



Universidad Austral de Chile

Facultad de Ciencias

Profesor Patrocinante
Dr. Esteban Rodríguez C.
Instituto de Histología
Facultad de Medicina

**TUBERALINA II:
¿LA SUBB DE UNA NUEVA HORMONA GLICOPROTEICA?**

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

PAOLA ANDREA VÁSQUEZ DÍAZ

VALDIVIA - CHILE

2007

Dedicado con mucho amor a mis padres Céllica y Nelson, y a todas las bellas personas que forman parte importante en mi vida, ya que este logro no hubiese sido posible si no es gracias al apoyo y amor incondicional de todos ellos.

AGRADECIMIENTOS

Quisiera a través de estas líneas expresar mi gratitud a todas las personas que, de forma directa, hicieron posible la realización de este trabajo.

De manera especial agradezco al Dr. Estaban Rodríguez C. por brindarme la oportunidad de llevar a cabo este estudio bajo su conducción y apoyo.

A todas las personas que conforman el Instituto de Histología de la Universidad Austral de Chile, que de alguna u otra manera me tendieron su apoyo desinteresado. En especial a Dr. Montserrat Guerra M. por su tiempo, opiniones y aportes que revistieron de un gran valor tanto en este trabajo como en la vida.

Esta tesis se realizó en el Instituto de Histología de la Facultad de Medicina de la Universidad de Austral de Chile y fue financiada con recursos provenientes del fondo Nacional de Desarrollo científico y Tecnológico, FONDECYT, proyecto 1000435.

INDICE DE CONTENIDO

	Página
1. RESUMEN	1
1.1.- SUMMARY	3
2. INTRODUCCIÓN	5
2.1.- Características generales de la hipófisis.	5
2.2.- La <i>pars tuberalis</i>	7
2.3.- Planteamiento del problema	11
2.4.- Hipótesis y objetivos	14
3. MATERIALES Y MÉTODOS	17
3.1.- Reactivos químicos	17
3.2.- Muestras biológicas	19
3.3.- Procesamiento de las muestras	20
3.4.- Análisis de los medios condicionados	21
3.5.- Procesamiento de las muestras para microscopía óptica	21
3.6.- Inmunocitoquímica	22
3.7.- Inmunoadsorción	23
3.8.- Preparación de los extractos	24
3.9.- Determinación de proteínas	25
3.10.- Inmunoprecipitación de proteínas de extracto de PT de vaca	26
3.11.- Electroforesis en gel de poliacrilamida-SDS (PAGE-SDS)	27
3.12.- Electrotransferencia de proteínas a membranas de nitrocelulosa e <i>immunoblotting</i>	28

3.13.- Electroforesis bidimensional	30
3.14.- Tinción de plata	32
3.15.- Alineamiento múltiple de secuencias	33
4. RESULTADOS	34
4.1.- La tuberalina II es un compuesto secretorio específico de la pars tuberalis	34
4.1.1.- Anti-tuberalina II reconoce varios compuestos en la PT de la hipófisis	34
4.1.2.- El compuesto de 21 kDa que reconoce anti-tuberalina II en la PT de la vaca no es la subalfa (sub α)	35
4.1.3.- Anti-tuberalina II reconoce compuestos PT-específicos en los extractos de PT de vaca	37
4.2.- Las subunidad beta (sub β) de las hormonas glicoproteicas adenohipofisarias comparten secuencias homólogas conservadas	42
4.3.- Estudios de inmunoadsorción muestran que anti-tuberalina II reconoce específicamente células secretorias de la pars tuberalis	45
4.3.1.- Estudios inmunocitoquímicos utilizando inmunoadsorbición de anti-tuberalina II con el péptido CAVCITINTTICAGYCPTR	45
5. DISCUSION	55
5.1.- La PT secreta compuestos de naturaleza glicoproteica	56
5.2.- Anti-tuberalina II reconoce compuestos “tipo PD” y compuestos PT-específicos	57

5.3.- ¿La tuberalina II es la subunidad β de una nueva hormona glicoproteica?	61
5.4.- CONCLUSIONES	68
6. BIBLIOGRAFIA	69
7. ANEXOS	76

INDICE DE TABLAS

	Página
Tabla I.- Anticuerpos utilizados en inmunocitoquímica	23
Tabla II.- Anticuerpos utilizados en <i>immunoblotting</i>	30

INDICE DE FIGURAS

	Página
Figura 1 A.- Desarrollo embrionario de la hipófisis	6
Figura 1 B.- Esquema corte sagital de cerebro.	6
Figura 2 A.- Corte frontal de hipófisis de conejo, tinción aldehído-fucsina (AF)	8
Figura 2 B.- Microscopía electrónica de transmisión de PT de vaca	8
Figura 3.- Eje de regulación pineal-pars tuberalis-pars distalis	16
Figura 4.- Análisis inmunológico de extracto de pars tuberalis (PT) de vaca	36
Figura 5.- Electroforesis bidimensional de extracto de PD. Tinción de plata	39
Figura 6.- Electroforesis bidimensional de extracto de PT. Tinción de plata	40
Figura 7.- Electroforesis bidimensional de extracto de PT de vaca e <i>immunoblotting</i> con anti-tuberalina II.	41
Figura 8.- Alineamiento múltiple de secuencias aminoacídicas	43
Figura 9.- Estudio inmunocitoquímico, corte sagital de hipófisis de rata.	49
Figura 10.- Estudio inmunocitoquímico, corte sagital de hipotálamo medio-basal (HMB) de rata inmunoteñido con antituberalina II e inmuoadsorbido con el péptido CAVCITINTTICAGYCPTR.	50
Figuras 11.- Estudio inmunocitoquímico, corte sagital de hipófisis de vaca inmunoteñido con antituberalina II e inmuoadsorbido con el péptido CAVCITINTTICAGYCPTR.	51

Figuras 12.- Estudio inmunocitoquímico , corte sagital de hipófisis de vaca inmunoteñido con antituberalina II e inmunoadsorbido con el péptido CAVCITINTTICAYCPTR.	52
Figura 13.- Estudio inmunocitoquímico en Corte sagital de hipófisis de vaca inmunoteñido con antituberalina II e inmunoadsorbido con 0,5 µg péptido sintético.	53
Figura 14.- Estudio inmunocitoquímico en Corte sagital de hipófisis de vaca inmunoteñido con antituberalina II e inmunoadsorbido con péptido sintético.	54
Figura 15.- Co-localización de la tuberalina II con la sub-alpha.	58
Figura 16 .- Posibles proteínas incluidas en la banda de 21 kDa que se utilizó como inmunógeno para la obtención de anti-tuberalina II.	60
Figura 17.- Diferentes estados en los que podemos encontrar la tuberalina II.	66
Figura 18 .- Relación molecular de la tuberalina II con las subunidades β de las hormonas PD conocidas	67

INDICE DE ABREVIATURAS

EM, eminencia media

FSH, hormona folículo estimulante

HMB, hipotálamo medio basal

LCR, líquido cefalorraquídeo

LH, hormona luteinizante

PD, pars distalis

PI, pars intermedia

PT, pars tuberalis

SDS-PAGE, electroforesis en geles de poliacrilamida-SDS

SP, sangre del sistema porta hipotálamo-hipofisiario

TSH, hormona tirotrófica

2D, segunda dimensión (electroforesis bidimensional)

3v, tercer ventrículo

ICQ, inmunocitoquímica

1. RESUMEN

La *pars tuberalis* (PT) de la adenohipófisis está constituida por células foliculares, y por una población de células secretoras denominadas células PT, que exhiben características morfológicas y fisiológicas que las diferencian de otros tipos celulares de la *pars distalis* (PD). Se postula que reguladas por melatonina, estas células secretan hormonas PT-específicas (**tuberalinas**) hacia la sangre del sistema porta hipotálamo-hipofisiario y/o hacia el líquido cefalorraquídeo. Aunque se desconoce la identidad de estos compuestos, se sugiere que las tuberalinas estarían relacionadas molecularmente con las hormonas glicoproteicas de la PD, y que actuarían a través del sistema porta hipotálamo-hipofisiario para regular la secreción de prolactina desde la PD.

En el laboratorio del Instituto de Histología y Patología de la Facultad de Medicina de la Universidad Austral de Chile, se han identificado dos tuberalinas de 72 (tuberalina I) y 21 (tuberalina II) kDa. El presente trabajo de Tesis postula la **hipótesis**: “La tuberalina II corresponde a la subunidad β de una nueva hormona glicoproteica”. Para caracterizar parcialmente la estructura molecular de la tuberalina II hemos estudiado su expresión y la de la subunidad α (sub α) común de las hormonas glicoproteicas de la PD (LH, FSH y TSH) mediante: (1) electroforesis mono y bidimensional de extractos de PT y PD de vaca, e *immunoblotting*; (2) inmunocitoquímica de PT de rata, utilizando anticuerpos específicos para la sub α (comercial) y para la tuberalina II (obtenido en nuestro laboratorio).

El análisis bioquímico mostró la presencia de *spots* PT-específicos en los extractos de PT de vaca, dos de los cuales inmunorreaccionaron con anti-tuberalina II. El estudio inmunocitoquímico mostró que la tuberalina II co-localiza en las mismas células que expresan las sub α y sub β TSH en la PT. Cuando anti-tuberalina II se adsorbió con concentraciones crecientes de un péptido deducido de una secuencia común homóloga entre las sub β conocidas, una población de células de la PT permaneció débilmente inmunoteñida. Estos resultados sugieren: (1) anti-tuberalina II reconoce epítopes comunes con las hormonas glicoproteicas de la PD y epítopes propios (PT-específicos). Anti-tuberalina II podría reconocer de manera cruzada las sub β conocidas en la PD, y anticuerpos contra las sub β conocidas podrían reconocer la tuberalina II en la PT; (2) apoyan la hipótesis que la tuberalina II podría corresponder a la sub β de una nueva hormona glicoproteica. Se predice una posible estructura molecular de la tuberalina II, con epítopes propios y comunes con las sub β LH, FSH, TSH.

Esperamos que la purificación de la tuberalina II en el futuro permitirá confirmar la estructura predicha, y más importantemente, conocer su función. La estandarización de la técnica de electroforesis bidimensional en nuestro laboratorio, a partir del desarrollo de la presente Tesis, significa un importante aporte metodológico para lograr estos fines.

1.1 SUMMARY

The *pars tuberalis* of the adenohypophysis is formed by PT-specific cells which display distinct ultrastructural and physiological features. It has been postulated that melatonin regulate in these cells the secretion of new hormones (tuberalins) to the blood of hypothalamic-adenohypophyseal portal system or to the cerebrospinal fluid (CSF). Although the nature and function of these compounds is still unknown, there are evidence suggesting a molecular relation with the PD-adenohypophyseal glycoprotein hormones. They may act as prolactin releasing factors.

We have identified two tuberalins of 72 (tuberalin I) and 21 (tuberalin II) kDa. The aim of this thesis was contribute to dilucidate the molecular nature of tuberalin II. We postulate that **tuberalin II is the β subunit of a new glycoprotein hormone**. To characterise the molecular structure of the tuberalin II we have studied the tuberalin II expression in relation with the α subunit of the PD-glycoprotein hormones (LH, FSH and TSH) by: (i) mono and bidimensional electrophoresis of PT and PD extracts, and immunoblotting; (ii) immunocytochemistry of rat and bovine PT, using specific antibodies against tuberalin II (obtained in our lab) and against α subunit (comercially available).

The biochemical studies showed PT-specific spots in the PT extracts of bovine. Two of them immunoreacted with anti-tuberalin II. The immunocytochemical studies showed that the tuberalin II and the α subunit are in the same population of PT-cells. When the anti-tuberalin II antiserum was adsorbed with increasing concentrations of a synthetic

peptide raised against a common homologous sequence that is contained in the PD-hormones, it immunostained a distinct population of cells in the PT.

These results suggest: (1) anti-tuberalin II recognise PT-distinct epitopes and common epitopes between tuberalin II and PD-glycoprotein hormones. So, anti-tuberalin II may also recognise PD-glycoprotein hormones, and anti-PD glycoprotein hormones may recognise also tuberalin II; (2) they support the hypothesis that tuberalin II may be the β subunit of a new adenohipophyseal glycoprotein hormone.

It has been predicted a putative molecular structure of tuberalin II. We expect the purification of tuberalin II in the future will verify the predicted structure, and more important, to know its physiological function. The standarization of bidimensional electrophoresis technique in our lab means a significant methodological contribution to this aim.

2. INTRODUCCION

2.1.- Características generales de la hipófisis.

La glándula pituitaria o hipófisis está situada en la silla turca del esfenoides, una cavidad ósea en la base del cráneo situada por debajo del hipotálamo, estructura con la cual la hipófisis presenta relaciones anatómicas y funcionales.

De acuerdo a su origen embriológico la hipófisis se divide en una porción nerviosa o neurohipófisis y una porción glandular o adenohipófisis. La adenohipófisis o hipófisis anterior, se desarrolla de una evaginación ascendente del ectodermo del suelo de la cavidad oral que se conoce con el nombre de Bolsa de Rathke. La neurohipófisis o hipófisis posterior surge como una evaginación descendente del neuroectodermo procedente del suelo del tercer ventrículo, creciendo ventralmente hasta ponerse en contacto con la bolsa de Rathke. Sólo después de que ambas porciones se contactan comienza su diferenciación (Fig. 1A).

La adenohipófisis constituye aproximadamente el 80 % de la glándula pituitaria. Está constituida por la *pars distalis* (PD), *pars intermedia* (PI), y *pars tuberalis* (PT) (Fig. 1-b). En estas zonas podemos encontrar cordones de células rodeados de una abundante red de capilares sinusoidales. Al microscopio óptico podemos diferenciar tres tipos celulares: (1) células foliculares (sin gránulos secretorios, de función desconocida), (2) células cromófilas (poseen gránulos citoplasmáticos con gran afinidad por los colorantes de uso habitual en histología), y (3) células cromófobas (sin gránulos

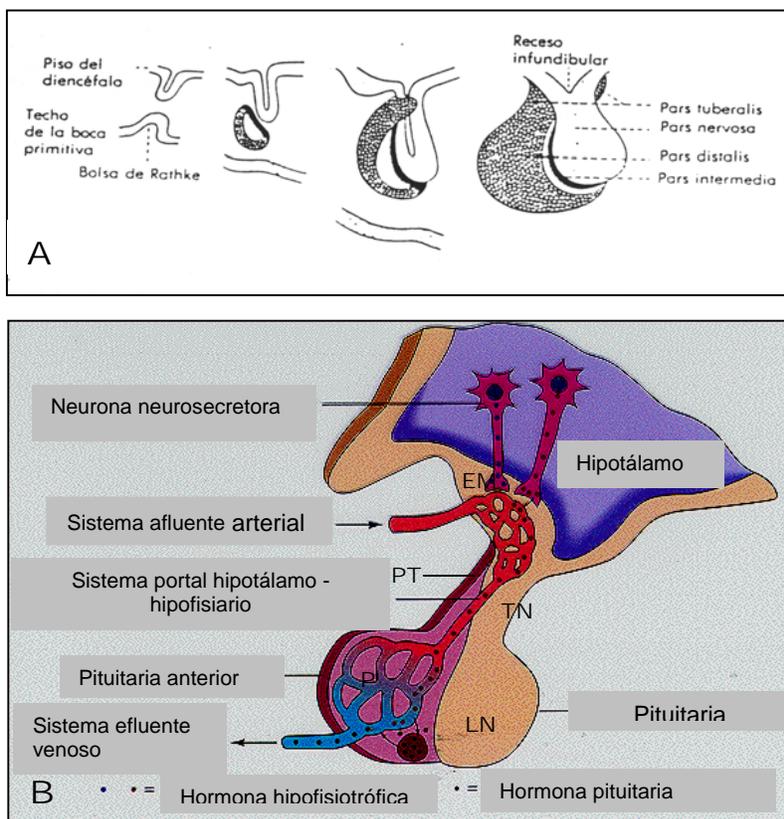


Figura 1. A.- Desarrollo embrionario de la hipófisis. La adenohipófisis se desarrolla de la Bolsa de Rathke, una evaginación ascendente del ectodermo del suelo de la cavidad oral; la neurohipófisis surge como una evaginación descendente del neuroectodermo procedente del suelo del tercer ventrículo, Después de que ambas porciones contactan comienza su diferenciación; **B.- Esquema corte sagital de cerebro.** Se muestran las regiones de la hipófisis y su entorno. Neuronas neurosecretorias del hipotálamo liberan factores hipofisiotrópicos a la circulación del sistema porta hipotálamo-adenohipofisiario. Estos factores llegan hasta la adenohipófisis, donde regulan la secreción de hormonas desde la *pars distalis* (PD). EM, eminencia media; LN, lóbulo neural; PI, *pars intermedia*; PT, *pars tuberalis*; TN, tallo neural.

citoplasmáticos visibles al microscopio óptico, citoplasma reducido y poco coloreado) (Fig. 2 A). El estudio de estas células al microscopio electrónico ha mostrado que las células cromófilas y cromófobas presentan características de células secretoras, con retículo endoplásmico rugoso (RER) y aparato de Golgi muy desarrollados, y gránulos de secreción en su citoplasma. Los diferentes tipos celulares varían en cuanto al tamaño y a las características de sus gránulos secretorios, aunque sólo pueden identificarse con seguridad mediante tinción inmunohistoquímica de las hormonas que almacenan (Nakane, 1970, 1971; Moriarti, 1972).

La PD sintetiza y secreta las siguientes hormonas: hormona luteinizante (LH), hormona folículoestimulante (FSH), hormona estimulante de la tiroides (TSH), adrenocorticotrofina (ACTH), somatotrofina (GH), y prolactina (PRL); la PI sintetiza y secreta la hormona estimulante de los melanocitos (MSH) y β -endorfina; en la actualidad se desconoce la naturaleza y rol de los compuestos que secreta la PT.

2.2.- La *pars tuberalis*

La *pars tuberalis* (PT) es una región adenohiposaria de marcada constancia filogenética y estructural: está presente en anfibios, reptiles, aves y mamíferos (Wingstrand, 1966; Fitzgerald, 1979). Está constituida por cordones celulares que se disponen longitudinalmente entre los vasos sanguíneos del plexo primario del sistema porta, en íntima relación con la eminencia media (EM), con la que

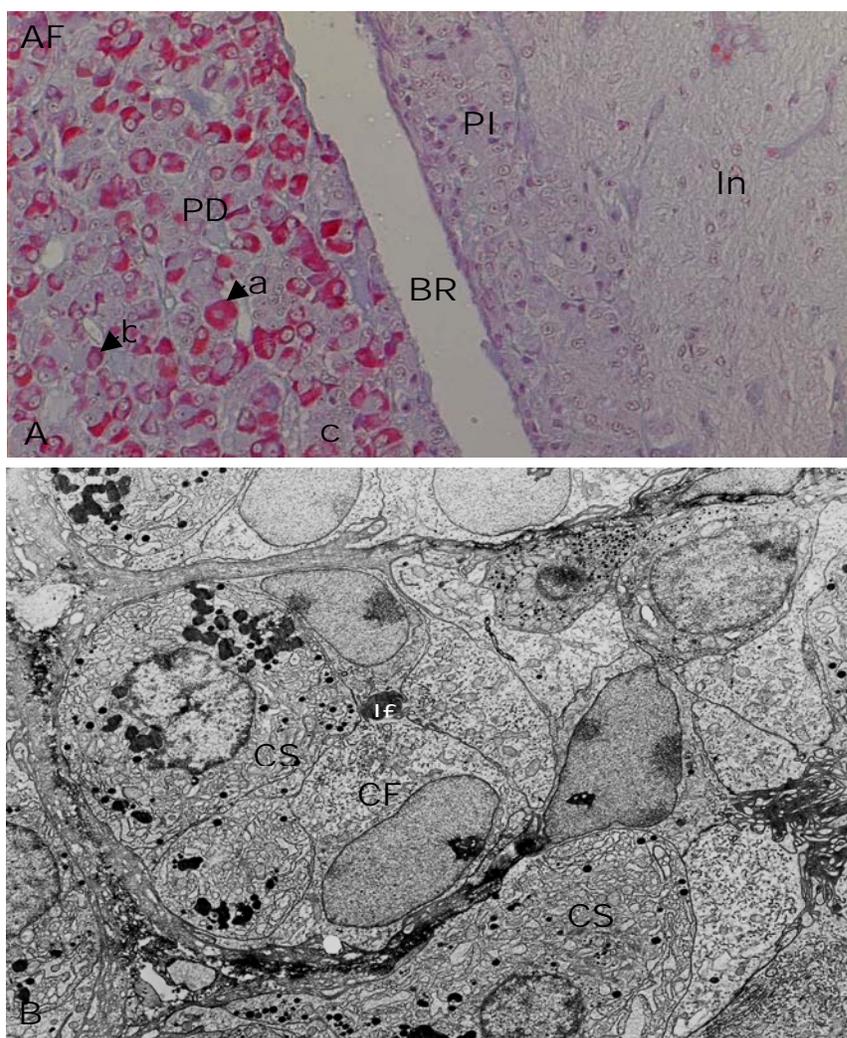


Figura 2.- A.- Corte frontal de hipófisis de conejo. Tinción aldehído fucsina. Se observan células teñidas en la *pars distalis* (PD). Según su afinidad tintorial se diferencian las células acidófilas (a) y basófilas (b). Las células cromóforas (c) no se tiñen. No se observan células teñidas ni en la *pars intermedia* (PI) ni en el lóbulo neural (LN). BR, lumen Bolsa de Ratke; **B.- Microscopía electrónica de transmisión. Corte frontal de *pars tuberalis* (PT) de vaca.** Las células de la PT se organizan en folículos. Se distinguen dos poblaciones de células: i) células foliculares (CF), que delimitan el lumen del folículo (lf); ii) células secretorias (CS), formando parte de la pared del folículo.

forma un complejo neuroglandular (Fig.1 B) (Fitzgerald, 1979). Los cordones contienen una población de células foliculares, no secretoras, y dos poblaciones de células secretoras diferentes: (1) células secretoras que también están presentes en la PD, y que se concentran en la porción más caudal de la PT, especialmente cerca de la zona de transición entre la PT y PD; (2) células secretoras específicas de la PT (Cameron y Foster, 1972; Dellmann y col., 1974; Stoeckel y Porte, 1984) (Fig. 2 B).

Células secretoras tipo PD

Estudios morfológicos e inmunocitoquímicos de la PT han descrito la presencia de células gonadótropas (LH, FSH) y tirótropas (TSH) en diferentes mamíferos, aunque el número relativo de los dos tipos celulares muestra considerables variaciones entre las especies estudiadas (Gross, 1984). Células inmunorreactivas para LH y FSH son el componente mayoritario en casi todas las especies, incluida el hombre; la excepción es la rata, que presenta mayor número de células inmunorreactivas para TSH. En algunas de estas especies (hombre, mono) también se han encontrado otros tipos celulares, incluyendo corticótropas (ACTH), somatótropas (GH) y lactótropas (PRL), aunque en menor número (Baker y Yu, 1975; Osamura y Watanabe, 1978; Gross, 1984).

Células secretoras tipo PT (células PT-específicas)

La población de células PT-específicas difiere en sus características morfológicas de las identificadas en las células de la PD o PI. Son células de naturaleza cromófica que se

caracterizan porque no se tiñen con las tinciones hipofisarias comunes (Fitzgerald, 1979). Se ha observado que poseen una gran cantidad de mitocondrias, RER y aparato de Golgi muy desarrollados, y gránulos de secreción, en número y tamaño variable según las especies, acumulados en extensiones celulares que finalizan sobre los capilares portales (Knowles y Kumar, 1969; Dierick y col., 1971; Cameron y Foster, 1972; Dellmann y col., 1974). Se diferencian de los otros tipos celulares adenohipofisarios: (1) porque es el primer tipo celular adenohipofisario en diferenciarse (Stoeckel et al. 1973,1979); (2) por la gran cantidad de partículas de glicógeno que acumulan en su citoplasma (Gross,1984); (3) porque no reaccionan en las mismas condiciones experimentales (castración, hipofisectomía, tiroidectomía) que sí inducen modificación de las células tipo PD (Young y col., 1966; Gross, 1978, 1983; Bockers y col., 1994); y (4) porque expresan receptores de melatonina y muestran cambios morfológicos que dependen del fotoperíodo (Wittkowski y col, 1984, 1988; Bergman y col, 1989; Mercks y col, 1993). Esta población de células es mayoritaria en el ratón, cobaya, oveja y conejo, donde representa más del 50 % del total de células de la PT (Baker y Yu, 1975; Gross, 1983, 1984; Tillet y col., 1990). En la rata, en base al desarrollo del RER y aparato de Golgi, la aparición de vesículas electrodensas y su contenido de glicógeno, estas células en el día 14 de gestación (E13) ya son comparables con las células de la PT adulta (Stoeckel y col, 1973, 1979). Sólo posteriormente se diferencian tipos celulares de la PD o PI, lo que sugiere que **la secreción de la hipófisis fetal comienza en este tipo celular.**

Por la localización anatómica de la PT, en íntima relación con el plexo primario del sistema porta hipotálamo-adenohipofisario, la secreción producida en las células PT-específicas podría liberarse a la circulación portal y alcanzar rápidamente otros blancos en la PD. En la rata además, Aguado y col. (1981) han descrito la existencia de un sistema de canales intercelulares abiertos hacia las membranas basales que separan la PT del espacio subaracnoideo, por lo que el líquido cefalorraquídeo (LCR) debiera también considerarse como una probable ruta para el transporte de estos productos secretorios, al menos en esta especie. Ello significa que cualquier región del sistema nervioso central (SNC) podría ser blanco de esta secreción.

2.3.- Planteamiento del problema

De las tres subdivisiones de la adenohipófisis (PD, PI y PT) la única cuya función se desconoce es la PT. Sin embargo, son varias las evidencias que sugieren un rol específico para la misma: (1) la PT muestra un patrón de diferenciación diferente del de otras regiones de la adenohipófisis (Nemerkeski y col., 1988); (2) contiene una población de células (células PT-específicas) que no responde con alteraciones morfológicas a cambios funcionales de las glándulas endocrinas periféricas, pero que sí responde a variaciones del fotoperíodo (Young y col., 1966; Gross, 1978, 1983); (3) en rata y ratón estas células alcanzan plena diferenciación secretoria en un estadio fetal en el que las células de la PD aún no están diferenciadas (Stoeckel y col., 1973, 1979); y (4) estas células contienen gránulos secretorios que se acumulan en prolongaciones celulares que finalizan sobre los capilares del plexo primario del sistema porta, y para los que se

ha mostrado liberación mediante exocitosis (Merks y col., 1993). Si asumimos que la presencia de gránulos secretorios en una célula indica su capacidad secretora, las evidencias expuestas anteriormente sugieren fuertemente un rol secretorio para las células PT-específicas, que comenzaría en estadios tempranos del desarrollo fetal. Como estas células no reaccionan con anticuerpos dirigidos contra las hormonas hipofisarias conocidas (Baker y Yu, 1975; Baker, 1977; Gross, 1984), se ha sugerido que melatonina regularía en las células PT-específicas la secreción a la circulación portal o al LCR de compuesto (s) diferente (s) de los que secretan las células de la PD o PI, y que se han designado genéricamente con el nombre de **tuberalinas**. Aspectos relevantes por resolver son la naturaleza y función de estos compuestos.

La *pars tuberalis* (PT) secreta compuestos de naturaleza glicosilada

Observaciones que provienen del análisis histoquímico utilizando lectinas sugieren que los compuestos que secretan las células PT-específicas son glicosilados (EM Rodríguez, comunicación personal). Estos estudios han mostrado que las células de la PT de rata unen las lectinas concanavalina A (ConA, afinidad por manosa y glucosamina, azúcares agregados en el RER) y aglutinina de germen de trigo (WGA, afinidad por glucosamina y ácido siálico, azúcares agregados en el aparato de Golgi). En la vaca, los sitios de unión a Con A se encuentran en gránulos secretorios.

Estudios realizados en rata y oveja han mostrado mediante técnicas inmunocitoquímicas e hibridación *in situ*, que las células PT-específicas sintetizan la

sub α que es común para las hormonas glicoproteicas adenohipofisarias conocidas (LH, FSH, TSH), pero ninguna de las sub β conocidas para estas hormonas (Wittkowski y col, 1992, 1999; Stoeckel y col, 1993, 1994). **Se ha postulado que las células PT-específicas sintetizan y liberan la sub α libre y/o una nueva hormona glicoproteica que consta de una sub α común con las otras hormonas glicoproteicas, y una sub β distinta (Stoeckel et al. 1979, Wittkowski 1974).**

Morgan y col (1996) han mostrado evidencias que un factor liberado desde cultivos celulares de PT de ovejas regula la liberación de prolactina desde células lactotropas mantenidas en cultivo. La actividad biológica de este factor es estable al calor y susceptible a la tripsina, por lo que han sugerido que es de naturaleza proteica o peptídica, aunque todavía no se ha podido identificar.

En el laboratorio de Histología y Patología, facultad de Medicina, universidad Austral de Chile se han identificado dos proteínas de 72 y 21 kDa que son liberadas a los medios condicionados de explantes de PT de vaca. La proteína de 21 kDa también es sintetizada en las células PT-específicas de otras especies, como la rata, ratón, hamster y conejo (Guerra, 1998; Guerra y Rodríguez, 2001). Estudios recientes han mostrado que tanto la proteína de 72 como la de 21 kDa están presentes en la sangre portal, y que su secreción se regula por melatonina (Guerra y Rodríguez, 2002; Guerra, 2004). Estas evidencias apoyan fuertemente que ambos compuestos corresponderían a dos diferentes tuberalinas. Se ha designado a la proteína de 72 kDa como tuberalina I, y a la proteína de 21 kDa como tuberalina II, y se han obtenido anticuerpos policlonales

contra las mismas (Guerra y Rodríguez, 2001). La tuberalina II exhibe un peso molecular similar al de las sub β conocidas de las hormonas glicoproteicas adenohipofisarias conocidas (14-21 kDa, según la especie), y también ha sido identificada en sangre portal (Guerra y Rodríguez, 2001)

En conjunto, estos datos sugieren que **la PT tiene una función particular**: regular la actividad endocrina dependiente del fotoperíodo a través de la secreción de hormonas (tuberalinas) desde las células PT-específicas al sistema porta, estableciéndose un eje de regulación pineal-PT-PD (Fig. 3).

2.4.- Hipotesis y objetivos

La evidencia presentada con anterioridad nos condujo a plantear la siguiente

Hipótesis

“La tuberalina II es la subunidad β de una nueva hormona glicoproteica”

y los siguientes **objetivos específicos**,

1. Estudiar la expresión de la tuberalina II y sub α en extracto de PT y PD de vaca, mediante electroforesis (mono y bidimensional) e *immunoblotting* con anti-tuberalina-II y sub α .

2. Identificar secuencias homólogas comunes entre las diferentes subunidades β de las hormonas glicoproteicas adenohipofisarias conocidas (LH,FSH,TSH), mediante análisis computacional comparativo.

3. Estudiar la expresión de la tuberalina II y de la sub α que es común para las hormonas glicoproteicas adenohipofisarias conocidas (LH,FSH,TSH) en la hipófisis de rata y vaca, mediante inmunocitoquímica con (i) anti-tuberalina II (suero total) y (ii) anti-tuberalina II adsorbido con un péptido diseñado a partir de alguna de las secuencias homólogas que se identifiquen en el objetivo 2.

3. MATERIALES Y METODOS

3.1.- Reactivos químicos

La mayoría de los reactivos utilizados fueron de grado proanálisis.

En Sigma Chemical Co. se adquirieron los siguientes reactivos: Tris-(hidroximetil)-aminometano (Tris), triton x 100, urea, fluoruro de fenil metil sulfonilo (PMSF), bicarbonato de amonio, glicerol, 2-mercaptoetanol, bis-acrilamida (N, N'-methilene-bis-acrilamida), N,N,N',N'- tetrametiletilendiamina (TEMED), dimetil sulfóxido (DMSO), glicina, lambda-carragenano, gelatina, 3-3-diaminobenzidina, peroxidasa, albúmina de suero bovino (BSA), anti-IgG de conejo, ditiotritiol (DTT), iodoacetamida, película fotográfica Kodak Biomax MR-1.

Para su utilización en los cultivos, también se adquirieron en Sigma (grado cultivo): solución balanceada de Hanks, medio de Eagle modificado de Dulbeco (DME), mezcla de nutrientes F12-HAM, tampón Hepes, carbonato de sodio, penicilina G sódica, estreptomicina, kanamicina sulfato, anfotericina B, melatonina, forskolina, NECA.

En Merk Química Chilena se adquirieron los siguientes reactivos: cloruro de sodio, cloroformo, etanol, metanol, azul brillante de Coomassie R-250, azul de bromofenol, peróxido de hidrógeno, fosfato de sodio, fosfato de potasio, y gelatina.

En Amersham Bioscience se adquirieron los gradientes de pH inmovilizados (IPG strips pH 3-10 NL, 13 cm), el aceite mineral y los buffers necesarios para su utilización en electroforesis bidimensional; en Bio-Rad (Hércules, CA, USA) se adquirieron las membranas de nitrocelulosa Trans-Blot de 0,2 μm ; en Pierce (Rockford, IL, USA) se adquirió el sistema de quimioluminiscencia intensificada SuperSignal.

Los marcadores de peso molecular y la síntesis del péptido constituido por 19 aminoácidos, se solicitaron a Invitrogen Life Technologies.

Acido acético glacial y alcoholes se adquirieron en Arquimed SA; parafina o paraplant en Monoject Scientific.

El resto de los reactivos provinieron de Sigma Chemical Co. y fueron de grado analítico.

3.2.- Muestras biológicas

Vaca.- Las hipófisis de bovino, procedentes indistintamente de vacas, vaquillas y vaquillonas, se obtuvieron en la Procesadora de Carnes Frigoríficos de Valdivia (FRIVAL), en Valdivia. El sacrificio de los animales se realizó mediante percusión mecánica (pistola de aire comprimido). La toma de muestras se realizó durante las mañanas y primeras horas de la tarde (9:00 am-14:00 pm) a lo largo de todo el año (primavera-verano-otoño-invierno). Las muestras (PTy PD de vaca): i) se procesaron para realizar cultivo organotípico de PT; ii) se fijaron mediante inmersión en Bouin y se procesaron para microscopía óptica; iii) se extractar en bicarbonato de amonio y se analizaron mediante electroforesis (mono y bidimensional) e *immunoblotting*.

Rata.- Se utilizaron ratas de la cepa Holtzman mantenidas desde el nacimiento con un ciclo de luz/oscuridad de 12/12, en una habitación con temperatura controlada, (18-20 °C), con alimento y agua *ad libitum* en el bioterio del Instituto de Histología y Patología, Facultad de Medicina, Universidad Austral de Chile (Valdivia, Chile)

3.3.- Procesamiento de las muestras

Las hipófisis de bovino, extraídas en un tiempo máximo de 20 minutos después del sacrificio de los animales en la Procesadora de Carnes (FRIVAL), se sumergieron en medio de cultivo estéril y se transportaron en hielo al laboratorio para su procesamiento. En la sala de cultivo, las hipófisis se trabajaron bajo lupa estereoscópica. En primer lugar se separó la mitad cefálica (hipotalámica) de la mitad caudal (hipofisiaria) del tallo neural. La segunda se descartó, y la primera se utilizó para la realización de todos los estudios de la presente Tesis. La mitad cefálica del tallo neural, que contiene EM y PT, se disecó cuidadosamente para eliminar la mayor cantidad posible de tejido nervioso. Las PT disecadas se dividieron en pequeños fragmentos (explantes) de aproximadamente 1 mm^3 cada uno (aproximadamente 10-15 explantes por PT). Posterior a la disección los explantes se depositaron en placas de Petri de 10 cm de diámetro, donde se mantuvieron en cultivo a $37 \text{ }^\circ\text{C}$, en una atmósfera 100 % humedad, 5 % CO_2 . Se depositaron aproximadamente 45 explantes por placa, en un volumen de 12-15 ml de medio de cultivo. Como medio de cultivo se utilizó DF12HAM, que contienen una combinación 1:1 de medio Dulbecco modificado (DME) y la mezcla de nutrientes F12HAM. A este medio se le agregaron los siguientes antibióticos y antimicóticos: penicilina G sódica (100 mg/l), estreptomina (50 mg/l), sulfato de kanamicina (25 mg/l) y anfotericina B (2.5 mg/l). La evolución de los explantes y su viabilidad se controló cada vez que se renovó el medio, aproximadamente cada tres días, mediante el procesamiento de algunos explantes para microscopía óptica y electrónica.

3.4.- Análisis de los medios condicionados

Posterior a la incubación, los medios condicionados se centrifugaron a 1000 *g* durante 10 minutos para sedimentar cualquier célula o material sólido que pudiera haber. El sobrenadante se transfirió a unidades *Centricon* (Filterpore Ltda) que permiten la concentración de proteínas mediante ultrafiltración. Las muestras se centrifugaron a una velocidad máxima de 3000 *g*, hasta producir un precipitado que corresponde al concentrado proteico del medio ($V_f=50 \mu\text{l}$). En los mismos sistemas de concentración las muestras se dializaron con bicarbonato de amonio 50 mM. Los medios condicionados concentrados y liofilizados fueron almacenados a una temperatura de $-70 \text{ }^\circ\text{C}$ hasta su posterior análisis mediante electroforesis en geles de PAA-SDS, transferencia a membranas de nitrocelulosa e *immunoblotting*, siguiendo el procedimiento descrito en el apartado II.3 de la presente sección.

3.5.- Procesamiento de las muestras para microscopía óptica

Las muestras seleccionadas (explantos o tallos neurales de bovino *in situ*, cerebro de rata) se fijaron por perfusión vascular y/o por inmersión en Bouin (Baker, 1977), se deshidrataron en concentraciones crecientes de etanol (70°, 80°, 96°, 100°) y se incluyeron en paraplast. Se obtuvieron cortes de 4 μm de grosor que fueron montados en portaobjetos gelatinizados y se utilizaron para el análisis histológico de los mismos mediante inmunocitoquímica

3.6.- Inmunocitoquímica

Cortes de las muestras seleccionadas (explantes o tallos neurales de bovino *in situ*, cerebro de rata) se inmunotñieron mediante el método peroxidasa-antiperoxidasa de Sternberger y col (1970).

Después de eliminar la parafina con xilol, los cortes se hidrataron; se lavaron durante 15 minutos (3 cambios x 5 minutos) con solución tampón de lavado Tris-fosfato-salino (TFS), conteniendo Tris-HCl 10 mM, pH 7,8, Na₂HPO₄ 8,3 mM., KH₂PO₄ 3,5 mM, y NaCl 0,12 M), y posteriormente se incubaron sucesivamente en: 1) primer anticuerpo durante 18 horas; 2) segundo anticuerpo (anti IgG de conejo/rata, según el origen del primer anticuerpo) diluido 1:20, durante 30 minutos; 3) complejo peroxidasa-antiperoxidasa (PAP) diluido 1:50, durante 30 minutos. Después de cada incubación los cortes se lavaron en tampón TFS (3 cambios x 5 minutos). Todos los anticuerpos se diluyeron en tampón TFS conteniendo además lambda-carragenano 0,7 % (P/V), y Tritón X-100 0.5 % (V/V). La peroxidasa se visualizó incubando los cortes en oscuridad durante 15 minutos en tampón TFS conteniendo 3,3'-diaminobenzidina 0,2 % (P/V) y peróxido de hidrógeno 0,007 % (P/V). Después de esta incubación los cortes se lavaron en agua destilada, se deshidrataron y montaron. El control de la inmunotinción se realizó omitiendo la incubación con el primer anticuerpo. En la Tabla I se indican los antisueros primarios que se utilizaron en este estudio.

Tabla I.- Anticuerpos utilizados en inmunocitoquímica

Anticuerpo	Especie	Antígeno que reconoce	Dilución
anti-tuberalina II ⁽¹⁾	Rata	Tuberalina II (p21)	1:500
anti-sub α ⁽²⁾	Conejo	Sub α común (LH, FSH, TSH)	1:500

(1) Guerra y Rodríguez (2001). Instituto de Histología y Patología, Universidad Austral de Chile (Valdivia, Chile)

(2) AF Parlow. National Institute of Health (NIH) (Torrane CA, USA).

3.7.- Inmunoadsorción

Puesto que anti-tuberalina II se obtuvo a partir de bandas aisladas de geles, era posible que el antisuero desarrollado reconociera más de un compuesto, alguno de los cuales podrían corresponder a las hormonas glicoproteicas de la PD (LH, FSH, TSH). Con el fin de eliminar estos anticuerpos, anti-tuberalina II se adsorbió con un péptido sintético constituido de 19 aminoácidos, deducido de una secuencia homóloga compartida entre las diferentes hormonas PD.

Para la inmunoadsorción, el péptido se disolvió en dimetilsulfoxido (DMSO) debido a su naturaleza hidrofóbica. Anti-tuberalina II (dilución 1:500, en buffer TCT: Tris, PBS,

Carragenina 0.7%(p/v); Triton x-100 0.5% (P/V)). Se adsorbió anti-tuberalina II con diferentes concentraciones del péptido (las que fluctuaron en un rango de 0. 5-10 µg). La inmunoadsorción se realizó a temperatura ambiente, con agitación constante, durante 18 hrs. Al término del período de incubación, el antisuero se centrifugó, y el sobrenadante final fue utilizado para inmunoteñir cortes de hipotálamo e hipófisis de rata y vaca.

3.8.- Preparación de los extractos

Las hipófisis de bovino, extraídas en un tiempo máximo de 20 minutos después del sacrificio de los animales en la Procesadora de Carnes (FRIVAL), se sumergieron en acetona conteniendo PMSF 0,5 mM, y se transportaron en hielo al laboratorio para su procesamiento.

En el laboratorio, las hipófisis se trabajaron bajo lupa estereoscópica siguiendo un procedimiento similar al descrito para la preparación de los cultivos. Posteriormente, los tejidos PT y PD se extractaron en una solución de bicarbonato de amonio 50 mM, conteniendo PMSF 0,5 mM y EDTA 1 mM. Esta solución se utiliza de manera rutinaria en nuestro laboratorio para la extracción de proteínas desde tejido neural (Hein, 1988). Los tejidos se homogeneizaron mecánicamente mediante la utilización de un homogeneizador de teflón, tipo Potter-Evelhein, a intervalos de un minuto, enfriando la muestra a 4°C durante 30 segundos. Posteriormente las muestras se sonicaron tres

veces durante 20 segundos, y se centrifugaron a 12.000 g durante 45 minutos, a 4°C. El sobrenadante obtenido se consideró como el extracto total de proteínas solubles. Se determinó la concentración de proteínas de los extractos, y éstos se alicuotaron y guardaron a -70 °C hasta su posterior análisis mediante electroforesis e *immunoblotting*.

3.9.- Determinación de proteínas

La concentración de proteínas de las muestras (medios condicionados, extractos) se determinó mediante el método de Bradford (Bradford, 1976), utilizando albúmina de suero bovino (BSA) como estándar.

A un volumen final de 100 µl de muestra problema se le adicionó 1 ml del reactivo de Bradford, una solución que contiene azul brillante de Coomassie G-250 0,1 % (V/V), etanol 4,7 % (V/V) y ácido fosfórico 8,5 % (V/V). La absorbancia fue registrada a 595 nm en un espectrofotómetro Shimadzu UV 240, utilizando un blanco de reactivo en el que la muestra fue reemplazada por agua destilada.

3.10.- Inmunoprecipitación de proteínas de extracto de PT de vaca

Se desarrolló siguiendo el procedimiento descrito por Celis y col (1994).

Brevemente, 120 μ l de un extracto de PT de vaca (2 μ g/ μ l) se incubaron con 20 μ l del anticuerpo anti-tuberalina II (1 μ g/ μ l) durante 3 h, a temperatura ambiente, con agitación rotatoria. Posterior a la incubación, se añadieron 100 μ l de una solución de proteína A-sefarosa (100 mg proteína A disuelta en 1 ml de buffer "stock" de inmunoprecipitación, conteniendo: 50 ml de Tris-HCl 1 M pH 7,4, 150 ml de NaCl 1 M, 10 ml EDTA 0,5 M, 50 ml NP-40 10% w/v, 200 ml desoxicolato sódico 2.5 %, 10 ml SDS 10 %, 2 g BSA) durante 1 h, a temperatura ambiente, con agitación rotatoria, y finalmente las muestras se centrifugaron durante 30 seg a 10.000 g. El sobrenadante se eliminó; el pellet se lavó cuatro veces con buffer de inmunoprecipitación. Posterior a cada lavado, las muestras se centrifugaron durante 30 seg a 10.000 g. Después de la última centrifugación, el pellet final se resuspendió en buffer de muestra para electroforesis, y se analizó mediante electroforesis en geles de poliacrilamida-SDS (PAGE-SDS) e *immunoblotting*.

3.11.- Electroforesis en gel de poliacrilamida-SDS (PAGE-SDS)

El dodecil sulfato sódico (SDS) es un detergente aniónico que desnaturaliza las proteínas mediante su unión alrededor de la cadena de aminoácidos. Así confiere al polipéptido una carga negativa proporcional a su longitud. En su presencia la migración de las proteínas está determinada por su peso molecular (Shapiro y col., 1971).

La electroforesis en geles de poliacrilamida-SDS (PAGE-SDS) se realizó siguiendo el procedimiento descrito por Laemmli (1970). Se utilizaron geles en placa (19x17 cm y 1.5 mm de espesor) con un gel espaciador al 5 % y un gel separador en gradiente lineal del 5 % al 15 %. Se sembró por surco un volumen total de 100 μ l, conteniendo 50 μ l de muestra (proveniente de la concentración de 15 ml de medio condicionado, conteniendo una concentración variable de proteínas totales, 60-80 μ g; o 90 μ g de proteína si se analizaban los extractos), más 50 μ l de tampón de muestra para electroforesis, conteniendo Tris-HCl 0,25 M (pH 6,8), glicerol 20 %, β -mercaptoetanol 4 % y SDS 4 %. Las muestras se calentaron en un baño de agua hirviendo durante 2 minutos y posteriormente se sembraron sobre el gel espaciador. Para identificar el frente iónico se utilizó azul de bromofenol al 0,2 %. La solución tampón de electrodos contenía Tris-HCl 0,025 M (pH 8,3), glicina 0,192 M y SDS 0,1 % (P/V). La electroforesis se realizó a 15 mA durante 3-4 h. Como marcadores de peso molecular se utilizaron: miosina (205 kDa), β -galactosidasa (116 kDa), fosforilasa B (97 kDa), albúmina (66 kDa), ovoalbúmina (45 kDa) y anhidrasa carbónica (29 kDa). Concluida la electroforesis el gel se tiñó con azul brillante de Coomassie o se electrotransfirió a membranas de nitrocelulosa, como se describe a continuación.

3.12.- Electrotransferencia de proteínas a membranas de nitrocelulosa e *immunoblotting*

La electroforesis en geles de poliacrilamida es una poderosa herramienta para el estudio de mezclas complejas de proteínas. Sin embargo, su posterior análisis es limitado, puesto que las proteínas están atrapadas en la matriz del gel. La transferencia de las proteínas a una membrana mantiene la elevada resolución de la electroforesis en gel de poliacrilamida, puesto que el patrón de bandas del gel se mantiene fielmente en el transferido a papel, y permite que las proteínas estén accesibles para un posterior análisis. La transferencia de proteínas se realizó, con algunas modificaciones, siguiendo el procedimiento descrito por Towbin y col. (1979).

Finalizada la electroforesis los geles y las membranas de nitrocelulosa se equilibraron durante 30 minutos en la solución de transferencia, conteniendo Tris-HCl 25 mM (pH 8,9), glicina 192 mM, metanol 20 % (V/V) y SDS 0,1 % (P/V). Posteriormente el gel se colocó sobre papel de filtro y su superficie libre se cubrió con papel de nitrocelulosa (0,22 μm ó 0,42 μm) del mismo tamaño del gel. Todas las burbujas de aire entre el gel y la membrana se eliminaron cuidadosamente. Sobre el papel de nitrocelulosa se colocó nuevamente papel de filtro y el "sandwich" resultante se aprisionó entre dos placas de acrílico cubiertas con esponjas en sus dos caras interiores. La transferencia se realizó a 70 mA durante 5 h utilizando el tampón de transferencia mencionado anteriormente. Considerando el rendimiento poco eficiente de la electroelución de proteínas de alto peso molecular se incorporó SDS a la solución de transferencia para

aumentar la cantidad de proteína transferida (Nielsen y col.,1982). Para controlar el grado de transferencia a las membranas de nitrocelulosa, finalizado el periodo de transferencia los geles de poliacrilamida-SDS se tiñeron con azul brillante de Coomassie R-250 y alguno de los papeles de nitrocelulosa se tiñeron con negro amido.

Análisis inmunoquímico de las proteínas transferidas a membranas de nitrocelulosa

La inmunotinción de electrotransferidos a nitrocelulosa se realizó mediante la técnica de quimioluminiscencia, siguiendo el procedimiento descrito por Walker y col (1995).

Las membranas conteniendo las proteínas electrotransferidas se saturaron en PBS-leche 5 % (P/V) a temperatura ambiente (4 cambios durante 20 minutos), y se incubaron sucesivamente con: 1) primer anticuerpo, durante 18 h (Tabla II); 2) segundo anticuerpo (anti IgG de rata o conejo conjugados con peroxidasa, según la procedencia del primer anticuerpo) en una dilución 1:50.000, durante 1,5 h; 3) sustrato SuperSignal (Luminol/solucion intensificadora: solución de peroxidasa estable, 1:1 ; SuperSignal, Pierce), durante 20 minutos. Todos los anticuerpos se diluyeron en PBS-leche 5% (P/V) (pH 7.2). Después de cada incubación las membranas se lavaron en PBS-leche 5 % (P/V)-0,05% Tween 20 (4 cambios durante 20 minutos). Todas las incubaciones y lavados se realizaron a temperatura ambiente y con agitación. Posterior a la incubación con el sustrato SuperSignal, las membranas se expusieron inmediatamente a película BioMax MR-1 (8G, Kodak) durante períodos de tiempo variable (5 segundos-5 minutos). Las películas se revelaron con solución D-72 (Kodak)

y se fijaron con solución fijadora U3 (Kodak). El control de la inmunotinción se realizó incubando alguna de las membranas en suero no inmune como primer anticuerpo.

Tabla II.- Anticuerpos utilizados en *immunoblotting*

Anticuerpo	Especie	Antígeno que reconoce	Dilución
anti-tuberalina II ⁽¹⁾	Rata	Tuberalina II (p21)	1:1000
anti-sub α ⁽²⁾	Conejo	Sub común (LH, FSH, TSH)	1:1000

(1) Guerra y Rodríguez (2001). Instituto de Histología y Patología, Universidad Austral de Chile (Valdivia, Chile)

(2) AF Parlow. National Institute of Health (NIH) (Torrane CA, USA).

3.13.- Electroforesis bidimensional

La electroforesis bidimensional (2-D) se considera el método actual con mayor resolución para la separación de mezclas complejas de proteínas (O'Farrell, 1975). La técnica, que separa las proteínas en función de dos criterios diferentes, el punto isoeléctrico y el peso molecular, se utiliza principalmente para identificar nuevos componentes celulares (proteínas del citoesqueleto, componentes de organelas, etc) y para detectar alteraciones en su expresión, utilizando comparaciones cualitativas y

cuantitativas (Celis y col., 1994). El análisis bidimensional se realizó utilizando un sistema de gradientes inmovilizados de pH 3-10 (IPG *strips*), que permite la resolución de aproximadamente 750 *spots*. El estudio se realizó utilizando el equipamiento disponible en el Laboratorio de Neurociencias de la Universidad de Los Andes, en Santiago (Chile).

Para su análisis en la primera dimensión (1D), 100-300 μg de muestra (proteínas de medio condicionado y extractos de PT y PD) se precipitaron con acetona pura (grado análisis, 1:2 vol:vol) a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$, dos horas o preferentemente toda la noche. Posterior a este procedimiento, las muestras se centrifugaron a $10.000 \times g$ durante 10 minutos a 4°C , se lavaron posteriormente dos veces con acetona a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$, y en el último lavado se eliminó la acetona remanente y se dejaron secar las muestras a temperatura ambiente. Una vez secas las muestras se disolvieron en tampón de solubilización (Urea 8 M, CHAPS o Tritón 100X 2% p/v; IPG buffer 0,5%; azul de bromofenol 0,002%). Todo el proceso debe efectuarse con la máxima delicadeza y asepsia evitando de esta forma contaminación. Después de 1 h de incubación, las muestras se centrifugaron a la máxima velocidad de una centrífuga Eppendorf durante 1 h, a temperatura ambiente, y se aplicaron en las IPG *strips*, que se recubrieron posteriormente con 1 ml de aceite mineral. Se utilizaron tiras (IPG *strips*) de 13 cm de longitud con un gradiente amplio de pH (3- 10). Todas las separaciones electroforéticas se realizaron horizontalmente a una temperatura optimizada de 20°C , empleando voltajes secuenciales de: 1) 30 volt, 12 h; 2) 500 volt, 30 min; 3) 1000 volt, 1 h; 4) 4000 volt, 1 h; 5) 8000 volt, hasta 64.000 volt/h, suministrados por una unidad electroforética Multiphor II (Amersham-

Pharmacia). Finalizado el tiempo de isoelectroenfoque, las tiras se equilibraron, a temperatura ambiente, secuencialmente, durante 15 min, en buffer de equilibrio (Tris - HCl 50 mM pH 8,8, Urea 6 M, Glicerol 30%, SDS 2%, Azul de bromofenol 0.002%) conteniendo DTT (1 mg/ml) o iodoacetamida (25 mg/ml). La segunda dimensión (2D), transferencia e *immunoblotting* se realizaron siguiendo el procedimiento descrito anteriormente para geles de PAGE-SDS 5-15 %. Finalizada la 2D algunos geles se tiñeron con plata, utilizando un protocolo compatible para una futura secuenciación de las proteínas aisladas.

3.14.- Tinción de plata

Se realizó el procedimiento estandarizado por Shevchenko et al (1996), con algunas modificaciones. Concluída la electroforesis, los geles: 1) se prefijaron en una solución que contenía metanol 50 % (V/V) y ácido acético 10 % (V/V), 30 min; 2) se lavaron en agua destilada durante 15 min; 3) se incubaron 3 min con tiosulfato de sodio pentahidratado 0.02% y se lavaron con agua destilada 3 min; 4) se incubaron con NO_3Ag 0,15%, 30-60 min, en oscuridad y se lavaron con agua destilada 3 min. La tinción se reveló incubando los geles en una solución de Na_2CO_3 2% conteniendo formalina 0,04%. La reacción de revelado se detuvo mediante el lavado de los geles con una solución de ácido acético 5% (V/V).

3.15.- Alineamiento múltiple de secuencias

El alineamiento de secuencias biológicas consiste en establecer un segmento entre ellas donde el número de coincidencias (una coincidencia se presenta cuando el aminoácido de la secuencia A es igual al aminoácido en la secuencia B) entre un conjunto de proteínas sea máximo. Los avances en las técnicas de secuenciamiento automático de genomas han generado una gran cantidad de información de secuencias de ácidos nucleicos y aminoácidos, que ha sido almacenada en bases de datos internacionales.

Para identificar secuencias homólogas entre las diferentes sub β de las hormonas glicoproteicas adenohipofisarias conocidas (LH, FSH, TSH) se compararon las secuencias aminoacídicas correspondientes a las sub β LH, sub β FSH, y sub β TSH de diferentes especies, utilizando el sistema computacional Multiple Sequence Alignment Search Tool (BCM Search Launcher) y la base de datos nr, que contiene todos los registros no redundantes del GenBank, CDS translations, PDB, SwissProt, PIR y PRF.

4. RESULTADOS

4.1.- La tuberalina II es un compuesto secretorio específico de la *pars tuberalis*

Estudios morfológicos previos de PT de vaca han mostrado que anticuerpos obtenidos contra este compuesto reconocen al menos dos poblaciones de células: una población de células PT-específicas, y una población de células gonadotropas (Guerra y Rodríguez, 2001).

Para caracterizar qué compuesto (s) de la hipófisis inmunorreaccionan con el anticuerpo anti-tuberalina II que disponemos, realizamos extractos de PT y PD de vaca, y los analizamos mediante inmunoquímica.

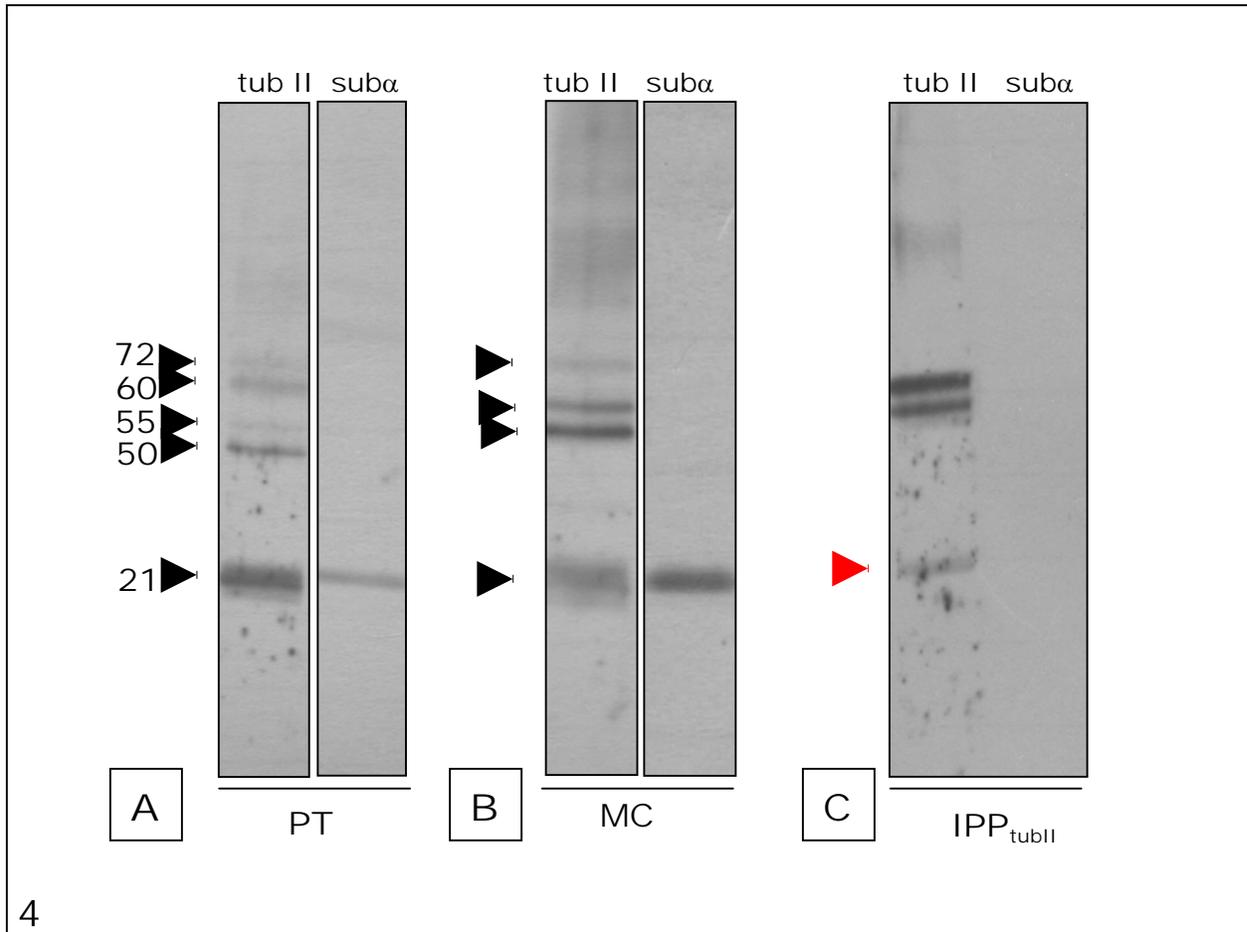
4.1.1.- Anti-tuberalina II reconoce varios compuestos en la PT de la hipófisis

El estudio de electrotransferidos de extractos de PT de vaca mostró que anti-tuberalina II (1:1000) reconoce en los extractos de PT varias bandas de diferente peso molecular: 72, 60, 55,50 y 21 kDa y que se caracteriza por presentar una intensa inmunoreacción (Fig. 4a). La banda de 21 kDa también reacciona con anticuerpos dirigidos contra la sub α de las hormonas glicoproteicas adenohipofisarias conocidas (LH, FSH, TSH) (Fig. 4 A) Como control utilizamos electrotransferidos de medios condicionados (MC) por explantes de PT de vaca. Anti-tuberalina II y anti-sub α , reconocen en los MC bandas de peso molecular similares a las reconocidas en los extractos (Fig. 4 B).

4.1.2.- El compuesto de 21 kDa que reconoce anti-tuberalina II en la PT de la vaca no es la subalfa (sub α)

Para descartar la posibilidad que alguno de los compuestos que reconoce anti-tuberalina II sea la sub α , inmunoprecipitamos extractos de PT de vaca con anti-tuberalina II y analizamos el pellet de inmunoprecipitación mediante PAGE-SDS e *immunoblotting* con ambos anticuerpos.

El análisis muestra que anti-tuberalina II reconoce en el pellet de inmunoprecipitación tres bandas proteicas de 60, 55 y 21 kDa; anti-sub α no reconoce ninguna proteína en el pellet de inmunoprecipitación (Fig. 4 C). Este resultado sugiere que el compuesto de 21 kDa que reconoce anti-tuberalina II en la PT no es la sub α común de las hormonas glicoproteicas adenohipofisarias conocidas (LH, FSH, TSH).



4

Figura 4.- Análisis inmunoquímico de extracto de pars tuberalis (PT) de vaca. Inmunoblotting con anti-tuberalina II y con anti- sub α como anticuerpo primario. **A.-** En los extractos de PT anti-tuberalina II reconoce cuatro bandas de 50-72 kDa, y de 21 kDa, esta última que también reacciona con anti-sub α ; **B.-** Anti-tuberalina II y anti-sub α reconocen en los medios condicionados (MC) de explantes de PT de vaca bandas similares a las reconocidas en los extractos; **C.-** Inmunoprecipitamos extractos de PT de vaca con anti-tuberalina II, y analizamos el pellet de inmunoprecipitación (IPP) con anti-tuberalina II y anti- sub α . El análisis revela que sólo anti-tuberalina II reconoce compuestos en el pellet de inmunoprecipitación, reaccionando con una banda de 21 kDa (flecha roja).

4.1.3.- Anti-tuberalina II reconoce compuestos PT-específicos en los extractos de PT de vaca

El análisis de los extractos de PD y PT de vaca mediante electroforesis bidimensional permitió separar las proteínas de los extractos en función de dos criterios diferentes, el punto isoeléctrico y el peso molecular. El análisis bidimensional se realizó utilizando un sistema de gradientes inmovilizados de pH (*IPG strips*, Amersham), que permite la resolución de un gran número de *spots* y disminuye la variabilidad en la migración electroforética entre los diferentes análisis.

Tinción de plata. El análisis electroforético de los extractos de PT y PD mediante electroforesis bidimensional (Figs. 5 y 6) permitió identificar: (1) proteínas presentes en los extractos de PT y PD (albúmina, *spots* numerados en negro); (2) proteínas presentes sólo en los extractos de PT (*spots* numerados en rojo, Fig. 6). Diversos *spots* no pudieron identificarse debido a la mala resolución de la migración electroforética en algunas zonas del gel (*spots* enumerados, Figs. 5 y 6).

Immunoblotting.- El análisis de extracto de PT de vaca mediante electroforesis bidimensional e *immunoblotting* con anti-tuberalina II resolvió la identificación de diversos *spots* inmunorreactivos con anti-tuberalina II, los que se concentran en el rango de 25-30 kDa (10 *spots*), y 50-60 kDa (5 *spots*) (Fig. 7). Cuando comparamos los *spots* inmunorreactivos con los de *spots* teñidos con plata en los extractos de PT (Fig. 6), tres de ellos (identificados como *spots* 9, 10, 11 en la tinción de plata) se

identificaron como compuestos reactivos con antituberalina II PT-específicos (Fig. 7); un conjunto de *spots* del mismo rango de peso molecular, pero con diferente pH isoeléctrico, también están presentes en los extractos de PD (Fig. 7, *spots* enumerados).

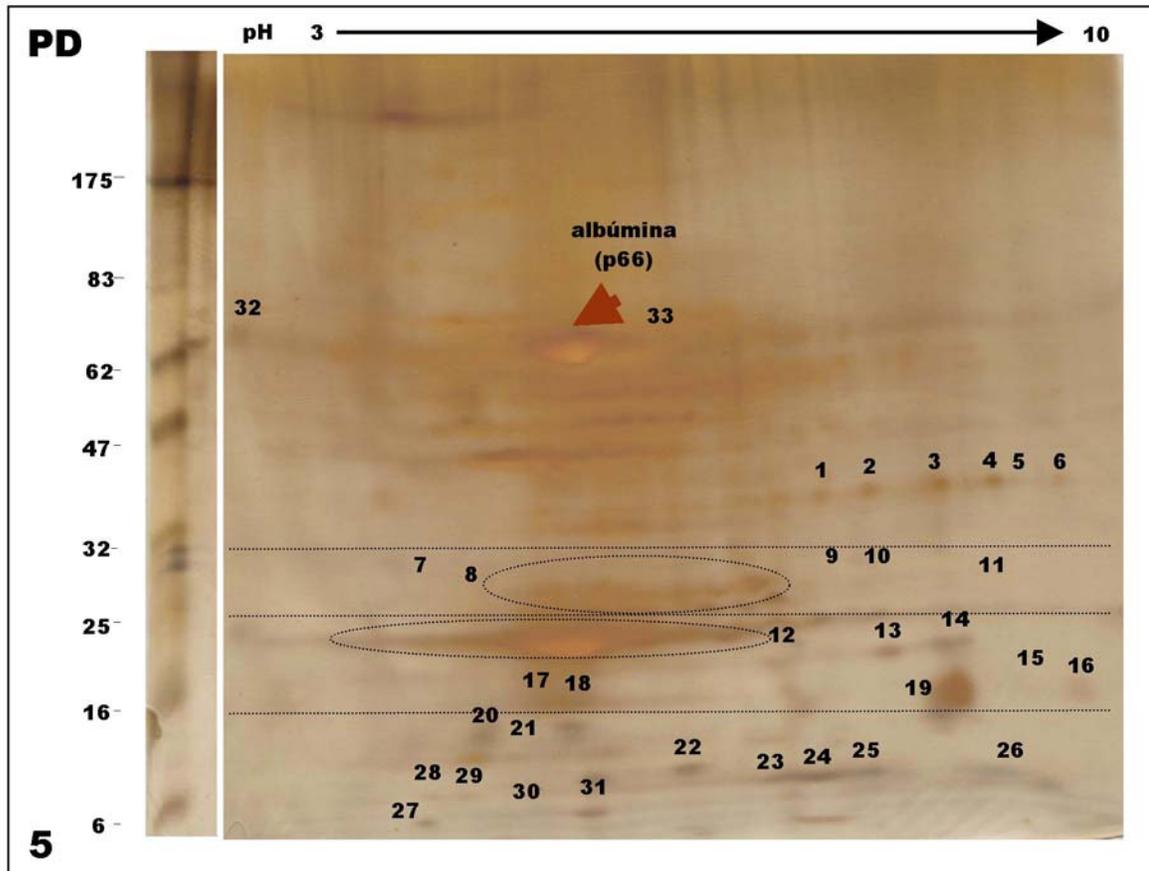


Figura 5.- Análisis de extracto de *pars Distalis* (PD) de vaca mediante electroforesis bidimensional. Tinción de plata. Se muestran diferentes compuestos, reconocibles como *spots* individualizados y que se encuentran enumerados del 1 al 33(color negro)

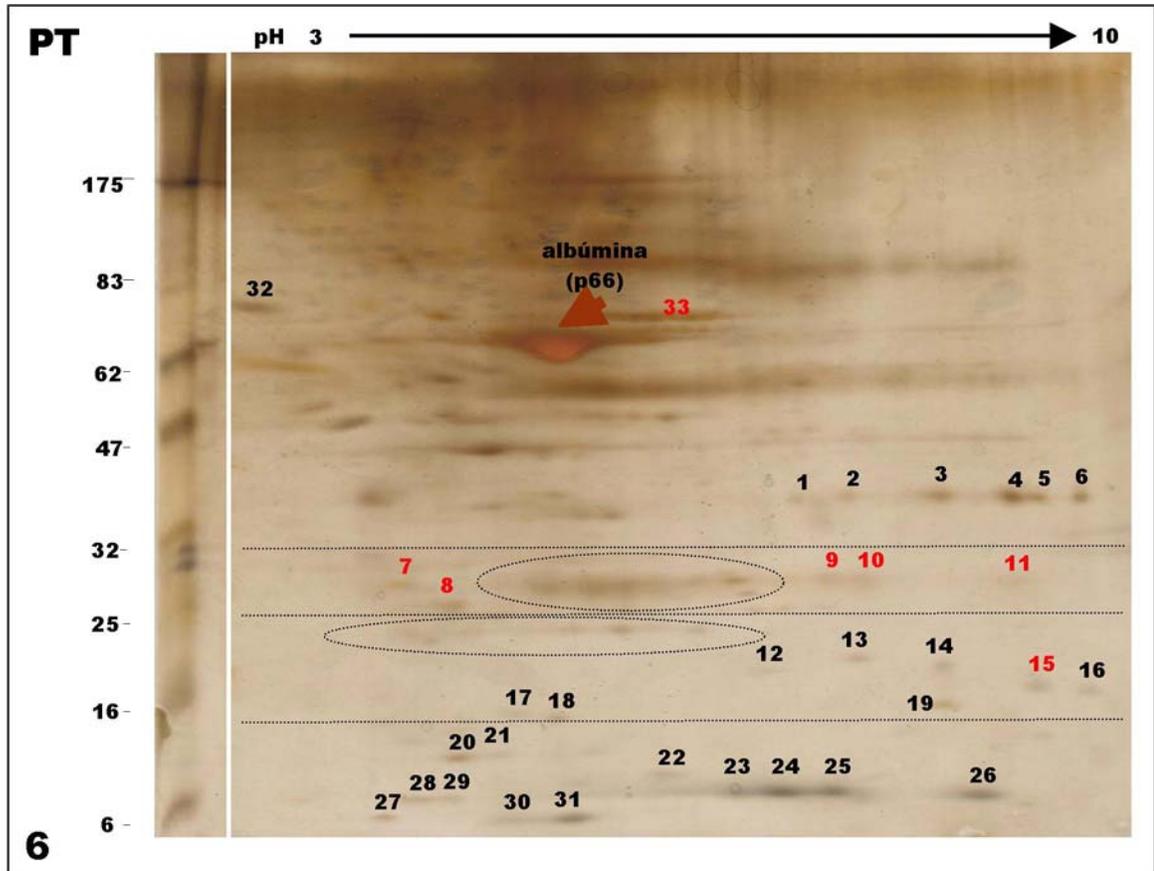


Figura 6.- Análisis de extracto de *pars tuberalis* (PT) de vaca mediante electroforesis bidimensional. Tinción de plata. Se muestran diferentes compuestos, reconocibles como *spots* individualizados y que se encuentran enumerados del 1 al 33 (color negro). Cuando se comparan las figuras 5 y 6 se reconocen como compuestos que solo están presentes en PT (enumerados en color rojo).

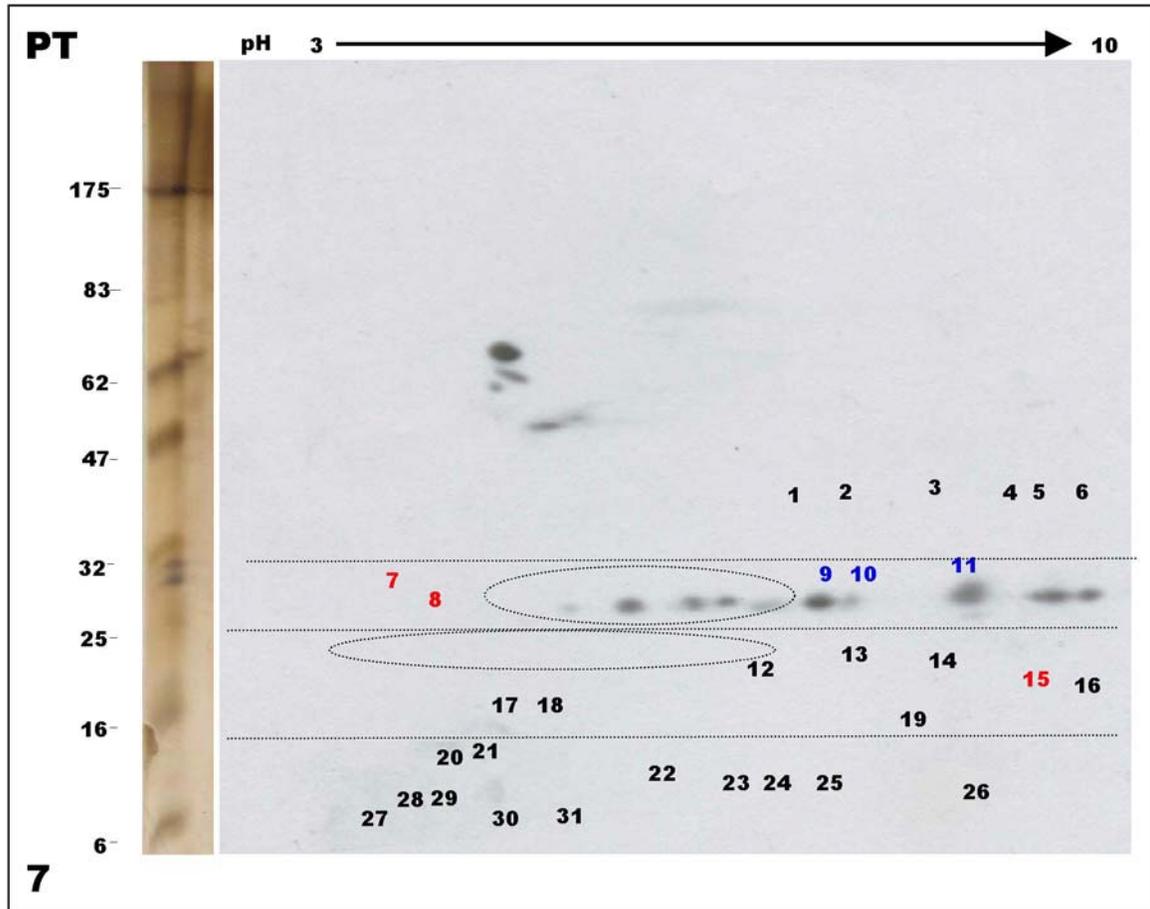


Fig. 7.- Análisis inmunoquímico de extractos de *pars tubercalis* (PT) de vaca. *Immunoblotting* con anti-tuberalina II (1:1000). Las proteínas de los extractos se separaron mediante electroforesis bidimensional. Se observan 15 *spots* inmunorreactivos con anti-tuberalina II. Los *spots* se concentran en el rango de 25-30 kDa y de 55-60 kDa. **Identificación de compuestos PT-específicos en los extractos de *pars tubercalis* de vaca.** Los *spots* inmunorreactivos con anti-tuberalina II se compararon con el total de *spots* identificados en los extractos de PT (tinción de plata, Fig. 6). Tres de los *spots* inmunorreactivos con anti-tuberalina II (9, 10, 11, color azul) son PT-específicos. El resto de los *spots* inmunorreactivos, de mismo peso molecular pero diferente punto isoeléctrico, también están presentes en los extractos de PD (*spots* remarcados con círculo, Fig 5, 6, 7). En la tinción de plata se observan *spots* PT-específicos (7, 8, 15) que no inmunorreaccionan con anti-tuberalina II.

4.2.- Las subunidad beta (sub β) de las hormonas glicoproteicas adenohipofisarias comparten secuencias homólogas conservadas

LH, FSH y TSH están constituidas por dos subunidades (cadenas polipeptídicas) unidas por fuerzas no covalentes. La subunidad alfa (sub α) es común para todas ellas; la sub β es única para cada hormona, y es la que confiere la especificidad funcional. Se sugiere que aunque sean diferentes, las sub β deben mostrar cierto grado de homología entre ellas puesto que se unen a una sub α común (Ryan y col., 1988).

Para identificar alguna de estas secuencias homólogas entre las diferentes sub β , hemos comparado las secuencias aminoacídicas correspondientes a las sub β LH, sub β FSH y sub β TSH de diferentes especies, utilizando el sistema computacional Multiple Sequence Alignment Search Tool (BCM Search Launcher) para el alineamiento múltiple de secuencias. Se analizaron 11 secuencias, provenientes de 4 especies diferentes (hombre, rata, ratón, vaca).

La Figura 8 muestra el resultado del alineamiento realizado. De la información obtenida se dedujo un péptido de 19 aminoácidos, de secuencia **CAVCITINTTICAGYCPTR**, seleccionado a partir de la región con mayor similitud de secuencia conservada entre las diferentes sub β . Ello fue confirmado para numerosas especies mediante el sistema computacional Basic Local Alignment Search Tool (BLAST) del National Center for Biotechnology Information (NCBI) (Ver anexo 1).

BOVINO:

31 45 46 60 75

FSH LTNITITVEKEE**CGF** **CISINTTWCAGYCYT** RDLVYRDPAR— PNT

TSH PTEYMMHVERKE**CAY** **CLTINTTVCAGYCMT** RDVNGKLFLPKYALS

LH PINATLAAEKE**CPV** **CITFTTSICAGYCPS** MKRVLPVILP--PMP

HUMANO:

31 45 46 60 75

FSH LTNITIAIEKEE**CRF** **CISINTTWCAGYCYT** RDLVYKDPAR—PKI

TSH PTEYTMHIERRE**CAY** **CLTINTTMCAGYCMT** RDINGKLFLPKYALS

LH PINAILAVEKE**GCPV** **CITVNTTICAGYCPT** MMRVLQAVLP--PLP

4.3.- Estudios de inmunoadsorción muestran que anti-tuberalina II reconoce específicamente células secretorias de la *pars tuberalis*

La evidencia bioquímica obtenida hasta el momento en el presente estudio sugiere que el antisuero anti-tuberalina II reconoce más de un compuesto (capítulo I, resultados), y que las diferentes sub β de las hormonas glicoproteicas de la PD comparten secuencias homólogas (capítulo II). Puesto que fue posible deducir una secuencia peptídica común a todas ellas, se sintetizó dicho péptido para inmunoadsorber el antisuero anti-tuberalina II y posteriormente utilizarlo para estudios inmunocitoquímicos de hipófisis de rata y vaca. Se utilizaron ratas adultas de la cepa Holtzmann, mantenidas con un fotoperíodo 12 horas luz/12 horas oscuridad, y las hipófisis de vaca obtenidas en FRIVAL, Valdivia.

4.3.1.- Estudios inmunocitoquímicos utilizando inmunoadsorción de anti-tuberalina II con el péptido CAVCITINTTICAGYCPTR

Estudio de la hipófisis de rata. En la hipófisis de rata anti-tuberalina II: (i) reacciona con numerosas células repartidas por toda la glándula (Fig. 9 A, B); (ii) la reacción es especialmente fuerte en una población de células localizadas en la región que se continúa con la *pars tuberalis* (Fig. 9 A, recuadro); (iii) reacciona fuertemente con el epitelio que tapiza la cavidad de la bolsa de Rathke (Fig. 9 A, B). Anti-tuberalina II no reacciona con el lóbulo neural o la *pars intermedia* de la hipófisis (Fig. 9 A, B). Tras la inmunoadsorción de anti-tuberalina II con 0,5 μ g del péptido CAVCITINTTICAGYCPTR, se observa una disminución significativa o desaparición de la inmunoreactividad del epitelio de la bolsa de Rathke y de las células de la PD

(Fig. 9 B, C), con excepción de las localizadas en la vecindad de la PT, que mantienen una reactividad moderada (Fig.9 A, inserto). La adsorción de anti-tuberalina II con concentraciones más altas del péptido (2, 5 y 10 μg) producen el mismo efecto.

La Inmunoadsorción con 0,5 μg de péptido sintético provoca disminución en la inmunoreacción con anti-tuberalina II de las células de la PT, manteniéndose la inmunotinción del *spot* paranuclear de las células específicas de la PT (Fig. 10 A-D). La adsorción de anti-tuberalina II con concentraciones más altas del péptido (2, 5 y 10 μg) producen el mismo efecto.

El procesamiento de los cortes con el método de la inmunoperoxidasa, pero evitando la incubación en anti-tuberalina II, resultó en ausencia total de tinción.

Estudio de la hipófisis de vaca. La inmunotinción de cortes sagitales de la hipófisis de vaca con anti-tuberalina II muestra: (i) inmunotinción de numerosas células de la PT (Fig. 11 A, 14 A); (ii) inmunoreacción de numerosas células distribuidas en toda la PD (Fig. 11 A, B, 12 A, B); (iii) no hay inmunoreacción con el tejido nervioso de la eminencia media y el lóbulo neural (Fig. 11 A).

La Inmunoadsorción de anti-tuberalina II con 0,5 μg de péptido sintético provoca una disminución sustancial o desaparición de la inmunoreactividad de las células de la PD (comparar Figs. 12 A con 12 C, y 12 B con 12 D). La adsorción de anti-tuberalina II con 2 y 5 μg de péptido producen el mismo efecto.

La Inmunoadsorción de anti-tuberalina II con 0,5 μ g de péptido sintético provoca sólo una moderada disminución de la inmunoreactividad de las células de la PT (Figs. 13, 14 B). La figura 13 es un corte sagital que incluye la PT y la PD, inmunoteñido con anti-tuberalina II adsorbido con 0,5 μ g de péptido sintético; se puede observar que las células de la PT continúan siendo reactivas mientras que las de la PD han dejado de ser reactivas (asterisco).

En la hipófisis de vaca, anti-tuberalina II reacciona con dos poblaciones de células PT-específicas (*cf.* Guerra y Rodríguez, 2001): (i) células tipo I, en las que se tiñe fuertemente todo el citoplasma; (ii) células tipo II, con una débil tinción del citoplasma y una fuerte inmunoreacción de una masa paranuclear (*spot*) (Fig. 14 D). La inmunotinción con anti-tuberalina II adsorbida con 0,5 μ g de péptido sintético provoca una leve disminución de la reactividad de ambas poblaciones celulares, pero las células tipo I siguen mostrando reactividad en todo el citoplasma y las del tipo II siguen mostrando el *spot* paranuclear (comparar figuras 14 A con 14 B y 14 D con 14 E).

La figura 14 A corresponde a un corte de PT inmunoteñido con anti-tuberalina II no adsorbida y se incluye un inserto de PD correspondiente al mismo corte, mostrando que las células de la PT y de la PD presentan una inmunotinción similar. La figura 14 B corresponde a un corte de PT inmunoteñido con anti-tuberalina II adsorbida con 0,5 μ g de péptido y se incluye un inserto de PD correspondiente al mismo corte, mostrando que las células de la PT son reactivas y las de la PD no.

El procesamiento de los cortes con el método de la inmunoperoxidasa, pero evitando la incubación en anti-tuberalina II, resultó en ausencia total de tinción, tanto en la PD (Fig. 12 E, F) como en la PT (Fig.14 C).

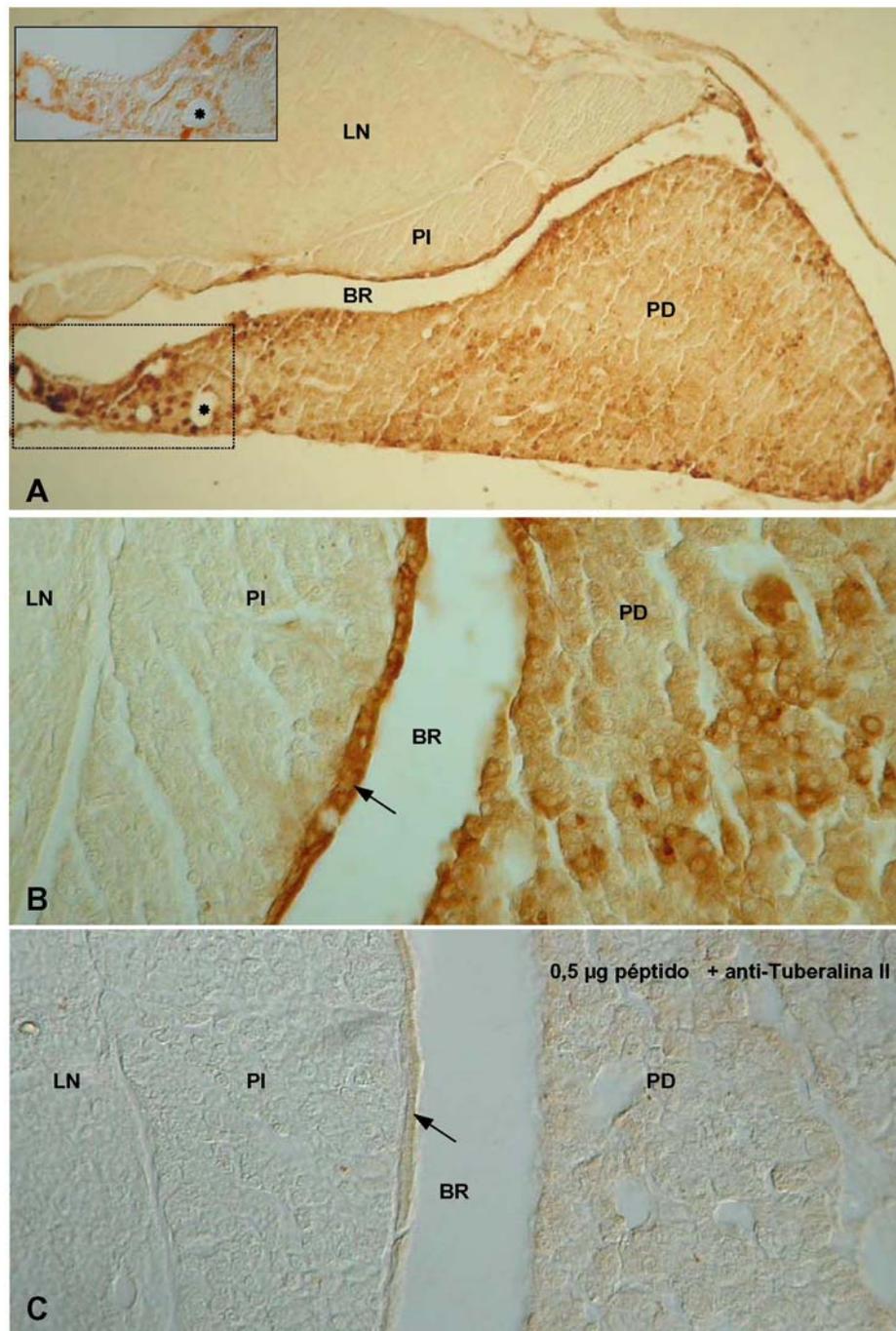


Figura 9.- Estudio inmunocitoquímico, corte sagital de hipófisis de rata. A y B.- Inmunotinción de células de la hipófisis de rata con anti-tuberalina II. Se observan células inmunorreactivas en la *pars distalis* (PD) y en el epitelio de la bolsa de Rathke (BR) (flechas). PI, *pars intermedia*; LN, lóbulo neural; **C.-**Inmuoadsorción de anti-tuberalina con 0,5 µg del péptido. A, x25; B, C x250.

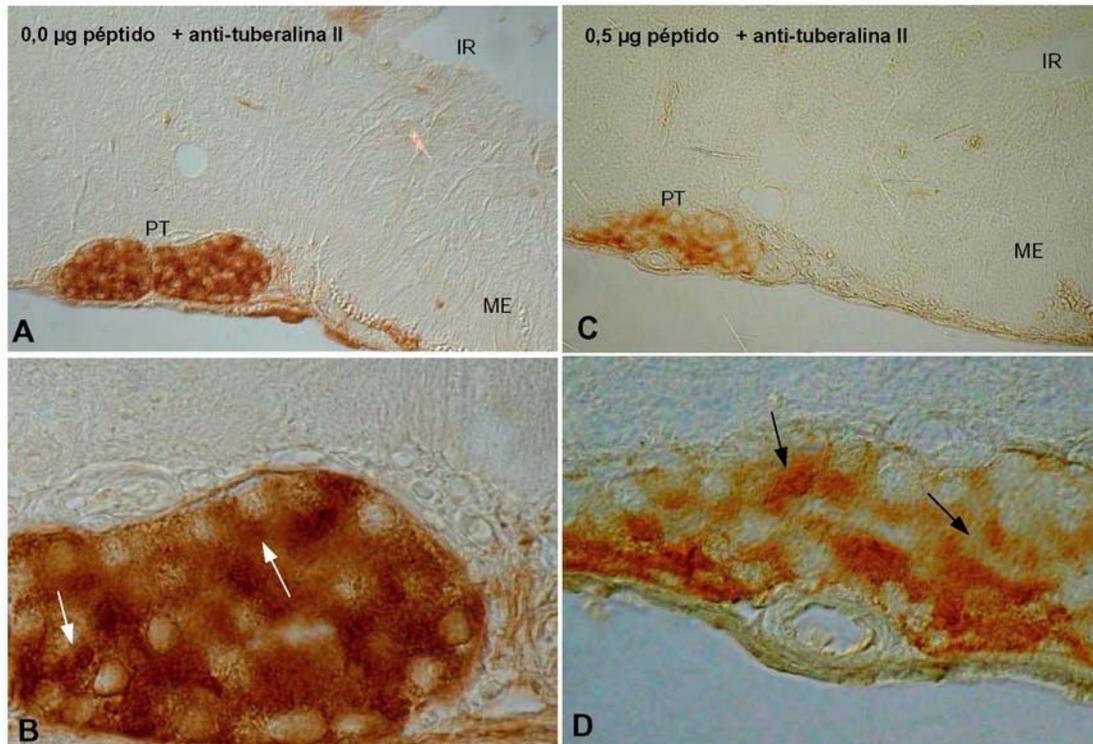


Figura 10.- Estudio inmunocitoquímico, corte sagital de hipotálamo medio-basal (HMB) de rata, inmunoteñido con anti-tuberalina II (A y B) e inmunoabsorbido con el péptido CAVCITINTTICAGYCPTR (Cy D). A y B.- Inmunoreacción de anti-tuberalina II en células de la PT; C y D.- Inmunoabsorción 0,5 µg de péptido sintético. Se observa disminución en la inmureacción con anti-tuberalina II en células de la PT, manteniéndose la inmunotinción del *spot* paranuclear de las células específicas de la PT (flechas). IR, receso infundibular; ME, eminencia media; PT, *pars tuberalis*. A, C, x250; B, D, x1000

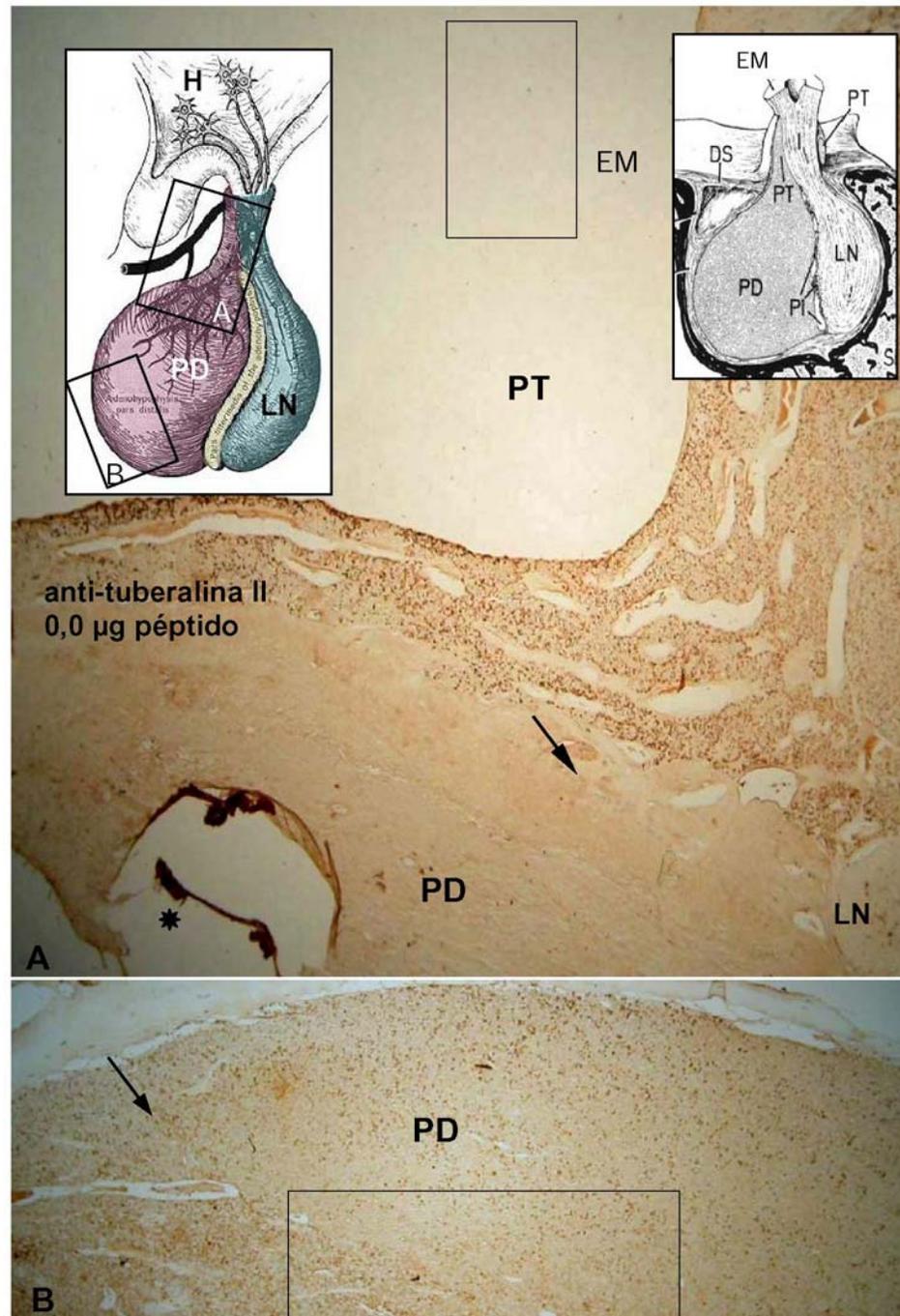


Figura 11.- Estudio inmunocitoquímico, corte sagital de hipófisis de vaca inmunoteñido con anti-tuberalina II.- Se observan numerosas células inmunorreactivas con anti-tuberalina II, distribuidas en la *pars tuberalis* (PT) y *pars distalis* (PD). LN, lóbulo neural. x25

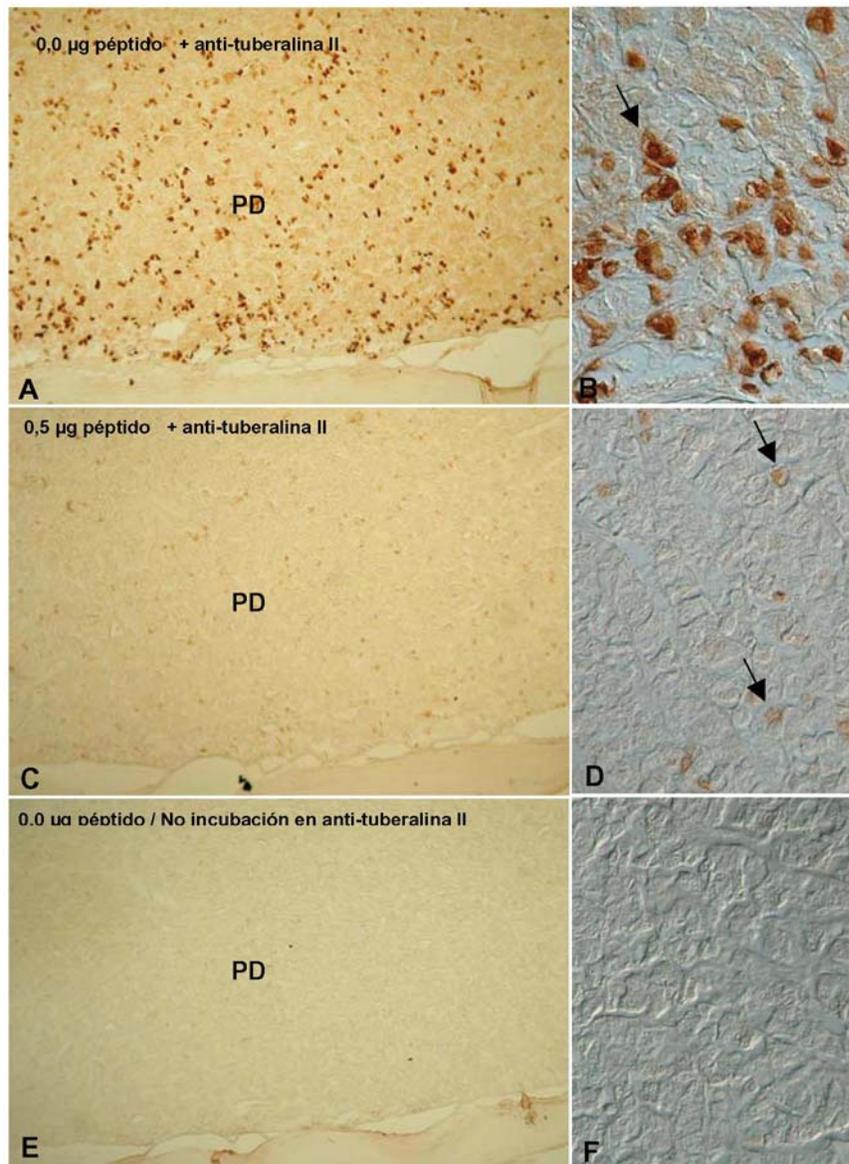


Figura 12.- Estudio inmunocitoquímico, corte sagital de hipófisis de vaca inmunoteñido con anti-tuberalina II (A y B) e inmunoabsorbido con 0,5 µg del péptido CAVCITINTTICAGYCPTR (C y D). **A y B.-** Inmunoreacción de anti-tuberalina II en células de la *pars distalis* (PD) (flechas); **C y D.-** Inmunoabsorción 0,5 µg de péptido sintético en PD; **E y F.-** Control negativo del método de la inmunoperoxidasa. Se observa la ausencia de tinción en PD. A, C, E x50; B, D, F x500.

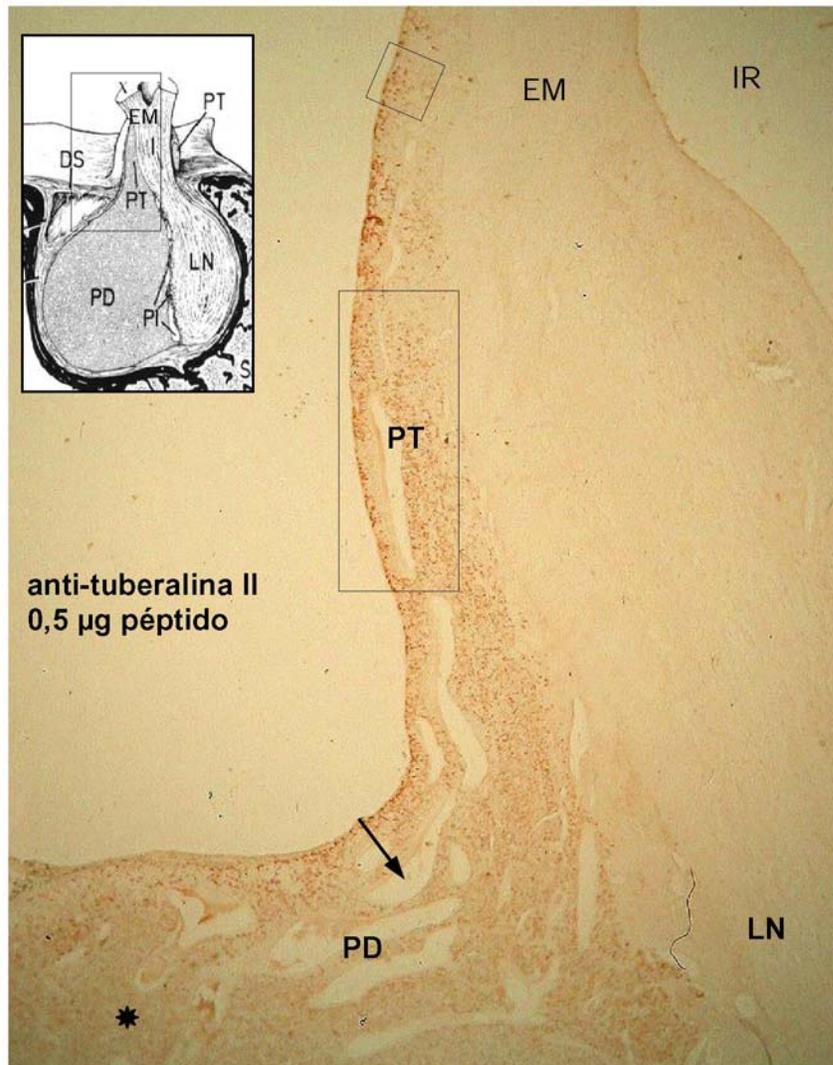


Figura 13.- Estudio inmunocitoquímico, corte sagital de hipófisis de vaca inmunoteñido con anti-tuberalina II inmovilizado con 0,5 μg del péptido CAVCITINTTICAGYCPTR. Se observa inmunotinción en las células de la *pars tuberalis* (PT), pero disminución de éstas en la *pars distalis* (PD) (asterisco) (comparar con Fig. 11). LN, lóbulo neural; EM eminencia media; IR, receso infundibular. x25

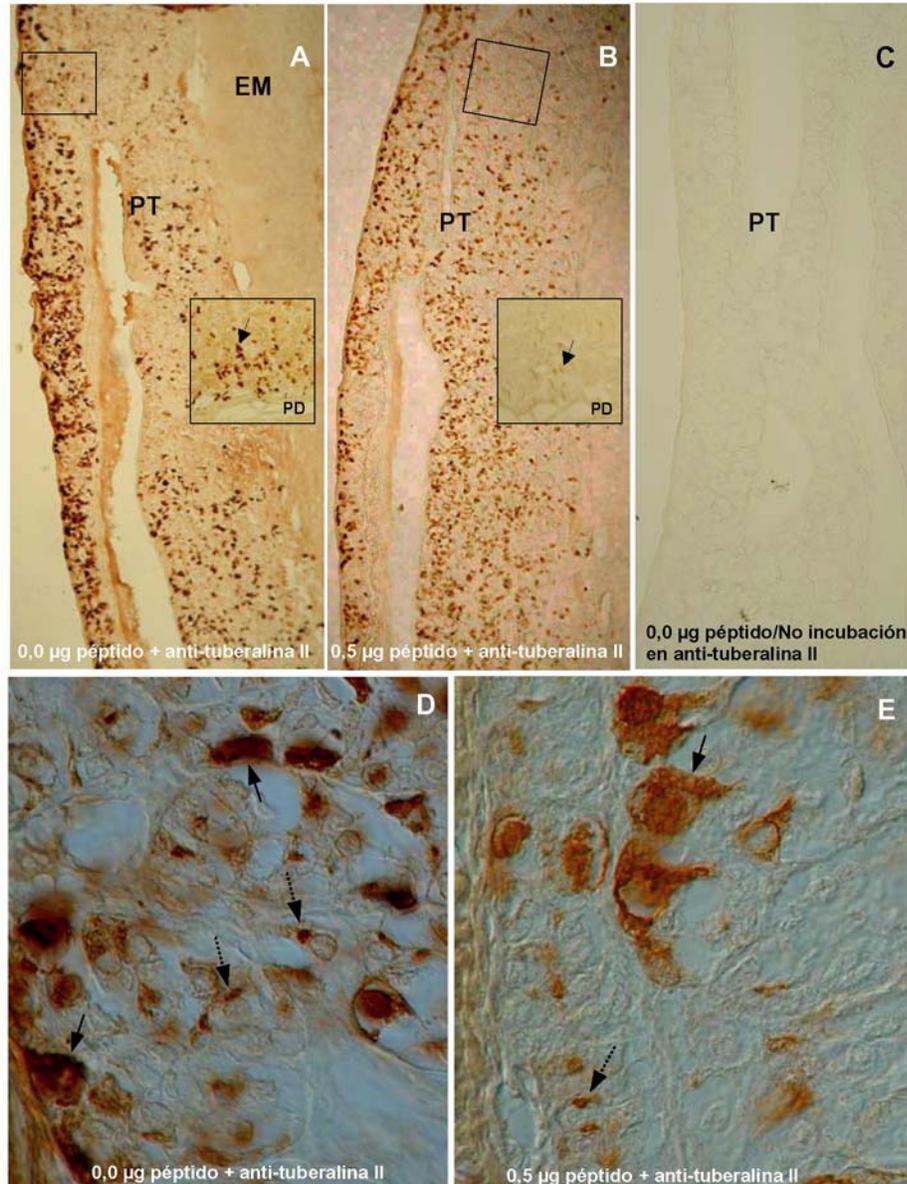


Figura 14.- Estudio inmunocitoquímico, corte sagital de hipófisis de vaca inmunoteñido con antituberalina II (A y D) e inmunoabsorbido con 0,5 µg del péptido CAVCITINTTICAGYCPTR (B y E). **A y D.-** Se observa corte de PT y PD inmunoteñido con anti-tuberalina II; **B y E.-** inmunoabsorción con 0,5 µg de péptido sintético presentando reactividad en células de la PT como de PD; **C.-** control negativo control negativo del método de la inmunoperoxidasa resulta en ausencia de tinción en PD como PT de vaca. A, B, C x50; D, E x1000

5. DISCUSION

La *pars tuberalis* (PT) está constituida por una población de células PT- específicas que muestra signos de actividad secretora y que difiere morfológicamente de otros tipos celulares adenohipofisarios (Cameron y Foster, 1972; Dellman y col., 1974). Estas células expresan receptores de melatonina, no muestran cambios en las mismas condiciones experimentales que inducen modificación de las células de la PD, ni inmunoreaccionan con anticuerpos dirigidos contra las hormonas adenohipofisarias conocidas, por lo que se ha sugerido que melatonina regularía en estas células la secreción de compuestos hormonales específicos de la PT, que se han denominado genéricamente como tuberalinas. Sus probables blancos estarían en la PD, a través de la circulación portal o en el SNC, a través del líquido cefalorraquídeo (LCR) circulante en el espacio subaracnoideo (Aguado y col., 1981; Wittkowski y col., 1988). Estudios previos realizados en el laboratorio de histología y Patología, UACH, han permitido identificar dos tuberalinas de 72 (tuberalina I) y 21 (tuberalina II) kDa (Guerra y Rodríguez 2001), y obtener anticuerpos contra las mismas. Estos compuestos están en la sangre portal y su secreción está regulada por melatonina (Guerra, 2004). **El presente estudio aborda la caracterización molecular parcial de uno de estos compuestos (tuberalina II),** utilizando electroforesis bidimensional y el antisuero anti-tuberalina II que disponemos, como una etapa preliminar que permita la purificación de este compuesto.

5.1.- La PT secreta compuestos de naturaleza glicoproteica

Una característica de la PT de mamíferos es la presencia de hormonas glicoproteicas (LH, FSH, TSH), y la ausencia (o su presencia en muy baja cantidad) de hormonas adenohipofisarias no glicosiladas. Sólo existen unas pocas excepciones a este modelo general, por lo que se ha concluido que este tejido parece ser único en su capacidad para producir hormonas de naturaleza glicoproteica (Gross, 1984). Así, LH ha sido detectada *in vivo* en la circulación portal en primates (Antunes y col., 1979), y en extractos de EM-PT de rata y hombre (Croxatto y col., 1964; Chaufen Cannata, 1979., Aguado y col., 1982). En rata se ha descrito que la LH liberada desde la PT muestra la misma actividad biológica que la LH liberada desde la PD (Aguado y col., 1982; Emmanuelle y col., 1981). Sin embargo, la capacidad secretora de LH de la PT en estado fisiológico normal se considera baja. Chaufen y Cannata (1979) han determinado que el contenido de LH en la PT de rata es sólo el 0.007% del de la PD, la que podría incrementar después de la hipofisectomía o castración (Gross, 1984), condiciones en las que la actividad gonadotrófica o tirotrófica de la PT podría tener mayor importancia e influir en resultados experimentales o clínicos (Baker, 1977).

Evidencias adicionales que sugieren la probable naturaleza glicoproteica de las tuberalinas provienen de estudios morfológicos previos, que han mostrado: (1) las células PT-específicas unen la lectina aglutinina de germen de trigo (WGA, con afinidad por azúcares agregados en el aparato de Golgi), y (2) estas células inmunorreaccionan con anticuerpos dirigidos contra la subunidad alpha de las

hormonas glicoproteicas de la PD (Fig. 15, tomada de Guerra y Rodríguez, 2001), hormonas que constan de dos subunidades, alpha y beta, que son glicosiladas.

5.2.- Anti-tuberalina II reconoce compuestos “tipo PD” y compuestos PT-específicos

El anticuerpo que reconoce la tuberalina II (anti-tuberalina II) se obtuvo utilizando bandas aisladas de geles preparativos en los que se analizaron medios condicionados de explantes de PT (Guerra y Rodríguez, 2001). Los resultados obtenidos en nuestro estudio han mostrado que en estas condiciones una de estas bandas incluye más de un compuesto. Así, cuando analizamos los extractos de PT de vaca mediante electroforesis bidimensional e inmunoblot con anti-tuberalina II, **se identificaron diez compuestos en el rango de 20-30 kDa, y al menos cinco en el rango de 60 kDa, que se diferencian en el punto isoeléctrico de los mismos y que inmunorreaccionan con el antisuero utilizado.** Estos resultados han sido replicados en nuestro laboratorio y confirman observaciones morfológicas realizados previamente en las que anti-tuberalina II reconoce diversas poblaciones de células en la PT y en la PD de vaca y rata (Guerra y Rodríguez, 2001).

De acuerdo a la evidencia anterior, algunos de los compuestos reconocidos por anti-tuberalina II podrían ser (Fig.16):

(1) LH, puesto que: (i) la subunidad β -LH tiene un peso molecular de aprox. 14-21 kDa en la mayoría de las especies estudiadas y podría haber estado incluida en la banda que se utilizó para inmunizar; (ii) LH es detectada en el tejido y en los medios condicionados por explantes de PT de vaca (Guerra, 1998); (iii) anti-tuberalina II reacciona con una población de células de la PT de vaca que exhibe características

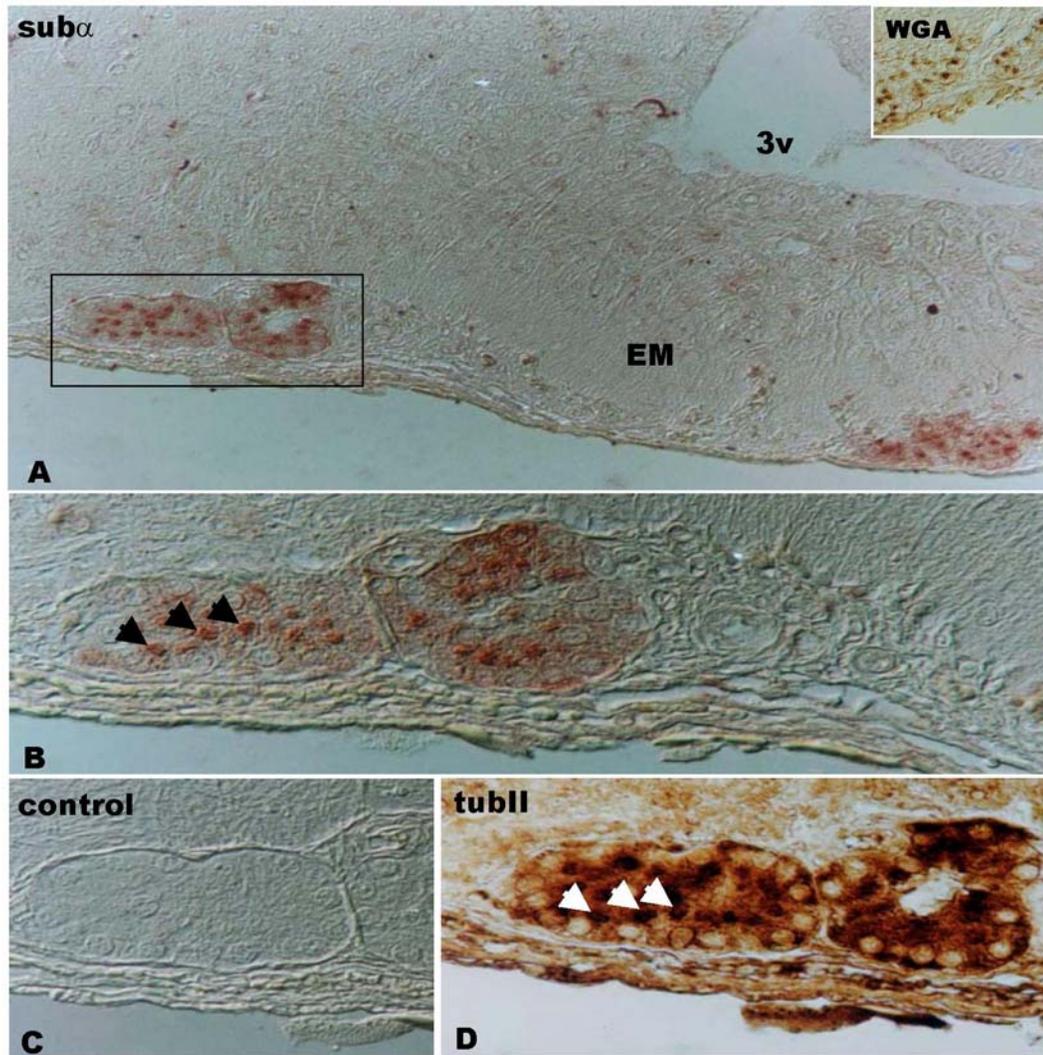


Figura 15.- Co-localización de la tuberalina II con la sub-alpha (Guerra y Rodríguez, 2001). Cortes frontales de hipotálamo medio basal (HMB) de rata adulta. **A y B.-** Inmunotinción con anti- subalpha. Se observan células inmunoreactivas en la *pars tuberalis*. El producto de inmunorreacción se visualiza como una masa (o *spot*) paranuclear (flechas). EM, eminencia media; x 250, x 1250; **C.-** Los anticuerpos anti-subalpha se eluyen de la sección, la que se incuba con anti-IgG y se revela. La ausencia de tinción se evidencia como control positivo de la elusión del primer anticuerpo; **D.-** Inmunotinción de la misma sección con anti-tuberalina II. Se observa inmunorreacción en el *spot* paranuclear (flechas).

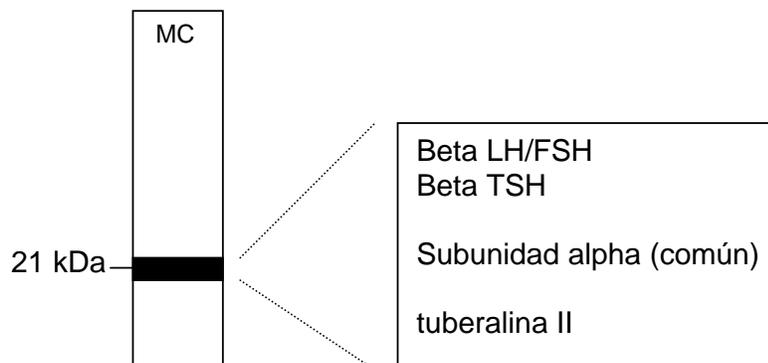
similares a las células gonadotropas de la PD: RER y aparato de Golgi muy desarrollados, dos poblaciones de gránulos secretorios, los de mayor tamaño de 350 nm de diámetro (Guerra y Rodríguez, 2001); (iv) uno de los *spots* diferenciados con anti-tuberalina II mediante *immunoblotting* a partir de electroforesis bidimensional en nuestro laboratorio ha sido identificado como LH (Andrés Carvajal, comunicación personal).

(2) β TSH, puesto que anti-tuberalina II reconoce en la PT de rata una población de células que también reacciona con anti- β TSH. Sin embargo, esta población de células no exhibe las características morfológicas de las células tirotropas de la PD, ni reacciona en las mismas condiciones experimentales que aquellas, por ejemplo, la tiroidectomía (Dellman, 1974).

(3) subunidad alpha común, puesto que, (i) la subunidad alpha tiene un peso molecular de aprox. 14-21 kDa en la mayoría de las especies estudiadas, y podría haber estado incluida en la banda que se utilizó para inmunizar; (ii) subunidad alpha es detectada en el tejido y en los medios condicionados por explantes de PT de vaca (Guerra, 1998, 2004). Sin embargo, el presente estudio, mediante experimentos de inmunoprecipitación, aporta evidencias que **la tuberalina II no es la subunidad alpha**.

(4) **tuberalina II**, que podría ser la subunidad beta de una nueva hormona glicoproteica.

Figura 16.- Posibles proteínas incluidas en la banda de 21 kDa que se utilizó como inmunógeno para la obtención de anti-tuberalina II.



MC: Medios condicionados

Aunque desconocemos cuál de los compuestos inmunorreactivos corresponde al compuesto designado como tuberalina II, evidencias de su existencia y PT-especificidad provienen:

(1) Del análisis comparativo de los extractos de PT y PD de vaca mediante electroforesis bidimensional, que ha demostrado que existen **compuestos PT-específicos que inmunorreaccionan con anti-tuberalina II, los que fueron enumerados como 7,8,9,10,11 y 15 en fig. 6 resultados del presente estudio.**

(2) Estudios morfológicos, que han mostrado: (i) células inmunorreactivas con anti-tuberalina II aparecen en la ontogenia de la hipófisis de la rata a los 14 días de gestación, una etapa en la que sólo las células PT-específicas están diferenciadas (Guerra, 1998); (ii) una población de células inmunorreactiva con anti-tuberalina II expresa receptores de melatonina (Guerra, 2004). Las células tipo PD, secretoras de las hormonas LH, FSH y TSH, no expresan estos receptores en la vida adulta.

(3) Estudios fisiológicos, que han mostrado una población de células en la PT que inmunorreacciona con anti-tuberalina II y que muestra cambios inmunocitoquímicos y ultraestructurales cuando varía la señal de melatonina mediante pinealectomía, fotoperíodo, o animales *knockout* para melatonina (Guerra, 2004).

(4) Melatonina regula la secreción de tuberalina II a los medios condicionados por explantes de PT de vaca (Guerra, 2004). Del total de bandas inmunorreactivas con anti-tuberalina II (de 55-60 kDa, y 21 kDa), sólo la banda de 21 kDa muestra variaciones que dependen de melatonina.

(5) Análisis de inmunoadsorción realizado en este estudio. La inmunoadsorción de anti-tuberalina II con extracto de PD o con un péptido sintético (de secuencia conservada entre las diferentes subunidades beta conocidas) elimina la marca en la PD; sin embargo el antisuero adsorbido es capaz de seguir reconociendo las dos poblaciones de células PT-específicas, incluyendo el *spot* paranuclear de una de estas poblaciones. Este *spot* ha sido identificado como una característica distintiva de la población de células específicas de la pars tuberalis (Wittkowski y col, 1998).

5.3.- ¿La tuberalina II es la subunidad β de una nueva hormona glicoproteica?

Las hormonas glicoproteicas de la PD constan de dos subunidades, alpha y beta, que son glicosiladas. La subunidad alpha es común a LH, FSH y TSH; la subunidad beta confiere la actividad biológica específica de la hormona. Las evidencias obtenidas en esta Tesis y en otros trabajos (Guerra, 2004) muestran que la tuberalina II no es la subunidad alpha, aunque se sintetiza en la misma población de células que sintetizan la subunidad alpha. ¿Podría ser la tuberalina II la sub β de una nueva hormona glicoproteica? De ser cierto, esta nueva subunidad beta debiera

compartir epítopes con las subunidades beta de las otras hormonas, puesto que todas ellas se unirían a una subunidad alpha común en algún dominio fuertemente conservado.

Para estudiar este aspecto, realizamos una búsqueda informática y un alineamiento de las secuencias de las subunidades beta clonadas de diferentes especies. El análisis permitió detectar una secuencia fuertemente conservada. Cuando anti-tuberalina II se adsorbió con el péptido deducido de esta secuencia, la marca en la PD desapareció, y en la PT sólo disminuyó moderadamente en las dos poblaciones de células PT-específicas. La eliminación de la marca en la PD cuando se adsorbe anti-tuberalina II con el péptido sintético, indica que las subunidades beta LH y beta TSH pudieran ser reconocidas por este antisuero, apoyando la evidencia inmunocitoquímica.

¿Beta LH y TSH son sintetizados en la PT? Estudios morfológicos han mostrado que la PT tiene poblaciones celulares tipo PD, concentradas principalmente en la porción más caudal de la glándula (Gross, 1984; Stoeckel, 1973). Sin embargo, la capacidad secretora de estas células se considera poco significativa. Así, su presencia en los medios condicionados que se utilizaron para la producción del antisuero podría considerarse insuficiente para generar una respuesta inmune. Es poco probable entonces que anti-tuberalina II reconozca epítopes específicos de estas hormonas. Otros estudios han mostrado mediante inmunocitoquímica e hibridación in situ que poblaciones celulares de la PT que exhiben las características ultraestructurales descritas para las células PT-específicas, sintetizan la subunidad alfa (sub α) de las hormonas glicoproteicas adenohipofisarias (LH, FSH, TSH), pero

ninguna de las sub β de estas hormonas (Wittkowski y col., 1992; Stoeckel y col., 1993, 1994).

¿La tuberalina II tiene epítopes comunes con las subunidades beta de LH y TSH? De ser así, anti-tuberalina II podría reconocer de manera cruzada las diferentes subunidades beta.

(1) El estudio computacional que hemos realizado nos ha permitido confirmar la existencia de secuencias homólogas conservadas entre las diferentes subunidades β conocidas (LH, FSH, TSH).

(2) El estudio de inmunoadsorción de anti-tuberalina II con concentraciones crecientes de un péptido diseñado a partir de una de estas secuencias, confirma la existencia en el suero anti-tuberalina II de anticuerpos que reconocen epítopes comunes a las subunidades beta.

(3) La fuerte disminución en la inmunotinción de la PD y en menor medida de la PT con anti-tuberalina II adsorbida con tan sólo 0.5 μ g del péptido, indica que anticuerpos dirigidos contra estos epítopes están muy representados en el suero.

¿La tuberalina II tiene epítopes propios (PT-específicos) que la diferencian de las subunidades beta de LH y TSH? La permanencia de inmunoreactividad en el spot paranuclear de una de las poblaciones PT-específicas podría explicarse por el procedimiento utilizado para generar anti-tuberalina II. Las proteínas que fueron utilizadas como inmunógeno fueron desnaturalizadas, quedando expuestos epítopes ocultos de la molécula nativa que pudieron haber inducido la formación de anticuerpos (Fig. 17). Por otro lado, la utilización de Bouin (pH 4.5) como fijador del tejido utilizado en la inmunoreacción procura que las proteínas se encuentren denaturadas de tal

manera de exponer epítopes ocultos al momento de la reacción antígeno-anticuerpo. La persistencia de inmunorreactividad en el *spot* de las células de la PT cuando ésta desaparece en la PD, sugiere que en el o los compuestos presentes en el *spot* hay epítopes PT-específicos que se exponen por la metodología utilizada (Fig. 10 D y 14 E). Por otro lado, la permanencia de inmunoreactividad en las dos poblaciones de células PT-específicas, cuando ésta desaparece en la PD al usar anti-tuberalina II adsorbida con el péptido sintético, sugiere que en el antisuero hay anticuerpos contra: (i) la secuencia común a las subunidades beta y que correspondería a la secuencia del péptido sintético; (ii) compuestos específicos secretados por la PT (Fig. 10 D y 14 E).

Estudios de microscopía electrónica han mostrado que el *spot* paranuclear corresponde a cuerpos crinofágicos, una mezcla de gránulos secretorios y lisosomas que también han sido descritos en otros tipos celulares adenohipofisarios, incluyendo lactotropas, somatotropas, gonadotropas y tirotropas (Smith y Farquhar, 1966; Farquhar y col., 1971), y no adenohipofisarios (células endocrinas de la médula adrenal, Farquhar y col., 1971). En los cuerpos crinofágicos, los lisosomas contienen proteasas y peptidasas específicas capaces de degradar las hormonas pituitarias hasta el nivel de oligopéptidos y dipéptidos inactivos (Mc Donald y col., 1971). Durante este proceso de degradación quedarían expuestos aquellos epítopes ocultos (PT-específicos) de la molécula nativa que se almacena en los gránulos secretorios (Fig. 14 E). Se explicaría así por qué las células PT-específicas productoras de tuberalina II muestran después de la adsorción con el péptido común, una reacción en el *spot* paranuclear, en la que se encuentran los cuerpos crinofágicos, y una ausencia de reacción en el citoplasma general de estas células, donde se almacena la molécula

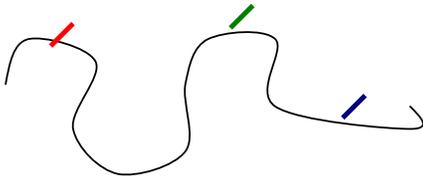
nativa en los gránulos secretorios (Fig. 14 E). La permanencia de marca en el spot paranuclear a concentraciones altas de los péptidos sugieren que anti-tuberalina II contiene anticuerpos capaces de reconocer los epítopes PT-específicos. Además estudios sobre la naturaleza glicoproteica de la tuberalina han evidenciado unión de la lectina aglutinina del germen de trigo al *spot* paranuclear del mismo modo que este inmunoreacciona con anticuerpos dirigidos contra la subunidad alpha de las hormonas adenohipofisarias (Fig. 15, tomada de Guerra y Rodríguez, 2001).

Todos los resultados obtenidos indican que anti-tuberalina II, un anticuerpo policlonal, contiene anticuerpos que reconocen: (i) una secuencia aminoacídica común con las hormonas PD conocidas (Fig. 18), (ii) epítopes PT-específicos. Las evidencias obtenidas en la presente Tesis apoyan la existencia de una relación molecular entre las hormonas glicoproteicas de la PD y la tuberalina II. Esta tendría epítopes comunes con aquellas, y epítopes propios (PT-específicos) que la diferenciarían (Fig 10 B y D, 14 D y E). La evidencia presentada sugiere que ambos compuestos, tuberalina II y la subunidad alpha, se localizarían en el mismo *spot* paranuclear. Se requieren estudios de purificación y secuenciación de la tuberalina II para confirmar se corresponde a una nueva hormona adenohipofisaria glicoproteica. Los resultados obtenidos no permiten descartar que en las células PT-específicas la tuberalina II y la subunidad α estén en forma libre (no asociadas) y que por lo tanto tuberalina II no pertenezca a la familia de hormonas adenohipofisarias glicoproteicas (LH, FSH y TSH).

Esperamos que en un futuro la purificación de la tuberalina II, utilizando metodología estandarizada en nuestro laboratorio a partir de esta Tesis (electroforesis bidimensional), confirmen y extiendan los presentes resultados.

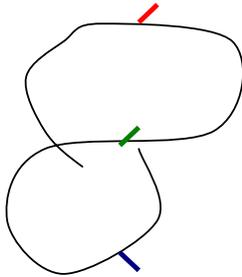
Figura 17.- Diferentes estados en los que podemos encontrar la tuberalina II.

A.- Molécula desnaturalizada, utilizada para la obtención del inmunógeno



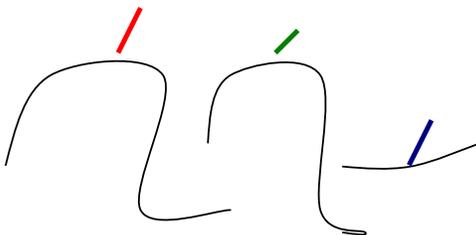
Se observan tres diferentes epítopes de la tuberalina II utilizada para la generación del antisuero (anti-tuberalina II). Los tres epítopes se encuentran expuestos. Anti-tuberalina II podría contener anticuerpos que reconocen los tres epítopes.

B.- Molécula nativa, se encuentra en los gránulos secretorios.



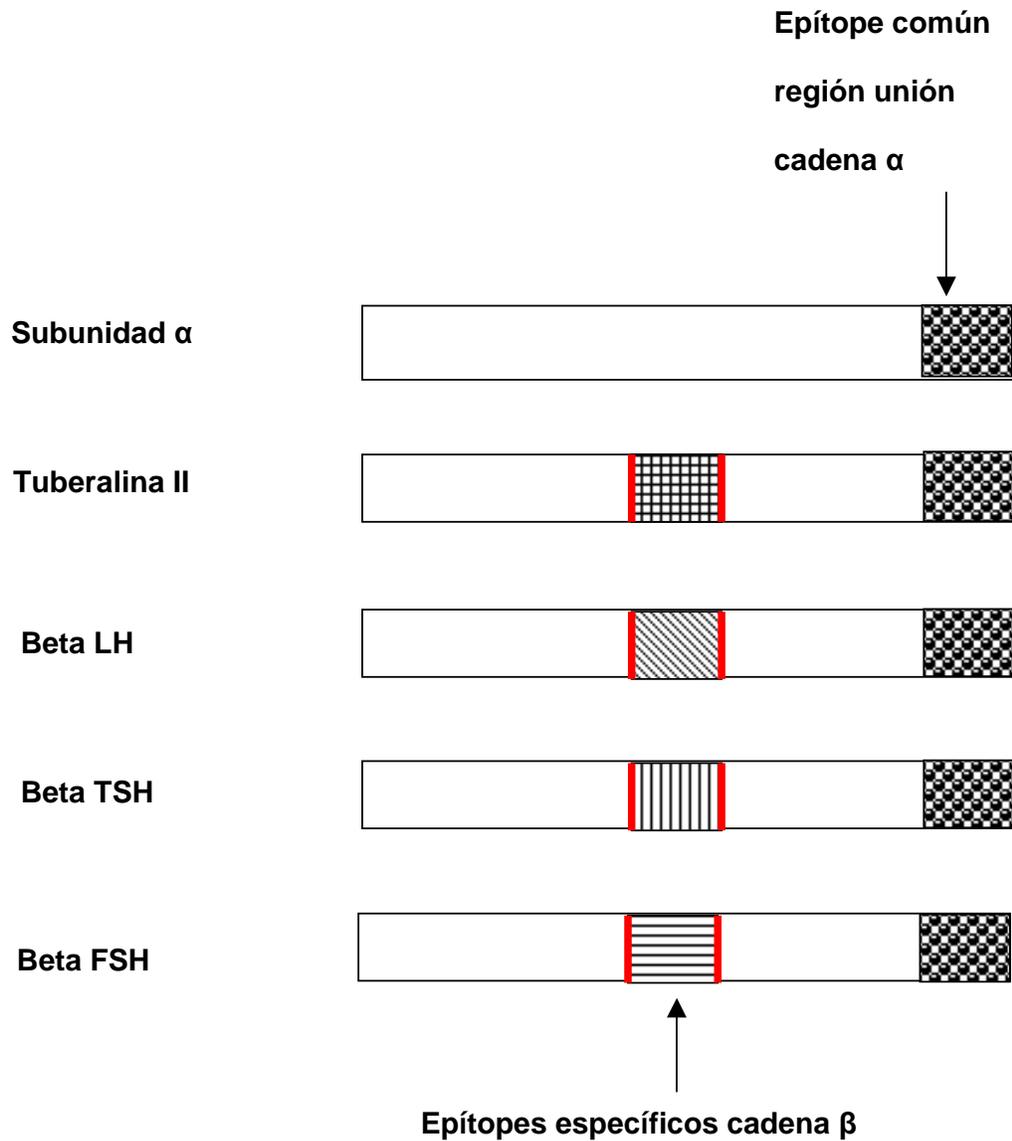
Se observa la tuberalina II en su forma nativa, donde dos de los tres epítopes se encuentran expuestos en la superficie de la molécula y uno de ellos en un dominio interno, no accesible al antisuero.

C.- Moléculas contenidas en el spot paranuclear, en los cuerpos crinófagicos.



La tuberalina II se degrada en los cuerpos crinofágicos en péptidos de menor tamaño. El proceso de degradación expone epítopes ocultos en la molécula nativa, que pueden ser reconocidos por el antisuero.

Figura 18.- Relación molecular de la tuberalina II con las subunidades β de las hormonas PD conocidas



La tuberalina II y las subunidades beta de las hormonas glicoproteicas de la PD, comparten epítotope conservados en la subunidad β que permite su unión a la subunidad α común. La tuberalina II tendría epítotope propios, PT-específicos, que determinarían su actividad biológica (¿liberación de prolactina?, Morgan y col, 1996).

5.4.- CONCLUSIONES

Se estandarizó la técnica de electroforesis bidimensional en nuestro laboratorio, lo que nos permitió analizar qué compuestos inmunorreaccionan con anti-tuberalina II en la PT y PD de la vaca:

- 1.- Anti-tuberalina II reconoce diez compuestos diferentes en el rango de 20-30 kDa, y al menos cinco en el rango de 60 kDa, los que se diferencian en el punto isoeléctrico.
- 2.- Dos de estos compuestos son PT-específicos.
- 3.- La tuberalina II comparte secuencia aminoacidica con las hormonas glicoproteicas de la PD. Esta secuencia sería: CAVCITINTTICAGYCPTR
- 4.-La secuencia CAVCITINTTICAGYCPTR del péptido sintético, sugiere que las zonas homólogas de las subunidades beta de LH, FSH y TSH corresponderían a un sitio de interacción con la subunidad alfa, común a estas tres hormonas.
- 5.- La tuberalina II tiene secuencias y glicosilación específicas, que la diferencian de las hormonas glicoproteicas de la PD (Fig. 15).

6. BIBLIOGRAFIA

- Aguado LI, Schoebitz K, Rodriguez EM (1981): Intercellular channels in the pars tuberalis of the rat hypophysis. Evidence for their relationship with the subarachnoid space. *Cell Tissue Res* 218:345-354
- Aguado LI, Hancke JL, Rodriguez S, Rodriguez EM (1982): Changes in the luteinizing hormone content of the rat pars tuberalis during the estral cycle and after lesions in the preoptic area. *Neuroendocrinology* 35:178-185
- Antunes J, Carmel PW, Zimmerman EH, Ferin M (1979): The pars tuberalis of the rhesus monkey secretes luteinizing hormone. *Brain Res* 166:49-55
- Baker BL, Yu YY (1975): Immunocytochemical analysis of cells in the pars tuberalis of the rat hypophysis with antisera to hormones of the pars distalis. *Cell Tissue Res* 156: 443-449
- Baker BL (1977): Cellular composition of the human pituitary pars tuberalis as revealed by immunocytochemistry. *Cell Tissue Res* 182:151-163
- Bergmann M, Wittkowski W, Hoffmann K (1989): Ultrastructural localization of the thyrotropin (TSH)-like immunoreactivity in specific secretory cells of the hypophyseal pars tuberalis of the Djungarian hamster, *Phodopus sungorus*. *Cell Tissue Res* 256:649-652
- Böckers TM, Sourgens H, Wittkowski W, Jekat A, Pera F (1990): Changes in TSH-immunoreactivity in the pars tuberalis and pars distalis of the fetal rat hypophysis following maternal administration of propylthiouracil and thyroxine. *Cell Tissue Res* 260:403-410

- Böckers TM, Bockmann J, Fauteck JD, Kreutz MR, Bock R, Wittkowski W (1994): Pars tuberalis specific cells in the ovine pituitary do express the common α -chain of glycoprotein hormones: an in situ hybridization and immunocytochemical study. *Eur J Endocrinol* 131:540-546
- Bradford MM. (1976): A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem.* 72:248-54.
- Cameron E, Foster CL (1972): Some light and electron microscopical observations on the pars tuberalis of the pituitary gland of the rabbit. *J Endocrinol* 54:505-511
- Celis JE, Lauridsen JB, Basse B (1994): Determination of antibody specificity by western blotting and immunoprecipitation. *Cell Biology: A laboratory handboock.* By Academic Press, Inc. 2: 305-313
- Chaufen S, Cannata MA (1979): Adenohypophysial hormone content of the rat pars tuberalis. *Experientia* 35:1404
- Croxatto H, Arrau J, Croxatto H (1964): Luteinizing hormone-like activity in human median eminence extracts. *Nature, Lond* 204:854-858
- Dellmann HD, Stoeckel ME, Hindelang-Gertner C, Porte A, Stutinski, F (1974). A comparative ultrastructural study of the pars tuberalis of various mammals, the chicken and the newt. *Cell Tissue Res* 148:313-329
- Dierickx K, Vanderberghe MP, Druyts A (1971): The structure and vascularization of the pars tuberalis of the hypophysis of *Rana temporaria*. *Z. Zelforsch* 114:135-150
- Emmanuelle N, Oslapas R, Connick E, Kirstein L, Lawrence AM (1981): Hypothalamic LH may play a role in control of pituitary LH release. *Neuroendocrinology* 33:12-17

- Fitzgerald, KT (1979): The structure and function of the pars tuberalis of the vertebrate adenohypophysis. *Gen Comp Endocrinol* 37:383-399
- Gonzalez CB, Rodriguez EM (1980): Ultrastructure and immunocytochemistry of neurons in the supraoptic and paraventricular nuclei of the lizard *Liolaemus cyanogaster*. Evidence for the intracisternal location of the precursor of neurophysin. *Cell Tissue Res.*207(3):463-77
- Gross DS (1978): Effect of castration and steroid replacement on immunoreactive luteinizing hormone cells in the pars tuberalis of the rat. *Endocrinology* 103:583-588
- Gross DS (1983): Hormone production in the hypophysial pars tuberalis of intact and hypophysectomized rats. *Endocrinology* 112:733-744
- Gross DS (1984): The mammalian hypophyseal pars tuberalis: a comparative immunocytochemical study. *Gen Comp Endocrinol* 56:283-298
- Gross DS, Turgeon LJ, Waring DW (1984): The ovine pars tuberalis: a naturally occurring source of partially purified gonadotropes which secrete luteinizing hormone in vitro. *Endocrinology* 2084-2091
- Guerra M (1998): Identificación inmunoquímica de compuestos secretados por la pars tuberalis de vaca. Tesis Magister. Biblioteca Universidad Austral.
- Guerra M, Rodríguez EM (2001): Identification, cellular and subcellular distribution of 21 and 72 kDa proteins (tuberalins?) secreted by the specific cells of the pars tuberalis. *J Endocrinol* 168 (3):363-79
- Guerra M, Rodríguez EM (2002): A Pineal-pars tuberalis-pars distalis axis? *European Comparative Endocrinologist* 123-127

- Guerra M (2004): Pineal-pars tuberalis-pars distalis: ¿un nuevo eje de regulación neuroendocrina?. Tesis Doctorado. Biblioteca Universidad Austral.
- Knowles FRS, Kumar A (1969): Structural changes related to reproduction in the hypothalamus and in the pars tuberalis of the rhesus monkey. Part I: The hypothalamus. Part II: The pars tuberalis. Philosophical Transaction of the Royal Society of London B. Biological Sciences 256:357-375
- Laemmli UK (1970): Cleavage of structural proteins during the assembly of the head bacteriophage T4. Nature 227:680-685
- Merks T, Schultze-Bonhage AH, Wittkowski W (1993): Photoperiod dependent changes in exocytic activity in the hypophyseal pars tuberalis of the Djungarian hamster, *Phodopus sungorus*. Cell Tissue Res 273:287-291
- Morgan PJ, Williams LM (1996): The pars tuberalis of the pituitary: a gateway for neuroendocrine output. Rev Reprod 1(3):153-61
- Moriarty GC, Halmi NS (1972): Electron microscopic study of the adrenocorticotropin-producing cell with the use of unlabeled antibody and the soluble peroxidase-antiperoxidase complex. J Histochem Cytochem 20(8):590-603.
- Nielsen LS, Hansen JG, Skriver L, Wilson EL, Kalltoft K, Zeuthen J, Dano K (1982.): Purification of zymogen to plasminogen activator from human glioblastoma cells by affinity chromatography with monoclonal antibody. Biochemistry. 21(25):6410-5.
- Nakane PK (1970): Classification of anterior pituitary cell types with immunoenzyme histochemistry. J Histochem. Cytochem 18: 9-20
- Nemerovski A, Setalo G, Halasz B (1988): Ontogenesis of the three parts of the fetal rat adenohipophysis. Neuroendocrinology 48:534-543

- O'farrell (1975): High resolution two-dimensional electrophoresis of proteins J.Biol chem. 25;250 (10):4007-21.
- Osamura Y, Watanabe K (1978). An immunohistochemical study of epithelial cells in the posterior lobe and pars tuberalis of the human adult pituitary gland. Cell Tissue Res 194, 513-524
- Rodríguez EM, González CB, Delannoy L (1979): Cellular organization of the lateral postinfundibular regions of the median eminence in the rat. Cell Tissue Res 201(3): 377-4080
- Shapiro SS, Jentsch JP, Yard AS. (1971): Protein composition of rabbit oviducal fluid. J Reprod Fertil 24(3):403-8.
- Shevchenko et al (1996). Mass spectrometric sequencing of proteins from silver - stained polyacrilamide gels. Electrophoresis 68, 850 – 858
- Sternberger LA, Hardy PH, Cuculis JJ, Meyer HG (1970): The unlabelled antibody-enzyme method of immunohistochemistry:preparation and properties of a soluble antigen-antibody complex (horseradish-peroxidase-antiperoxidase) and its use in identification of spirochetes. J Histochem Cytochem 18:315-345
- Stoeckel ME, Porte A, Hindelang-Gertner C, Dellmann HD (1973): A light and electron microscopic study of the pre and postnatal development and secretory differentiation of the pars tuberalis of the rat hypophysis. Z. Zellforsch 142:348-36
- Stoeckel ME, Hindelang-Gertner C, Porte A (1979): Embryonic development and secretory differentiation in the pars tuberalis of the mouse hypophysis.Cell Tissue Res 198:465-476

- Stoeckel ME, Porte A (1984): Fine structure and development of the pars tuberalis in mammals. In:
- Motta PM (ed). Ultrastructure of endocrine cells and tissues. Nijhoff. Boston pp 29-38
- Stoeckel ME, Hindelang C, Klein MJ, Poissonnier M, Felix JM (1993): Early expression of the glycoprotein hormone α -subunit in the pars tuberalis of the rat pituitary gland during ontogenesis. *Neuroendocrinology* 58: 616-624
- Stoeckel ME, Hindelang C, Klein MJ, Poissonnier M, Felix JM (1994): Expression of the α -subunit of glycoprotein hormones in the pars tuberalis-specific glandular cells in rat, mouse and guinea pig. *Cell Tissue Res* 278:617-624
- Tillet Y, Pelletier J, Tramu G, Reviers MM (1990): The sheep pars tuberalis: an immunohistochemical study. *Histochemistry* 94: 403-408
- Towbin H, Staehelin T, Gordon J (1979): Electrophoretic transfer of proteins from polyacrilamide gels nitrocellulose sheets: Procedure and some application. *Proc Natl Sci* 76: 4350-4354
- Wingstrand (1966): Comparative anatomy and evolution of the hypophysis. In *"The pituitary gland"*. Vol. I, pp. 58-126. Harris and Donovan, Eds. London.
- Wittkowski W, Hewing M, Hoffman K, Bergmann M, Fechner J (1984): Influence of photoperiod on the ultrastructure of the hypophysial pars tuberalis of the Djungarian hamster, *Phodopus sungorus*. *Cell Tissue Res* 238: 213-216
- Wittkowski W, Bergmann M, Hoffmann K, Pera F (1988): Photoperiod-dependent changes in TSH-like immunoreactivity of cells in the hypophyseal pars tuberalis of the Djungarian hamster, *Phodopus sungorus*. *Cell Tissue Res* 251:183-187

Wittkowski WH, Schultze-Bonhage AH, Bockers TM (1992): The pars tuberalis of the hypophysis: a modulator of the pars distalis? *Acta Endocrinol (Copenh)* 126:285-290

Wittkowski W, Bockman J, Kreutz M, Böckers M (1999): Cell and molecular biology of the pars tuberalis of the pituitary. *Int Rev Cytol* 185, 157-194

Young BA, Foster CL, Cameron E (1966): Ultrastructural changes in the adenohypophysis of castrated rabbits. *J Endocrinol* 35:101-106

7. ANEXOS

Anexo 1.- Alineamiento secuencias cortas. Se muestran las secuencias con las que el péptido comparte homología. **BLASTP 2.2.12 [Aug-07-2004]**



Reference:

Altschul, Stephen F., Thomas L. Madden, Alejandro A. Schäffer, Jinghui Zhang, Zheng Zhang, Webb Miller, and David J. Lipman (1997), "Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs", *Nucleic Acids Res.* 25:3389-3402.

RID: 1131541313-16249-61138694748.BLASTQ2

Database: All non-redundant GenBank CDS

translations+PDB+SwissProt+PIR+PRF excluding environmental samples

3,023,944 sequences; 1,040,428,944 total letters

If you have any problems or questions with the results of this search please refer to the [BLAST FAQs](#)

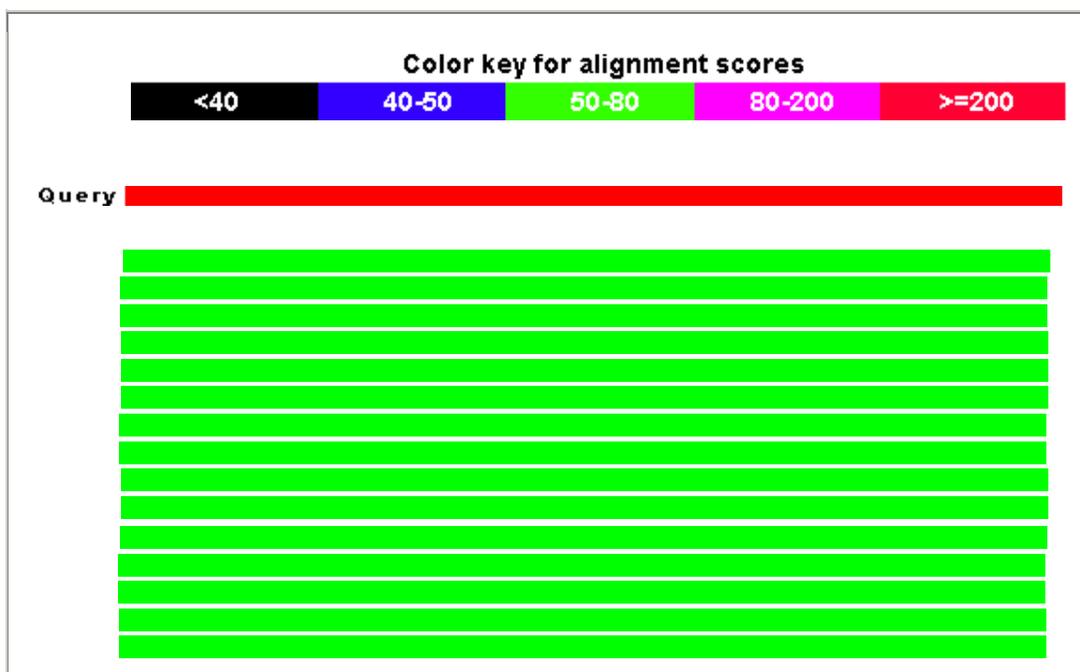
Taxonomy reports

Query= CAVCITINTTICAGYCPTR

(19 letters)

Distribution of 100 Blast Hits on the Query Sequence

Mouse-over to show defline and scores, click to show alignments



Score

Sequences producing significant alignments:

(Bits)

gij15451750 ref NP_149133.1	chorionic gonadotropin, beta pol...	57.9	G
gij18448474 gb AAL69730.1	chorionic gonadotropin beta subunit [57.9	
gij18448472 gb AAL69729.1	chorionic gonadotropin beta subunit [57.9	
gij18448470 gb AAL69728.1	chorionic gonadotropin beta subunit [57.9	
gij18448468 gb AAL69727.1	chorionic gonadotropin beta subunit [57.9	
gij18448466 gb AAL69726.1	chorionic gonadotropin beta subunit [57.9	

[gi|18448464|gb|AAL69725.1|](#) chorionic gonadotropin beta subunit [[57.9](#)
[gi|18448462|gb|AAL69724.1|](#) chorionic gonadotropin beta subunit [[57.9](#)
[gi|18448458|gb|AAL69722.1|](#) luteinizing hormone beta subunit [Pre [57.9](#)
[gi|18448452|gb|AAL69719.1|](#) luteinizing hormone beta subunit [Ho [57.9](#)
[gi|18448450|gb|AAL69718.1|](#) chorionic gonadotropin beta subunit [[57.9](#)
[gi|18448448|gb|AAL69717.1|](#) chorionic gonadotropin beta subunit [[57.9](#)
[gi|18448446|gb|AAL69716.1|](#) chorionic gonadotropin beta subunit [[57.9](#)
[gi|18448444|gb|AAL69715.1|](#) chorionic gonadotropin beta subunit [[57.9](#)
[gi|18448442|gb|AAL69714.1|](#) chorionic gonadotropin beta subunit [[57.9](#)
[gi|18448432|gb|AAL69709.1|](#) chorionic gonadotropin beta subunit [[57.9](#)
[gi|13027716|gb|AAK08644.1|](#) chorionic gonadotropin beta subunit [57.9](#)
[gi|13027714|gb|AAK08643.1|](#) chorionic gonadotropin beta subunit [57.9](#)
[gi|74136405|ref|NP_001028100.1|](#) chorionic gonadotropin beta s..... [57.9](#)
[gi|180444|gb|AAA53287.1|](#) chorionic gonadotropin beta subunit [57.9](#)
[gi|1335075|emb|CAA25068.1|](#) beta-gonadotropin [Homo sapiens] > [57.9](#)
[gi|4502789|ref|NP_000728.1|](#) chorionic gonadotropin beta 3 sub... [57.9](#)
[gi|4504989|ref|NP_000885.1|](#) luteinizing hormone beta subunit ... [57.9](#)
[gi|76826946|gb|AAI06725.1|](#) Unknown (protein for MGC:119823) [57.9](#)
[gi|55650291|ref|XP_524479.1|](#) PREDICTED: hypothetical protein [57.9](#)
[gi|55649685|ref|XP_524335.1|](#) PREDICTED: similar to Lutropin b...[57.9](#)
[gi|1335012|emb|CAA25069.1|](#) beta-gonadotropin [Homo sapiens] >.[57.9](#)
[gi|26996824|gb|AAH41054.1|](#) CGB protein [Homo sapiens] [57.9](#)
[gi|30583985|gb|AAP36241.1|](#) Homo sapiens chorionic gonadotropi.. [gi|18448430|gb|AAL69708.1|](#)
 chorionic gonadotropin beta subuni... [57.9](#) [gi|18448428|gb|AAL69707.1|](#) chorionic gonadotropin
 beta subunit [[57.9](#) [gi|18448426|gb|AAL69706.1|](#) chorionic gonadotropin beta subunit [[57.9](#)
[gi|18448422|gb|AAL69704.1|](#) chorionic gonadotropin beta subunit [[57.9](#)
[gi|61364497|gb|AAX42553.1|](#) chorionic gonadotropin beta polypepti [57.9](#) [gi|223127|prf||0511229A](#)
 lutropin beta [57.9](#) [gi|18448454|gb|AAL69720.1|](#) luteinizing hormone
 beta subunit [Pon [55.4](#) [gi|18448440|gb|AAL69713.1|](#) chorionic gonadotropin beta subunit [[55.4](#)
[gi|18448438|gb|AAL69712.1|](#) chorionic gonadotropin beta subunit [[55.4](#)

gi 18448436 gb AAL69711.1 	chorionic gonadotropin beta subunit [55.4
gi 18448434 gb AAL69710.1 	chorionic gonadotropin beta subunit [55.4
gi 116185 sp P07434 CGHB_PAPAN	Choriogonadotropin beta chain	55.4
gi 18448460 gb AAL69723.1 	lutinizing hormone beta subunit [Col	54.9
gi 18448456 gb AAL69721.1 	lutinizing hormone beta subunit [Mac	54.9
gi 50079994 emb CAH03730.1 	glycoprotein lutinizing hormone,...	54.9
gi 55649687 ref XP_524336.1 	PREDICTED: similar to CGB protein	54.5
gi 40643692 emb CAD66070.1 	thyrotropin [Glirulus japonicus]	51.1
gi 56203630 emb CAI22270.1 	thyroid stimulating hormone, beta [H	50.7
gi 15042687 gb AAK82413.1 	thyroid-stimulating hormone beta s...	50.7
gi 74136499 ref NP_001028146.1 	thyroid stimulating hormone b...	50.7
gi 62530411 gb AAX85431.1 	thyrotropin beta [Felis catus]	50.7
gi 4090295 emb CAA10519.1 	thyroid stimulating hormone beta subu	50.7
gi 37231732 gb AAH58488.1 	Thyroid stimulating hormone, beta ...	50.7
gi 6678443 ref NP_033458.1 	thyroid stimulating hormone, beta...	50.7
gi 4507699 ref NP_000540.1 	thyroid stimulating hormone, beta...	50.7
gi 55741817 ref NP_999533.1 	thyrotropin beta subunit [Sus sc...	50.7
gi 37470 emb CAA26618.1 	unnamed protein product [Homo sapiens]	50.7
gi 57417 emb CAA25684.1 	unnamed protein product [Rattus norv...	50.7
gi 40644414 emb CAD66074.1 	thyrotropin [Tamiasciurus sp. 5813]	50.7
gi 40644412 emb CAD66071.1 	thyrotropin [Muscardinus avellanariu	50.7
gi 40644410 emb CAD66069.1 	thyrotropin [Myomimus roachi]	50.7
gi 40643706 emb CAD66080.1 	thyrotropin [Graphiurus ocellaris]	50.7
gi 40643704 emb CAD66079.1 	thyrotropin [Graphiurus murinus]	50.7
gi 40643702 emb CAD66078.1 	thyrotropin [Graphiurus platyops]...	50.7
gi 40643698 emb CAD66076.1 	thyrotropin [Graphiurus microtis]	50.7
gi 40643696 emb CAD66075.1 	thyrotropin [Glaucomys sp. 4660]	50.7
gi 40643694 emb CAD66073.1 	thyrotropin [Myoxus glis]	50.7
gi 40643690 emb CAD66068.1 	thyrotropin [Dryomys nitedula]	50.7
gi 40643688 emb CAD66067.1 	thyrotropin [Dryomys laniger]	50.7

gi 40643686 emb CAD66066.1 	thyrotropin [Eliomys quercinus]	50.7
gi 40643684 emb CAD66065.1 	thyrotropin [Eliomys melanurus]	50.7
gi 40641838 emb CAD66072.1 	thyrotropin [Aplodontia rufa]	50.7
gi 50979102 ref NP_001003290.1 	thyrotropin beta chain [Canis...	50.7
gi 3122979 sp P79357 TSHB_LAMGL	Thyrotropin beta chain precur...	50.7
gi 3122984 sp Q28376 TSHB_HORSE	Thyrotropin beta chain precur...	50.7
gi 17646746 gb AAL41022.1 	lutinizing hormone beta subunit p...	49.0
gi 860906 emb CAA68572.1 	LH precursor [Canis familiaris] >gi...	49.0
gi 73948014 ref XP_533624.2 	PREDICTED: similar to Lutropin b...	49.0
gi 27806371 ref NP_776630.1 	thyroid stimulating hormone, bet...	48.1
gi 229563 prf 760571B	thyrotropin beta	47.7
gi 1150544 emb CAA62298.1 	beta-thyrotropin [Phodopus sungoru...	46.9
gi 6539648 gb AAF15966.1 	lutinizing hormone beta subunit [P...	46.9
gi 7690113 gb AAB30828.2 	thyroid-stimulating hormone beta subun	46.9
gi 23451979 gb AAN32898.1 	lutinizing hormone beta subunit prec	46.4
gi 74136495 ref NP_001028143.1 	lutinizing hormone beta [Mon...	46.4
gi 23344109 gb AAN28376.1 	lutinizing hormone beta subunit p...	46.4
gi 57163809 ref NP_001009277.1 	lutinizing hormone beta [Fel...	46.4
gi 11133364 sp O46482 LSHB_TRIVU	Lutropin beta chain precurso...	46.4
gi 6225640 sp O46483 LSHB_MACRU	Lutropin beta chain precursor..	46.4
gi 47680441 gb AAT37165.1 	lutinizing hormone beta subunit [...	46.0
gi 4098462 gb AAD00275.1 	lutinizing hormone beta subunit [Sus	46.0
gi 76642096 ref XP_874942.1 	PREDICTED: similar to Lutropin b...	46.0
gi 33868591 gb AAQ55237.1 	lutinizing hormone beta subunit [Mas	46.0
gi 1772992 emb CAA71445.1 	lutinizing hormone beta subunit [Mus	46.0
gi 34555681 gb AAQ74976.1 	lutinizing hormone beta-subunit [Mer	46.0
gi 8250134 emb CAB93505.1 	thyroid-stimulating hormone [Acipense	46.0
gi 75992459 dbj BAE45121.1 	lutinizing hormone beta-subunit ...	46.0
gi 74210595 dbj BAE23656.1 	unnamed protein product [Mus musculu	46.0

[gi|61676899|gb|AAX51913.1](#) luteinizing hormone beta-subunit [... [46.0](#)
[gi|33868593|gb|AAQ55238.1](#) luteinizing hormone beta subunit [Mes [46.0](#)
[gi|73992786|dbj|BAE43406.1](#) luteinizing hormone beta-subunit [Cr [46.0](#)

Alignments (10 seq)

[gi|15451750|ref|NP_149133.1](#) **G** chorionic gonadotropin, beta polypeptide 7 precursor [Homo sapiens]

Length=165

Score = 57.9 bits (129), Expect = 4e-08

Identities = 16/18 (88%), Positives = 17/18 (94%), Gaps = 0/18 (0%)

Query 1 CAVCITINTTICAGYCPT 18

C VCIT+NTTICAGYCPT

Sbjct 43 CPVCITVNTTICAGYCPT 60

[gi|18448474|gb|AAL69730.1](#) chorionic gonadotropin beta subunit [Macaca mulatta]

Length=159

Score = 57.9 bits (129), Expect = 4e-08

Identities = 16/18 (88%), Positives = 17/18 (94%), Gaps = 0/18 (0%)

Query 1 CAVCITINTTICAGYCPT 18

C VCIT+NTTICAGYCPT

Sbjct 38 CPVCITVNTTICAGYCPT 55

[gi|18448472|gb|AAL69729.1](#) chorionic gonadotropin beta subunit [Macaca mulatta]

Length=159

Score = 57.9 bits (129), Expect = 4e-08

Identities = 16/18 (88%), Positives = 17/18 (94%), Gaps = 0/18 (0%)

Query 1 CAVCITINTTICAGYCPT 18

C VCIT+NTTICAGYCPT

Sbjct 38 CPVCITVNTTICAGYCPT 55

> [gi|18448470|gb|AAL69728.1](#) chorionic gonadotropin beta subunit [Macaca mulatta]

Length=159

Score = 57.9 bits (129), Expect = 4e-08

Identities = 16/18 (88%), Positives = 17/18 (94%), Gaps = 0/18 (0%)

Query 1 CAVCITINTTICAGYCPT 18

C VCIT+NTTICAGYCPT

Sbjct 38 CPVCITVNTTICAGYCPT 55

> [gi|18448468|gb|AAL69727.1](#) chorionic gonadotropin beta subunit [Colobus guereza]

Length=159

Score = 57.9 bits (129), Expect = 4e-08

Identities = 16/18 (88%), Positives = 17/18 (94%), Gaps = 0/18 (0%)

Query 1 CAVCITINTTICAGYCPT 18

C VCIT+NTTICAGYCPT

Sbjct 38 CPVCITVNTTICAGYCPT 55

> [gi|18448466|gb|AAL69726.1](#) chorionic gonadotropin beta subunit [Colobus guereza]

Length=159

Score = 57.9 bits (129), Expect = 4e-08

Identities = 16/18 (88%), Positives = 17/18 (94%), Gaps = 0/18 (0%)

Query 1 CAVCITINTTICAGYCPT 18

C VCIT+NTTICAGYCPT

Sbjct 38 CPVCITVNTTICAGYCPT 55

> [gi|18448464|gb|AAL69725.1](#) chorionic gonadotropin beta subunit [Colobus guereza]

Length=159

Score = 57.9 bits (129), Expect = 4e-08

Identities = 16/18 (88%), Positives = 17/18 (94%), Gaps = 0/18 (0%)

Query 1 CAVCITINTTICAGYCPT 18

C VCIT+NTTICAGYCPT

Sbjct 38 CPVCITVNTTICAGYCPT 55