



Universidad Austral de Chile

Facultad de Ciencias
Escuela de Bioquímica

Profesor Patrocinante
Dra. Ilona I. Concha G.
Instituto de Bioquímica
Facultad de Ciencias
Universidad Austral de Chile

Expresión del factor GM -CSF en células germinales masculinas

Tesis de Grado presentada como
parte de los requisitos para optar al
Grado de **Licenciado en**
Bioquímica y al Título Profesional
de **Bioquímico**

Edith Alejandra Mancilla Nova

Valdivia Chile 2002

A mis papás, gracias por todo lo que han hecho por mí, gracias por su paciencia, comprensión y por la confianza que siempre me han tenido. A mis hermanos gracias por el apoyo incondicional.

A mis amigos gracias por la infinita paciencia y ayuda desinteresada.

Agradecimientos

Quisiera agradecer a la Dra. Ilona Concha por darme la oportunidad de formar parte de su grupo de trabajo, por la infinita paciencia y comprensión, por sus enseñanzas y consejos.

Al Dr. Juan Carlos Slebe y al Dr. Jaime Figueroa por formar parte de la comisión evaluadora de esta tesis.

A Mónica Brito por su invaluable ayuda en el desarrollo de esta tesis.

A mis compañeros y amigos del laboratorio, Cecilia Rauch, Enrique Werner, Angara Zambrano, Tibusay Vilanova, gracias por toda la ayuda brindada, por la paciencia y tolerancia.

A la Dra. Gloria León y Dra. Ana María Zárraga, gracias por sus consejos, comprensión y apoyo.

A todos mis grandes amigos, muchas gracias por su incondicional apoyo, nunca me faltó una palabra de aliento para poder superar esta última etapa y así lograr obtener mi título profesional.

A todas las personas del Instituto de Bioquímica que de alguna u otra manera colaboraron en la realización de esta tesis.

Esta tesis fue financiada por el proyecto FONDECYT 1990994.

INDICE DE CONTENIDOS

	Página
AGRADECIMIENTOS	
INDICE DE CONTENIDOS	I
INDICE DE FIGURAS	IV
INDICE DE TABLAS	V
LISTA DE ABREVIATURAS	VI
1. RESUMEN	1
SUMMARY	2
2. INTRODUCCIÓN	3
3. MATERIALES Y METODOS	19
3.1 Material	19
3.2 Métodos	22
3.2.1 Inmunohistoquímica en cortes de tejido.	22
3.2.1.1 Inmunohistoquímica en cortes de testículo humano	22
3.2.1.2 Inmunohistoquímica en cortes de testículo de bovino.	23
3.2.2 Extracción de proteínas de testículo de bovino	24
3.2.3 Análisis electroforético de proteínas en geles de poliacrilamida SDS.	24
3.2.4 Análisis de “Western blot”.	25
3.2.4.1 Electrotransferencia	25
3.2.4.2 Detección inmunológica	26

3.2.5	Amplificación de secuencias génicas.	27
3.2.5.1	Obtención del cDNA	27
3.2.5.2	Reacción de polimerasa en cadena	28
3.2.5.3	Visualización de los productos de amplificación.	28
3.2.6	Hibridación <i>in situ</i> en cortes de tejido	29
3.2.6.1	Marcaje no radiactivo de la sonda para GM-CSF con digoxigenina-11-dUTP	29
3.2.6.2	Hibridación <i>in situ</i> de tejido humano	30
3.2.6.3	Hibridación <i>in situ</i> de testículo de bovino	31
3.2.7	Determinación de la concentración de GM-CSF en líquido seminal humano y bovino.	31
3.2.7.1	Espermiogramas	31
3.2.7.2	Obtención del líquido seminal	32
3.2.7.3	Inmunoensayo	32
4.	RESULTADOS	34
4.1	Inmunohistoquímica del factor estimulador de colonia granulocito macrófago	34
4.1.1	Inmunocitoquímica en cortes de testículo humano y bovino	34
4.2	Análisis de Western blot para proteínas de testículo humano y bovino.	39

4.3	Análisis de RT-PCR.	41
4.4	Hibridación in situ de GM-CSF en cortes de testículo humano y bovino.	43
4.5	Detección de GM-CSF en líquido seminal humano y bovino.	45
5. DISCUSIÓN		
6. BIBLIOGRAFÍA		58

INDICE DE FIGURAS

		Página
Figura 1	Estructura terciaria de GM-CSF humano	9
Figura 2-A	Inmunohistoquímica de GM-CSF en testículo humano	35
Figura 2-B	Inmunohistoquímica de GM-CSF en testículo humano	36
Figura 2-C	Inmunohistoquímica de GM-CSF en testículo humano	37
Figura 3	Inmunodetección de GM-CSF en cortes de testículo de bovino	38
Figura 4	Identificación del GM-CSF mediante “Western blot”	40
Figura 5	Detección de los productos de amplificación mediante RT-PCR	42
Figura 6	Hibridación <i>in situ</i> de GM-CSF en testículo humano y bovino	44
Figura 7	Curva de calibración de la cuantificación por EASIA de GM-CSF en líquido seminal humano y bovino.	46

INDICE DE TABLAS

		Página
Tabla 1	Diferencia entre citoquinas y hormona endocrina.	4
Tabla 2	Resultados de Densidad Optica a 450 nm obtenidos para las muestras de semen.	47

LISTA DE ABREVIATURAS

aá	:	aminoácido
APC	:	células presentadoras de antígeno
BSA	:	albúmina de suero bovino
%C	:	porcentaje de bisacrilamida
cDNA	:	DNA complementario
cm	:	centímetro
DAB	:	diaminobenzidina
DNA	:	ácido desoxirribonucleíco
dNTP	:	desoxinucleótidos 5'-trifosfato
DO	:	densidad óptica
DTT	:	1,4-ditiotreitol
EDTA	:	ácido etilendiaminotetraacético
EGTA	:	ácido etilenglicol-bis (β -aminoetileter) N,N,N',N'-tetraacético
ELISA	:	Enzyme linked immunosorbent assay
FSH	:	hormona folículo estimulante
$x g$:	aceleración de gravedad
g	:	gramo
GLUT	:	transportador facilitativo de glucosa
G-CSF	:	factor de estimulación de colonias de granulocitos
GM-CSF	:	factor de estimulación de colonia granulocito-macrófago
GM-CSFr	:	receptor factor de estimulación de colonias granulocitos macrófago

IL	:	interleuquina
Kb	:	kilobases
Kd	:	constante de disociación
kDa	:	kiloDalton
LH	:	hormona luteinizante
mA	:	miliAmpere
mg	:	miligramo
ml	:	mililitro
mM	:	milimolar
mmol	:	milimol
mRNA	:	RNA mensajero
NBT/BCIP	:	nitro blue tetrazolium/ bromo cloro indolil fosfato
nmol	:	nanomol
pb	:	pares de base
PBS	:	tampón fosfato salino
PKC	:	proteína kinasa C
PM	:	peso molecular
pmol	:	picomol
PMSF	:	fluoruro de sulfonil fenil metano
RNA	:	ácido ribonucleico
RT-PCR	:	reacción de la polimerasa en cadena en transcripción reversa
SDS	:	dodecil sulfato de sodio

SDS-PAGE	:	electroforesis en geles de poliacrilamida en condiciones desnaturalantes
SSC	:	solución citrato salina
%T	:	porcentaje total de acrilamida
TAE	:	tampón acetato-EDTA
TEMED	:	N,N,N'',N''-tetrametilendiamina
TMB	:	tetrametilbenzidina
TNF	:	factor de necrosis tumoral
Tris	:	tris-hidroximetilamina
Tritón X-100	:	octil fenoxi polietoxietanol
U.V.	:	ultravioleta
μl	:	microlitro
μg	:	microgramo

1. RESUMEN

El **GM-CSF** es una citoquina pleiotrópica que tiene como principal función regular la proliferación y diferenciación celular de los precursores de células mieloides, además de la estimulación funcional de los granulocitos y fagocitos mononucleares maduros. Con respecto a células no hematopoiéticas, el factor induce proliferación y migración de células endoteliales, proliferación celular de líneas tumorales, regulación del desarrollo embrionario temprano; y el aumento de transporte de glucosa y vitamina C.

Su receptor es una glicoproteína compuesta por dos subunidades α y β , que se expresan en células mieloides precursoras y maduras, así como también, en otras células no hematopoiéticas.

En nuestro laboratorio hemos demostrado la expresión del receptor para GM-CSF en testículo humano y bovino. La unión del factor a su receptor en espermatozoides de toro señala un aumento en la captación de glucosa y vitamina C y promueve el aumento de la motilidad espermática.

En este trabajo se demuestra la expresión del GM-CSF en las células de la línea germinal masculina, utilizando diversas técnicas, como Western blot, inmunohistoquímica, RT-PCR, hibridación *in situ* y ELISA. Estos hallazgos sugieren que GM-CSF estaría involucrado en funciones proliferativas y de diferenciación celular que se establecen en los procesos de gametogénesis.

SUMMARY

The granulocyte-macrophage colony stimulating factor (GM-CSF) is a pleiotropic cytokine, and its main function is to regulate the proliferation and differentiation of myeloid precursor cells as well as to stimulate the functioning of mature mononuclear granulocytes and phagocytes. In non-hematopoietic cells, GM-CSF can induce proliferation and migration of endothelial cells, proliferation of tumor cell lines, regulation of early embryonic development, and an increased glucose and vitamin C transport.

Its receptor is a glycoprotein formed by two subunits, α and β , and it is expressed in precursor and mature myeloid cells, as well as in some non-hematopoietic cells.

In our laboratory we have demonstrated the expression of GM-CSF receptor in human and bovine testis. GM-CSF binding to its receptor in bovine spermatozoa signals for an increased glucose and vitamin C uptake and enhances sperm motility.

The expression of GM-CSF in bovine male germ cell lines was demonstrated in this study, using several techniques like immunocytochemistry, Western blot, RT-PCR, *in situ* hybridization and ELISA. These findings suggest that GM-CSF could be involved in the proliferation and differentiation processes of gametogenesis.

2. INTRODUCCION

Las citoquinas son definidas como proteínas reguladoras que controlan la supervivencia, crecimiento, diferenciación y función efectora de tejidos celulares. Las citoquinas abarcan aquellas familias de reguladores diversamente conocidos como factores de crecimiento, factores estimuladores de colonia, interleuquinas, linfoquinas, monoquinas e interferones. Se excluyen las clásicas hormonas endocrinas debido a que sus propiedades generales son diferentes de las citoquinas (Tabla nº 1).(Nicola, 1997).

La confusa nomenclatura de las citoquinas se origina debido a variadas corrientes de investigación que conducen al descubrimiento de diferentes citoquinas. A mediados de los sesenta, una variedad de ensayos *in vitro* son desarrollados para medir la proliferación, diferenciación y función de células linfoides y hematopoiéticas. Los factores estimuladores de colonia fueron así nombrados debido a que ellos estimulan la formación de colonias de granulocitos y macrófagos desde las células precursoras en la médula ósea (Robinson et al., 1967). El término "linfoquina" se forja para describir los mediadores solubles generados en reacciones inmunológicas entre linfocitos y antígenos, pero el descubrimiento de que los monocitos también producen factores activadores de linfocitos lleva al término complementario de "monoquinas" (Dumonde *et al.*, 1969). El interferón fue el primero descrito como una proteína que confiere resistencia celular a infecciones vírales, además de la acción de los interferones como mediadores inmunes (Isaacs and Lindenmann, 1957; Wheelock, 1965). El término "interleuquina" y el sistema de numeración se introdujeron para

reflejar el hecho de que estos reguladores servían como señales de comunicación entre leucocitos, y no sólo entre linfocitos (Aarden *et al.*, 1979). Similares razones llevan al término primario "citoquina"; se usa este término debido a que es el más general y no se restringe al sistema inmunohematopoiético (Cohen *et al.*, 1974)

Tabla 1. Diferencia entre citoquinas y hormona endocrina.

PROPIEDAD	HORMONA ENDOCRINA	CITOQUINA
<i>Sitios de producción</i>	Pocos	Muchos
<i>Células blanco</i>	Muchos	Pocos
<i>Papel biológico</i>	Homeostasis	Combate infección en tejidos
<i>Redundancia biológica</i>	Baja	Alta
<i>Pleiotropía biológica</i>	Baja	Alta
<i>¿En la circulación?</i>	Sí	Raramente
<i>Esfera de influencia</i>	Ampliamente generalizado	Autocrina, paracrina(local)
<i>Inductores</i>	Variaciones fisiológicas	Insultos externos

Estas citoquinas comparten algunos rasgos en común. Son moléculas encontradas en el medio extracelular que interactúan con células blanco específicas para comunicar información relativa al estado del animal y ello resulta en una respuesta biológica apropiada en el tejido blanco. Las células productoras representan los sensores biológicos de las condiciones animales, las citoquinas son el medio de señal

de transducción, los receptores son la manera de recepción de la señal y la sensibilidad de las células representan el medio para efectuar una apropiada respuesta biológica. Los sensores incluyen sensores de oxígeno para la producción de células rojas de la sangre; sensores de varios productos microbiológicos para la producción de células blancas de la sangre, función y quimiotaxis; sensores de partida en reacciones inmunes también para la función de las células blancas de la sangre; y sensores de tejido dañado producidos por células epiteliales y neurales.

Las citoquinas, representan diferentes moléculas con un enigmático conjunto de actividades biológicas las cuales a menudo se superponen unas con otras. Ciertamente, las dos palabras claves que describen la acción biológica de las citoquinas son pleiotropía y redundancia. Los ejemplos extremos de citoquinas pleiotrópicas son el factor inhibitorio de leucemia y el factor de crecimiento transformante β el cual afecta casi a todos los órganos del cuerpo; lo que ha llegado a ser cada vez más apreciable. Las citoquinas al principio con el propósito de ser relativamente específicas en su acción son ahora objeto tanto de un desempeño pleiotrópico como de una prueba biológica adicional. Por otro lado, surgen muy pocas respuestas biológicas que son mediadas por sólo una citoquina y muchas respuestas pueden ser llevadas a cabo por varias citoquinas distintas (Nicola, 1997).

Uno de los aspectos característicos de las citoquinas que las diferencia de las hormonas clásicas es que éstas se encuentran raramente en la circulación. Para un sistema de trabajo, citoquina/receptor, el campo de acción de la influencia de la citoquina liberada debe ser extremadamente limitado y se elude la extensión sistémica a otros sitios. Muchos mecanismos se describen para desarrollar el sistema de

citoquinas con el objeto de lograr estos resultados. Primero, las células productoras de citoquinas están a menudo físicamente localizadas inmediatamente adyacentes a las células de respuesta. Segundo, las células productoras de citoquinas secretan generalmente muy pequeñas cantidades de citoquina y, en algunos casos, esto es direccional hacia las células de respuesta. Tercero, muchas citoquinas se unen a elementos de la matriz extracelular alrededor de las células de respuesta, favoreciendo la restricción de su diseminación más allá del sitio inmediato e incrementando su viabilidad a las células de respuesta. Un ejemplo extremo de esta unión localizada son las superficies celulares de las citoquinas las cuales probablemente requieren contacto célula-célula para su acción. Finalmente, hay varios ejemplos de muy altos niveles de receptores de citoquinas solubles en la circulación, unidas a proteínas y aún a receptores antagonistas los cuales pueden servir para inhibir la acción biológica de una citoquina que ha encontrado su camino dentro del suero (Arend, 1993; Fernández-Bottran, 1991).

Muchas citoquinas son proteínas relativamente pequeñas conteniendo protecciones de carbohidratos y uniones disulfuro intramoleculares. Estos elementos aumentan la solubilidad de las citoquinas, estabilidad y resistencia a las proteasas.

Es posible hacer una subclasificación de las citoquinas considerando su receptor y las características de éste, como por ejemplo: similitudes en la respuesta biológica, mecanismo de inducción, estructuras tridimensionales y similitudes en los tipos de subunidades de receptores que ellos utilizan.

Entre los factores más estudiados está el factor estimulador de colonia granulocito macrófago (GM-CSF) que es una glicoproteína con un rango aparente de

masa molecular entre los 14500-35000 Da. Regula primariamente la producción de granulocitos y de macrófagos como el aumento de la actividad funcional de las células maduras involucradas en la defensa del huésped. Esta producción y secreción son inducidas por activación inmune en células endoteliales, fibroblastos y macrófagos, además de linfocitos T. La utilidad clínica potencial de GM-CSF está en el aumento de la velocidad de recuperación hematopoiética después de quimioterapia de cáncer y en aumento de la respuesta inmune. Patológicamente podría estar involucrado en una reacción inflamatoria y autoinmune (Nicola, 1997).

Los nombres alternativos que posee este factor son los siguientes: factor estimulador de colonia 2 (CSF-2), inductor macrófago granulocito-1GM (MGI-1GM), factor estimulador de colonia- α (CSF- α), pluripoiatina α .

La secuencia de nucleótidos del cDNA clonado de GM-CSF desde humano predice una proteína de 144 aminoácidos conteniendo una secuencia líder de 17 aminoácidos. En el caso de bovino el cDNA predice una proteína de 143 aminoácidos, con un peso molecular de 16.160 Da. El GM-CSF bovino exhibe un alto grado de homología de secuencias con el GM-CSF humano y de ratón a nivel de nucleótidos y aminoácidos. La comparación de la secuencia aminoacídica de GM-CSF de las tres especies, indica que el precursor de GM-CSF bovino contiene una secuencia señal putativa de 17 aminoácidos, escisión que podría producir una proteína de 14.250 Da de peso molecular (Maliszewski *et al.*, 1988).

GM-CSF es una glicoproteína secretada como monómero conteniendo 127 residuos de aminoácidos en humanos en la proteína madura (la proteína central tiene un peso molecular de alrededor de 15.000). El GM-CSF humano contiene dos puentes

disulfuro intramoleculares (Cis54-Cis96 y Cis88-Cis21) el primero de los cuales es esencial para el correcto plegamiento y actividad biológica. GM-CSF contiene N y O-glicosilaciones aumentando a varios rangos de peso molecular, donde las especies van desde 15-35 kDa (en humano existe N-glicosilaciones en posiciones 27 y 37). Las N-glicosilaciones parecieran reducir la actividad biológica específica y la afinidad de unión al receptor de GM-CSF comparada con la molécula no glicosilada (Cebon *et al.*, 1990). Este factor es una glicoproteína ácida con punto isoeléctrico entre 3.5 y 4.5 debido a su variable sialilación. Es una proteína altamente estable, no es fácil desnaturalarla irreversiblemente por calor, valores extremos de pH, proteasas o sales caotrópicas, con la condición de que los puentes disulfuro estén intactos. La estructura de GM-CSF ha sido determinada por cristalografía de rayos X y como otras citoquinas ocupa la conformación de un ovillo con cuatro hélices α antiparalelas con dos hebras β antiparalelas como lazos entre las hélices A y B y las hélices C y D (ver figura 1) (Walter *et al.*, 1992; Diederichs *et al.*, 1991). Una variedad de estudios sobre la estructura y la función sugieren que las hélices C y D son importantes para la unión a la cadena α del receptor de GM-CSF, mientras que los residuos de la hélice A son importantes para la unión de la cadena β del receptor del factor (Walter *et al.*, 1992; Diederichs *et al.*, 1991; Kaushansky *et al.*, 1989; Shanafelt *et al.*, 1991; López *et al.*, 1992).

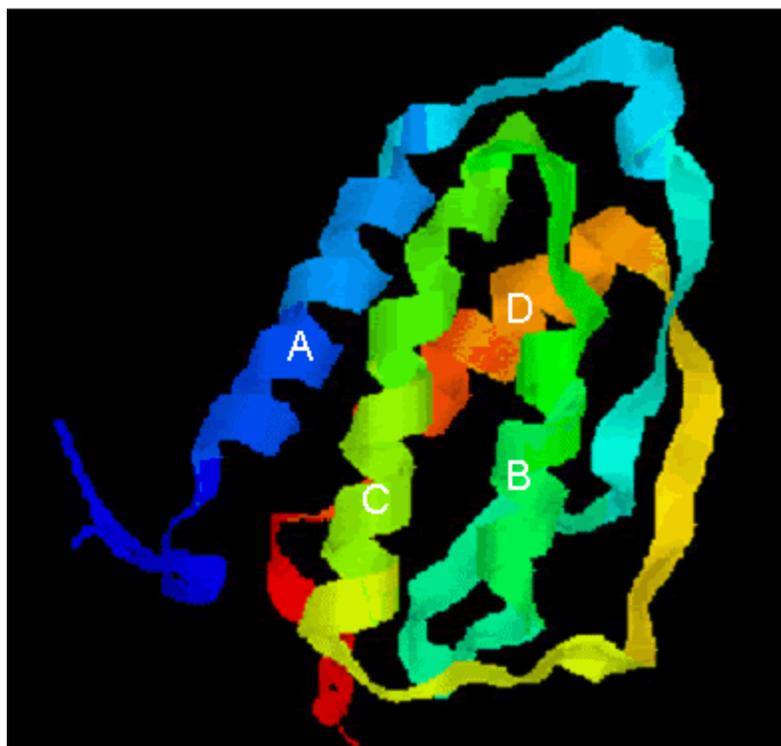


Figura 1. Estructura terciaria de GM-CSF humano. Determinado por cristalografía de rayos X. Adaptado de Diederichs *et al.*, 1991.

GM-CSF ha sido purificado usando variados procesos: cromatografía convencional y HPLC (Burgess and Nice, 1985) o por cromatografía de afinidad utilizando anticuerpos monoclonales y elusión con ácido (Cebon *et al.*, 1990).

En el humano el gen de GM-CSF está localizado en el cromosoma 5q21q32. Éste se encuentra muy cercano al gen de interleuquina 3 (10 kb) y aparentemente están corregulados. El gen abarca alrededor de 2.5 kb y contiene 4 exones (Miyatake *et al.*, 1985). Esto genera un mRNA simple de 0.8 kb sin transcritos alternativos descritos. El mRNA contiene una secuencia rica en AU en el extremo 3' lo que confiere inestabilidad en el mensaje debido a una actividad en la unión al RNA (Shaw and Kamen, 1986).

El gen de GM-CSF tiene una actividad constitutiva en monocitos, células endoteliales y fibroblastos, pero la producción de GM-CSF puede ser inducida por un incremento de la transcripción y por estabilización del mensajero. Se han descrito una gran gama de inductores incluyendo endotoxinas bacterianas, ésteres de forbol, factor de necrosis tumoral (TNF), interleuquina 1 y agentes activadores de macrófagos. La activación de células T por antígeno, concanavalina, anti-CD3, anticuerpo o ionóforo de calcio y ésteres de forbol resulta en un gran incremento de la producción de GM-CSF (Gough and Nicola, 1990).

GM-CSF es llamado así por su capacidad de estimular la formación de colonias de granulocitos y macrófagos en cultivos semi-sólidos de células de médula ósea. En este ensayo la actividad biológica específica es de aproximadamente 10^8 U/mg (donde 50 unidades/ml es la concentración requerida para la mitad de la máxima estimulación). GM-CSF, tiene una amplia especificidad hematopoiética con acción sobre neutrófilos,

eosinófilos, macrófagos, progenitores eritroides, progenitores megacariocíticos y células dendríticas presentadoras de antígeno. Estas acciones incluyen la prolongación de la supervivencia de las células progenitoras (inhibición de la apoptosis) y, en el caso de neutrófilos, eosinófilos y macrófagos, de las células madres; estimulación de la proliferación de las células progenitoras; y aumento de la capacidad funcional de las células madres (Gough and Nicola, 1990; Gasson, 1991; Tao and Levy, 1993; Dranoff *et al.*, 1993).

En resumen, las acciones biológicas son:

1. Aumentar la supervivencia de neutrófilos, eosinófilos, macrófagos y sus células progenitoras.
2. Estimular la proliferación de neutrófilos, eosinófilos, macrófagos, megacariocitos y progenitores celulares eritroides tempranos, así como, algunas leucemias y células tumorales no hematopoiéticas.
3. Inducir la diferenciación acoplada a proliferación de neutrófilos, eosinófilos, macrófagos y células progenitoras megacariocíticas, así como algunas líneas celulares de leucemia mieloide.
4. Estimular la secreción de citoquinas y mediadores inflamatorios solubles desde neutrófilos (IL-1, G-CSF, M-CSF, PAF, LTB₄) y macrófagos (G-CSF, M-CSF, IL-1, IL-6, PGE).
5. Incrementar la fagocitosis y citotoxicidad mediada por células dependiente de anticuerpo (ADCC) de neutrófilos, eosinófilos y macrófagos y preparar a estas células para el aumento de la formación del despliegue oxidativo por el estímulo primario.

6. Aumentar la actividad bactericida en neutrófilos y macrófagos y el exterminio de parásitos en eosinófilos y macrófagos.
7. Aumentar la actividad de presentación de antígeno de macrófagos y células de Langerhans y estimula las reacciones inmunes para antígenos foráneos.

En vivo, la administración del factor resulta en un aumento de los niveles en la circulación de neutrófilos, eosinófilos, monocitos y todas las células progenitoras e incremento del número y estados de activación de los macrófagos en tejidos. Esto ha sido usado clínicamente para el aumento de la recuperación hematopoiética en pacientes con cáncer que reciben quimioterapia con o sin trasplante de médula ósea (Nicola, 1997).

El GM-CSF media sus efectos vía interacción con receptores ubicados en la superficie celular, los cuales son altamente específicos. Este receptor está constituido por dos subunidades α y β . Ambas subunidades del receptor de GM-CSF contienen un dominio extracelular de 200 residuos de aminoácidos cuya estructura es conservada entre los miembros de la familia de receptores hematopoiéticos y es modelo de receptor de hormona de crecimiento. Los detalles de la señalización biológica a través de los receptores de GM-CSF son desconocidos, pero ninguna de las subunidades α o β contiene elementos de señalización reconocibles. El receptor está presumiblemente acoplado a tirosinas quinasas y a otros componentes de señalización presentes en las células.

El GM-CSF se une a la subunidad α específica aislada con baja afinidad (Kd: 1-7 nmoles/L), la subunidad β que es fosforilable, es incapaz de unir el factor por sí sola, sin

embargo, lo hace en complejo con la subunidad β y forma un receptor de alta afinidad (Kd: 20-100 pmoles/L). Esta subunidad β es común para el receptor de IL-3 e IL-5, uniéndose a las cadenas α específicas de estas citoquinas, siendo requerida para la señalización proliferativa en cada uno de estos receptores (Hayashida *et al.*, 1990; Kitamura *et al.*, 1991; Park *et al.*, 1992).

Los receptores de GM-CSF están presentes en células hematopoiéticas tales como progenitores y células mieloides y en fagocitos mononucleares, monocitos, eosinófilos y neutrófilos (Gasson,1991). También, han sido descritos en tejidos normales no hematopoiéticos, tales como, trofoblastos de placenta, células endoteliales, oligodendrocitos en el sistema nervioso y en algunas neoplasias y líneas de células tumorales (Baldwin *et al.*, 1989; Metcalf *et al.*, 1990; Baldwin *et al.*, 1991; Baldwin *et al.*, 1993; Brosnan *et al.*, 1993; Rivas *et al.*, 1998).

En nuestro laboratorio, hemos demostrado la expresión de receptores funcionalmente activos para GM-CSF en células no hematopoiéticas, tales como células germinales masculinas (Noli, 1999). La unión de GM-CSF a su receptor en espermatozoides de toro revela que éstos últimos tienen acerca de 105 sitios de alta afinidad con un Kd de 222 pM y aproximadamente 1100 sitios de baja afinidad con un Kd de 10 nM, señalizando un aumento en la captación de glucosa y vitamina C. (Noli, 1999, Zambrano, 1999). Además, la presencia y funcionalidad del receptor GM-CSF en la línea germinal masculina y en espermatozoides eyaculados humanos y bovinos se demostró por Zambrano *et al.* (2001). En este estudio se encontró que los niveles de mRNA de ambas subunidades son equivalentes, pero a nivel proteico existe una mayor densidad de la subunidad α en comparación con la subunidad β , lo que puede sugerir

una regulación a nivel traduccional o de estabilidad proteica; en línea celular de cáncer prostático se observa la misma situación (Rivas *et al.*, 1998). En estudios realizados en células de melanoma con ausencia de mRNA para la subunidad β y que expresaban sólo la subunidad α del receptor GM-CSF, las células fueron estimuladas con el factor aumentando la captación de glucosa independiente de la fosforilación (Spielholz *et al.*, 1995).

Los efectos de GM-CSF al interactuar con su receptor desencadena una cascada de fosforilación de proteínas cuya combinación induce proliferación, diferenciación y función celular. El receptor de GM-CSF no posee un dominio de actividad de tirosina quinasa, pero el proceso de señalización induce una rápida activación de tirosinas quinasas intracelulares (Kishimoto *et al.*, 1994) desencadenando variadas respuestas celulares (Kanakura *et al.*, 1990; Eder *et al.*, 1993; Ihle, 1995)

Se ha comprobado que algunas citoquinas incrementarían la captación de glucosa. Posibles mecanismos involucran aumento en la translocación de GLUTs desde vesículas intracelulares hacia la superficie celular, como también, aumento de la transcripción y producción de los transportadores de glucosa. En células mieloides hay una variedad de factores de crecimiento que participan en la incorporación de glucosa (Hiraki *et al.*, 1988; Nefesh *et al.*, 1991; Hamilton *et al.*, 1988) mientras que en fibroblastos, IL-1 se ha informado que aumenta el transporte de glucosa, regulando la afinidad del transportador por la glucosa. Además, este mecanismo involucraría tirosinas quinasa y proteína quinasa C (PKC). Se ha observado que IL-3 aumenta el transporte de glucosa en linfocitos debido a un efecto sobre la actividad intrínseca del sistema de transporte de glucosa (Nefesh *et al.*, 1991). Se estudió, también, el efecto del

aumento de incorporación de glucosa en macrófagos, producidos por factores de crecimiento hematopoiéticos como CSF-1, M-CSF, GM-CSF, IL-3 (Hamilton *et al.*, 1988). Estos autores determinaron que en estas células la captación basal y la estimulada ocurren vía los transportadores facilitativos de hexosas.

El GM-CSF señala un aumento en el transporte de glucosa en células hematopoiéticas no proliferativas. Estudios de transporte de glucosa realizados en células HL-60, las cuales expresarían el complejo α - β del receptor de GM-CSF determinaron que la captación de glucosa aumenta después del tratamiento con el factor. Por otro lado, en líneas de melanoma humano, las cuales expresaban el mRNA para la subunidad α , el factor, estimuló la captación de glucosa presumiblemente a través de los GLUTs, ya que el transporte y por ende la estimulación fue bloqueada por el uso de citocalasina B. GM-CSF estimuló la captación de glucosa 2.0 veces con respecto al control, pero no estimuló la proliferación celular (Spielholz *et al.*, 1995).

Datos de la literatura nos indican que las células germinales masculinas son altamente dependientes de la concentración de glucosa, fructosa y lactato (Grootegoed y Boer, 1990).

Por estudios realizados en nuestro laboratorio, se ha logrado demostrar que los espermatozoides humanos, de toro y rata expresan varias isoformas de los transportadores facilitativos de hexosas y que estos se localizan al nivel de cabeza y cola del espermatozoide. Además se comprobó la participación directa de estos transportadores en el transporte de glucosa, fructosa y vitamina C por el espermatozoide (Angulo, 1996; Rauch, 1996; Angulo *et al.*, 1998).

Por muchos años se ha pensado que las distintas etapas de maduración del espermatozoide hacia la fecundación estarían controladas por factores de crecimiento y moléculas reguladoras que se unen a los receptores de superficie celular, induciendo una serie de respuestas.

Evidencias experimentales sugieren que las células del sistema inmune pueden estar involucradas en interacciones de las células testiculares. En el testículo, el epitelio seminífero se encuentra separado del vascular por un tejido conectivo intersticial; además, las células del tejido conectivo y las células de Leydig contienen macrófagos residentes y linfáticos, estructuralmente y funcionalmente similares a los macrófagos encontrados en otros tejidos. En testículo humano y de ratón los macrófagos son numerosos; por otra parte se han identificado linfocitos en el tejido intersticial tanto de testículos normales como infértiles humanos.

Por estudios experimentales y clínicos, las células germinales masculinas y el espermatozoide son conocidos por ser altamente inmunogénicos. En el animal adulto, la respuesta inmune celular y humoral para la mayor parte de los antígenos, son iniciadas por células presentadoras de antígenos (APC) en las cuales se incluyen los macrófagos. La respuesta inmune subsiguiente es llevada a cabo por factores de crecimiento y diferenciación secretados por los APCs los que inducen y controlan la activación de linfocitos, proliferación y el evento inflamatorio. Los factores representantes de estos factores son: IL -1, IL-6 y TNF; en respuesta a su acción, los linfocitos secretan sus propios factores de diferenciación y crecimiento.

En humanos, la placenta es aparentemente la mejor fuente de GM-CSF (Zhao *et al.*, 1998) y tejidos como los ovarios y las trompas de Falopio expresan GM-CSF y las

dos subunidades del receptor (Zhao *et al.*, 1994). GM-CSF es sintetizado bajo la influencia reguladora de estrógenos por células del epitelio laminal y glandular uterino (Giacomini *et al.*, 1995). Se ha publicado que GM-CSF causa diferenciación morfológica de citotrofoblastos humanos (García-Lloret *et al.*, 1994).

El tejido de ovario humano durante varios estados reproductivos también expresa mRNA y proteína para GM-CSF así como para su receptor y sus dos subunidades. (Zhao *et al.*, 1995)

Lo encontrado nos lleva a pensar que sí el factor se está produciendo en línea germinal, puede regular en una manera autocrina/paracrina varias actividades biológicas del tipo celular.

De acuerdo con los antecedentes recopilados la hipótesis de este trabajo es: **"el factor estimulador de colonia granulocito macrófago (GM-CSF) se expresa en las células de la línea germinal masculina."**

Los objetivos específicos para probar esta hipótesis son:

- Localizar el factor estimulador de colonia granulocito macrófago (GM-CSF) en testículo humano por medio de inmunohistoquímica e identificar el polipéptido mediante análisis de Western Blot.
- Detectar el mRNA para la proteína por medio de las técnicas de RT-PCR e hibridación "in situ".
- Determinar la concentración del factor en líquido seminal utilizando un test de ELISA.

Determinar si el factor estimulador de colonia granulocito macrófago se está produciendo en células de la línea germinal masculina, ayudará a definir la importancia que posee el GM-CSF en los procesos celulares. Se puede relacionar así con mayor claridad la importancia que este factor presenta en la producción de espermatozoides y, por lo tanto, en fertilidad masculina.

3. MATERIALES Y METODOS

3.1 MATERIAL

Como sistema de estudio se utilizó cortes de testículo humano y bovino. Además, se utilizaron proteínas comerciales de testículo humano y proteínas de testículo de bovino extraídas según los métodos descritos posteriormente. Se utilizó RNA comercial de testículo humano. Y por último, muestras de semen humano frescas de donantes jóvenes y muestras de semen bovino frescas fueron proporcionadas por el Centro de Inseminación Artificial de la Universidad Austral de Chile

Las membranas de nitrocelulosa Hybond C (poro 0,45 μm) fueron obtenidas de **Amersham International plc**, al igual que ECL Western blotting reactivos de detección; anti-IgG de conejo conjugado a peroxidasa.

A **Biosource International** fue encargada la síntesis de la siguiente sonda que fue utilizada para Hibridación *in situ*:

Antisense GM-CSF: 5'-GTCTGGGTTGCACAGGAAG-3'

Además, de los siguientes partidores para la reacción de PCR con cDNA bovino:

Antisense: 5`-ATGTGGCTGCAGAACCTGCTTC- 3`

Sense: 5`-CTGGTTCCCAGCAGTCAAAGGG- 3`

De **Biosource Europe S.A.**; se utilizó el kit GM-CSF EASIA, un ensayo inmunoenzimométrico para la cuantificación de GM-CSF en suero, plasma, medios de cultivos celulares u otros fluidos biológicos.

De **Boehringer Mannheim GmbH**, se obtuvo digoxigenina 11-dUTP, enzima desoxinucleotidil transferasa terminal, tRNA de levadura y anticuerpo anti-digoxigenina conjugado a fosfatasa alcalina. Además, de Leupeptina, Apoproteinina, Pepstatina A e inhibidor de tripsina.

De **Clontech, laboratories, Inc.** se obtuvo RNA total de testículo humano y proteínas totales de testículo humano.

De **DAKO** se obtuvo los cortes de tejido humano normal (Checkerboard block, DAKO) y se utilizó el Kit de inmunohistoquímica LSAB[®]

De **Gibco Laboratories Life Technologies, Inc** se obtuvieron lo siguientes reactivos: agarosa, tampón 10X PCR, transcriptasa reversa Superscript II, MgCl₂, dNTPs (100 mM), DNA Taq polimerasa, estándar de 100 pares de bases y aceite mineral.

De **Merck, Darmstadt**. Fueron utilizados los siguientes reactivos: ácido clorhídrico, cloruro de sodio, fosfato ácido de sodio, Tween 20, glicerol, ácido acético, hidróxido de sodio, PMSF, cloruro de potasio, cloruro de calcio, cloruro de magnesio, sulfato de cromo III y potasio, etanol, xilol.

De **Sigma Chemical Co.** se utilizaron los siguientes reactivos: acrilamida, bisacrilamida, Trisma base, SDS, persulfato de amonio, TEMED, albúmina de suero bovino (fracción V), 2-mercaptoetanol, glicina, DTT, azul de bromofenol, azul de Coomassie, Triton X-100, gelatina de piel de bovino, solución Denhardt (0,2 % Ficoll, 0.02 % polivinil pirrolidona, 0.02% albúmina de suero bovino), DNA de salmón, sulfato de dextrano, sarcosil, isotiocianato de guanidina,

De **Sudelab** se obtuvo ácido acético, alcohol isopropílico y metanol, todos de grado técnico.

De **R&D SYSTEMS**, se utilizaron los partidores específicos de GM-CSF para la amplificación de un segmento de cDNA proveniente de testículo humano por la reacción de la polimerasa en cadena (PCR) los cuales tenían las siguientes secuencias:

Antisense: 5'-GGAGCATGTGAATGCCATC-3'

Sense: 5'-ATCTGGGTTGCACAGGAAG-3'

Además, se utilizó papel filtro N°1 de Whatman International Ltd., Hstochoice tissue fixative MB de Amresco y Cytoseal[®] 60 de Stephens Scientific.

El equipo utilizado fue el siguiente: centrífuga Eppendorf 5417-R, centrífuga Heraeus megafuge 1,0R, fuente de poder EPS 250 de Scientific Company, agitador magnético IKAMAG[®] RCT, estufa Boekel Industries Inc.136500, espectrofotómetros Shimadzu UV-150-02 y Shimadzu UV-120-12, pHmetro Radiometer Copenhagen PHM 83 Autocal, cámara de Neubauer, balanza Precisa 180A, sistema de electroforesis y transferencia Mini Protean II y Mini Trans Blot de BioRad, agitador orbital LAB-LINE, microscopio de rutina Axioskop 2 con cámara MC 80 DX de Zeiss, Freezer a -70°C Forma Scientific Bio-freezer 8425, freezer a -20°C M&S 280 Consul y refrigerador Fenza. El lector de placas de ELISA que se utilizó fue prestado por gentileza del laboratorio de Biotecnología de la Facultad de Ciencias Veterinarias.

3.2 MÉTODOS

3.2.1 Inmunohistoquímica en cortes de tejido.

3.2.1.1 Inmunohistoquímica en cortes de testículo humano

Se utilizaron cortes de tejido humano normal (Checkerboard block, DAKO) fijados a portaobjetos, los cuales fueron desparafinizados e hidratados como sigue: xileno dos veces por 5 minutos cada uno, etanol 100% dos veces por 3 minutos, etanol 80 % por 3 minutos, etanol 70% por 3 minutos, etanol 50 % por 3 minutos y agua destilada por 5 minutos. Después de dos lavados con tampón fosfato salino, PBS 1 X [NaH_2PO_4 15 mM (pH 7,4), NaCl 150mM], los cortes fueron tratados con solución de H_2O_2 1%, para incubar posteriormente con solución de bloqueo conteniendo BSA 1%, Tritón X-100 0,3%, leche descremada 5%, en PBS 1X durante una hora en cámara húmeda a temperatura ambiente. Posteriormente los cortes se cubrieron con 100 μl de solución de bloqueo conteniendo 1 μl de anticuerpo dirigido contra el factor GM-CSF y se incubaron toda la noche a temperatura ambiente. Para el revelado se utilizó DAKO® Kit de inmunohistoquímica LSAB®, esta técnica se basa en que las muestras, luego de ser incubadas con el primer anticuerpo, son expuestas a una solución que consiste en una IgG de conejo biotilada, para ser posteriormente incubadas con una solución de estreptavidina conjugada a peroxidasa. La técnica es completada después de la incubación con una solución sustrato-cromógeno, la reacción es desarrollada usando

3,3' diamino benzidina (DAB) dando como resultado un precipitado insoluble de color café en el sitio del antígeno.

A continuación, las muestras se incubaron por un minuto con una solución de hematoxilina para proceder posteriormente, a la deshidratación utilizando una batería ascendente de etanol al 50, 70, 80, y 100%, incubando 3 minutos en cada solución. Finalmente las muestras se dejaron en xilol por 5 minutos; se montaron usando Cytoseal[®] 60 y se analizaron por microscopía óptica.

3. 2. 1. 2 Inmunohistoquímica en cortes de testículo de bovino.

Sobre portaobjetos que fueron previamente lavados y cubiertos con una solución de gelatina de piel de bovino al 0,5% y sulfato de cromo (III) y potasio al 0,05% se adhieren cortes de testículo de bovino parafinizados. Se sigue el procedimiento antes descrito en la sección 3.2.1.1 con unas pequeñas modificaciones. Se realiza un tratamiento de permeabilización para la exposición del antígeno con citrato de sodio 10 mM (pH 6.0) en microondas como sigue: 1 minuto a 100% de potencia, 10 minutos a 10% de potencia, 15 minutos a temperatura ambiente. La dilución utilizada del anticuerpo corresponde 1 μ l de anticuerpo anti GM-CSF humano diluido en 100 μ l de solución de bloqueo, es decir 1:100.

3.2. 2. Extracción de proteínas de testículo de bovino.

Las proteínas fueron preparadas a partir de testículo de bovino. Se pesaron aproximadamente 10 mg de tejido, se suspendió en un tampón Tris-HCL 50 mM (pH 7,4) que contenía Tritón X-100 1,5%, DTT 25 mM, PMSF 0,1 mM, EDTA 1 mM, EGTA 10 mM, Aprotinina, Leupeptina, Pepstatina A, Bestatina, inhibidores de tripsina, todas 10 µg/ml, incubándose en hielo (4°C) durante 1 hora, para luego ser homogeneizado, utilizando un homogenizador de vidrio-teflón. La suspensión obtenida fue centrifugada a 15000 $\times g$ por 1 hora y se determinó la concentración de proteínas en el sobrenadante mediante el método de Bradford (Bradford, 1976). Para la curva de calibración se utilizó BSA en una concentración de 2 mg/ml como estándar.

3. 2. 3 Análisis electroforético de proteínas en geles de poliacrilamida SDS.

La electroforesis se efectuó en geles de poliacrilamida al 12% de acuerdo al procedimiento descrito por Laemmli (1970) en el sistema de electroforesis Mini Protean® (BIO-RAD). Las medidas del gel fueron: 9 cm de ancho, 6.3 cm de alto y 0.075 cm de grosor. Tanto el gel separador como el gel espaciador se prepararon a partir de una solución de acrilamida/bisacrilamida 30:0,8 % (30,8 % T, 2,6 % C). El gel separador se preparó a una concentración final de poliacrilamida al 12%, conteniendo además: Tris-HCl 1,5 M (pH 8,8), SDS 0,1%, persulfato de amonio 1 % y TEMED 0.03%. En tanto, el gel espaciador se preparó a una concentración final de

poliacrilamida de 4% incluyendo Tris-HCl 0,5 M (pH 6.8) SDS 0,1 %, persulfato de amonio 1 % y TEMED 0,04%.

De la muestra de proteínas totales de testículo humano se cargaron por carril 200 µg de proteína. En el caso de las proteínas de testículo de bovino se cargaron en el gel 216 µg de muestra por carril.

La electroforesis se llevó acabo a 30 mA por media hora aproximadamente, en tampón de corrida [Tris-HCl 25mM (pH 8,0), glicina 190 mM y SDS 0.1%]. Una vez terminada la corrida, se transfirió el gel desde las placas a una solución de fijación (isopropanol 25% y ácido acético 10%), por espacio de 15 minutos, tiñendo posteriormente con solución de azul de Coomassie (metanol 30% y de ácido acético 10%), por aproximadamente media hora. Finalmente el gel fue desteñado en microondas en un vaso con agua destilada se sumerge el gel y calentando a máxima potencia por tres minutos, se repitió el procedimiento tres veces.

3.2.4 Análisis de “Western blot”.

3.2.4.1 Electrotransferencia.

Después de finalizada la separación electroforética de 200 µg de proteínas totales por surco, las muestras se transfirieron a membranas de nitrocelulosa (Hybond C; 0,45 µm de poro, Amersham), según lo descrito por Tsang *et al.* (1983) en el sistema de transferencia Mini Trans Blot ® de BIO RAD. Para lo cual, sobre una esponja embebida en tampón de transferencia [Tris-HCl 25 mM (pH 8,3), glicina 190 mM, SDS

0,1% y metanol 20%] se depositó un trozo de papel filtro Whatman N°1, posteriormente la membrana de nitrocelulosa, luego el gel a transferir y otro papel filtro, todo lo cual se cubrió con otra esponja embebida en la misma solución. Este "sandwich" se colocó en la cámara de electrotransferencia conteniendo el tampón antes mencionado, y se aplicó una intensidad de corriente de 30 mA durante 14 horas. Transcurrido este tiempo la membrana se dejó secar a temperatura ambiente. Para verificar el buen resultado de la transferencia el gel fue teñido según lo descrito en 3.2.3.

3.2.4.2 Detección inmunológica.

Las membranas se incubaron con 10 ml de solución de bloqueo PBS-Tween 20-Leche [NaH_2PO_4 15 mM (pH 7,4), NaCl 150 mM, Tween 20 0,3% y leche descremada 5%] a 50°C, por 1 hora. Luego, cada membrana fue incubada con 5 ml de una solución que contenía el anticuerpo policlonal específico para el factor GM-CSF, diluido 1 : 250 en la solución de bloqueo con agitación constante durante toda la noche a 37°C. Posteriormente las membranas fueron lavadas 3 veces con PBS- Tween20 (Tween 20 0.3%, en PBS 1X) a 37°C por 15 minutos cada vez. Luego se incubaron a 37°C por una hora con 5 ml de una solución que contenía el segundo anticuerpo (anti IgG de conejo conjugado con peroxidasa) diluido 1:500 en solución de bloqueo. El exceso de anticuerpo se eliminó con 3 lavados con PBS-Tween 20 por 10 minutos cada uno a 37°C.

Finalmente, las membranas se expusieron usando un método de quimioluminiscencia no radiactivo denominado ECL, el cual se basa en la emisión de

luz, este método detecta antígenos inmovilizados unidos directa o indirectamente con anticuerpos conjugados con peroxidasa. El resultado se obtiene al mezclar partes iguales de dos reactivos, obteniéndose una solución de peróxido de hidrógeno y luminol que se vierte sobre las membranas, dejándose actuar por espacio de 1 min y secando el exceso con papel filtro, para exponer en un film el resultado de la excitación del luminol. Finalmente, se detiene la reacción al retirar la película de la membrana, procediendo a su revelado con reactivo D₇₂ y a su fijación con reactivo U₃.

3.2.5 Amplificación de secuencias génicas

3.2.5.1 Obtención del cDNA.

Se tomó 1 µg de RNA de testículo humano y 2 µg RNA de bovino, junto con 0.5 µg de oligo dT completando un volumen de 10 µl con agua desionizada y estéril, para ser desnaturado a 70° C por 10 minutos. Luego se adicionaron 4 µl del tampón 5X de la enzima transcriptasa reversa, el que contiene Tris-HCl 250mM (pH 8,3), KCl 375 mM y MgCl₂ 15 mM, más 2 µl de DTT 10 mM, 1 µl de dNTPs Mix 10 mM (dATP, dGTP, dCTP, dTTP), 2 µl de agua desionizada estéril. Los tubos fueron incubados a 42°C por 2 minutos para finalmente ser agregada 200 unidades de enzima transcriptasa reversa Super Script II. La mezcla se incubó 50 minutos a 42°C. A las muestras control de la reacción se les adicionó agua desionizada estéril, y no se le agrega enzima transcriptasa reversa.

3.2.5.2 Reacción de la polimerasa en cadena.

Para llevar a cabo la reacción de la polimerasa en cadena (PCR) se tomaron 5µl del cDNA obtenido depositándolos en otro tubo Eppendorf estéril, adicionando en forma secuencial los siguientes reactivos: 5µl de tampón 10X de la enzima Taq polimerasa el que contiene, Tris-HCl 100mM (pH 8,4) y KCl 500 mM, más 1,5 µl de MgCl₂ 50 mM ,1 µl de dNTPs Mix 10 mM, 45 pmoles de un mix de partidores y 0,5 µl de la enzima Taq polimerasa, para completar un volumen de 50 µl con agua desionizada estéril, sellando con una capa fina de aceite mineral. Antes de comenzar con los ciclos de PCR se realiza una desnaturación previa a 94°C por 4 minutos. Según lo descrito en la especificaciones de uso (R&D SYSTEMS), los ciclos se dividen en desnaturación 94°C por 1 minuto, hibridación a 55°C por 1 minuto, alineamiento a 72°C por 1 minuto y elongación a 72°C por 1 minuto. Este ciclo se repite 30 veces. Como control negativo se utilizó un tubo que contenía todo lo anterior al que se le agregó el control negativo de la transcripción reversa.

3.2.5.3 Visualización de los productos de amplificación.

Se tomaron 10µl de producto de amplificación de PCR, a los cuales se les agregó 2 µl de tampón muestra (TAE 6 X, azul de bromofenol 0,25% y glicerol 60 %). Los estándares de peso molecular se prepararon de manera similar, tomando 1 µl de estándar de 100 pb para DNA y se les adicionó 2 µl de tampón. Terminado estos

procesos, las muestras fueron sembradas en un gel de agarosa al 2% en tampón TAE 1X Tris-acetato 40 mM, EDTA 2 mM (pH 8,5), y además bromuro de etidio en una concentración final de 0.5 mg/ml. La corrida se llevó a cabo a 50 mA por espacio de aproximadamente una hora, al término de la cual se observó el gel sobre un transiluminador, visualizando de esta forma los productos de amplificación y los marcadores de tamaño molecular.

3.2.6 Hibridación *in situ* en cortes de tejido.

3.2.6.1 Marcaje no radioactivo de la sonda para GM-CSF con digoxigenina-11-dUTP.

La sonda antisense 5'-GTCTGGGTTGCACAGGAAG-3' para el factor GM-CSF se marcó con digoxigenina-11-dUTP en el extremo 3', según el procedimiento descrito por Concha et al (1993). La reacción se realizó en un tubo estéril de 0,5 ml con un volumen final de reacción de 20 μ l que contiene tampón 5X, digoxigenina-11-dUTP, 70 picomoles de sonda, dATP 0.45 mM, CoCl_2 1.5 mM y 50 U de la enzima desoxinucleotidil transferasa terminal. Se incubó a 37°C durante una hora y la reacción se detuvo en frío, posteriormente la sonda se guarda a -20°C.

3.2.6.2 Hibridación *in situ* de tejido humano.

El procedimiento de detección del mRNA de GM-CSF en cortes de testículo humano se realizó según el método descrito por Concha *et al.* (1993) con algunas modificaciones. Los cortes se desparafinizaron y rehidrataron en una batería de alcoholes comenzando en xilol dos veces, etanol 100% dos veces, etanol 95% dos veces por tres minutos cada uno, y finalmente dos veces con agua estéril por 5 minutos. Se realizó un tratamiento de permeabilización para exposición del antígeno de la muestra con citrato de sodio 10mM a pH 6.0 que consiste en llevar la muestra a un microondas por 1 minuto a máxima potencia (100%), luego 10 minutos a 10% de potencia, luego 15 minutos a temperatura ambiente. Luego se realizó un lavado con PBS 1X por 5 minutos, posteriormente se incubó en SSC 2X [NaCl 0.3 M y citrato de sodio 30mM a pH 7.2] por 10 minutos. Transcurrido este tiempo se prehibridó en solución de prehibridación que consiste en: formamida desionizada 50%, SSC 4X, solución Denhardt 1X, sulfato de dextrano 10%, tRNA de levadura 250 µg/ml, DNA de salmón 250 µg/ml y EDTA 2mM, durante 30 minutos a 37 °C. Luego se hibridó con la sonda marcada a una dilución 1:200 en solución de prehibridación a 37° C durante 14 horas. Posteriormente se realizaron lavados estrictos con SSC 2X por 10 minutos a temperatura ambiente, SSC 1X por 10 minutos a temperatura ambiente, SSC 0.5X por 20 minutos a 45°C y SSC 0.5X por 10 minutos a temperatura ambiente. Luego se incubó en tampón I [Tris-HCl 100mM (pH 7.5), NaCl 150mM] por 5 minutos seguido de solución de bloqueo [Tris-HCl 100mM (pH 7.5), NaCl 150mM, BSA 2% y Tritón X-100 0.3%] durante 60 minutos. Después se incubó con anticuerpo anti-digoxigenina a una

dilución 1:500 en solución de bloqueo durante 3 horas. Enseguida se lava con tampón I por 5 minutos.

3.2.6.3 Hibridación *in situ* de testículo de bovino.

Se repitió el procedimiento antes descrito en 3.2.6.2 utilizando la sonda antisense diseñada para mRNA de GM-CSF humano.

3.2.7 Determinación de la concentración de GM-CSF en líquido seminal humano y bovino.

3.2.7.1 Espermiogramas

Los espermiogramas se realizaron a una población de 12 muestras humanas y 2 bovinas, determinando los siguientes parámetros: examen macroscópico que incluye la determinación del pH de la muestra, la medición del volumen, aspecto y fluidez. El examen microscópico consiste en un examen directo que identificaba las características generales de una gota de semen homogéneo, es decir, un recuento de espermatozoides, la presencia de otros tipos celulares. Además, se realiza una tinción especial para ver morfología y supervivencia con eosina y negrosina, la motilidad se midió en grados según los movimientos del espermatozoide: grado 0 (inmóviles), grado I (movimiento pendular sin desplazamiento), grado II (movimiento pendular con leve

desplazamiento), grado III (movimiento progresivo lento), grado IV (movimiento progresivo rápido), dos horas después de tomada la muestra.

3.2.7.2 Obtención del líquido seminal.

Las muestras fueron centrifugadas a 15000 $\times g$ por 5 minutos para separar los espermatozoides del líquido seminal, después se centrifugaron durante 2 horas a 15000 $\times g$ para eliminar cualquier tipo de contaminación. A este fluido seminal se le determina la concentración de GM-CSF por medio del EASIA.

3.2.7.3 Inmunoensayo

El MEDGENIX GM-CSF EASIA es un inmunoensayo de sensibilidad enzimática amplificada en fase sólida resuelto en una placa. El ensayo está basado sobre un sistema oligoclonal en el cual se usa una mezcla de anticuerpos monoclonales dirigidos contra distintos epítopes. Los estándares poseían las siguientes concentraciones: 50, 150, 500, 1000, 2000 pg/ml, de éstos se tomaron 200 μl al igual que las muestras y el control. Como siguiente paso se agregó 50 μl de una solución que poseía anti-GM-CSF conjugado, se incubaron por 4 horas a temperatura ambiente con agitación suave. Después de un periodo de incubación que da paso a la formación del sandwich, las placas fueron lavadas para remover las uniones inespecíficas del anticuerpo unido a peroxidasa. La unión del anticuerpo marcado con peroxidasa se midió a través de una reacción cromogénica, para ello se le agregó tetrametilbenzidina (TMB) y peróxido de

hidrógeno. La reacción fue detenida agregando una solución que contiene ácido sulfúrico (H_2SO_4), y las placas fueron leídas a 450 nm de longitud de onda. La cantidad de sustrato producido fue determinada colorimétricamente por medidas de absorbancia. Se realizó la curva de calibración y la concentración de GM-CSF se determinó por interpolación en la curva de calibración.

4. RESULTADOS

4.1 Inmunohistoquímica del Factor de Estimulación Granulocito Macrófago (GM-CSF).

4.1.1 Inmunohistoquímica en cortes de testículo humano y bovino.

La identificación del factor GM-CSF se realizó sobre portaobjetos los cuales contenían cortes de testículo humano normal provenientes de DAKO y cortes de testículo de bovino, como se describió en la sección 3.2.1.2. Para ello se utilizó un anticuerpo policlonal dirigido contra el carboxilo terminal de la proteína humana, seguido de un segundo anticuerpo unido a peroxidasa según lo descrito para DAKO Kit de inmunohistoquímica LSAB[®]. En la **figura 2**, se muestra el resultado obtenido para la inmunohistoquímica realizada en distintos cortes de testículo humano, observándose inmunoreacción positiva en el citoplasma, alrededor del núcleo, a través de todo el túbulo seminífero, pero mayoritariamente en estadios primarios de la línea germinal, lo que indica presencia de la proteína del factor GM-CSF en testículos humanos.

El mismo estudio se realizó en muestras de testículo de bovino utilizando el anticuerpo dirigido contra la proteína humana. En la **figura 3**, se muestra la inmunolocalización para cortes de testículo de bovino, observándose reacción positiva especialmente la zona que corresponde a etapas de mayor maduración de la línea germinal.

A

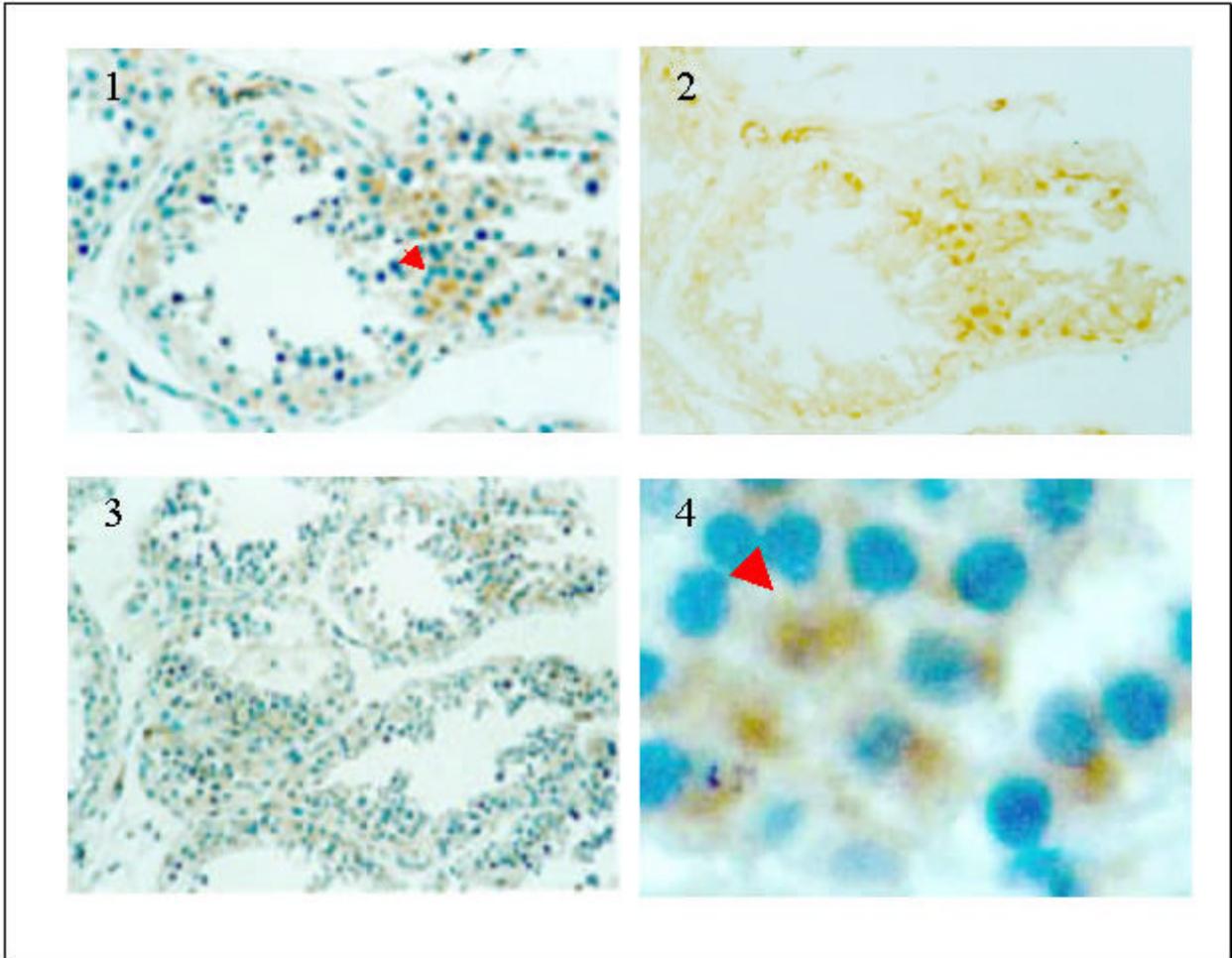


Figura 2-A. Inmunohistoquímica de GM-CSF en testículo humano normal. La localización celular del factor se llevó a cabo utilizando anticuerpos policlonales para el factor GM-CSF revelado según lo descrito por el kit de inmunohistoquímica LSAB[®]. Los núcleos de las células fueron contrateñidos con hematoxilina. Se puede apreciar que la marca está localizada a nivel citoplasmático y perinuclear de toda la línea germinal especialmente en estadios tempranos. Las flechas rojas indican inmunoreacción positiva en el citoplasma de las células que componen el túbulo seminífero del testículo. El panel 1 corresponde a un corte de testículo con los núcleos teñidos con hematoxilina con un aumento de 400 x. El panel 2 es un corte sólo con inmunoreacción positiva sin contrateñimiento con un aumento de 400 x. El panel 3 corresponde a un menor aumento del mismo corte de testículo (200 x). El panel 4 muestra el mismo corte con un aumento de 1000 x.

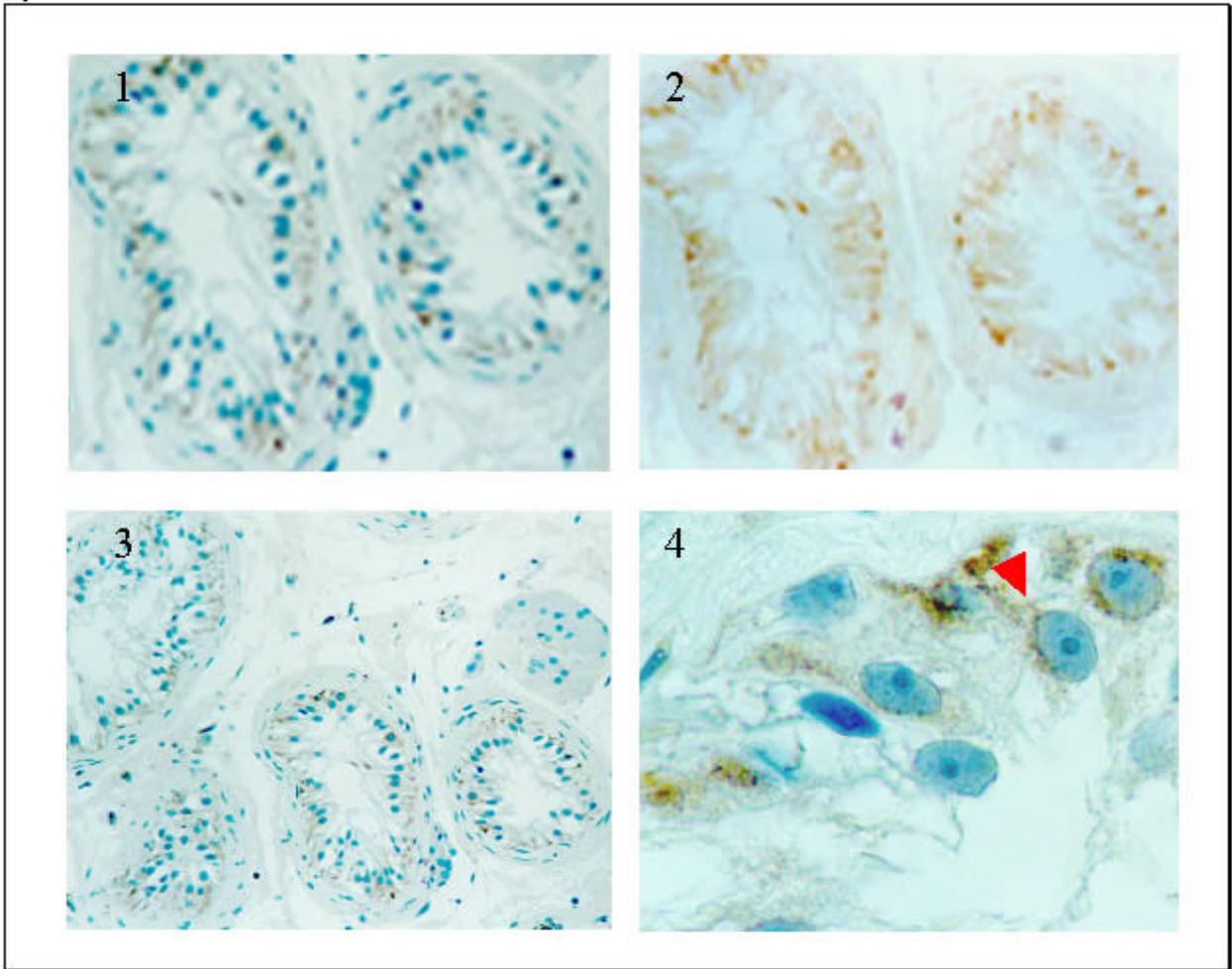
B

Figura 2-B. Inmunohistoquímica de GM-CSF en testículo humano. Cortes de testículo de humano normal incubados con anticuerpo para la proteína GM-CSF que presentan inmunoreacción positiva. Panel 1 y 2 muestran el mismo corte con y sin contratinción, respectivamente, con un aumento de 400 x. El panel 3 muestra el mismo corte a un menor aumento 200 x. El panel 4 muestra una sección del corte con un aumento de 1000 x. Las flechas rojas indican donde se evidencia inmunoreacción positiva.

C

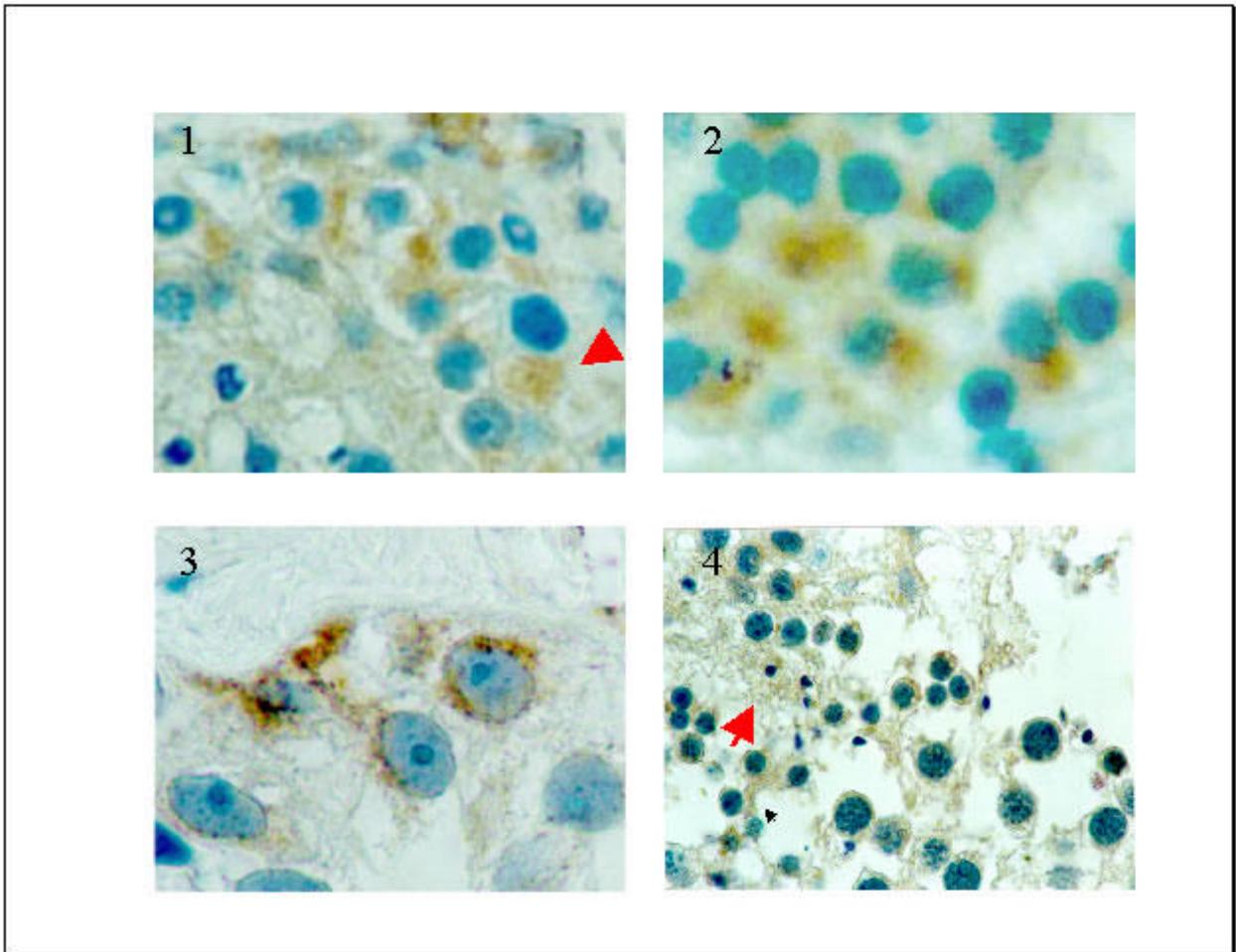


Figura 2C. Inmunohistoquímica de GM-CSF en testículo humano. Cortes de testículo humano normal incubados con el anticuerpo antiGM-CSF humano. Los paneles 1, 2 y 3 muestran inmunoreacción positiva de distintos cortes de testículo humano contrateñidos con hematoxilina con un aumento de 1000 x. El panel 4 muestra un corte donde se aprecia inmunoreacción a través de toda la línea germinal con un aumento de 400 x. Las flechas rojas indican donde se encuentra localizada la inmunoreacción.

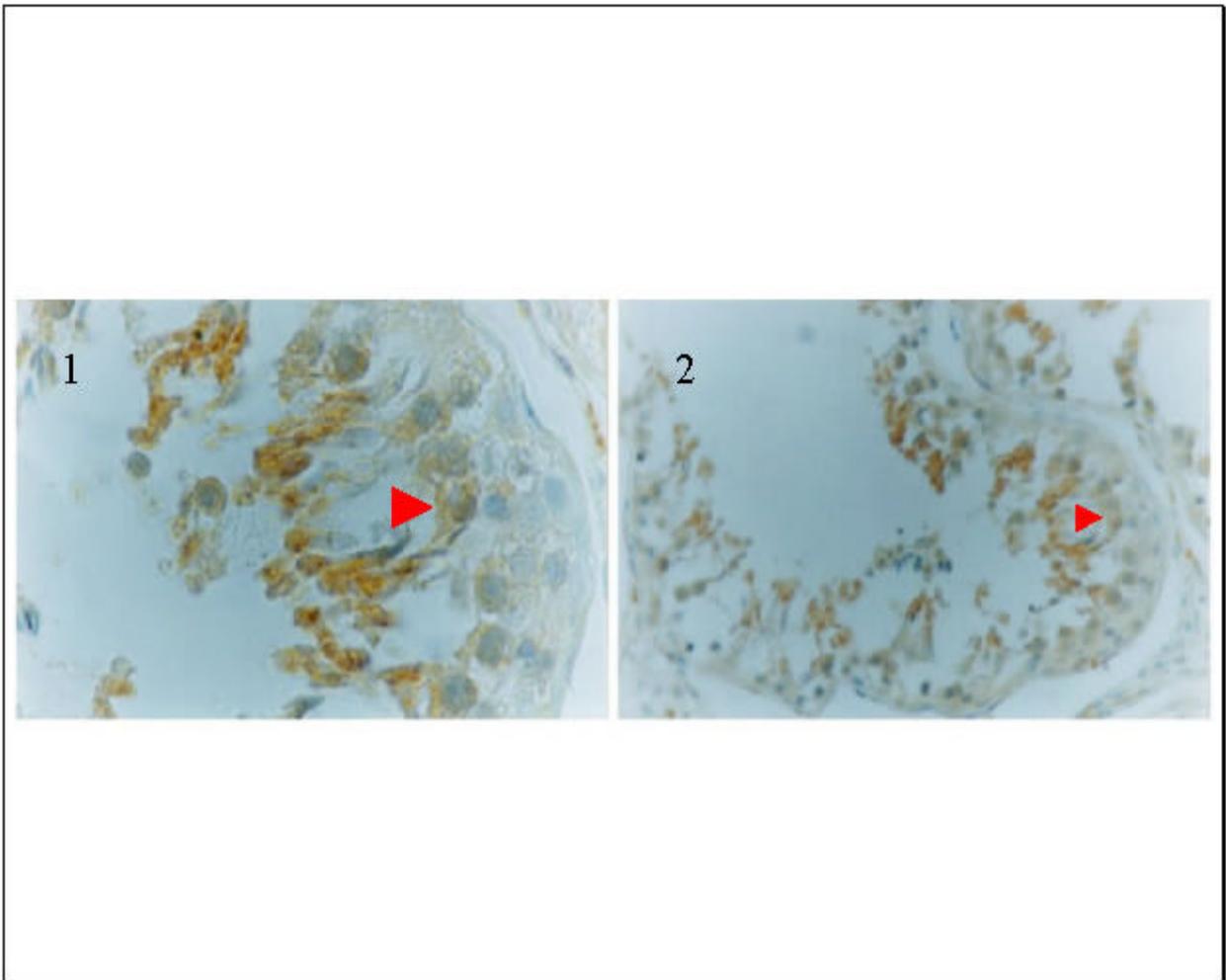


Figura 3. Inmunodetección de GM-CSF en cortes de testículo de bovino. En cortes de testículo de bovino se realizó la localización celular del factor, se utilizó anticuerpos policlonales para el factor GM-CSF humano, en una dilución de 1:100, seguido por la incubación de un segundo anticuerpo acoplado a peroxidasa según lo descrito por el Kit de inmunohistoquímica LSAB[®]. En testículo de bovino normal, se puede apreciar que la distribución de la inmunoreacción es, a través, de toda la línea germinal principalmente hacia la luz del túbulo seminífero. El panel 1 muestra un corte con un aumento de 400 x y el panel 2 muestra inmunoreacción positiva con un aumento de 200 x. Las flechas rojas muestran la marca dentro del citoplasma celular.

4.2. Análisis de Western Blot para proteínas de testículo humano y bovino.

Con el propósito de localizar el factor GM-CSF en testículo humano se recurrió a proteínas totales comerciales de testículo y se realizó una extracción de proteínas de bovino como se describe en el procedimiento 3.2.2. Posteriormente, fueron sometidas a electroforesis en gel de poliacrilamida en condiciones desnaturalantes al 12%. Este gel fue electrotransferido a una membrana de nitrocelulosa para realizar un inmunoblot el que fue revelado con un reactivo quimioluminiscente según lo descrito en 3.2.4.

El resultado del Western blot se presenta en la **figura 4**, donde se compara el resultado obtenido para proteínas testículo de humano y bovino, ambas incubadas con el anticuerpo antiGM-CSF humano en una dilución de 1:250 lo que reveló una masa molecular aparente para humanos de 34 kDa y para bovino de 37 kDa.



Figura 4. Identificación del factor estimulador de colonia granulocito-macrófago mediante "Western blot". 100 μg . de proteínas totales de testículo humano y 216 μg de proteína de testículo de bovino, fueron fraccionadas en SDS-PAGE al 12% y más tarde electrotransferidas a membranas de nitrocelulosa e incubadas con anticuerpos policlonales antiGM-CSF humano en una dilución de 1:250. Posterior a esto, las membranas fueron incubadas con un segundo anticuerpo conjugado con peroxidasa, siendo más tarde revelada mediante la técnica de quimioluminiscente ECL, la inmunoreacción producida se señala con flechas rojas. Al lado del panel se observan los correspondientes pesos moleculares obtenidos.

4.3 Análisis de RT-PCR.

Para continuar el estudio de la expresión del factor de estimulación de colonia granulocito macrófago en línea germinal de humano y toro se muestra en la **figura 5** el resultado del análisis de RT-PCR. El RNA de testículo humano y bovino se analizó por la reacción de la polimerasa en cadena reversa, usando partidores complementarios para la amplificación de un segmento de mRNA. En el carril 2 se observa una banda de aproximadamente 420 pb, tamaño esperado para el producto de amplificación de GM-CSF bovino. Un análisis similar usando partidores complementarios para GM-CSF humano reveló un producto de amplificación de aproximadamente 260 pb. En ambos casos, el tamaño de las bandas amplificadas corresponden exactamente a los tamaños de las respectivas bandas amplificadas desde RNA obtenido de línea hematopoiética. Como control negativo de la reacción de transcripción reversa no se utilizó la enzima transcriptasa reversa, para confirmar la ausencia de DNA contaminante en la preparación de RNA.

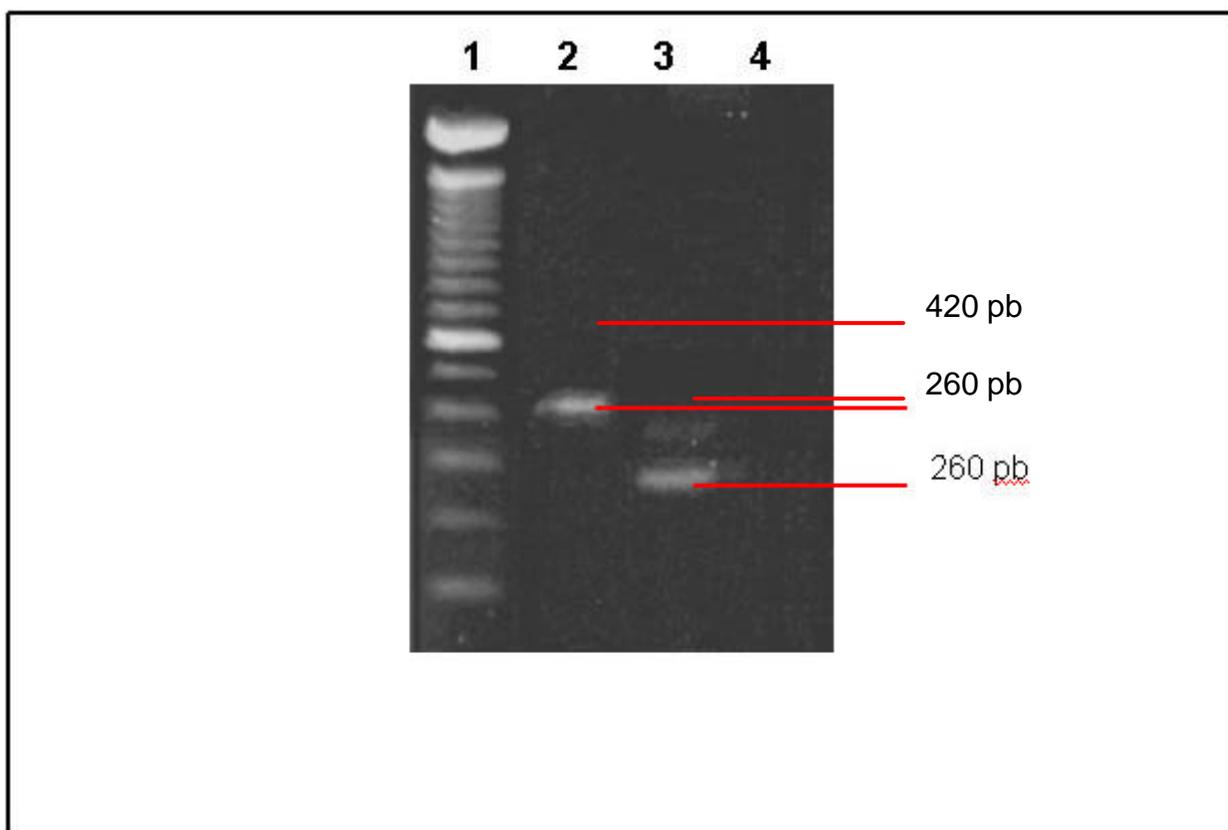


Figura 5. Detección de los productos de amplificación mediante RT-PCR. Los productos obtenidos, son visualizados en gel de agarosa al 2% con bromuro de etidio. Se utilizó para la reacción, 2 μg de RNA total de testículo bovino y 1 μg de RNA total de testículo humano, 45 pmoles de partidores en el caso de humano y bovino. El **carril 1** corresponde a la corrida electroforética de estándar de 100 pb. Los **carriles 2 y 3** corresponden al producto de amplificación del cDNA del factor en bovino y humano, respectivamente. El **carril 4** corresponde al control negativo de la reacción de RT-PCR.

4.4 Hibridación *in situ* de GM-CSF en cortes de testículo humano y bovino.

La detección del mRNA de GM-CSF se realizó mediante hibridación *in situ* en cortes humanos y bovinos. En el procedimiento, se utilizó una sonda diseñada para el mRNA humano a una concentración de 35 pmoles/ μ l marcada con digoxigenina, seguido de un segundo anticuerpo anti-digoxigenina unido a fosfatasa alcalina y revelado con NBT/BCIP, según lo descrito en 3.2.6. Como control negativo de la hibridación *in situ* los cortes de tejido humano y bovino fueron previamente tratados con RNAsa (datos no mostrados).

En la figura 6 se observa la marca de hibridación en ambos casos humano y bovino, a través, de toda la línea germinal en el túbulo seminífero.

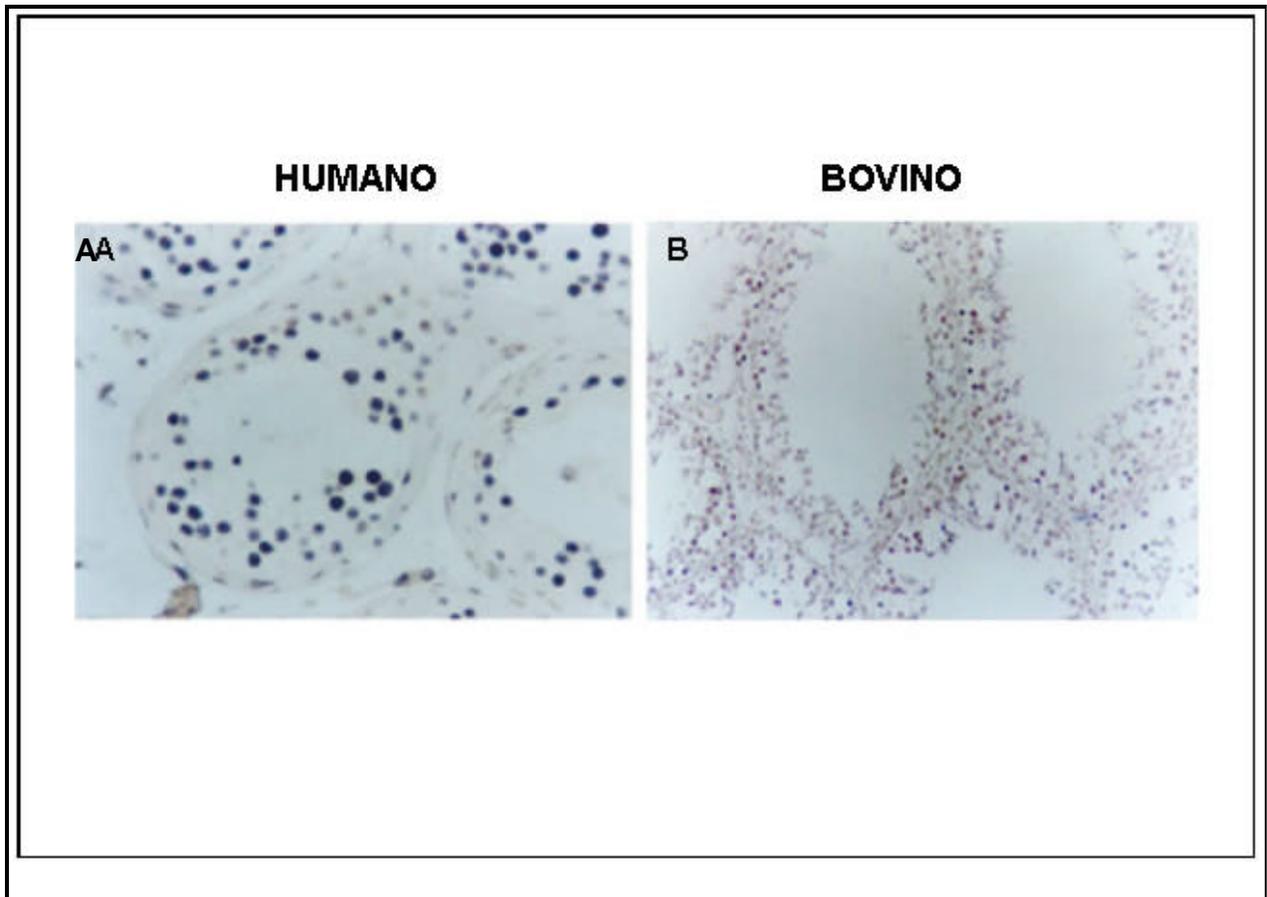


Figura 6. Hibridación *in situ* de GM-CSF en testículo humano y bovino. Cortes de testículo humano normal y de testículo bovino fueron incubados con una sonda *antisense* para GM-CSF marcada con digoxigenina. En el **panel A**, se muestra el resultado obtenido en la hibridación de un corte de testículo humano, la señal se observa a través de todo el túbulo seminífero. En el **panel B**, se tiene un corte de testículo de bovino el cual también presenta una señal positiva, a través de toda la línea germinal. (x400)

4.5 Detección de GM-CSF en líquido seminal humano y bovino.

Para realizar este ensayo se obtuvieron muestras de líquido seminal frescas por donación de distintos hombres jóvenes, las muestras de líquido seminal bovino fueron donadas por el Centro de Inseminación Artificial. Esta detección se realizó utilizando la técnica de EASIA como se describe en 3.2.7.3.

En la figura 7 se representa la curva de calibración, promedio que se obtuvo después de realizadas 4 determinaciones la que considera los siguientes valores para GM-CSF 0, 50, 150, 500, 1000, 2000 pg/ml,

En la **tabla 2** se representan los resultados obtenidos para las distintas muestras de fluido seminal. Las doce primeras muestras corresponden a líquido seminal humano eyaculado, las dos muestras siguientes corresponden a semen bovino y la última muestra representa un suero humano normal. En el ensayo 1 se leyó la densidad óptica a 450 nm, las muestras fueron diluidas 100 veces y la incubación del anticuerpo fue hecha a temperatura ambiente, como se describió en el protocolo del kit EASIA. En el segundo ensayo se utilizaron las muestras sin diluir con una incubación de 25°C. En el caso del tercer ensayo las muestras estaban también sin diluir, pero la incubación se realizó a 37°C. En el cuarto ensayo las muestras fueron concentradas al doble, y la incubación se realizó a 37°C.

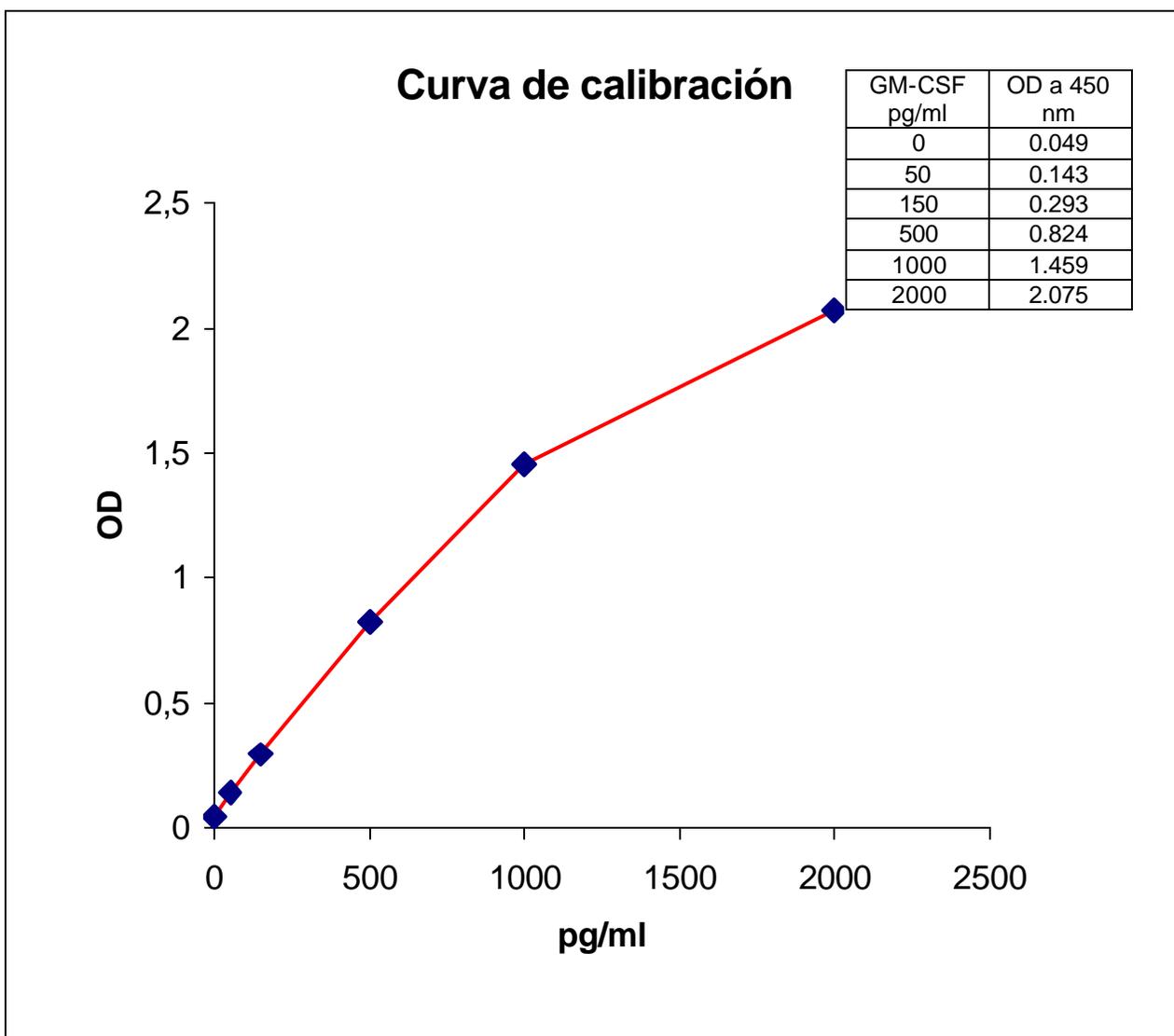


Figura 7. Curva de calibración de la cuantificación por EASIA de GM-CSF en líquido seminal humano y bovino. Esta curva es un ejemplo de uno de los ensayos realizados para la determinación de la concentración de GM-CSF en fluido seminal humano y bovino, y suero normal.

TABLA DE RESULTADOS

Nº de muestra	1º ensayo D.O.	2º ensayo D.O.	3º ensayo D.O.	4º ensayo D.O.
1	0.061	0.069	0.056	0.050
2	0.057	0.059	0.052	0.059
3	0.048	0.048	0.049	0.060
4	0.046	0.052	0.051	0.054
5	0.050	0.049	0.049	0.055
6	0.067	0.066	0.059	0.062
7	0.062	0.059	0.055	0.057
8	0.070	0.070	0.053	0.060
9	0.054	0.054	0.049	0.053
10	0.056	0.058	0.061	0.059
11	0.072	0.076	0.066	0.061
12	0.058	0.053	0.049	0.056
13	0.050	0.063	0.058	0.058
14	0.048	0.063	0.055	0.057
15	0.051	0.049	0.050	0.051

Tabla 2. Resultados de Densidad Optica a 450 nm obtenidos para las muestras de semen. Las doce primeras muestras corresponden a semen humano, las dos siguientes pertenecen a muestras bovinas y la última muestra es suero normal. El primer ensayo se realizó a temperatura ambiente utilizando las muestras diluídas 100 veces, el segundo y tercer ensayo se realizaron con las muestras sin diluir a 25 y 37°C, respectivamente; el cuarto ensayo considera las muestras concentradas al doble y a 37°C de incubación del anticuerpo.

5. DISCUSION

El presente trabajo de tesis tuvo como objetivo demostrar que las células de la línea germinal masculina expresan el factor de estimulación granulocito-macrófago GM-CSF.

En células sanguíneas, GM-CSF es una citoquina importante que participa en el desarrollo de la línea hematopoiética, mediando la proliferación, maduración y función de estas células (Nicola, 1997).

GM-CSF tiene distintas capacidades en línea hematopoiética, así como, en células no hematopoiéticas. Por ejemplo, se ha demostrado que GM-CSF estimula la captación de glucosa y vitamina C, a través de los transportadores facilitativos de hexosas (GLUTs), los cuales se componen de una familia de proteínas que pueden tener una actividad transportadora multifuncional, transportando glucosa, fructosa y vitamina C (Vera *et al.*, 1993; Ding *et al.*, 1994; Concha *et al.*, 1997, Angulo *et al.*, 1998; Zambrano *et al.*, 1999). También, se ha descrito que GM-CSF actúa como inhibidor de la muerte programada tanto en eosinófilos como en neutrófilos y su efecto es mediado por la fosforilación en tirosina de sustratos intracelulares (Yousefi *et al.*, 1994).

Distintos factores de crecimiento han sido implicados en la regulación de múltiples funciones celulares durante la embriogénesis, desarrollo y adultez. Durante estos eventos, péptidos mitogénicos pueden inducir distintas poblaciones de células a proliferar y a expresar funciones especializadas. Las células pueden secretar factores de crecimiento para actuar en vías autocrinas, para aumentar la proliferación de sí misma y células hermanas adyacentes. En suma, los factores de crecimiento pueden

actuar en rutas paracrinas para estimular células de diferentes líneas embrionarias. Si inducen la proliferación celular u otras acciones pleiotípicas, los factores de crecimiento pueden actuar individualmente o en conjunto para coordinar la expresión de múltiples funciones. La liberación de estos ligandos peptídicos generalmente está acoplada con la expresión de receptores específicos sobre unas apropiadas células blanco, un evento necesario para que los factores de crecimiento puedan ejercer sus efectos. Tales mecanismos se presume que modulan las interacciones célula-célula dentro del desarrollo y adultez de los testículos y por esa razón regulan el nacimiento y mantención de la espermatogénesis en mamíferos (Bellevé *et al.*, 1989).

La espermatogénesis es controlada de una manera diversa por las células somáticas del testículo, las células de Leydig y las células de Sertoli, requiriendo además de una regulación endocrina, para-autocrina y de una estrecha y directa interacción célula-célula (Kierszenbaum, 1994). Básicamente, la espermatogénesis consiste en tres fases secuenciales de proliferación y diferenciación celular. Por lo que se puede asumir que estén involucradas ciertas citoquinas o factores de crecimiento que regulen, mediante mecanismos autocrinos y/o paracrinicos, la función testicular y, tal vez, la capacidad fecundante de los espermatozoides. Los factores de crecimiento son secretados en muy pequeñas cantidades y en el caso de las gónadas, están involucrados en mecanismos autocrinos y paracrinicos que modulan la capacidad de respuesta de las células blanco a la FSH y LH, (Hafez y Hafez 2000), alterando de alguna manera la sensibilidad celular a las gonadotrofinas de forma estimulante o inhibitoria.

El GM-CSF media sus efectos a través de la interacción con su receptor de membrana, que está compuesto por dos subunidades α y β . La subunidad α es específica y presenta baja afinidad por GM-CSF, la subunidad β es común para varias citoquinas como las IL-3 e IL-5, esta subunidad no une al factor por sí sola.

Los receptores de GM-CSF están presentes en variados tipos celulares de la línea hematopoiética como por ejemplo: células mieloides, en fagocitos mononucleares, monocitos, eosinófilos y neutrófilos (Gasson.,1991). También, han sido descritos en tejidos normales no hematopoiéticos tales como trofoblastos de placenta, células endoteliales, oligodendrocitos en el sistema nervioso y en algunas neoplasias y líneas de células tumorales (Baldwin *et al.*, 1989; Metcalf *et al.*, 1990; Baldwin *et al.*, 1991; Baldwin *et al.* 1993; Brosnan *et al.*, 1993; Rivas *et al.*, 1998).

En nuestro laboratorio, hemos demostrado la expresión de receptores funcionalmente activos para GM-CSF en células no hematopoiéticas, tales como células germinales masculinas (Noli, 1999). La unión de GM-CSF a su receptor en espermatozoides de toro revela que éstos tienen acerca de 105 sitios de alta afinidad con un Kd de 222 pM y aproximadamente 1100 sitios de baja afinidad con un Kd de 10 nM, señalizando un aumento en la captación de glucosa y vitamina C. (Noli, 1999, Zambrano, 1999; Zambrano *et al.*, 2001). La presencia y funcionalidad del receptor GM-CSF en la línea germinal masculina y en espermatozoides eyaculados humanos y bovinos se demostró por Zambrano *et al.* (2001). En este estudio se encontró que los niveles de mRNA de ambas subunidades son equivalentes, pero a nivel proteico existe una mayor densidad de la subunidad α en comparación con la subunidad β , lo que

puede sugerir una regulación a nivel traduccional o de estabilidad proteica. Además, en línea celular de cáncer prostático se observa la misma situación (Rivas *et al.*, 1998).

Se ha descrito la expresión del factor y de su receptor en ovarios y trompas de Falopio humanos (Zhao *et al.*, 1995). También, se ha aislado distintas citoquinas en el líquido folicular (Mendoza *et al.*, 1999) incluyendo al GM-CSF (Jasper *et al.*, 1996), señalándolas como reguladores positivas de la fase final del desarrollo del ovocito intrafolicular. En el tracto reproductivo femenino, GM-CSF es sintetizado bajo la influencia reguladora de estrógenos por células del epitelio laminal y glandular uterino (Giacomini *et al.*, 1995). Se ha publicado que GM-CSF causa diferenciación morfológica de citotrofoblastos humanos (García-Lloret *et al.*, 1994), así como también las prostaglandinas aumentan la expresión de GM-CSF para proveer un mejor crecimiento y supervivencia en etapas embrionarias de bovinos (Emond *et al.*, 1998).

Existe mucha información que demuestra la expresión de variadas citoquinas y sus receptores en gónadas femeninas de diversas especies. Se les ha involucrado en mecanismos autocrinos y paracrinos como reguladores de las actividades biológicas del ovario como por ejemplo: crecimiento y diferenciación celular, ovulación, atresia folicular, luteolisis, etc. Se ha demostrado que los macrófagos están presentes en el estroma ovárico y en la región de la teca antes y después del momento de la ovulación (Jasper *et al.*, 2000), aumentando 5 veces su número en la región de la teca antes de la ovulación (Brannstrom *et al.*, 1994), representando una potencial fuente de secreción de citoquinas. Lo que se puede análogar con lo que sucede en el espacio intersticial de los testículos de mamíferos que está constituido en un 25% por macrófagos (Niemi *et al.*, 1986). Estas células poseen receptores para GM-CSF y transcriben ocho veces más

mRNA para GM-CSF que los macrófagos de otros tejidos (Fawcett *et al.*, 1973) y por lo tanto, su secreción de GM-CSF es más abundante (Kern *et al.*, 1995), infiriendo que las citoquinas pueden ser importantes en la fisiología del desarrollo de ambos gametos.

Debido a los antecedentes previos se puede especular que el factor se estaría produciendo en testículo y cumpliría un papel fisiológico, es decir, participaría en la proliferación, diferenciación y maduración de la línea germinal masculina, así como lo hace en línea germinal femenina. Y por otro lado, estaría aumentando el transporte de glucosa y vitamina C en las células de la línea germinal. En suma, todos estos argumentos llevan a pensar que este factor es un agente importante en la mantención de una buena calidad espermática, sugiriendo un papel preponderante en fertilidad y reproducción.

Para comprobar la hipótesis planteada se procedió a realizar variados experimentos. En primer lugar, se realizó una inmunolocalización en testículos humanos y de toro, utilizando anticuerpos policlonales dirigidos al factor estimulante de colonias granulocito-macrófago humano, de la cual se observó inmunoreacción positiva, a través de toda la línea germinal, en el caso de humanos, principalmente en estadios primarios. En cortes de testículo de bovino, se observa localización a través de toda la línea germinal, mayoritariamente hacia la luz del túbulo seminífero.

Posterior a los estudios de inmunohistoquímica se realizó el análisis de "Western blot" para proteínas totales de testículos humanos y de toro, con el fin de determinar la presencia de GM-CSF.

Las proteínas de testículo humano y toro fueron separadas electroforéticamente en geles de poliacrilamida al 12% en condiciones desnaturantes (SDS-PAGE). La

detección de GM-CSF en el análisis de "Western blot" para las proteínas de testículo humano y toro, completan el resultado obtenido mediante inmunohistoquímica, ya que se obtuvo una señal a los 34 kDa para humano que según lo descrito por Nicola (1997) se encuentra dentro de los rangos esperados para esta proteína. En el caso de la especie bovina se obtuvo una señal de 37 kDa.

Una vez detectada la proteína del factor estimulante de colonias granulocito-macrófago en testículos humanos y bovinos, se procedió a estudiar la presencia del mRNA de GM-CSF en cortes de testículo humano utilizando la técnica de hibridación *in situ* por medio de una sonda complementaria marcada con digoxigenina. Al revelar la hibridación se evidencia la presencia del mensajero en testículo, correlacionándose con la inmunohistoquímica. En bovino la hibridación *in situ* se realizó utilizando la sonda complementaria a una región de mRNA humano debidamente unido a digoxigenina obteniéndose localización al igual que humano, en todo el túbulo seminífero.

Para corroborar lo antes mencionado se realizó una reacción en cadena de la polimerasa en transcripción reversa (RT-PCR) lo que demostró la presencia del mensajero esperado de 260 pb, en el caso de mRNA humano. Para bovino se amplificó el cDNA obtenido por transcripción reversa con sus partidores respectivos observándose un producto de 420 pb según lo esperado.

Aunque la acción de los factores de crecimiento y sus receptores en la fisiología del testículo normal es desconocida, estos resultados sugieren que el GM-CSF puede tener un papel en mantener la función en las células de la línea germinal masculina normal. GM-CSF podría estimular las células de la línea germinal de manera similar a

las células de la línea hematopoiética, y puede participar en la proliferación, maduración y función de estas células.

Se ha demostrado que el GM-CSF producido en el espacio intersticial del testículo cruza la barrera hemato-testicular (McLay *et al.*, 1997) pasando a las células del epitelio seminífero, muy probablemente a ejercer alguna función reguladora en el proceso de espermatogénesis mediante importantes señales entre el sistema inmune y el testículo.

Considerando lo anteriormente mencionado y el hecho que se está demostrando la producción del factor en línea germinal, sería lógico pensar que en líquido seminal exista la proteína en niveles detectables, así como otras citoquinas. Se ha determinado que las células de Sertoli y Leydig producen una gran variedad de citoquinas (Hecht, 1990) que estarían involucradas en mecanismos autocrinos y/o paracrinos regulando la función testicular y, tal vez, la capacidad fecundante de los espermatozoides. Sin embargo, las relaciones encontradas entre las distintas citoquinas del plasma seminal y los parámetros seminales difieren según sea la citoquina involucrada. Como ejemplo, tenemos lo demostrado por Naz y Evans (1998) quienes encontraron una relación significativa entre los niveles de interleuquina 12 en el líquido seminal humano con la concentración espermática y el porcentaje de espermatozoide morfológicamente normales, sugiriendo que esta interleuquina pudiera estar involucrada en la fertilidad humana. Por el contrario Dousset *et al.* (1997) y Paradisi *et al.* (1997) encontraron en el plasma seminal de hombres infértiles un aumento de la interleuquina β e interleuquina 6 respectivamente, estableciendo una situación inversa a la encontrada por los investigadores antes mencionados.

Para cuantificar el GM-CSF en fluido seminal se utilizó un inmunoensayo a diversas muestras humanas, bovinas y una muestra de suero normal. De hecho, esta fue una de las razones por las que se realizaron los espermogramas a las muestras que fueron sometidas a ELISA, para así poder encontrar alguna relación entre la calidad espermática y la cantidad de GM-CSF en el líquido seminal. Este ensayo se realizó en muestras diluidas, sin diluir y concentradas. Los resultados obtenidos (**Tabla 2**) nos muestran que a pesar de ser concentradas al doble, la densidad óptica a 450 nm. no presenta ninguna variación significativa, de hecho, se encuentran dentro de los rangos de densidad óptica que presenta el blanco del ensayo. Por lo tanto, el ensayo no detectó GM-CSF en líquido seminal.

El resultado obtenido para muestras de suero es corroborado por lo ya descrito por Gasson *et al.* (1991), que informan que GM-CSF no aparece en la circulación en niveles detectables, por lo tanto a diferencia de las clásicas hormonas endocrinas, GM-CSF se comporta de acuerdo a un modelo paracrino donde la sustancia es producida y actúa localmente. Esto, a su vez, es aplicable a lo sucedido en el túbulo seminífero. La determinación de GM-CSF en el plasma seminal mediante técnicas de ELISA demostró que las concentraciones del factor son muy bajas en semen bovino y humano, confirmando que aunque GM-CSF se encuentra en niveles muy altos en testículo (Kern *et al.*, 1995), su vía de acción es autocrina o paracrina actuando en el mismo tejido donde se produce.

Ciertamente, se han informado muchos ejemplos, de la inducción de síntesis de citoquinas y revelan desde sus células blanco ambas citoquinas reguladoras positivas y negativas, las cuales podrían actuar en una manera autocrina, paracrina o intercrina.

No obstante, ha sido extremadamente dificultoso informar los detalles de la producción de citoquinas e inducción de citoquinas secundarias *in vivo* especialmente bajo condiciones estables. Esto tiende a dirigir algunos de los propósitos de las citoquinas, que tiene que ver con el día a día del funcionamiento del cuerpo, pero que se representa en el lugar de una respuesta a daño de tejido, infección y otro agravio. Esto último es indudablemente verdad, podrían haber muchas razones de por qué muchas citoquinas son difíciles de encontrar en el suero bajo condiciones normales (Nicola, 1997).

Se han descrito variados usos clínicos para GM-CSF y otros factores de crecimiento, que se relacionan con su capacidad para aumentar el número de células de defensa estimulando la habilidad de neutrófilos, macrófagos y eosinófilos para fagocitar y destruir una variedad de microorganismos. En cuanto a células no hematopoiéticas el factor puede inducir la proliferación y migración de células endoteliales, como también la proliferación de un número de líneas tumorales que incluyen sarcoma osteogénico, carcinoma y adenocarcinoma (Bussolino *et al.*, 1989).

En el hombre, la disminución de vitamina C del semen, está relacionada con la disminución de la calidad espermática expresada en la reducción de la motilidad, menor número de espermatozoides, alteración en la morfología y abundante aglutinación entre las células (Dawson *et al.*, 1987). Esta vitamina, además de otros compuestos del líquido seminal, tienen un papel importante en la protección del espermatozoide contra especies oxígeno reactivas tales como los aniones superóxido y peróxido de hidrógeno los que se generan a nivel de las propias membranas (Aitken y Fischer, 1994) y son responsables de la lipoperoxidación de éstas.

El hallazgo que el GM-CSF es capaz de aumentar el movimiento espermático, confirma que este factor de crecimiento juega un papel importante en la fisiología espermática (Vilanova, 2002).

La expresión del GM-CSF y de las subunidades α y β de su receptor en la línea germinal femenina y masculina de los bovinos, y de otras especies, podría estar indicando que esta citoquina está involucrada más allá que la funcionalidad del testículo y del ovario, teniendo una acción directa en el desarrollo embrionario. Esta premisa fue comprobada por Sjöblom *et al.* (2001) quienes reportaron que el GM-CSF aumenta la viabilidad de embriones humanos mediante una acción protectora de la masa celular interna embrionaria ante la apoptosis, y por lo tanto la adición de GM-CSF al cultivo embrionario aumenta la calidad y tasa de desarrollo a blastocisto y el índice de preñez humana en los programas de reproducción asistida (Kim *et al.*, 2001).

Por lo tanto, el hecho de que GM-CSF sé sintetice en el testículo y que aumente el transporte de vitamina C, estimule la proliferación, diferenciación y función de las células del testículo nos ayuda a comprender de una manera análoga la fisiología de la línea germinal masculina, y porque no, femenina.

En suma, se puede concluir que GM-CSF es producido por las células de la línea germinal humana y bovina, y este factor se encontraría ejerciendo su función a nivel autocrino/paracrino.

6. BIBLIOGRAFIA

- Aarden, I., Brunner, T., Cerottini, J., Dayer, J., de Weck, A., Dinarello, C., Di Sabato, G., Farrar, J., Gery, I., Gillis, S., and 24 others (1979). Revised nomenclature for antigen-non-specific T cell proliferation and helper factors. *J. Immunol.*, 123, 2928-2929.
- Adashi, E.Y. (1990). The potential relevance of cytokines to ovarian physiology: the emerging role of resident ovarian cells of the white blood cell series. *Endocr. Rev.*, 11, 454-464.
- Adashi, E.Y. (1994). Endocrinology of the ovary. *Hum. Reprod.*, 9, 815-827.
- Angulo, C. (1996). Transportadores facilitativos de hexosas en espermatozoides humanos. Transporte de glucosa y fructosa. Tesis, Escuela de Licenciatura en Ciencias, Facultad de Ciencias, Universidad Austral de Chile.
- Angulo, C., M. Rauch, A. Droppelmann, A. Reyes, J. Slebe, F. Delgado-López, V. Guaiquil, J. Vera, I. Concha. (1998). Hexose transporter expression and function in mammalian spermatozoa. Cellular localization and transport of hexoses and vitamin C. *J. Cell Biochem.*, 71, 189-203.
- Arend, W. (1993). Interleukin-1 receptor antagonist. *Adv. Immunol.*, 54, 167-227.
- Baldwin, G. C., Benveniste, E. N., Chung, G. Y., Gasson, J. C., and Golde, D. W. (1993). Identification and characterization of a high-affinity granulocyte-macrophage colony-stimulating factor receptor on primary rat oligodendrocytes. *Blood*, 82, 3279-82.

- Baldwin, G. C., Golde, D. W., Widhopf, G. F., Economou, J., and Gasson, J. C. (1991). Identification and characterization of a low affinity granulocyte-macrophage colony stimulating factor receptor on primary and cultured human melanoma cells. *Blood*, 78 (3), 609-15.
- Baldwin, G. C., Gasson, J. C., Kaufman, S. E., Quau, S. G., Williams, R. S., Avalos, B. R., Gazdar, A. F., Golde, D. W., and Di Persio, P. F. (1989). Non-hematopoietic tumor cells express functional GM-CSF receptors. *Blood* 73 (4), 1033-1037.
- Bellevé, A. R. and W. Zheng. (1989). Growth factors as autocrine and paracrine modulators of male gonadal functions. *J. Reprod. Fertil.* 85, 771-793.
- 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.
- Brannstrom, M., Norman, R. (1993). Involvement of leukocytes and cytokines in the ovulatory process and corpus luteum function. *Hum. Reprod.*, 8, 1762-1775.
- Brannstrom, M., Norman, R., Seamark, R., Robertson, S. (1994). Rat ovary produces cytokines during ovulation. *Biol. Reprod.*, 50, 88-94.
- Brosnan, C. F., Shafit-Zagardo, B., Aguido, D. A., and Berman, J. W. (1993). Expression of monocyte / macrophage growth factors and receptors in the central nervous system. *Adv in Neur*, 59, 349.
- Bussolino, F., Wang, J. M., Defilippi, P., Turrini, F., Sanavio, F., Edgell, C-J. S., Aglietta, M., Arese, P., and Mantovani, A. (1989). Granulocyte and granulocyte-macrophage colony stimulating factors induce human endothelial cells to migrate and proliferate. *Nature*, 337: 471-473.

- Burgess, A. and Nice, E. (1985). Murine granulocyte-macrophage colony-stimulating factor. *Methods Enzymol.*, 116, 588-600.
- Cebon, J., Nicola, N., Ward, M., Grdner, I., Dempsey, P., Layton, J., Duhrsen, U., Burgess, A., Nice, E., and Morstyn, G. (1990). Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor from human lymphocytes. The effect of glycosylation on receptor binding and biological activity. *J. Biol. Chem.*, 265, 4483-4491.
- Cohen, S., Bigazzi, P., and Yoshida, T. (1974). Similarities of T cell function in cell mediated immunity and antibody production. *Cell Immunol.*, 12, 150-159.
- Concha, I.I., Velásquez F., Martínez, J., Angulo, C., Droppelmann, A., Reyes, A., Slebe, J.C., Vera, J., Golde, D. W.(1997). Human erythrocytes express GLUT5 and transport fructosa. *Blood*, 89, 4190-4195.
- Dawson, E. B., Harris, W. A., Rankin, W. E., Charpentier, L. A., and Mc. Ganity, W. J. (1987). Effect of ascorbic acid on male fertility. *Annu. Rev. N.Y. Acad. Sci.*, 498, 312-23.
- Diederichs, K., Boone, T, and Karplus, P. (1991). Novel fould and putative receptor binding site of granulocyte-macrophage colony-stimulating factor. *Science* , 254, 1779-1782.
- Ding, D. X., Rivas, C. I., Heaney, M. L., Raines, M. A., Vera, J. C., and Golde, D. W. (1994). The alpha subunit of the human granulocyte-macrophage colony stimulating factor receptor signals for glucose transport via a phosphorylation-independent pathway. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A*, 91 (7), 2537-41.
- Dranoff, G. Jaffee, E., Lazenby, A., Columbek, P., Levitsky, H., Brose, K., Jackson, V., Hamada, H., Pardoll, D., and Mulligan, R. (1993). Vaccination with irradiated

- tumour cells engineered to secrete murine granulocyte-macrophage colony-stimulating factor stimulates potent, specific, and long-lasting anti-tumour immunity. *Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)*, 90, 3539-3543.
- Dumonde, D., Woltencroft, R., Panayi, G., Mathew, M., Marley, J., and Howson, W. (1969). "Lymphokines": Non-antibody mediators of cellular immunity generated by lymphocyte activation. *Nature*, 224, 38-42.
- Eder, M., Griffin, J., Ernst, T. (1993) The human granulocyte-macrophage colony-stimulating factor receptor is capable of initiating signal transduction in NIH3T3 cells. *EMBO. J.* 12, 1647-1656.
- Fawcett, D., Neaves, W., Flores, M., (1973). Comparative observations on interstitial lymphatics and organization of the interstitial tissue of the mammalian testis. *Biol. Reprod.*, 9, 500-532.
- Fernández-Bottran, R. (1991). Soluble cytokine receptors: their role in immunoregulation. *Faseb J.* 5, 2567-2574.
- Garcia-Lloret M, Morrish D, Wegmann T, Honore L, Turner A, Guilbert L, (1994). Demonstration of functional cytokine-placental interactions: CSF-1 and GM-CSF stimulate human cytotrophoblast differentiation and peptide hormone secretion. *Exp. Cell. Res.*, 214; 46-54.
- Gasson, J. C. (1991). Molecular physiology of granulocyte-macrophage colony-stimulating factor. [Review]. *Blood*, 77 (6), 1131-45.
- Giacomini G, Tabibzadeh S, Satyaswaroop P, Bonsi L, Vitale L, Bagnara G, Strippoli P, Jasonni V, (1995). Epithelial cells are the major source of biologically active

- granulocyte macrophage colony-stimulating factor in human endometrium. *Hum Reprod*, 10; 3259-3263.
- Gough, N., and Nicola, N.(1990). Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor. In *Colony-stimulating factors* (eds T. M. Dexter, J. M. Garland, and N.G. Testa), pp. 111-153. Marcel Dekker, New York.
- Grootegoed, J., Den Boer, P. (1990). Energy metabolism of spermatids: a review. En: Hamilton D.W., Waites GMH Eds.: "Scientific basis for fertility regulation. Cellular and molecular events in spermiogenesis". *Cambridge University Press*, 193-216.
- Hamilton, J. A., Uairo, G., and Lingelbach, S. R. (1988). Activation and proliferation signals in murine macrophages: stimulation of glucose uptake by hemopoietic growth factors and other agents. *J. Cell. Physiol.*, 134 (3), 405-12.
- Hayashida, K., Kitamura, T., Gorman, D. M., Arai; K., Yokota, T., and Miyajima, A. (1990). Molecular cloning of a second subunit of the receptor for human granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF): reconstitution of a high-affinity GM-CSF receptor. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 87 (24), 9655-9.
- Hecht, N. (1990). Gene expression during spermiogenesis. En: Thibault, C., M-C. Levasseur, R.H.F. Hunter (Eds.) *Reproduction in Mammals and Man*. Ellipses. Paris. pp. 227-255.
- Hiraki, Y., Rosen, O. M., and Birnbaum, M. J. (1988). Growth factors rapidly induce of the glucose transporter gene. *J. Biol. Chem.*, 263: 13655-13662.
- Ihle, J. N. (1995). Cytokine receptor signaling. *Nature*, 377 (6550): 591-4.
- Jasper, M., Brannstrom, M., Olofsson, J., Petrucco, O., Mason, H., Robertson, S., Norman, R., (1996). Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor: presence

- in human follicular fluid, protein secretion and mRNA expression by ovarian cells. *Mol Hum Reprod* 2 (8) : 555.
- Isaacs, A., and Lindenmann, J. (1957). Virus interference. I. The interferon. *Proc. R. Soc. (London)*, Ser. B, 147, 258-267.
- Jasper, M., Robertson, S., Van Der Hoek, K., Bonello, N., Brannstrom, M., Norman, R.. (2000). Characterisation of ovarian function in granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF) deficient mice. *Biol Reprod.* 62: 704-713.
- Kanakura, Y., Druker, B., Canistra, S. A., Furukawa, Y., Torimoto, Y., and Griffin, J. D. (1990). Signal transduction of the human granulocyte-macrophage colony-stimulating factor and interleukin-3 receptors involves tyrosine phosphorylation of a common set of cytoplasmic protein. *Blood*, 76 (4): 706-15.
- Kaushansky, K., Shoemaker, S., Alfaro, S. , and Brown, C. (1989). Hematopoietic activity of granulocyte-macrophage colony-stimulating factor is dependent upon two distinct regions of the molecule: functional analysis based upon the activities of interspecies hybrid growth factors. *Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)*, 86, 1213-1217.
- Kern, S., Robertson, S., Mau, V., Maddocks. S.. (1995). Cytokine secretion by macrophages in the rat testis. *Biol. Reprod.*, 53: 1407-1416
- Kim, D., Kim, M., Hang, H., Lee, H., Park, W., Kwon, H.,(2001) The supplementation of granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF) in culture medium improves the pregnancy rate in human ART programs. *Fertil. Steril.* 76 (abstract) n° 3 suppl 1.
- Kishimoto, T., Taga, T. & Akira, S. (1994). Cytokine signal transduction. *Cell*, 76: 253-262.

- Kitamura, T., Sato, N., Arai, K., and Miyajima, A. (1991). Expression cloning of the human IL-3 receptor cDNA reveals a shared beta subunit for the human IL-3 and GM-CSF receptors. *Cell* 66 (6): 1165-74.
- Laemmli, U.K. (1970). Cleavage of structural protein during the assembly of the head of bacteriophage. *Nature* 227, 680-685
- López, A., Shannon, M., Hercus, T., Nicola, N., Cambareri, B., Dottore, M., Layton, M., Eglinton, L., and Vadas, M. (1992). Residue 21 of human granulocyte-macrophage colony-stimulating factor is critical for biological activity and for high but not low affinity binding. *EMBO J.*, 11, 909-916.
- McLay, R., Banks, W., Kastin, A., (1997). Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor crosses the blood-testis barrier in mice. *Biol. Reprod.* 57: 822-826.
- Mendoza, C., Cremades, N., Ruiz, E., Martínez F., Ortega, E., Bernabeu, S., Tesarik, J., (1999). Relationship between fertilization results after intracytoplasmic sperm injection, and intrafollicular steroid, pituitary hormone and cytokine concentrations. *Hum Reprod* 14: 628-635.
- Metcalf, D., Nicola, N. A., Gearing, D. P., and Gough, N. M. (1990). Low affinity placenta-derived receptors for human granulocyte-macrophage colony stimulating factor can deliver a proliferative signal to murine hematopoietic cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 87 (12):4670-4.
- Miyatake, S., Otsuka, T., Yokota, T., Lee, F., and Arai, K. (1985). Structure of the chromosomal gene for granulocyte-macrophage colony stimulating factor: comparison of the mouse and human genes. *EMBO J.*, 4, 2561-2568.

- Naz, R., Evans, L.. (1998). Presence and modulation of interleukin-12 in seminal plasma of fertile and infertile men. *J Androl.*, 19, 302-307.
- Nicola, N. (1997). Guidebook to Cytokines and Their Receptors. A Sambrook & Tooze Publication at Oxford University Press. Pp 171-177.
- Niemi, M., Sharpe, R. M., Brown, W. (1986). Macrophages in the interstitial tissue of the rat testis. *Cell Tissue Res* 243: 337-344.
- Noli, C. (1999) "Receptor del factor de estimulación granulocito-macrófago (GM-CSF) en células de la línea germinal masculina" Tesis Bioquímica. Facultad de Ciencias. Universidad Austral de Chile.
- Rauch, M. (1996). Transporte de vitamina C vía transportadores facilitativos de hexosas en espermatozoides. Tesis, Escuela de Bioquímica, Facultad de Ciencias, Universidad Austral de Chile.
- Rauch, M., J. Reyes, I.I. Concha. (2001). Expression of hexose transporters GLUT 1 and GLUT 3 in isolated male germ cells. *Eur J Biochem* 268:272
- Rivas, C. I., Vera, J. C., Delgado-López, F., Guiquil, V. H., Zhang, R. H., Sher, H. I., Concha, I. I., Nualart, F., Cordon-Cardo, C., and Golde, D. W. (1998). Expression of GM-CSF receptors in human prostate cancer. *Blood*, 91 (3): 1037-1043.
- Robinson, W.A., Metcalf, D., and Bradley, T.R.(1967). Stimulation by normal and leukaemic mouse sera of colony formation *in vitro* by mouse bone marrows cells. *J.Cell Comp. Physiol.*,69,83
- Simon, C., A. Frances, G. Piquette, M. Polan. (1994). Immunohistochemical localization of the interleukin-1 system in the mouse ovary during follicular growth, ovulation and luteinization. *Biol Reprod* 50: 449-457.

- Shanafelt, A., Johson, K., and Kastelein, R. (1991). Identification of critical amino acid residues in human and mouse granulocyte macrophage colony-stimulating factor and their involvement in species specificity. *J. Biol. Chem.*, 266, 13804-13810.
- Shaw, G., and Kamen, R. (1986). A conserved AU sequence from the 3' untranslated region of GM-CSF mRNA mediates selective mRNA degradation. *Cell*, 46, 659-667.
- Spielholz, C., Heaney, M. L., Morrison, M. E., Houghton, A. N., Vera, J. C., and Golde, D. W. (1995). Granulocyte macrophage colony-stimulating factor signals for increased glucose uptake in human melanoma cells. *Blood*, 85 (4): 973-80.
- Tabibzadeh, S. (1994). Cytokines and the hypothalamic-pituitary-ovarian-endometrial axis. *Hum Reprod* 9: 947-967.
- Tao, M., and Levy, R. (1993). Idiotypic/granulocyte macrophage colony-stimulating factor fusion protein as a vaccine for B-cell lymphoma. *Nature*, 362, 755-758.
- Vera, J. C., Rivas, C., and Golde, D. W. (1998). Colony-stimulating factors signal for increased transport of vitamin C in host defense cells. *Blood*, 91: 2536.
- Vilanova, L.T., (2002). Presencia y funcionalidad del receptor GM-CSF en espermatozoides bovinos y su relación con la motilidad espermática. Tesis Doctoral. Facultad de Ciencias Veterinarias. Universidad Austral de Chile.
- Walter, M., Cook, W., Ealick, S., Nagabhushan, T., Trotta, P., and Bugg, C. (1992). Three-dimensional structure of recombinant human granulocyte-macrophage colony-stimulating factor. *J. Mol. Biol.*, 224, 1075-1085.
- Wheelock, E. (1965). Interferon-like virus-inhibitor induced in human leukocytes by phytohemagglutinin. *Science*, 149, 310-311.

- Yousefi, S., Green, D., K. Blaser, H. Simon. (1990). Protein-tyrosine phosphorylation regulates apoptosis in human eosinophils and neutrophils. *Proc Natl Acad Sci USA*. 91: 10868-10872.
- Zambrano, A. (1999). El factor GM-CSF induce un aumento del transporte de vitamina C mediado por los transportadores facilitativos de hexosas. Tesis de Bioquímica, Facultad de Ciencias, Universidad Austral de Chile :70 p
- Zambrano, A., C. Noli, M. Rauch, E. Werner, M. Brito, R. Amthauer, J. Slebe, J. Vera, I. Concha. (2001). Expression of GM-CSF receptors in male germ cells and their role in signaling for increased glucose and vitamin C transport.. *J Cell Biochem* 80: 625-634.
- Zhao, Y., H. Rong, N. Chegini. (1994). Human fallopian tube expresses granulocyte-macrophage colony stimulating factor (GM-CSF) and GM-CSF alpha and beta receptors and contain immunoreactive GM-CSF protein. *J Clin Endocrinol Metab* 79, 662-665.
- Zhao, Y., H. Rong, N. Chegini. 1995. Expression and selective cellular localization of granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF) α and β receptor messenger ribonucleic acid and protein in human ovarian tissue. *Biol Reprod*, 53: 923-930.