. Reprod.* **70**, 562-569.
5. Arámburo, C., Carranza, M., Sánchez, R., and Perera, G. (1989) Partial biochemical and biological characterization of purified chicken growth hormone (cGH). Isolation of cGH charge variants and evidence that cGH is phosphorylated, *Gen. Comp Endocrinol.* **76**, 330-339.
6. Arámburo, C., Montiel, J. L., Perera, G., Navarrete, S., and Sánchez, R. (1990) Molecular isoforms of chicken growth hormone (cGH): different bioactivities of cGH charge variants, *Gen. Comp Endocrinol.* **80**, 59-67.
7. Arámburo, C., Navarrete, S., Montiel, J. L., Sánchez, R., and Berghman, L. R. (1991) Purification and electrophoretic analysis of glycosylated chicken growth hormone (G-cGH): evidence of G-cGH isoforms, *Gen. Comp Endocrinol.* **84**, 135-146.
8. Arámburo, C., Montiel, J. L., Sánchez, R., Perera, G., Navarrete, S., Carranza, M., García-Moreno J, and Fenton B (1993) La hormona de crecimiento de pollo: una familia de proteínas con diversidad molecular y funcional, *Memorias del Congreso Conmemorativo de Jubileo del Instituto de Investigaciones Biomédicas de la UNAM* 483-499.
9. Arámburo, C., Luna, M., Carranza, M., Reyes, M., Martínez-Coria, H., and Scanes, C. G. (2000) Growth hormone size variants: changes in the pituitary during development of the chicken, *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* **223**, 67-74.
10. Arámburo, C., Carranza, M., Reyes, M., Luna, M., Martínez-Coria, H., Berumen, L., and Scanes, C. G. (2001) Characterization of a bioactive 15 kDa fragment produced by proteolytic cleavage of chicken growth hormone, *Endocrine.* **15**, 231-240.
11. Argente, J., Pozo, J., and Barrios, V. (1992) Neuroregulation and the growth hormone, *An. Esp. Pediatr.* **36 Suppl 50**, 19-33.
12. Arsenijevic, Y., Wehrenberg, W. B., Conz, A., Eshkol, A., Sizonenko, P. C., and Aubert, M. L. (1989) Growth hormone (GH) deprivation induced by passive immunization against rat GH-releasing factor delays sexual maturation in the male rat, *Endocrinology* **124**, 3050-3059.

13. Baker, J., Hardy, M. P., Zhou, J., Bondy, C., Lupu, F., Bellve, A. R., and Efstratiadis, A. (1996) Effects of an Igf1 gene null mutation on mouse reproduction, *Mol. Endocrinol.* 10, 903-918.
14. Baldwin, G. S., Grego, B., Hearn, M. T., Knesel, J. A., Morgan, F. J., and Simpson, R. J. (1983) Phosphorylation of human growth hormone by the epidermal growth factor-stimulated tyrosine kinase, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 80, 5276-5280.
15. Bartke, A., Chandrashekar, V., Turyn, D., Steger, R. W., Debeljuk, L., Winters, T. A., Mattison, J. A., Danilovich, N. A., Croson, W., Wernsing, D. R., and Kopchick, J. J. (1999) Effects of growth hormone overexpression and growth hormone resistance on neuroendocrine and reproductive functions in transgenic and knock-out mice, *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 222, 113-123.
16. Baumann, G., Stolar, M. W., and Buchanan, T. A. (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.
17. Baumann, G., Davila, N., Shaw, M. A., Ray, J., Liebhaber, S. A., and Cooke, N. E. (1991) Binding of human growth hormone (GH)-variant (placental GH) to GH-binding proteins in human plasma, *J. Clin. Endocrinol. Metab* 73, 1175-1179.
18. Berger, P., Untergasser, G., Hermann, M., Hittmair, A., Madersbacher, S., and Dirnhofer, S. (1999) The testis-specific expression pattern of the growth hormone/placental lactogen (GH/PL) gene cluster changes with malignancy, *Hum. Pathol.* 30, 1201-1206.
19. Bertherat, J., Bluet-Pajot, M. T., and Epelbaum, J. (1995) Neuroendocrine regulation of growth hormone, *Eur. J. Endocrinol.* 132, 12-24.
20. Bluet-Pajot, M. T., Epelbaum, J., Gourdjji, D., Hammond, C., and Kordon, C. (1998) Hypothalamic and hypophyseal regulation of growth hormone secretion, *Cell Mol. Neurobiol.* 18, 101-123.
21. Bradford, M. M. (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding, *Anal. Biochem.* 72, 248-254.
22. Breier, B. H., Vickers, M. H., Gravance, C. G., and Casey, P. J. (1996) Growth hormone (GH) therapy markedly increases the motility of spermatozoa and the concentration of insulin-like growth factor-I in seminal vesicle fluid in the male GH-deficient dwarf rat, *Endocrinology* 137, 4061-4064.
23. Breier, B. H., Vickers, M. H., Gravance, C. G., and Casey, P. J. (1998) Therapy with growth hormone: major prospects for the treatment of male subfertility?, *Endocr. J.* 45 Suppl, S53-S60.
24. Champion, Z. J., Vickers, M. H., Gravance, C. G., Breier, B. H., and Casey, P. J. (2002) Growth hormone or insulin-like growth factor-I extends longevity of equine spermatozoa in vitro, *Theriogenology* 57, 1793-1800.

25. Chen, H. T., Pan, F. M., and Chang, W. C. (1988) Purification of duck growth hormone and cloning of the complementary DNA, *Biochim. Biophys. Acta* 949, 247-251.
26. Chen, W. Y., Chen, N. Y., Yun, J., Wight, D. C., Wang, X. Z., Wagner, T. E., and Kopchick, J. J. (1995) Amino acid residues in the third alpha-helix of growth hormone involved in growth promoting activity, *Mol. Endocrinol.* 9, 292-302.
27. Cunningham, B. C., Ultsch, M., de Vos, A. M., Mulkerrin, M. G., Clauser, K. R., and Wells, J. A. (1991) Dimerization of the extracellular domain of the human growth hormone receptor by a single hormone molecule, *Science* 254, 821-825.
28. Devesa, J., Lois, N., Arce, V., Diaz, M. J., Lima, L., and Tresguerres, J. A. (1991) The role of sexual steroids in the modulation of growth hormone (GH) secretion in humans, *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 40, 165-173.
29. Devesa, J., Lima, L., and Tresguerres, J. A. (1992) Neuroendocrine control of growth hormone secretion in humans, *Trends Endocrinol. Metab* 175-183.
30. Diaz, M. J., Dominguez, F., Haro, L. S., Ling, N., and Devesa, J. (1993) A 12-kilodalton N-glycosylated growth hormone-related peptide is present in human pituitary extracts, *J. Clin. Endocrinol. Metab* 77, 134-138.
31. Domínguez, B., Luna, M., and Arámburo, C. (2004) Distribución de la hormona de crecimiento (GH) en el testículo de pollo. Tesis de Licenciatura en Biología, UAQ.
32. Fabbri, A., Ciocca, D. R., Ciampani, T., Wang, J., and Dufau, M. L. (1995) Growth hormone-releasing hormone in testicular interstitial and germ cells: potential paracrine modulation of follicle-stimulating hormone action on Sertoli cell function, *Endocrinology* 136, 2303-2308.
33. Fleischman, R. A. (1993) From white spots to stem cells: the role of the Kit receptor in mammalian development, *Trends Genet.* 9, 285-290.
34. Frankenne, F., Rentier-Delrue, F., Scippo, M. L., Martial, J., and Hennen, G. (1987) Expression of the growth hormone variant gene in human placenta, *J. Clin. Endocrinol. Metab* 64, 635-637.
35. García-Aragon, J., Lobie, P. E., Muscat, G. E., Gobius, K. S., Norstedt, G., and Waters, M. J. (1992) Prenatal expression of the growth hormone (GH) receptor/binding protein in the rat: a role for GH in embryonic and fetal development?, *Development* 114, 869-876.
36. Gaytan, F., Barreiro, M. L., Chopin, L. K., Herington, A. C., Morales, C., Pinilla, L., Casanueva, F. F., Aguilar, E., Dieguez, C., and Tena-Sempere, M. (2003) Immunolocalization of ghrelin and its functional receptor, the type 1a growth hormone secretagogue receptor, in the cyclic human ovary, *J. Clin. Endocrinol. Metab* 88, 879-887.
37. Glander, H. J., Kratzsch, J., Weisbrich, C., and Birkenmeier, G. (1996) Insulin-like growth factor-I and alpha 2-macroglobulin in seminal plasma correlate with semen quality, *Hum. Reprod.* 11, 2454-2460.

38. Goffin, V., Shiverick, K. T., Kelly, P. A., and Martial, J. A. (1996) Sequence-function relationships within the expanding family of prolactin, growth hormone, placental lactogen, and related proteins in mammals, *Endocr. Rev.* 17, 385-410.
39. Handelsman, D. J., Spaliviero, J. A., Scott, C. D., and Baxter, R. C. (1985) Identification of insulin-like growth factor-I and its receptors in the rat testis, *Acta Endocrinol. (Copenh)* 109, 543-549.
40. Harvey, S., Decuypere, E., Darras, V. M., and Berghman, L. (1991) Differential effects of T4 and T3 on TRH- and GRF-induced GH secretion in the domestic fowl, *Reprod. Nutr. Dev.* 31, 451-459.
41. Harvey, S. (1995) Growth Hormone Synthesis, in *Growth Hormone* pp 55-78, CRC, Boca Raton.
42. Harvey, S., Johnson, C. D., and Sanders, E. J. (2000) Extra-pituitary growth hormone in peripheral tissues of early chick embryos, *J. Endocrinol.* 166, 489-502.
43. Harvey, S., Azumaya, Y., and Hull, K. L. (2000) Pituitary and extrapituitary growth hormone: Pit-1 dependence?, *Can. J. Physiol Pharmacol.* 78, 1013-1028.
44. Harvey, S., Baudet, M. L., Murphy, A., Luna, M., Hull, K. L., and Arámburo, C. (2004) Testicular growth hormone (GH): GH expression in spermatogonia and primary spermatocytes, *Gen. Comp Endocrinol.* 139, 158-167.
45. Hennen, G. and Frankenne, F. (1987) Influence of placental protein hormones on maternal physiology, *Ann. Endocrinol. (Paris)* 48, 278-288.
46. Hennen, G., Frankenne, F., Scippo, M. L., Igout, A., Closset, J., Pirens, G., and Gomez, F. (1988) Placental growth hormone. Significance relative to growth hormone and lactogen hormone, *Reprod. Nutr. Dev.* 28, 1699-1706.
47. Hook, V., Yasothornsrikul, S., Greenbaum, D., Medzihradszky, K. F., Troutner, K., Toneff, T., Bunday, R., Logrinova, A., Reinheckel, T., Peters, C., and Bogoy, M. (2004) Cathepsin L and Arg/Lys aminopeptidase: a distinct prohormone processing pathway for the biosynthesis of peptide neurotransmitters and hormones, *Biol. Chem.* 385, 473-480.
48. Houston, B. and Goddard, C. (1988) Molecular forms of growth hormone in the chicken pituitary gland, *J. Endocrinol.* 116, 35-41.
49. Hull, K. L., Janssens W.C., and Harvey, S. (1997) Growth Hormone: local actions in sites of synthesis, *J. Endocrinol.* 375-386.
50. Hull, K. L. and Harvey, S. (1997) Growth hormone: an immune regulator in vertebrates, *International Congress of comparative Endocrinology* -893.
51. Hull, K. L. and Harvey, S. (2000) Growth hormone: roles in male reproduction, *Endocrine.* 13, 243-250.
52. Hull, K. L. and Harvey, S. (2000) Growth hormone: a reproductive endocrine-paracrine regulator?, *Rev. Reprod.* 5, 175-182.

53. Kanzaki, M. and Morris, P. L. (1999) Growth hormone regulates steroidogenic acute regulatory protein expression and steroidogenesis in Leydig cell progenitors, *Endocrinology* 140, 1681-1686.
54. Kuroda, K. (1989) Study on testicular tissue in animals with congenital hormone deficiency, *Nippon Hinyokika Gakkai Zasshi* 80, 3-10.
55. Laron, Z. and Klinger, B. (1998) Effect of insulin-like growth factor-I treatment on serum androgens and testicular and penile size in males with Laron syndrome (primary growth hormone resistance), *Eur. J. Endocrinol.* 138, 176-180.
56. Lecomte, C. M., Renard, A., and Martial, J. A. (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 Res.* 15, 6331-6348.
57. Lee, J. H., Kim, H. J., Kim, H., Lee, S. J., and Gye, M. C. (2006) In vitro spermatogenesis by three-dimensional culture of rat testicular cells in collagen gel matrix, *Biomaterials* 27, 2845-2853.
58. Lewis, U. J., Dunn, J. T., Bonewald, L. F., Seavey, B. K., and Vanderlaan, W. P. (1978) A naturally occurring structural variant of human growth hormone, *J. Biol. Chem.* 253, 2679-2687.
59. Lewis, U. J. (1984) Variants of growth hormone and prolactin and their posttranslational modifications, *Annu. Rev. Physiol* 46, 33-42.
60. Lewis, U. J. (1992) Growth hormone: what its it what it does it do?, *Trends Endocrinol. Metab* 117-121.
61. Lewis, U. J., Sinha, Y. N., and Lewis, G. P. (2000) Structure and properties of members of the hGH family: a review, *Endocr. J.* 47 Suppl, S1-S8.
62. Li, Z., Zhang, Y., Liu, X., and Xu, R. (2002) Correlation of expression of preprothyrotropin-releasing hormone and receptor with rat testis development, *Chin Med. J. (Engl.)* 115, 12-16.
63. Liebhaber, S. A., Urbanek, M., Ray, J., Tuan, R. S., and Cooke, N. E. (1989) Characterization and histologic localization of human growth hormone-variant gene expression in the placenta, *J. Clin. Invest* 83, 1985-1991.
64. Liu, J., Zheng, D., Deng, J., Xiao, S., Liu, S., and 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. (Engl.)* 110, 362-365.
65. Lobie, P. E., Breipohl, W., Aragon, J. G., and Waters, M. J. (1990) Cellular localization of the growth hormone receptor/binding protein in the male and female reproductive systems, *Endocrinology* 126, 2214-2221.
66. Lobie, P. E., Garcia-Aragon, J., Wang, B. S., Baumbach, W. R., and Waters, M. J. (1992) Cellular localization of the growth hormone binding protein in the rat, *Endocrinology* 130, 3057-3065.

67. Loir, M. (1999) Spermatogonia of rainbow trout: II. in vitro study of the influence of pituitary hormones, growth factors and steroids on mitotic activity, *Mol. Reprod. Dev.* 53, 434-442.
68. Luna, M., Martínez-Coria, H., Carranza, M., Huerta, L., Harvey, S., and Arámburo, C. (2000) Abstract 33, *20th. Conference of European Comparative Endocrinologists*.
69. Luna, M., Huerta, L., Berumen, L., Martínez-Coria, H., Harvey, S., and Arámburo, C. (2004) Growth hormone in the male reproductive tract of the chicken: heterogeneity and changes during ontogeny and maturation, *Gen. Comp Endocrinol.* 137, 37-49.
70. Malamed, S., Gibney, J. A., Cain, L. D., Perez, F. M., and Scanes, C. G. (1993) Immunocytochemical studies of chicken somatotrophs and somatotroph granules before and after hatching, *Cell Tissue Res.* 272, 369-374.
71. Malamed, S., Deaver, D., Perez, F., Radecki, S., Gibney, J., and Scanes, C. G. (1997) Quantitative studies of chicken somatotrophs during growth and development by morphometry, immunocytochemistry, and flow cytometry, *Gen. Comp. Endocrinol.* 108, 25-34.
72. Masuda, N., Watahiki, M., Tanaka, M., Yamakawa, M., Shimizu, K., Nagai, J., and Nakashima, K. (1988) Molecular cloning of cDNA encoding 20 kDa variant human growth hormone and the alternative splicing mechanism, *Biochim. Biophys. Acta* 949, 125-131.
73. Matsubara, S., Sato, M., Mizobuchi, M., Niimi, M., and Takahara, J. (1995) Differential gene expression of growth hormone (GH)-releasing hormone (GRH) and GRH receptor in various rat tissues, *Endocrinology* 136, 4147-4150.
74. Mena, F., Clapp, C., Aguayo, D., Lorenson, M. Y., and Martínez-Escalera, G. (1986) Thiol regulation of depletion-transformation and release of prolactin by the pituitary of the lactating rat, *Endocrinology* 118, 1795-1802.
75. Mertani, H. C., García-Caballero, T., Lambert, A., Gerard, F., Palayer, C., Boutin, J. M., Vonderhaar, B. K., Waters, M. J., Lobie, P. E., and Morel, G. (1998) Cellular expression of growth hormone and prolactin receptors in human breast disorders, *Int. J. Cancer* 79, 202-211.
76. Miao, Z. R., Lin, T. K., Bongso, T. A., Zhou, X., Cohen, P., and Lee, K. O. (1998) Effect of insulin-like growth factors (IGFs) and IGF-binding proteins on in vitro sperm motility, *Clin. Endocrinol. (Oxf)* 49, 235-239.
77. Montiel, J. L., Berghman, L. R., and Arámburo, C. (1992) Identification of growth hormone molecular variants in chicken serum, *Gen. Comp Endocrinol.* 88, 298-306.
78. Morera, A. M., Chauvin, M. A., de, P. E., Binoux, M., and Benahmed, M. (1987) Somatomedin C/insulin-like growth factor 1: an intratesticular differentiative factor of Leydig cells?, *Horm. Res.* 28, 50-57.
79. Moretti, C., Mencacci, C., Frajese, G. V., Cerilli, M., and Frajese, G. (2002) Growth hormone-releasing hormone and pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide in the reproductive system, *Trends Endocrinol. Metab* 13, 428-435.

80. Nagano, M., Avarbock, M. R., Leonida, E. B., Brinster, C. J., and Brinster, R. L. (1998) Culture of mouse spermatogonial stem cells, *Tissue Cell* 30, 389-397.
81. Olchovsky, D., Bruno, J. F., and Berelowitz, M. (1996) Growth hormone-releasing factor expression is discordantly regulated in the hypothalamus and testis of streptozotocin-diabetic rats, *J. Endocrinol.* 148, 189-192.
82. Ovesen, P., Jorgensen, J. O., Ingerslev, J., Ho, K. K., Orskov, H., and Christiansen, J. S. (1996) Growth hormone treatment of subfertile males, *Fertil. Steril.* 66, 292-298.
83. Palmethofer, A., Zechner, D., Luger, T. A., and Barta, A. (1995) Splicing variants of the human growth hormone mRNA: detection in pituitary, mononuclear cells and dermal fibroblasts, *Mol. Cell Endocrinol.* 113, 225-234.
84. Pekary, A. E., Yamada, T., Sharp, B., Bhasin, S., Swerdloff, R. S., and Hershman, J. M. (1984) Somatostatin-14 and -28 in the male rat reproductive system, *Life Sci.* 34, 939-945.
85. Pescovitz, O. H., Berry, S. A., Laudon, M., Ben-Jonathan, N., Martin-Myers, A., Hsu, S. M., Lambros, T. J., and Felix, A. M. (1990) Localization and growth hormone (GH)-releasing activity of rat testicular GH-releasing hormone-like peptide, *Endocrinology* 127, 2336-2342.
86. Pescovitz, O. H., Berry, S. A., Laudon, M., Ben-Jonathan, N., Martin-Myers, A., Hsu, S. M., Lambros, T. J., and Felix, A. M. (1990) Localization and growth hormone (GH)-releasing activity of rat testicular GH-releasing hormone-like peptide, *Endocrinology* 127, 2336-2342.
87. Radecki, S. V., Deaver, D. R., and Scanes, C. G. (1994) Triiodothyronine reduces growth hormone secretion and pituitary growth hormone mRNA in the chicken, in vivo and in vitro, *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 205, 340-346.
88. Rand-Weaver, M., Kawauchi, H., and Ono, M. (1993) Evolution of structure of the growth hormone and prolactin family, in *The endocrinology of growth and metabolism in vertebrates* (Screibman, M. P., Scanes, C. G., and Plang, P. K., Eds.) pp 13-35, San Diego Academic Press Inc..
89. Ray, J., Jones, B. K., Liebhaber, S. A., and Cooke, N. E. (1989) Glycosylated human growth hormone variant, *Endocrinology* 125, 566-568.
90. Rechler, M. M. and Brown, A. L. (1992) Insulin-like growth factor binding proteins: gene structure and expression, *Growth Regul.* 2, 55-68.
91. Render, C. L., Hull, K. L., and Harvey, S. (1995) Neural expression of the pituitary GH gene, *J. Endocrinol.* 147, 413-422.
92. Render, C. L., Hull, K. L., and Harvey, S. (1995) Expression of the growth hormone gene in immune tissues, *Endocrine* 729-735.
93. Scanes, C. G., Duyka, D. R., Lauterio, T. J., Bowen, S. J., Huybrechts, L. M., Bacon, W. L., and King, D. B. (1986) Effect of chicken growth hormone, triiodothyronine and hypophysectomy in growing domestic fowl, *Growth* 50, 12-31.

94. Scanes, C. G. (1995) Growth hormone action: endocrine function, in *Growth Hormone* (Harvey, S., Scanes, C. G., and Daughaday, W. H., Eds.) 1st. Edition ed., pp 423-428, CRC Press, Boca Raton.
95. Scanes, C. G. (1995) Growth hormone action: osmoregulation, in *Growth Hormone* (Harvey, S., Scanes, C. G., and Daughaday, W. H., Eds.) 1st. Edition ed., pp 415-422, CRC Press, Boca Raton.
96. Scanes, C. G. (1995) Growth hormone action: reproductive function, in *Growth Hormone* (Harvey, S., Scanes, C. G., and Daughaday, W. H., Eds.) 1st. Edition ed., pp 393-406, CRC Press, Boca Raton.
97. Scanes, C. G. (1995) Growth hormone action: Immune function, in *Growth Hormone* (Harvey, S., Scanes, C. G., and Daughaday, W. H., Eds.) 1st. Edition ed., pp 407-414, CRC Press, Boca Raton.
98. Scanes, C. G. (1995) Growth hormone action: carbohydrate metabolism, in *Growth Hormone* (Harvey, S., Scanes, C. G., and Daughaday, W. H., Eds.) 1st. Edition ed., pp 371-378, CRC Press, Boca Raton.
99. Scanes, C. G. (1995) Growth hormone action: lipid metabolism, in *Growth Hormone* (Harvey, S., Scanes, C. G., and Daughaday, W. H., Eds.) 1st. Edition ed., pp 379-388, CRC Press, Boca Raton.
100. Scanes, C. G. and Daughaday, W. H. (1995) Growth hormone action: growth, in *Growth Hormone* (Harvey, S., Scanes, C. G., and Daughaday, W. H., Eds.) 1st. Edition ed., pp 351-370, CRC Press, Boca Raton.
101. Shoham, Z., Conway, G. S., Ostergaard, H., Lahlou, N., Bouchard, P., and Jacobs, H. S. (1992) Cotreatment with growth hormone for induction of spermatogenesis in patients with hypogonadotropic hypogonadism, *Fertil. Steril.* 57, 1044-1051.
102. Sinha, Y. N. and Gilligan, T. A. (1984) A "20K" form of growth hormone in the murine pituitary gland, *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 177, 465-474.
103. Sinha, Y. N., Ott, K., and Vanderlaan, W. P. (1987) Detection of multiple PRL- and GH-like proteins in human pituitary by Western blot analysis, *Am. J. Med. Sci.* 294, 15-25.
104. Sinha, Y. N. and Jacobsen, B. P. (1987) Glycosylated growth hormone: detection in murine pituitary gland and evidence of physiological fluctuations, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 145, 1368-1375.
105. Sinha, Y. N., Klemcke, H. G., Maurer, R. R., and Jacobsen, B. P. (1990) Changes in the glycosylated and nonglycosylated forms of prolactin and growth hormone in lean and obese pigs during pregnancy, *Endocrinology* 127, 410-418.
106. Srivastava, C. H., Collard, M. W., Rothrock, J. K., Peredo, M. J., Berry, S. A., and Pescovitz, O. H. (1993) Germ cell localization of a testicular growth hormone-releasing hormone-like factor, *Endocrinology* 133, 83-89.
107. Sturkie, P. D. (1986) *Avian Physiology* Springer-Verlag, U.S.A.

108. Tanaka, M., Hayashida, Y., Sakaguchi, K., Ohkubo, T., Wakita, M., Hoshino, S., and Nakashima, K. (1996) Growth hormone-independent expression of insulin-like growth factor I messenger ribonucleic acid in extrahepatic tissues of the chicken, *Endocrinology* 137, 30-34.
109. Tanaka, M., Hayashida, Y., Nakao, N., Nakai, N., and Nakashima, K. (2001) Testis-specific and developmentally induced expression of a ghrelin gene-derived transcript that encodes a novel polypeptide in the mouse, *Biochim. Biophys. Acta* 1522, 62-65.
110. Tena-Sempere, M., Barreiro, M. L., Gonzalez, L. C., Gaytan, F., Zhang, F. P., Caminos, J. E., Pinilla, L., Casanueva, F. F., Dieguez, C., and Aguilar, E. (2002) Novel expression and functional role of ghrelin in rat testis, *Endocrinology* 143, 717-725.
111. Thurston, R. J., Korn, N., Froman, D. P., and Bodine, A. B. (1993) Proteolytic enzymes in seminal plasma of domestic turkey (*Meleagris gallopavo*), *Biol. Reprod.* 48, 393-402.
112. Untergasser, G., Kranewitter, W., Schwarzler, P., Madersbacher, S., Dirnhofer, S., and Berger, P. (1997) Organ-specific expression pattern of the human growth hormone/placental lactogen gene-cluster in the testis, *Mol. Cell Endocrinol.* 130, 53-60.
113. Untergasser, G., Hermann, M., Rumpold, H., and Berger, P. (1998) Complex alternative splicing of the GH-V gene in the human testis, *Eur. J. Endocrinol.* 139, 424-427.
114. Wei, S., Feng, Y., Kalinina, E., and Fricker, L. D. (2003) Neuropeptide-processing carboxypeptidases, *Life Sci.* 73, 655-662.
115. Wilber, J. F. and Xu, A. H. (1998) The thyrotropin-releasing hormone gene: cloning, characterization, and transcriptional regulation in the central nervous system, heart, and testis, *Thyroid* 8, 897-901.
116. Wu, H., Devi, R., and Malarkey, W. B. (1996) Localization of growth hormone messenger ribonucleic acid in the human immune system--a Clinical Research Center study, *J. Clin. Endocrinol. Metab* 81, 1278-1282.
117. Zhu, L. J., Krempels, K., Bardin, C. W., O'Carroll, A. M., and Mezey, E. (1998) The localization of messenger ribonucleic acids for somatostatin receptors 1, 2, and 3 in rat testis, *Endocrinology* 139, 350-357.

Apéndice I Abreviaturas

Ab	- Anticuerpo
ANOVA	- Análisis de Varianza
ARNm	- Acido ribonucléico mensajero
°C	- Grados Celsius
cGH	- Hormona de Crecimiento de Pollo
CNR	- Condiciones no reductoras
CR	- Condiciones Reductoras
DAB	- Diaminobencidina
ELISA	- Ensayo Inmunoenzimático
g	- Gramo
GH	- Hormona de Crecimiento
G-cGH	- Hormona de Crecimiento de Pollo Glicosilada
GH-IR	- Inmunoreactividad a Hormona de Crecimiento
GHRH	- Hormona Liberadora de la Hormona de Crecimiento
h	- Hora
HT	- Hormonas Tiroideas
hGH-N	- Hormona de Crecimiento Humana Normal
hGH-V	- Hormona de Crecimiento Humana Variable
IEF	- Isoelectroenfoque
kDa	- Kilodaltones
mg	- Miligramo
min	- Minuto
ml	- Mililitro
mV	- Milivolt
mM	- Milimolar
ng	- Nanogramo
nl	- Nanolitro
nM	- Nanomolar
PAGE	- Electroforesis en Gel de Poliacrilamida
PBS	- Amortiguador de fosfatos
pH	- Potencial Hidrógeno
PL	- Lactógeno Placentario
PRL	- Prolactina
rcGH	- Hormona de Crecimiento de Pollo Recombinante
Rpm	- Revoluciones por Minuto
TBS	- Amortiguador de Tris
TRH	- Hormona Liberadora de Tirotropina
SDS	- Dodecil Sulfato de Sodio
SFB	- Suero Fetal Bovino
SRIF	- Somatostatina