



Universidad Nacional Autónoma de México
Instituto de Neurobiología
Campus Juriquilla, Querétaro



Caracterización de la Hormona del Crecimiento de la Iguana Verde (*Iguana iguana*)

T E S I S

Que para obtener el grado de

Maestro en Ciencias (Neurobiología)

P R E S E N T A

Biol. Avila Mendoza José

Director de Tesis

Dr. Carlos Arámburo de la Hoz

Campus Juriquilla, Agosto 2010



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

Este trabajo se realizó en el laboratorio Bioquímica de Hormonas del Dr. Carlos Arámburo de la Hoz, en el Instituto de Neurobiología, UNAM, Campus Juriquilla, Querétaro.

El proyecto se llevo a cabo con el apoyo de recursos de los donativos de PAPIIT-UNAM IN205406-3, IN21029 y CONACYT F1-60296, así como a presupuesto institucional asignado por el INB al Lab D-01. Beca para estudios de maestría de CONACYT No. 220839 Así como con el apoyo con el material biológico de la Unidad de Manejo Ambiental, UMA-Cementos Holcim-Apasco, Acapulco, Guerrero.

RESUMEN

La hormona del crecimiento es una proteína que ha sido ampliamente estudiada en un buen número de vertebrados; sin embargo, en el grupo de los reptiles ha sido poco estudiada. En el presente trabajo se describe que, como en todas las especies estudiadas, la hormona del crecimiento de iguana verde (igGH) es sintetizada en los somatotropos localizados en la adenohipófisis. Estas células tienen un diámetro aproximado de $6.5 \times 10 \mu\text{m}$ y contienen gránulos electrodensos de aproximadamente 300 nm en los que se almacena la GH. Mediante hibridación *in situ* con una sonda específica se determinó la distribución del ARN mensajero y utilizando inmunohistoquímica y un anticuerpo anti GH de pollo se localizaron los somatotropos en la región caudal de la adenohipófisis. Estas células expresan GH como una proteína monomérica de 26 kDa y una variante de masa de 52 kDa correspondiente al dímero de la proteína. Además, se encontraron 4 variantes de carga con puntos isoeletricos entre los 6.2 a 7.4. El ARN mensajero que codifica para esta proteína está constituido de 1016 nucleótidos con un marco de lectura abierto de 657 pb que codifica para un péptido señal de 27 aminoácidos y una proteína madura de 191 aminoácidos. La estructura primaria de igGH conserva los cuatro residuos de cisteína y el sitio consenso de glicosilación presente en las GHs de otros vertebrados. Presenta una similitud de 81, 83 y 84% con la GH de pollo, cocodrilo y tortuga, respectivamente. Filogenéticamente la igGH se localiza en un clado entre las aves y otras especies de reptiles (tortugas y cocodrilos) sugiriendo un surgimiento de la GH de los squamata después de tortugas y cocodrilos y antes de las aves. Para entender los mecanismos a través de los cuales la igGH ejerce sus efectos biológicos se describió una secuencia parcial del ARN mensajero que codifica para el receptor de igGH (igGHR) que contiene de 750pb que se traduce en una proteína de 250 aminoácidos que corresponde a un fragmento de la región extracelular y al dominio transmembranal. Estos resultados sugieren que todo el sistema de la igGH (las células que la sintetizan, la organización estructural de la glándula hipófisis y la estructura de la proteína y del ADNc que la codifica) se mantiene conservado a lo largo de la escala filogenética manteniendo mayor similitud entre el grupo de reptiles y el grupo de las aves.

SUMMARY

Growth hormone is a protein that widely has been studied in a large number of vertebrates; however on the group of reptiles few studies exist. In this work we describe that, like all vertebrates studied so far, green iguana growth hormone (giGH) is expressed in somatotrophs located in adenohypophysis. These cells have a diameter of $6.5 \times 10 \mu\text{m}$ approximately and contain electron-dense granules of 300 nm, approximately, where GH is stored. By *in situ* hybridization, with a specific riboprobe, it was determined the distribution of mRNA and through immunohistochemistry with an antibody against chicken GH, the somatotrophs were localized in adenohypophysis caudal region. Somatotrophs express GH like a 26 kDa monomeric protein and a 52 kDa molecular variant corresponding to protein dimer. Furthermore, the giGH has at least four charge variants between isoelectric points of 6.2-7.4. The giGH cDNA consisted of 1016 bp encodes a prohormone of 218 aa. The mature protein has 191 aa and a signal peptide of 27 aa. GH primary structure conserves the 4 cysteine residues and the consensus site of glycosylation present in all vertebrates' GHs and has 81, 83 and 84 % identity with chicken, crocodile and turtle GHs, respectively. The phylogenetic analysis of giGH shows that crocodiles and turtles are closer to birds, but the iguana (squamata) goes in other branch. To understand the GH action mechanism, it was described a partial sequence of mRNA that encodes to its receptor, containing 750 bp that translates a 250 aa protein corresponding to a fragment of extracellular and transmembrane domains. These results suggest that the system of igGH (cells that synthesized, the structural organization of the hypophysis and the structure of the protein and the cDNA that encoded it) maintains conserved through the phylogenetic scale, keeping more similarity among the groups of reptiles and birds.

DEDICATORIAS

A quien tras bambalinas siempre fue el combustible del motor de mi pasión, con mucho amor, admiración y respeto, a Roxana Rodríguez Fernández

A mis padres, María Mendoza Castañeda y José Avila Castañeda, que sembraron en mi la semilla del árbol de la superación y que día con día cuento con su apoyo.

A Natziely Avila Mendoza, mi hermana, porque tu gran dedicación y sed de superación son siempre ejemplos de implacable voluntad.

A Miguel Angel Avila Mendoza, mi hermano, porque tu gran valor me ha mostrado la gran fortaleza de ti.

A David Ignacio Avila Mendoza, mi hermanito, porque de tu gran nobleza siempre hay algo nuevo que aprender.

Con mucho cariño le dedico esta tesis a quien me enseñó a ir tras los sueños, y que ahora se ha convertido en el ángel que vigila nuestro andar, al Dr. Roberto Carlos Vázquez Juárez, Q.E.P.D.

No hubiera sido nada sin ustedes...

Ni con toda la gente que estuvo a mi alrededor

Desde el comienzo...

Algunos, siguen hasta hoy...

GRACIAS.....TOTALES

G. Ceratti

AGRADECIMIENTOS

Al Dr. Carlos Arámburo de la Hoz, por creer, permitir y apoyar el desarrollo del proyecto; por su siempre buena disposición para atender menesteres concernientes a este y todos los proyectos; porque sin su ayuda, aun no conoceríamos la GH de iguana verde; por eso y por muchas cosas más, simplemente GRACIAS.

A la Dra. Maricela Luna Muñoz por estar siempre al tanto del cauce del proyecto, por la buena orientación recibida y por sus atinados comentarios.

A los Doctores Alfredo Varela Echavarría y Michael Jeziorski, que semestre a semestre contribuyeron con críticas y comentarios al mejoramiento del trabajo.

A la M. en C. Martha Carranza Salas, por ser pieza fundamental en el desarrollo experimental del presente trabajo.

A Gerardo Courtois Torres por estar siempre respaldando en la parte técnica el trabajo del laboratorio, incluyendo los experimentos realizados en esta tesis.

A mis compañeros de laboratorio, Adriana, Carlos, Cinthya, Clarita, José Luis y Mariselita por estar siempre dispuestos a brindar apoyo ante cualquier eventualidad.

A la unidad de Microscopía, particularmente a Ma. de Lourdes Palma Tirado y Lorena López Sánchez por su apoyo durante la realización de la parte de histología.

A la Unidad de Proteogenómica por su apoyo en los análisis de biología molecular.

Al Dr. Ernesto Pérez Rueda, por su pertinente orientación en los análisis filogenéticos.

A la Unidad de Manejo Ambiental (UMA) Holcim-Cementos Apasco, Acapulco Guerrero, por la donación del material biológico utilizado en el presente proyecto.

A Mario Nava Villalba, por extender la mano de un amigo justo en los momentos más indicados y por hacer de la vida en Querétaro, una aventura más.

A mi compañero y amigo León Eduardo Sánchez-Mejorada Zúñiga, porque siempre la vida hay que llevarla ligera, y la maestría, así la vivimos.

A mis amigos universitarios, Adán, Master, Dianis y Karla, que aun con la distancia, su apoyo incondicional siempre estuvo presente.

A las iguanas que donaron su vida en pro de la ciencia...

A todos y cada uno de ustedes, incluyendo aquellas personas que por alguna u otra razón olvidé mencionar, Gracias... Totales.

INDICE

| | |
|--|------|
| RESUMEN | iv |
| SUMMARY | v |
| DEDICATORIAS | vi |
| AGRADECIMIENTOS..... | vii |
| INDICE..... | viii |
| ÍNDICE DE FIGURAS | ix |
| INDICE DE TABLAS..... | 10 |
| ÍNDICE DE ANEXOS | x |
| INTRODUCCIÓN..... | 1 |
| ANTECEDENTES..... | 3 |
| <i>Hipófisis.....</i> | 3 |
| <i>Estructura y Función de la Hormona del Crecimiento.....</i> | 5 |
| <i>Heterogeneidad de la Hormona del Crecimiento.....</i> | 8 |
| <i>Evolución de la Hormona del Crecimiento.....</i> | 11 |
| <i>La hormona del Crecimiento en Reptiles.....</i> | 13 |
| JUSTIFICACIÓN..... | 16 |
| HIPÓTESIS..... | 16 |
| OBJETIVO | 17 |
| <i>Objetivos particulares.....</i> | 17 |
| DISEÑO EXPERIMENTAL | 18 |
| MATERIAL Y MÉTODOS..... | 19 |
| <i>Hipófisis.....</i> | 19 |
| <i>Purificación de la GH de iguana verde.....</i> | 22 |
| <i>Caracterización bioquímica.....</i> | 23 |
| <i>Clonación molecular del cDNA de la GH de iguana verde y de su receptor (GHR).....</i> | 24 |
| <i>Amplificación Rápida de los Extremos 3' y 5' (RACE 3' y 5') de igGH.....</i> | 26 |
| <i>Análisis bioinformático de los cDNAs de GH y GHR.....</i> | 27 |
| RESULTADOS..... | 29 |
| <i>Histología e Inmunohistoquímica de la Hipófisis de Iguana Verde.....</i> | 30 |
| <i>Purificación de Hormona del Crecimiento de Iguana Verde.....</i> | 36 |
| <i>Caracterización Estructural de la Hormona del Crecimiento de Iguana Verde.....</i> | 37 |
| <i>Clonación Molecular del cDNA de la Hormona del Crecimiento de Iguana Verde.....</i> | 41 |

| | |
|-------------------------|----|
| DISCUSION | 49 |
| CONCLUSIONES..... | 57 |
| LITERATURA CITADA | 59 |
| ANEXOS | 67 |

ÍNDICE DE FIGURAS

| | |
|--|----|
| Figura 1.- Variabilidad morfológica de la hipófisis de diferentes grupos de vertebrados..... | 4 |
| Figura 2.- Distribución de los somatotropos en la región caudal de la adenohipófisis del lagarto <i>Chalcides chalcides</i> | 5 |
| Figura 3.- Comparación esquemática de la organización de exones-intrones del gen de GH entre diferentes especies | 6 |
| Figura 4.- Estructura tridimensional de la hormona del crecimiento | 7 |
| Figura 5.- Procesamiento alternativo del gen hGH-N..... | 10 |
| Figura 6.- Árbol filogenético molecular de la hormona del crecimiento propuesto por Noso y cols. (1995) | 15 |
| Figura 7.- Diseño experimental..... | 18 |
| Figura 8.- Representación esquemática de la ubicación de los oligonucleótidos con los que se amplificó en el ADNc del la GH de iguana verde..... | 27 |
| Figura 9.- Luminograma de SDS-PAGE y Western-blot de GH de iguana verde..... | 29 |
| Figura 10.- Ensayo de paralelismo de la GH de iguana verde | 30 |
| Figura 11.- Tinción de hematoxilina-eosina en cortes sagitales de hipófisis de iguana..... | 32 |
| Figura 12.- Inmunohistoquímica para GH en la hipófisis de iguana verde. | 34 |
| Figura 13.- Micrografías de microscopía electrónica estructural y de inmunohistoquímica de adenohipófisis de iguana verde. | 35 |
| Figura 14.- Hibridación <i>in situ</i> en cortes sagitales de hipófisis de iguana verde | 36 |
| Figura 15.- Purificación del anticuerpo policlonal..... | 37 |
| Figura 16.- Purificación de la hormona del crecimiento de iguana verde por cromatografía de inmunoafinidad | 38 |
| Figura 17.- Análisis electroforético de GH purificada. | 39 |
| Figura 18.- Electroforesis de doble dimensión de GH de iguana verde..... | 40 |
| Figura 19.- Secuenci péptidos internos de GH de iguana verde | 41 |
| Figura 20.- Análisi electroforético del ADNc de GH de iguana verde. | 42 |
| Figura 21.- Clonación del ADNc de GH de iguana verde | 43 |

| | |
|---|----|
| Figura 22.- Secuencia nucleotídica y de aminoácidos deducidos del ADNc de GH de iguana verde.. | 45 |
| Figura 23.- Alineamiento de la secuencia de aminoácidos deducida del ADNc de GH de iguana verde (igGH) con la secuencia de GHs de otras especies..... | 46 |
| Figura 24.- Dendograma de GH generado con el método neighbor joining (N-J) | 47 |
| Figura 25.- Secuencia parcial del ADNc del receptor de GH de iguana verde..... | 48 |

INDICE DE TABLAS

| | |
|---|----|
| Tabla 1.- Secuencias de oligonucleótidos utilizados en la PCR y en RACE..... | 26 |
| Tabla 2.- Especies utilizadas para la reconstrucción de relaciones filogenéticas.. | 27 |
| Tabla 3.- Variantes de carga de la hormona del crecimiento..... | 40 |
| Tabla 4.-Comparación del porcentaje de similitud entre la GH de diferentes especies. | 46 |

ÍNDICE DE ANEXOS

| | |
|---|----|
| Anexo 1.- Tinción Hematoxilina-Eosina de Harris (Junqueira, 1988)..... | 67 |
| Anexo 2.- Inmunohistoquímica..... | 70 |
| Anexo 3.- Hibridación <i>in situ</i> | 73 |
| Anexo 4.- Cromatografía de inmunoafinidad | 78 |
| Anexo 5.- SDS-PAGE y Western Blot..... | 81 |
| Anexo 6.- Isoelectroenfoque | 86 |
| Anexo 7.- Tinción argéntica de plata para geles de poliacrilamida | 88 |
| Anexo 8.- Extracción de RNA | 90 |
| Anexo 9.- RT-PCR..... | 92 |
| Anexo 10.- Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)..... | 93 |

INTRODUCCIÓN

Tanto el crecimiento como el desarrollo de los animales están finamente regulados por una amplia gama de interacciones multifactoriales que involucran al sistema neuroendócrino con variables nutricionales, ambientales y genéticas, entre otras. Se conoce que un buen número de hormonas desempeñan algún papel en el control del crecimiento de dichos organismos. Una de estas es la hormona del crecimiento (GH, por sus siglas en inglés *Growth Hormone*) que pertenece a una familia de proteínas las cuales, se ha postulado, evolucionaron por duplicaciones sucesivas de un gen ancestral común, seguidas de divergencia (Niall y cols., 1971; Ono y cols., 1990). Esta hormona se expresa principalmente en la hipófisis de todos los vertebrados (aunque también se ha documentado su expresión en diversos tejidos extra-hipofisarios) y está asociada a múltiples funciones relacionadas con la diferenciación y proliferación celular así como a diversos efectos moduladores sobre el metabolismo. En general, las hormonas del crecimiento de diferentes especies presentan gran similitud en su estructura primaria. Intraespecíficamente se ha documentado la existencia de un número importante de isoformas que contribuyen a la heterogeneidad molecular y funcional de esta proteína. Dicha heterogeneidad es producto de diferentes procesos. En algunos casos se genera por efecto de una duplicación génica, pues en algunas especies existe más de un gen que codifica para distintas isoformas de hormona del crecimiento. Sin embargo, en la mayoría de los vertebrados ésta hormona está codificada en un solo gen, el cual puede sufrir modificaciones postranscripcionales o postraduccionales que son una fuente importante de heterogeneidad molecular de la GH (Forsyth y Wallis, 2002).

Aunado a esto, existe heterogeneidad interespecífica de la hormona, lo que significa que existen variaciones estructurales de la GH entre diferentes especies. Estas variaciones podrían explicar la diversidad funcional con las que se ha asociado esta familia de proteínas en diferentes grupos taxonómicos, en donde además de sus importantes efectos sobre la diferenciación y proliferación celular, puede ejercer acciones tan variadas como la osmoregulación, el control de la síntesis de moléculas anticongelantes y la regulación de la maduración sexual en peces (Riley y cols., 2003); la reproducción, la producción de huevos y envejecimiento en aves (Arámburo y cols., 2000; Zhao y cols., 2004); y el crecimiento postnatal en mamíferos (Forsyth y Wallis, 2002), entre otras. Es bien conocido que la GH también desempeña un papel importante en el metabolismo de lípidos (Scanes, 1995a), en el metabolismo de proteínas (Scanes, 1995b) y de

carbohidratos (Scanes, 1995c), así como en la regulación hidromineral (Scanes, 1995,d), en la mayor parte de los vertebrados. Adicionalmente, ejerce notables efectos moduladores sobre el sistema inmune (Scanes, 1995e), en el control de la angiogénesis (Scanes y Daughaday, 1995), como un factor anti-apoptótico (Bounzinba y cols., 2003) y como neuroprotector (Frago y cols., 2002).

Si bien existen estudios importantes sobre la evolución de la relación estructura-actividad de la GH en algunos grupos de vertebrados (mamíferos, aves y peces), hasta el momento, es realmente muy poco lo que se ha estudiado sobre estos aspectos en anfibios y en reptiles. En el caso de los reptiles, únicamente se ha descrito la purificación y la elucidación de la estructura primaria de la GH del cocodrilo de Nueva Guinea (Noso y cols., 1995) y la de tortuga marina (Yasuda y cols., 1989), siendo los organismos del Orden Squamata (serpientes y lagartos) los menos estudiados. A dicho orden pertenece la iguana verde (*Iguana iguana*), especie con un creciente potencial pecuario en las regiones geográficas en las que se distribuye, desde el sureste mexicano hasta Sudamérica.

Con la realización de este trabajo se pretende contribuir a la ampliación del conocimiento sobre la evolución de la estructura de la GH en un grupo de vertebrados poco atendido, que puede dar luz sobre los requerimientos estructurales necesarios para la expresión de diversas funciones atribuidas a este importante mensajero peptídico. Adicionalmente, se intentará sentar las bases para la posible aplicación, en un futuro, de este conocimiento en el diseño de estrategias que puedan impactar en el desarrollo pecuario de este grupo de reptiles.

ANTECEDENTES

Hipófisis

En los vertebrados, la glándula hipófisis es un componente clave del sistema neuroendócrino y de la regulación neurosecretora. Se sitúa en la zona ventral diencefálica alojada en una depresión ósea situada en el hueso esfenoideas, denominada como silla turca. Esta glándula mixta está constituida, por una parte, por un órgano de origen nervioso (neurohipófisis) y por la otra por una glándula endócrina de origen epitelial que secreta hormonas (adenohipófisis) que regulan la actividad de otras glándulas. Esta última, anatómicamente, se divide rostrocaudalmente en tres regiones: el lóbulo tuberal, el lóbulo anterior y el lóbulo intermedio, siendo las secreciones de los tipos celulares del lóbulo anterior las que controlan la actividad de las glándulas endócrinas periféricas (suprarrenales, tiroides y gónadas, entre otras), contribuyendo también al control de actividades fisiológicas como el crecimiento y la diferenciación de los tejidos y los órganos (Holmes y Ball, 1974).

A lo largo de la filogenia, la hipófisis muestra una gran diversidad tanto en la morfología de sus diferentes lóbulos como en la distribución de sus tipos celulares. Existen cambios importantes incluso dentro de una misma clase de vertebrados siendo los más antiguos evolutivamente los que presentan una mayor diversidad: peces, anfibios y reptiles. Estos últimos ocupan una posición central en la evolución de los tetrápodos ya que en la hipófisis de este grupo de vertebrados existen formas que presentan características comunes a las de los anfibios, por una parte, y formas con características similares a las de aves y mamíferos, por la otra. Las principales diferencias anatómicas dentro del grupo de reptiles se presentan en la adenohipófisis donde algunas especies (p. ej. cocodrilos y tortugas) presentan un lóbulo intermedio y un lóbulo tuberal bien desarrollado: además de un lóbulo anterior claramente dividido en una región rostral y una región caudal; mientras que en otras especies (p.ej. en los lacértidos) el lóbulo tuberal, al igual que en algunos anfibios, ha perdido su conexión con la hipófisis (Figura 1).

La hipófisis de los reptiles presenta semejanzas con la de las aves, y la de éstas a su vez tiene características en común con la de los mamíferos. Sin embargo, la hipófisis en las aves presenta características que son exclusivas de este grupo, en donde la glándula posee una separación entre la neurohipófisis y la adenohipófisis debido a la carencia de lóbulo intermedio (Figura 1) a diferencia de la de mamíferos, aunque se asemeja a la de éstos por la presencia de un

lóbulo tuberal bien desarrollado (Wingstrand, 1966). Asimismo, las aves al igual que el resto de los vertebrados no mamíferos, presentan una regionalización marcada de los diferentes tipos celulares secretores.

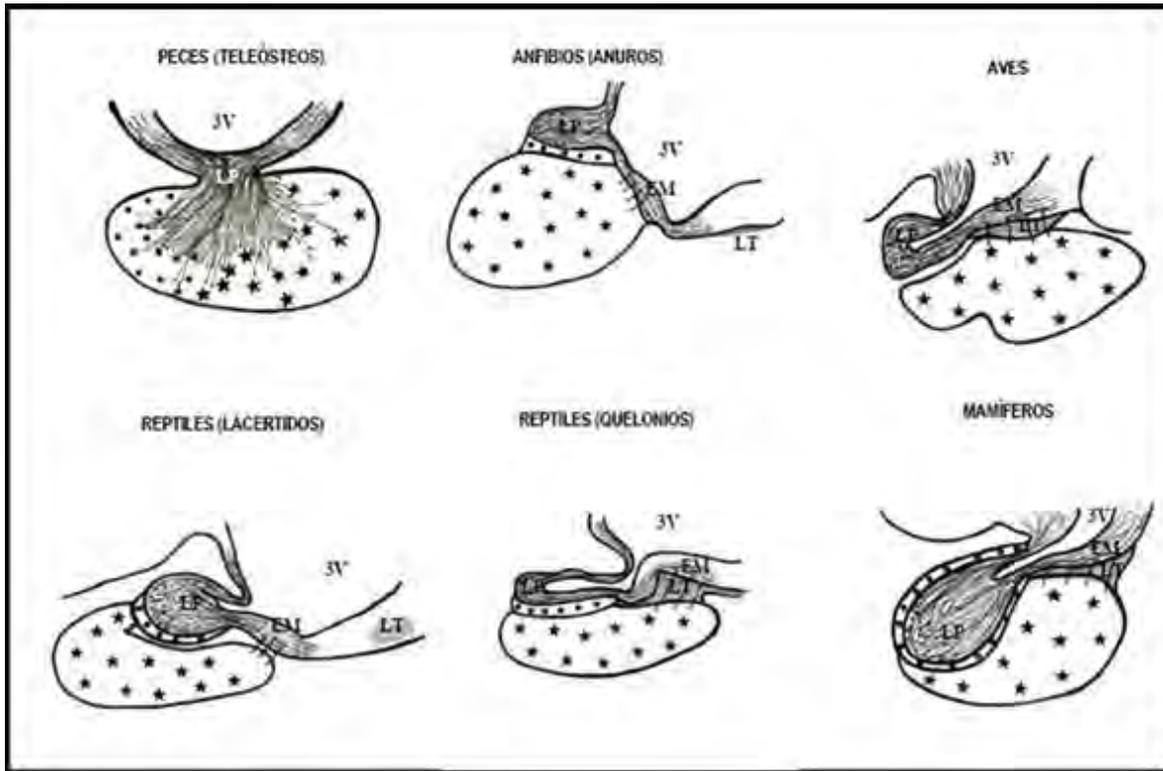


Figura 1.- Esquema que ilustra la variabilidad morfológica de la hipófisis de diferentes grupos de vertebrados. LT- lóbulo tuberal; ★ - lóbulo anterior; • - lóbulo intermedio; LP - lóbulo posterior (neurohipófisis); 3V- tercer ventrículo y; EM - eminencia media. Tomado de Matsumoto e Ishii, 1992.

Los tipos celulares secretores de la adenohipófisis inicialmente se clasificaron en cromófilos y cromófobos en razón a su afección o falta de afinidad por los colorantes comúnmente utilizados en la tinción rutinaria de los cortes histológicos. A las células cromófilas se les denominó acidófilas o basófilas, de acuerdo a su propiedad de teñirse con colorantes ácidos o básicos, respectivamente (Fawcett, 1995). Sin embargo, a medida que se fueron descubriendo las hormonas secretadas por esta glándula y con el desarrollo de nuevas herramientas histológicas más específicas para identificar a los diversos tipos celulares, éstos se han clasificado en función de la hormona que en dichas células se producen. De este modo, las células que producen la hormona estimulante de la tiroides (TSH) se denominan tiotropas; las células que secretan gonadotropinas se llaman gonadotropas; las células que secretan hormona adrenocorticotrópica

(ACTH) son denominadas corticotropas; las que sintetizan prolactina (PRL) se llaman lactotropas; y las que secretan hormona del crecimiento (GH) son las somatotropas. Estas últimas son células acidófilas de forma redonda, oval o triangular con un núcleo grande con heterocromatina, nucléolos prominentes y numerosos poros nucleares. Contienen abundantes gránulos esféricos u ovoides de 300 a 350nm de diámetro y son el tipo celular más copioso en el lóbulo anterior (Fawcett, 1995).

En reptiles se han identificado claramente los somatotropos. Inicialmente, Licht y Nicoll (1969) describieron una proteína con características similares a GH en extractos hipofisarios del lagarto *Dipsosaurus dorsalis* localizándola en la parte caudal de la adenohipófisis y que estaba prácticamente ausente en la región rostral. De igual manera, Dancasiu y cols. (1967) describieron en el lagarto *Emys arbicularis* células secretoras de GH con características similares a las descritas para otros grupos de vertebrados. Mediante técnicas de inmunofluorescencia se describió el mismo tipo celular en otras especies: *Lacerta simula*, *Natrix natrix* y *Anolis caronilensis* (De la Corte y cols., 1968; Milcou y cols., 1971; Pearson y Licht, 1973). En otra especie de lagarto, *Chalcides chalcides*, se describió la regionalización de diferentes tipos celulares en la adenohipófisis mediante inmunohistoquímica (Ferrandino y cols., 2001) encontrándose los somatotropos principalmente en la región caudal de esta glándula (Figura 2).

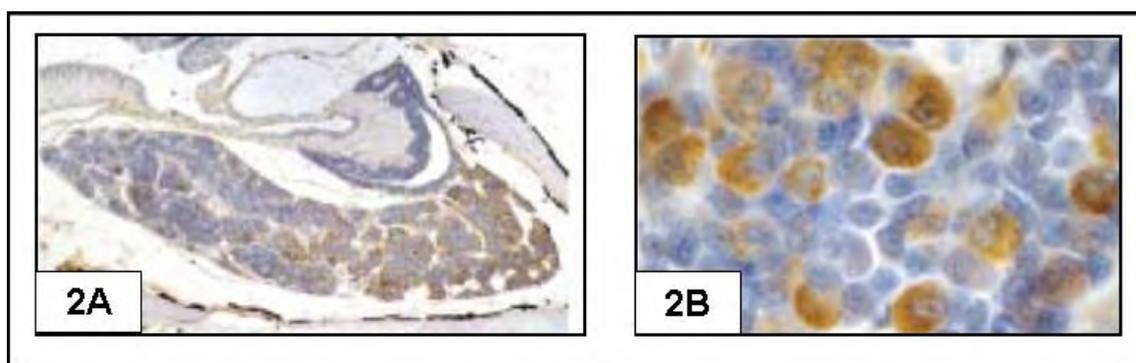


Figura 2.- Distribución de los somatotropos en la adenohipófisis del lagarto *Chalcides chalcides*. 2A–Vista panorámica de la hipófisis (80X); 2B–Amplificación de las células con inmunorreacción positiva a GH (450X). Para la inmunohistoquímica se utilizó un antisuero contra GH de humano. Tomado de Ferrandino y cols. 2001.

Estructura y Función de la Hormona del Crecimiento

La hormona del crecimiento se encuentra codificada en un gen que en los vertebrados terrestres estudiados comprende 5 exones divididos por 4 intrones con una longitud total de

aproximadamente 2 kb siendo la mayor longitud ocupada por los intrones (Forsyth y Wallis, 2002). Por el contrario, en peces salmónidos se ha documentado la presencia de un intrón más que resulta en 6 exones divididos por 5 intrones (Figura 3). Además, la longitud del gen que codifica para GH en peces es mayor que la de vertebrados terrestres, entre 3 y 5 kb en algunos teleósteos como los salmónidos y cerca de 14 kb en la lamprea (Moriyama y cols., 2008). Sin embargo y a pesar de la diferencia en la longitud del gen de GH entre las diferentes especies, éste se transcribe en un ARNm precursor que es procesado dando como resultado un ARNm maduro de aproximadamente 650 pb en todas las especies estudiadas.

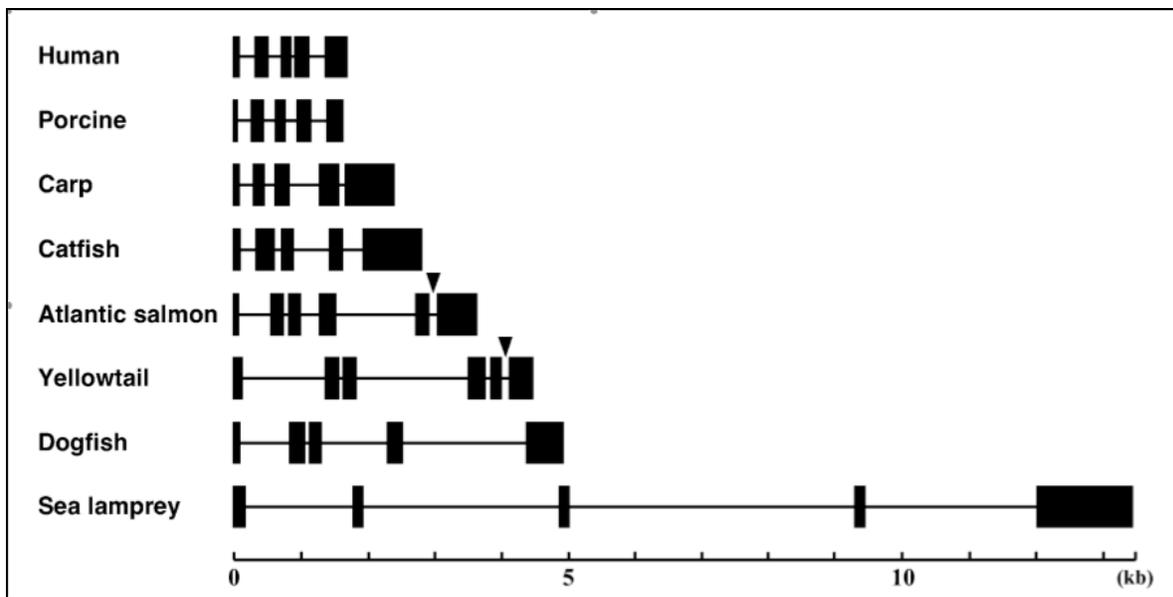


Figura 3.- Comparación esquemática de la organización de exones-intrones del gen de GH entre diferentes especies. Humano, cerdo, carpa, pez gato, salmón del atlántico, anguila espinosa, pez perro y lamprea. Los exones son representados con cuadros negros y los ontrones con líneas. La barra de inferior indica la longitud en kb. Tomado de Moriyama y cols., (2008)

La hormona del crecimiento es una proteína que contiene 191 aminoácidos en la mayoría de los vertebrados estudiados, por lo que tiene un peso molecular de 22 kDa aproximadamente. Dentro de su estructura contiene cuatro residuos de cisteína conservadas para las GHs de todas las especies estudiadas, con lo que se forman dos puentes disulfuro (posiciones 53-264 y 181-189) dando origen a una asa central grande y una más pequeña cercana al extremo carboxilo terminal (Scanes y Campbell, 1995). Las estructuras secundaria y terciaria de la GH se han dilucidado gracias a los estudios de cristalografía de rayos X en mamíferos, concluyendo que está

formada por cuatro α -hélices antiparalelas que se extienden en los segmentos 7-34, 75-87, 106-127 y 152-183, en donde cada hélice presenta diferente carácter anfifílico, con la hélice 4 siendo mayormente hidrofóbica. Además, la estructura primaria de las GHs de vertebrados, presenta considerable similitud dentro de estas regiones α -hélicoidales. Se tienen también dos pequeñas formaciones tipo α -hélice en las regiones 53-58 y 89-96 (Figura 4) por lo que la conformación α -hélicoidal abarca aproximadamente un 50% de la estructura total de la GH (De Vos y cols., 1992).

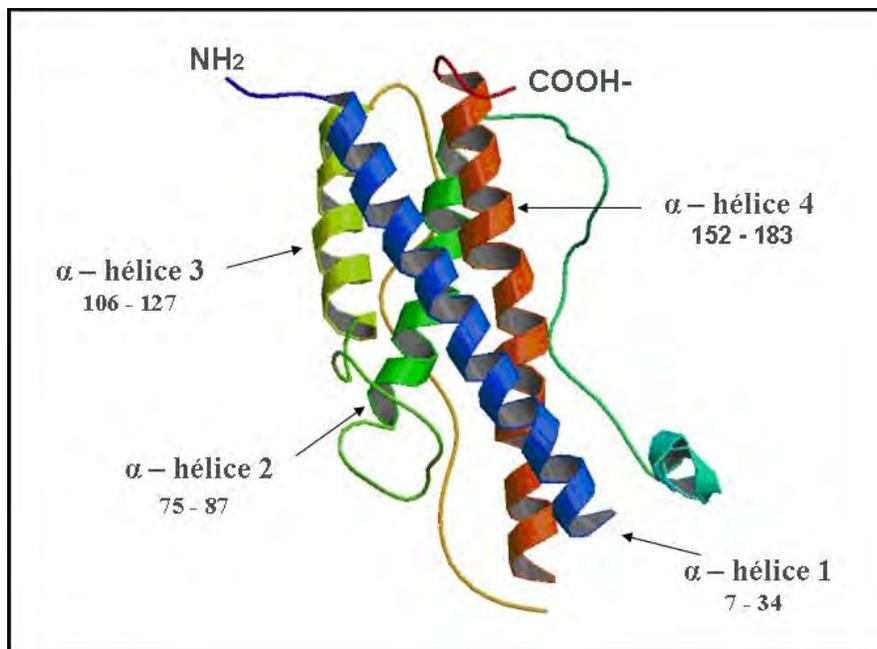


Figura 4.- Estructura tridimensional de la hormona del crecimiento mostrando las 4 α -hélices que la componen. NH₂ – Región amino terminal; COOH- Región carboxilo terminal

La hormona del crecimiento ejerce su actividad a través de la unión a su receptor específico, con el que forma un complejo heterotrimérico debido a que cada molécula de GH puede interactuar con dos moléculas del receptor a través de los dos sitios de unión que tiene: el primero incluye la hélice 4 desde su región central hasta la región carboxilo terminal, mientras que el segundo sitio incluye la hélice 3 y la hélice 1 (Juárez y cols., 1999) De esta manera, se forma un heterotrímero con enlaces (puentes de hidrógeno y salinos específicos) entre la hormona y las dos moléculas del receptor, y entre ambos receptores a su vez (De Vos y cols., 1992). Esta dimerización del receptor es aparentemente indispensable para iniciar la cascada de eventos de transducción de señales intracelulares (Goffin y cols., 1996) que finalmente regulan sus efectos.

Aunque en un principio se pensó que la GH inducía la dimerización del receptor al ponerse en contacto con la membrana, estudios recientes demuestran que el receptor se dimeriza en el retículo endoplásmico antes de que se una a su ligando (Gent y cols., 2002).

Los efectos que desencadena la hormona del crecimiento al unirse a su receptor están relacionados con el crecimiento y el desarrollo de los organismos, aunque la GH también interviene en el metabolismo de proteínas, lípidos, carbohidratos, ácidos nucleicos y minerales (Isaksson y cols., 1982; Davison, 1987; Casanueva, 1992). Además, exhibe actividad sobre la proliferación y diferenciación celular. Estos efectos pueden ser directos sobre las células blanco o mediados a través de otros mensajeros peptídicos regulados por esta hormona, como es el caso del factor de crecimiento insulinoide tipo I, IGF-I (Harvey, 1995). Esta amplia diversidad funcional de la GH puede ser explicada en parte por la heterogeneidad molecular que presenta esta proteína, que constituye en realidad una familia de variantes e isoformas (Arámburo y cols., 1993). Así, se han descrito efectos metabólicos directos que facilitan el crecimiento muscular y la conservación de la glucosa, y efectos sobre el crecimiento esquelético que son parcialmente mediados por el IGF-I. Entre los primeros efectos se incluye: la estimulación de la lipólisis, captura y transporte de aminoácidos, síntesis de proteínas, inhibición de la lipólisis estimulada por adrenalina o por glucagon, inhibición de la lipogénesis inducida por la insulina, inducción de la resistencia periférica a la insulina (efecto diabetógeno) y participación en la regulación de la absorción tubular de algunos iones (Kopchick y Andry, 2000). La GH, a través de IGF-I, como ejemplo de efecto indirecto, promueve la diferenciación de preadipocitos, mioblastos y posiblemente de gran variedad de tejidos, incluyendo la placa cartilaginosa de la epífisis (Arámburo y cols., 1993) de los huesos.

Heterogeneidad de la Hormona del Crecimiento

En todas las especies estudiadas la hormona del crecimiento presenta más de una forma molecular, por lo que se ha descrito la existencia de variantes de masa y de carga de la GH que son la resultante de diversos procesos, como pueden ser la duplicación génica, las modificaciones postranscripcionales, las modificaciones postraduccionales y/o las modificaciones post-secreción. En cuanto a la duplicación génica se han identificado isoformas para la GH humana (Cooke y cols., 1988), para la GH de trucha (Agellon y cols., 1988) y la GH de rana (Martens, 1986) En el caso de humanos el gen de la GH se encuentra en un conjunto de genes (del inglés “cluster”)

constituido por dos genes de GH, el normal (GH-N) y el variante (GH-V) así como por tres genes que codifican para tres variantes del lactógeno placentario (PL-L, PL-A y PL-B). Las hormonas del crecimiento expresadas a partir de los dos genes, aunque tienen el mismo peso molecular (22 kDa), difieren en 13 residuos de aminoácidos y su síntesis ocurre en dos sitios distintos: el gen normal (hGH-N) se expresa principalmente en la hipófisis mientras que el gen variante (hGH-V) es expresado en la placenta, así como los lactógenos placentarios. La proteína del gen hGH-V es la forma predominante en la circulación de mujeres durante el tercer trimestre del embarazo (Forbes y cols., 1994), y está constituida de 191 aminoácidos (92% de similitud con la GH normal) y tiene un pI más básico que la codificada por hGH-N (Baumann y cols., 1991). Así mismo, se ha descrito en salmónidos la duplicación del gen de GH que da origen a dos formas funcionales de ésta hormona, la GH-I y GH-II (McKay y cols., 2004), aunque en la mayoría de los vertebrados ésta hormona está codificada en un solo gen.

Aunado a este proceso, se han identificado diferentes ARNs mensajeros como producto del procesamiento del gen de GH tanto en roedores como en humanos. El gen de la hGH-N puede procesarse en tres ARNs mensajeros cuyas proteínas resultantes son la de 22 kDa, la de 20 kDa y una variante de 17.5 kDa (Lewis y cols., 1992). Entre las variantes de 22 kDa 20 kDa se presenta una deleción de 15 aminoácidos correspondientes al segmento 32-46 del exon 3 por alargamiento del segundo “loop” (Figura 5). Así mismo, en bovinos se ha reportado un procesamiento alternativo en el que el intrón D es retenido debido a un factor *trans* de 35kDa que se une a secuencias *cis* localizadas en el exón 5 (Sun y cols., 1993).

Después de la síntesis, la GH puede sufrir modificaciones postraduccionales que dan origen a diferentes variantes estructurales de la molécula (Arámburo y cols., 1993). El análisis mediante electroforesis desnaturizante (SDS-PAGE) bajo condiciones no reductoras revela que predomina la forma monomérica de la hormona, 22kDa (Baumann y cols., 1996). Sin embargo, las formas diméricas y otros oligómeros pueden representar hasta el 40% de la GH secretada al plasma, y el contenido de las variantes de masa dentro de la hipófisis pueden modificarse durante el desarrollo (Arámburo y cols., 2000). Además, existe evidencia de formas fosforiladas, glicosiladas, desaminadas o acetiladas que se han descrito en preparaciones de diferentes especies como humano, rata, oveja y pollo (Liberti y cols., 1985; Oetting y cols., 1986; Arámburo y cols., 1989a, Arámburo y cols., 1991; Berumen y cols., 2004). En esta última especie se han descrito variantes tanto de carga como de masa mediante el uso de isoelectroenfoque y electroforesis

nativa no desnaturalizante en la que se identificaron variantes con movilidades relativas (Rf) de 0.23, 0.3 y 0.35. Dos de estas variantes, en estudios sobre diversidad funcional, presentaron diferente bioactividad en el metabolismo de lípidos, siendo la de Rf=0.23 esencialmente lipolítica mientras que la de Rf=0.3 mostró una actividad antilipolítica (Arámburo y cols., 1990). Ambas variantes, sin embargo, presentaron una actividad somatotrópica equivalente. En electroforesis SDS-PAGE se identificó que la forma mayoritaria es la hormona monomérica (22kDa) en extractos hipofisarios, aunque se describen también formas oligoméricas como el dímero y el tetrámero, así como una forma submonomérica de 15kDa. Cuando el monómero fue analizado por isoelectroenfoque, se describieron ocho variantes con puntos isoelectrónicos de 5.9, 6.8, 7.3, 7.5, 7.9, 7.11, 8.05 y 8.18 (Arámburo y cols., 1990) y se evidenció que la proporción relativa de variantes de masa de esta hormona se modifica a lo largo de la ontogenia del pollo (Arámburo y cols., 2000).

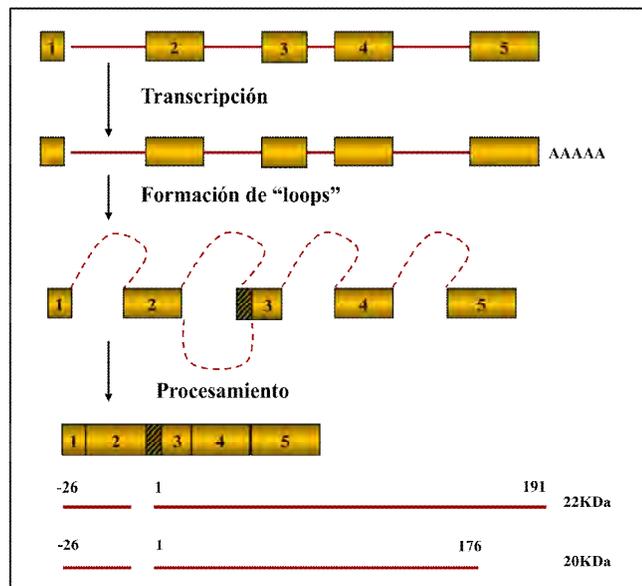


Figura 5.- Procesamiento alternativo del gen hGH-N. Los recuadros numerados corresponden a los exones divididos por los intrones. Las líneas punteadas representan las "loops" que se forman en el procesamiento del ARN. El recuadro del exon 3 con rayas diagonales representa el fragmento cortado que genera la variante de 20 kDa.

En el pollo se identificó una forma glicosilada de la GH que tiene un peso molecular aparente de 29 kDa al analizarla bajo condiciones reductoras. Cuando esta molécula se analizó con diferentes criterios electroforéticos se mostró que también presenta una heterogeneidad molecular, encontrándose seis variantes glicosiladas con puntos isoelectrónicos entre 6.52 y 7.17

(Arámburo y cols., 1991, Berumen y cols., 2004). Esta variante se ha medido en plasma y muestra variaciones de acuerdo con la etapa reproductiva del organismo. Adicionalmente se sabe que las variantes sintetizadas en la adenohipófisis son liberadas a la circulación bajo la regulación diferencial de secretagogos tales como la hormona liberadora de hormona del crecimiento (GHRH por sus siglas en inglés - Martínez-Coria y cols., 2002). Esto apoya la propuesta de que las variantes moleculares de hormona del crecimiento desempeñan un papel relevante en la expresión de la amplia bioactividad característica de esta hormona.

Evolución de la Hormona del Crecimiento

La hormona del crecimiento, al igual que la prolactina, los lactógenos placentarios y la somatolactina (descrita sólo en peces) son miembros de una familia de hormonas hipofisarias con una estructura, función y organización génica similar. Se ha relacionado a la familia de la GH con una variedad de citocinas que incluyen algunas interleucinas, factores estimuladores de colonias y eritropoyetinas, ya que presentan una estructura en común (cuatro hélices alfa) y un tipo de receptor característico (Wallis, 1992). La superfamilia GH/citosina presumiblemente surgió durante el curso de la evolución como resultado de una serie de duplicaciones génicas que se ha descrito en todos los vertebrados estudiados. Sin embargo, proteínas similares a la GH (o incluso a otro miembro de la superfamilia de las citocinas) no han sido descritos en ningún invertebrado, aunque existen algunos reportes en donde se ha mostrado inmunorreactividad semejante a GH y/o PRL en algunos insectos y crustáceos (De Loof y cols., 1990). Esto sugiere que esta superfamilia tiene origen en un organismo intermedio entre los invertebrados y vertebrados actuales aunque se desconoce la naturaleza de éste (Forsyth y Wallis, 2002).

Los datos obtenidos hasta el momento sugieren que por duplicación génica de un gen ancestral común seguida de divergencia evolutiva surgieron la GH y la prolactina en la evolución temprana de los vertebrados. Posteriormente, implicando otro evento de duplicación, se dio origen a otra hormona de la misma familia, la somatolactina, que sólo está presente en peces (May y cols. 1999).

En los mamíferos se presentaron duplicaciones del gen que codifica para esta proteína, dando como resultados genes confinados a expresarse en la placenta, particularmente en primates. Esta duplicación resultó en la formación de un conjunto de cinco genes similares al de la GH, en el cual solo el de la GH-N es expresado en la hipófisis, mientras que los otros cuatro

(lactógenos placentarios y una variante de la GH, GH-V) exclusivamente se expresan en la placenta. En vertebrados evolutivamente más antiguos la evidencia de un complejo de genes agrupados no ha sido reportada, pero existen una especie de cocodrilo, *Cocodrilus novoguinea*, y una de rana, *Xenopus sp.*, en las que se ha reportado la presencia de dos GHs muy similares, lo que probablemente sea debido a un proceso de duplicación génica (Forsyth y Wallis, 2002). Esta duplicación génica si ha sido reportada en teleósteos salmónidos que presentan dos genes funcionales que expresan las variantes GH-I y GH-II (McKay y cols., 2004).

Los cambios evolutivos en la estructura de la hormona del crecimiento de diferentes grupos taxonómicos dieron como resultado la expresión de una clara especificidad de especie, la cual fue reconocida en estudios en los que se describió que la GH de especies no primates no es activa en humanos. Ahora se sabe que la GH de vertebrados evolutivamente más antiguos muestra una considerable especificidad debido a las diferencias estructurales presentes entre diferentes grupos taxonómicos. Por ejemplo, la GH de teleósteos es marcadamente diferente a la de tetrápodos (< 50% de similitud) lo que explica por qué la GH de teleósteos no es activa en mamíferos (Wallis, 1996).

La expresión de GH es controlada principalmente por el promotor localizado en el extremo 5' del gen que codifica para esta proteína, aunque secuencias intrónicas (como el elemento de respuesta a glucocorticoides en el intrón 1 de la GH de algunas especies) y/o secuencias en la región no codificante del extremo 3' (como el elemento de respuesta negativo a la hormona tiroidea) pueden estar involucradas en la regulación de dicha expresión (Eberhardt y cols., 1996). Es en esta zona regulatoria de la expresión del gen de GH donde ocurren cambios que pueden jugar un papel muy importante en la evolución de la hormona; por ejemplo, el elemento de respuesta a AMP cíclico encontrado en la región 5' en el gen de la GH de humano está ausente o no es funcional en otros órdenes de mamíferos. Además, la tasa de evolución para la región promotora de la GH ha sido variable, lo que se evidencia en la reorganización en esta región promotora cuando se comparan los genes de diferentes clases de vertebrados (Chuzhanova y cols., 2000).

La evolución molecular de la GH muestra dos características particulares: las duplicaciones génicas múltiples y la tasa evolutiva variable. Respecto a esta última, se ha descrito que los mamíferos presentan una rápida tasa evolutiva en comparación con la de las aves (Forsyth y Wallis, 2002) en las que se ha descrito que el péptido maduro de la hormona del crecimiento es

prácticamente constante y con pocas variaciones en todas las especies que conforman este grupo taxonómico; sin embargo, se identificaron sitios funcionalmente importantes ubicados en el péptido señal que presentan una tasa de variación mayor. Esto puede tener implicaciones en la función diferencial de la GH de aves como es la disminución del control del crecimiento postnatal en estas especies, en comparación con lo que sucede en mamíferos (Kansaku y cols., 2008).

Con base en el análisis de la estructura primaria de la hormona del crecimiento de diferentes especies se han obtenido árboles filogenéticos en los que, de manera general, se agrupan separadamente a los mamíferos, a los peces y a las aves. En este último grupo, debido a la similitud de su secuencia, se han agrupado a dos especies pertenecientes al grupo taxonómico de los reptiles: el cocodrilo de Nueva Guinea y la tortuga marina (Figura 6) obteniendo con ello el primer acercamiento que se tiene respecto a la relación evolutiva de los reptiles, basado en la secuencia de la hormona del crecimiento, con otros grupos taxonómicos (Noso y cols., 1995).

La hormona del Crecimiento en Reptiles

Tanto la estructura como la función de la hormona del crecimiento en reptiles ha sido poco estudiada. Sólo se conoce la secuencia de aminoácidos de esta hormona en dos especies de reptiles: la de una especie de tortuga marina y la del cocodrilo de Nueva Guinea. Ambas tienen una composición de 190 aminoácidos con los cuatro residuos de cisteína conservados en todas las GHs (Yasuda y cols., 1989; Noso y cols., 1995) proponiéndose con ello que forman dos puentes disulfuro. Ambas secuencias, al ser alineadas con las secuencias de otras especies, presentan amplia similitud con la GH de aves siendo la de tortuga marina 89% similar a la de pollo y la de cocodrilo 90 y 92% a pollo y pato, respectivamente. En reptiles pertenecientes al orden Squamata (orden al que pertenecen los iguánidos) no ha sido reportada la estructura primaria de esta hormona; sin embargo, se sabe de su presencia gracias a los estudios heterólogos en la caracterización de los tipos celulares secretores de GH (Ferrandino y cols., 2001).

Los estudios enfocados a discernir el papel funcional de la GH en reptiles también han sido heterólogos. El primer acercamiento lo realizaron Noble y Bradley (1965) quienes observaron que al realizar una hipofisectomía en el lagarto *Hemidactylus brookii* se disminuía considerablemente el proceso de muda; sin embargo, esta disminución era efecto de la falta de todas las hormonas hipofisiarias. Posteriormente, Licht y Pearson (1968) describieron el efecto

solo de la adenohipofisectomía en la función testicular del lagarto *Anolis carolinensis* concluyendo que el mantenimiento y desarrollo de las células germinales, así como la producción de andrógenos, depende de la adenohipófisis. Sin embargo, las hormonas que participan en este proceso no fueron identificadas. A este respecto se han realizado estudios usando hormona del crecimiento heteróloga, donde se ha descrito que el contenido de colágena en huesos largos se incrementa significativamente en lagartos de jardín tratados con hormona del crecimiento porcina (Panigrhay y Patnaik, 1975). Por otra parte, el crecimiento de reptiles en respuesta a la administración exógena de GH fue evaluado por Andersen y cols. (1990), quienes describieron un aumento del 18% en el peso corporal de cocodrilos del Nilo tratados con GH recombinante humana en comparación con los organismos control. Asimismo, tanto la longitud como la eficiencia de conversión alimenticia de estos organismos se incrementaron en un 10 y 8% respectivamente, indicando así la actividad somatotrópica de la GH en reptiles.

Un acercamiento al mecanismo por el cual la GH ejerce sus efectos en reptiles lo da la descripción del receptor de GH de tortuga marina, el cual está compuesto por 625 aminoácidos incluyendo un presumible péptido señal de 21 aminoácidos, un dominio extracelular de 217 aminoácidos, un dominio transmembranal de 24 aminoácidos y un dominio intracelular de 353 aminoácidos. En el dominio intracelular se describe la presencia de una región rica en prolina designada como “box1” que se ha propuesto interacciona con la vía de las JAK cinasas, similar a lo que se ha propuesto para el receptor de GH de otras especies (Zhang y cols., 2000). Este receptor sólo ha sido descrito en esta especie. En especies del orden Squamata, como la iguana verde, no ha sido descrita ni la hormona del crecimiento ni su receptor.

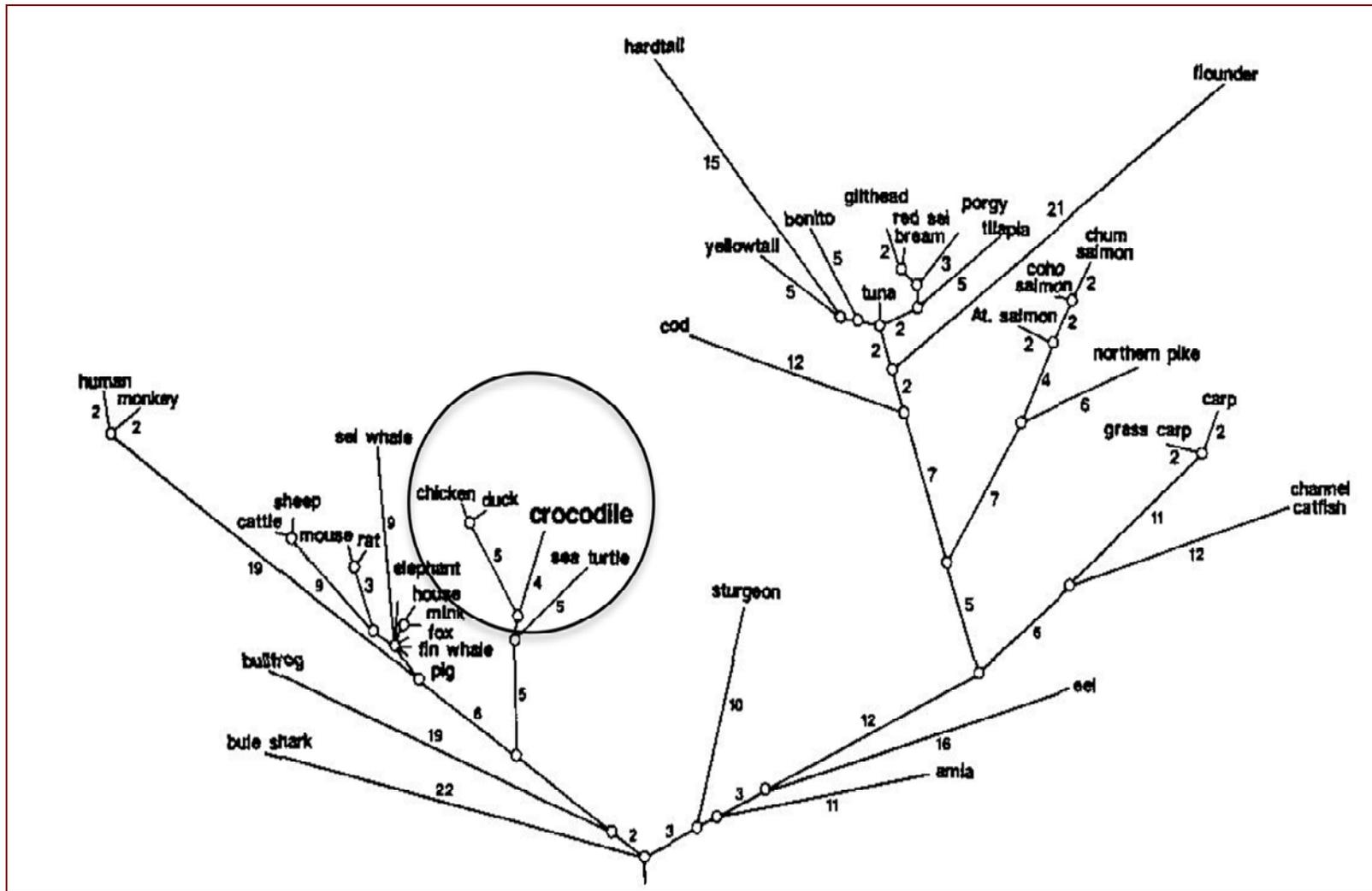


Figura 6.- Árbol filogenético molecular de la hormona del crecimiento propuesto por Noso y cols. (1995). En el círculo se muestra el grupo de los reptiles asociado con el de las aves.

JUSTIFICACIÓN

Las características bioquímicas, estructurales, moleculares y funcionales de la hormona del crecimiento se han descrito ampliamente en aves, peces y mamíferos, atribuyéndosele un papel muy importante en el crecimiento y desarrollo de los organismos así como en la regulación del metabolismo. En contraste, en reptiles esta proteína ha sido poco estudiada por lo que su caracterización permitirá hacer un análisis de su evolución tanto estructural como funcionalmente. De manera adicional se contará con la posibilidad de estudiar su potencial para incidir en el desarrollo pecuario de esta especie.

HIPÓTESIS

Durante la evolución de los vertebrados la hormona del crecimiento presenta cambios estructurales que se reflejan en su bioactividad, contribuyendo a la expresión de una amplia diversidad funcional.

OBJETIVO

Caracterizar la hormona del crecimiento de iguana verde (*Iguana iguana*).

Objetivos particulares

- Caracterizar morfológica e histológicamente a la hipófisis de iguana verde e identificar a las células que producen hormona de crecimiento.
- Purificar a la hormona del crecimiento de la hipófisis de iguana verde y analizar su patrón de heterogeneidad molecular.
- Clonar y secuenciar el cDNA que codifica para la hormona del crecimiento de iguana verde a fin de determinar la estructura primaria de la GH.
- Analizar filogenéticamente la estructura primaria de la hormona de crecimiento de iguana verde

DISEÑO EXPERIMENTAL

El diseño experimental se resume en la figura 7.

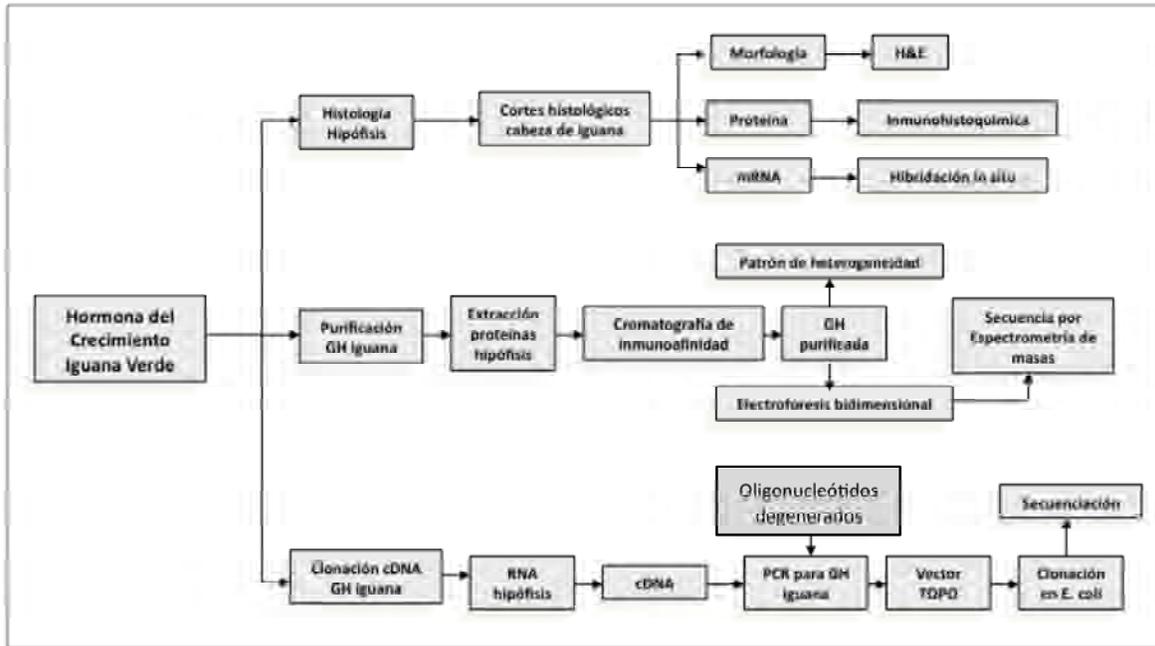


Figura 7.- Diseño experimental

MATERIAL Y MÉTODOS

Animales

Se obtuvieron lotes de individuos juveniles de iguana verde (*Iguana iguana*) de aproximadamente 8 meses de edad con un peso promedio de 120gr, donados por la Unidad de Manejo Ambiental (UMA) de Cementos Holcim-Apasco, ubicada en Acapulco, Guerrero. Los animales se mantuvieron bajo condiciones adecuadas dentro del bioterio del Instituto de Neurobiología: temperatura (28 - 30°C); humedad relativa (entre 50-60%); y un ciclo controlado de luz oscuridad de 12 x 12 hrs. Fueron alimentados diariamente con frutas y verduras frescas (calabaza, zanahoria y manzana) y alimento comprimido para conejo hecho a base de alfalfa (Purina) *ad libitum*.

Hipófisis.

Los animales fueron sacrificados por decapitación con guillotina para la obtención de las hipófisis, las cuales fueron tratadas de diversas maneras de acuerdo a la metodología y tipo de análisis a realizar (caracterización morfológica, purificación de GH, obtención de ARNm para clonación y secuenciación), tal como se detalla más adelante .

Anticuerpos

Anticuerpos policlonales dirigidos contra la GH nativa y recombinante de pollo, CAP-1 y C-1, respectivamente (Arámburo y cols., 1989b), fueron empleados como herramientas para caracterizar la GH de iguana una vez demostrada su inmunoreactividad cruzada (mediante ELISA, Western blot e inmunohistoquímica).

Análisis morfológico de la hipófisis de iguana verde.

Histología

De la cabeza completa de iguana se desprendió la mandíbula y se seccionó el cráneo mediante un corte coronal a nivel de los oídos, usando tijeras de cirugía, para dejar expuesto el cerebro. El tejido completo se sumergió en una solución de Bouin Hollande (Romeis, 1989) a temperatura ambiente para ser fijado por al menos 2 días y máximo 15 días. Posteriormente la

cabeza se descalcificó en una solución de ácido fórmico al 8% durante 18 hrs hasta que el tejido óseo perdió su rigidez. Cuando el tejido estuvo perfectamente fijado y descalcificado se deshidrató en un gradiente de alcoholes (etanol 60%, etanol 70%, etanol 80%, etanol 96%, etanol 96%, etanol 100%, etanol 100%, alcohol-xilol 1:1, xilol y xilol, por 1 hora cada uno) para su inclusión en parafina (dos incubaciones de 1.5 horas cada una) y se obtuvieron cortes de 10 μ m en un microtomo (marca LEICA RM2135, de la Unidad de Microscopía, INB) que se colocaron en portaobjetos. Estos cortes fueron desparafinados con citri-solve y procesados en un tren de alcoholes (2 de etanol absoluto, 2 de etanol al 96%, 1 de etanol al 70%, 1 de etanol al 50%, durante 5 minutos en cada solvente) para rehidratarlos.

Se hizo un primer análisis histológico para distinguir la morfología del tejido y distinguir la distribución de las células con características acidófilas y basófilas en la hipófisis mediante la tinción de hematoxilina-eosina de Harris (Junqueira, 1988 - descrita en el Anexo 1) empleando un microscopio Olympus BX51.

Inmunohistoquímica

Una vez descrita la morfología del tejido, se identificó el patrón de distribución de los somatotropos usando la técnica de inmunohistoquímica previamente estandarizada por Berghman y cols. (1992). Se obtuvieron cortes de la misma forma que se describió en la sección anterior. Las laminillas con los cortes, previamente rehidratados, se incubaron con el anticuerpo policlonal CAP-1 contra cGH a una dilución 1:200; después se lavaron para la segunda incubación con el segundo anticuerpo, de cabra contra IgG de conejo conjugado con peroxidasa, a una dilución 1:200. Para la inmunodetección las preparaciones se incubaron con 3,3'-diaminobencidina (DAB) y peróxido de hidrógeno (para detalles, ver Anexo2). La especificidad de la inmunoreacción se comprobó incubando una laminilla con el anticuerpo primario preabsorbido con un exceso de GH recombinante de pollo (1 mg/mL) a 4°C durante toda la noche. Para corroborar la distribución específica de los somatotropos, se caracterizó la distribución de otro tipo celular presente en la adenohipófisis, los lactotropos, usando un anticuerpo primario policlonal dirigido contra la prolactina de pollo (donado por el Dr. Steve Harvey) a una dilución 1:100, siguiendo la misma técnica.

Hibridación in situ

En experimentos siguientes se corroboró la expresión de GH en los somatotropos de iguana verde mediante la localización del RNA mensajero que codifica para esta proteína, usando la técnica de hibridación *in situ* con el método descrito y estandarizado por Harvey y cols. (2000) y detallado en el Anexo 3. Inicialmente se sintetizó una ribosonda específica para el ARN mensajero de igGH. Para ello se amplificó y se clonó el cDNA de 620 pb que codifica para la GH de iguana verde (descrito en la siguiente sección) en el vector TOPO (Invitrogen). Con el vector y el inserto ligado se transformaron células competentes de *E. coli* y las células positivas fueron expandidas. De este cultivo se purificó el plásmido mediante “miniprep” usando el kit comercial Qprep Miniprep Kit (Qiagen). El plásmido purificado fue tratado con las enzimas de restricción *Pst*I y *Not*I para una subsecuente producción de las sondas antisentido y sentido, respectivamente. Estas ribosondas fueron sintetizadas mediante transcripción *in vitro* con las ARN polimerasas T7 y T3, respectivamente, y fueron marcadas con digoxigenina (DIG) en presencia de la mezcla de “DIG RNA labeling mix” (Roche Diagnostics) de acuerdo a las indicaciones del fabricante.

Para la hibridación *in situ* se obtuvieron cortes siguiendo el procedimiento antes descrito pero con la diferencia de que los cortes se extendieron en agua tratada con Dietil-Piro-Carbonato (DEPC) 0.1% para luego levantarlos en los portaobjetos. La hibridación *in situ* se llevó a cabo inicialmente con una desparafinación del tejido en un tren de alcoholes (citri-solve, etanol al 100%, 100%, 95%, 70% y 50% de forma consecutiva). Los cortes fueron tratados contra ARNasas usando PBS-DEPC, seguido de un tratamiento con proteinasa K (10 µg/ml) para permeabilizar el tejido. Se realizó una postfijación con paraformaldehído al 4% y para disminuir uniones inespecíficas del ARN, el tejido se acetiló con ácido acético 0.25%. Los cortes se prehibridizaron con formamida 50% para una posterior hibridación por 16 horas en presencia de la sonda previamente desnaturalizada. Después de la hibridación se realizó una serie de lavados para luego detectar la sonda mediante el uso de un anticuerpo anti-DIG acoplado a fosfatasa alcalina (Roche), en una dilución 1:2,000. El anticuerpo, a su vez, fue revelado indirectamente mediante una reacción colorimétrica de la fosfatasa alcalina con el sustrato NBT-BCIP (Roche) evidenciando la presencia de la sonda en los somatotropos (Anexo 3).

Microscopía electrónica

También se describió la morfología ultraestructural de los somatotropos usando la técnica de microscopía electrónica. Se disectaron hipófisis de juveniles de iguana y se fijaron con 0.5% de glutaraldehído, se bloquearon los sitios reactivos con glicina 50 mM y luego se deshidrataron gradualmente en soluciones con concentraciones crecientes de etanol (hasta 70%), y se incluyeron en LR white-resin (Polysciences). Se obtuvieron cortes ultrafinos (90nm) con un ultramicrotomo Ultracut que fueron montados en rejillas precubiertas con Formvar (resina de formapolivinilo). La inmunodetección de los gránulos que contienen GH se realizó incubando las secciones con el anticuerpo CAP-1 (1:200) toda la noche seguida de una incubación con el anticuerpo GAR-10nm-Au (1:50, EMS fort Washington, PA). Para comprobar que la marca fuera específica y no un producto de inespecificidad se utilizó como control negativo el primer anticuerpo preabsorbido con un exceso de hormona del crecimiento recombinante de pollo (1 mg/mL); se usó BSA al 5% durante 1 hr como agente bloqueador. Las secciones se contrastaron con acetato de uranilo 5% y -citrato 0.1% y se observaron en un microscopio electrónico JEOL 100 B (Unidad de Microscopía del INB).

Purificación de la GH de iguana verde.

A partir de un conjunto de 10 hipófisis de iguanas juveniles se realizó un extracto proteínico mediante la homogeneización del tejido con agitación constante en un amortiguador Tris-HCl 50 mM a pH 9 adicionado con la mezcla de inhibidores de proteasas Complete (*Roche*) y PMSF 0.5 mM durante 2 horas a 4°C (la mezcla contiene los inhibidores: APMSF, aprotinina, bestanina, inhibidor calpaina I y II, quimiostatina, E-64, hirudina, leupeptina, α 2-macroglobulina, pepstatina, PMSF, TLCK-HCl, inhibidor de tripsina). Posteriormente se centrifugó el lisado celular a 12,000g durante 15 min a 4°C y se colectó el sobrenadante en un tubo nuevo. La concentración de proteínas totales en el extracto fue cuantificada mediante el método de Bradford (1976). Se realizó una curva patrón empleando concentraciones conocidas de albúmina sérica bovina (0, 1, 5, 10 y 20 μ g de proteína). Se preparó la muestra con 10 μ L del extracto hipofisiario para cuantificar la concentración proteínica y, después de obtener la lectura de la absorbencia en el espectrofotómetro Beckman DU 640 a una longitud de onda de 465 nm, se realizó una regresión lineal para extrapolar los valores obtenidos en la densidad óptica y obtener la concentración de proteínas totales en el extracto hipofisiario.

La hormona del crecimiento de iguana verde se purificó empleando una cromatografía de inmunoafinidad a través de una columna de sefarosa-BrCN acoplada a un anticuerpo policlonal C-1 dirigido específicamente contra la GH de pollo, siguiendo el método descrito por Berghman y cols. (1998) (Anexo 4). En breve, la columna se equilibró con Tris-HCl 0.05M, NaCl 0.15M, pH7.6 y después de pasar el extracto hipofisiario se eluyó con un amortiguador de pH ácido (glicina 0.05mM, NaCl 0.15M, pH3). Se colectaron fracciones de 9 mL en tubos conteniendo 1 mL Tris-HCl 3M pH 7.6 para neutralizarlas y se monitoreó su absorbencia a 280nm para determinar su contenido de proteína.

Caracterización bioquímica

El peso molecular aparente (PM) de las proteínas purificadas y el patrón de heterogeneidad molecular de las variantes de masa de GH se analizaron mediante una electroforesis unidimensional en geles de poliacrilamida en presencia de dodecil sulfato de sodio (SDS-PAGE) a una concentración de 15%, tanto en condiciones reductoras (en presencia de 5% 2-mercaptoetanol) como en no reductoras. Las proteínas separadas se transfirieron a membranas de nitrocelulosa empleando amortiguador Tris 25 mM, glicina 192 mM, metanol 20% pH 8.3 a 200 mA por 60 min, para posteriormente ser analizadas mediante Western-Blot (Anexo 5) bloqueando la membrana con leche descremada 5% en TBS por 2 horas, y usando para la inmunodetección los mismos anticuerpos policlonales dirigidos contra la GH de pollo.

Las variantes de carga fueron determinadas mediante isoelectroenfoque (como se describe en el Anexo 6) a partir de 1 µg de proteínas totales de un extracto hipofisiario de iguana verde. Las proteínas fueron resueltas en un gel de poliacrilamida al 4% por 1 hora a 1000 V usando anfólinas en un intervalo de pH de 3-10. Después se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa y mediante Western-Blot usando el anticuerpo anti GH de pollo (C-1) se visualizaron las bandas inmunorreactivas correspondientes a las variantes de carga de la GH de iguana verde. Paralelamente se resolvió un gel que fue teñido con la tinción de plata (Anexo 7) para visualizar todas las proteínas y comparar las que fueron inmunorreactivas en el Western Blot. Para determinar el punto isoelectrónico de cada proteína inmunorreactiva, el gel, una vez digitalizado, se cortó en fragmentos de un centímetro cada uno, se disolvieron en agua por 16 horas y se les midió el pH a cada fragmento. Con estos datos se realizó una regresión lineal con la

que el punto isoeléctrico de cada banda fue extrapolado usando la distancia de migración de cada proteína.

Para corroborar la identidad de la hormona del crecimiento de iguana verde, las proteínas purificadas mediante cromatografía de inmunoafinidad se resolvieron en electroforesis bidimensional. La primera dimensión correspondió a un isoelectroenfoque en el que las proteínas se separaron de acuerdo a su carga en una tira de anfolinas en un intervalo de pH de 5-10. Posteriormente, la tira se colocó sobre un gel preparativo de poliacrilamida y se corrió la segunda dimensión con las condiciones descritas para SDS-PAGE. Las proteínas fueron teñidas con azul de Coomassie al 0.2% por 16 horas y desteñidas con 5 lavados con la solución para desteñir (isopropanol 40% y ácido acético 10%). El punto correspondiente a la hormona del crecimiento se identificó con otro gel de doble dimensión resuelto paralelamente en el que las proteínas fueron transferidas a una membrana de nitrocelulosa para, mediante Western-blot (con las condiciones antes descritas) identificar el punto con mayor inmunorreactividad. El punto identificado fue comparado en el gel teñido con azul de Coomassie y éste se cortó, se depositó en un tubo eppendorf de 0.5 μ L y fue enviado a la Unidad de Proteómica del Instituto de Biotecnología, UNAM, para secuenciarlo mediante espectrometría de masas en un espectrometro de masas Orbitrap-XL a través de LC-MS/MS (cromatografía líquida acoplada a espectrómetros de masas) basada en la obtención de la secuencia de la proteína por fragmentación de la misma, en este caso por CID (Collision-Induced Dissociation), y comparando su espectro de masas con los bancos de datos. Las secuencias obtenidas fueron analizadas y comparadas con los datos depositados en el Gen Bank con el algoritmo “blastp” (www.ncbi.nlm.nih.gov).

Clonación molecular del cDNA de la GH de iguana verde y de su receptor (GHR)

Se alinearon las secuencias de cDNA de la hormona del crecimiento de tres especies (cocodrilo, tortuga y pollo), obtenidas del Gen-Bank (ver números de acceso en la Tabla 2) y se identificaron las regiones conservadas. A partir de este alineamiento se diseñaron y sintetizaron en Invitrogen Company (EUA) el oligonucleótido directo *igGHdF1* y el reverso *igGHdR* (Tabla 1). Se diseñaron también oligonucleótidos degenerados a partir de un alineamiento de la secuencia de aminoácidos de GHR de tortuga, pollo y conejo. Los oligonucleótidos correspondientes fueron denominados: *igGHRf1* y *igGHRr1* (Tabla 1 y Figura 8).

Los tejidos utilizados para clonación molecular (hígado e hipófisis) fueron obtenidos de iguanas decapitadas rápidamente y procesados inmediatamente. A partir de ellos se realizó una extracción de RNA total de un conjunto de 10 hipófisis de iguanas y 100 mg de tejido hepático mediante el método de Trizol[®] (Invitrogen) siguiendo las indicaciones del fabricante, detalladas en el Anexo 8. El cDNA utilizado para amplificar el extremo 5' del cDNA de GH (ver sección de RACE) se sintetizó a partir de 1 µg de RNA total usando el oligonucleótido específico igGHRACEf2 y para el extremo 3' se usó el oligonucleótido PA142 (12.5 pmol). Los cDNAs de GH y GHR utilizados como templado para RT-PCR fueron sintetizados a partir de 1 µg de RNA total usando 0.5µg de oligo d(T), 1 mM dNTP's, amortiguador SSII (Invitrogen) y 100 unidades de transcriptasa reversa Superscript II (Invitrogen) en un volumen de reacción de 20 µL, incubándose a 65°C por 5 min seguido de 42°C por 60 min, (Anexo 9).

Se obtuvieron secuencias parciales del cDNA de GH y su receptor a partir de hipófisis e hígados de iguana verde, respectivamente, mediante RT-PCR usando cuatro juegos de oligonucleótidos: igGHdf1-igGHdr1 para el cDNA de GH; igGHRf1-igGHRr1 para un fragmento del extremo 3' de GHR (Tabla 1). Todas las amplificaciones fueron realizadas en una mezcla de reacción de 25 µL conteniendo 12.5 pmol/µL de cada oligonucleótido, 0.5 mM de la mezcla dNTP's, 1.5 mM de MgCl₂, amortiguador *Taq-pol* (Invitrogen) y 2.5 U de *Taq* polimerasa (Invitrogen). Las condiciones de PCR fueron las siguientes: 95°C por 3 min, 72°C 3 min, seguido de 35 ciclos de 95°C 1min, 52°C (para GH) y 55°C (para GHR) 1.5 min y 72°C 1 min, finalizando con una extensión a 72°C por 10 minutos (Anexo 10). Los productos de PCR fueron separados por electroforesis en un gel de agarosa al 1.2% Tris-Acetato-EDTA (TAE) y visualizados usando bromuro de etidio como marcador en un transiluminador de luz UV. Los amplicones fueron purificados del gel usando el estuche comercial Zymoclean Gel DNA recovery Kit (ZIMO RESEARCH) siguiendo las indicaciones del fabricante. Los amplicones purificados fueron clonados en el vector TOPO TA cloning[®] (Invitrogen) de acuerdo a las indicaciones del fabricante. El amplicón fue secuenciado mediante el método de terminación con el Big Dye de Applied Biosystems usando el secuenciador ABI PRISM 310 Genetic Analyzer en la Unidad de Proteogenómica del Instituto de Neurobiología, UNAM. La secuencia obtenida fue analizada y comparada con la base de datos del National Center for Biotechnology Information (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>).

Amplificación Rápida de los Extremos 3' y 5' (RACE 3' y 5') de igGH

Una vez obtenida la secuencia parcial del cDNA de igGH se diseñaron oligonucleótidos específicos en el extremo 3' y 5' (Tabla 1) para amplificar los extremos mediante RACE. Para el extremo 5' el cDNA sintetizado con el oligo igGHRACEf2 se sometió a una reacción en un volumen de 20µL conteniendo 0.5 mM dCTP, amortiguador *Taq-pol* (Invitrogen), 1.5 mM de MgCl₂ y se incubó a 95°C por 3 min. Se adicionaron 15 U de transferasa terminal de desoxinucleótidos (TdT Invitrogen) y se incubó a 37°C por 20 min. La enzima se inactivó a 65°C por 20 min. Posteriormente se realizó un PCR-anidado usando en la primera ronda el juego de oligonucleótidos RACEout5-igGHRACEf2. El producto de amplificación se diluyó 1:50 y se tomó 1 µL para la segunda ronda usando los oligonucleótidos RACEin- igGHRACEf1. Para el extremo 3' se utilizó el cDNA sintetizado con el oligonucleótido PA142 y la primera ronda se realizó con el par de oligonucleótidos RACEout3-igGHRACEr2 mientras que en la segunda ronda se usaron los oligonucleótidos RACEin-igGHRACEr1. Las condiciones de estos PCRs fueron las mismas que las descritas en la sección anterior con pequeñas variaciones: se corrieron 30 ciclos y la temperatura de alineamiento que se usó en todos estos PCRs fue de 55°C.

Tabla 1.- Secuencias de oligonucleótidos utilizados en la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y en la amplificación rápida de los extremos del cDNA (RACE).

| Nombre | Secuencia (5' – 3') |
|-------------------|--|
| <i>igGHdF1</i> | GGSTCRTGGTTTTCTCCTC |
| <i>igGHdR</i> | TCARATGGTGCAGTTGCTYTCTCCRAAGCG |
| <i>igGHRACEf1</i> | AGGGCCAAGATAAACAAAGC |
| <i>igGHRACEf2</i> | AAAGCTGTTGTTCCCTCAGG |
| <i>igGHRACEr1</i> | TGAAAGTGATGAAATGCAGGC |
| <i>igGHRACEr2</i> | TCAAAAAGGACCTGCACAAG |
| <i>PA142</i> | GACTTCAGGCTAGCATCGATCCATGGGTCGACT(T) ₁₆ |
| <i>RACEout</i> | GACTTCAGGCTAGCATCGAT |
| <i>RACE in</i> | CATCGATCCATGGGTCGAC |
| <i>igGHRf1</i> | TGGAARGARTGYCCNGAYTA |
| <i>igGHRr1</i> | AGYTCDATRAAYTCNACCCA |

A- Adenina; T- Timina; C-Citocina; G- Guanina; M- A o C; W- A o T; R- A o G; Y- C o T; N- A o T o C o G

Análisis bioinformático de los cDNAs de GH y GHR

Las secuencias obtenidas mediante PCR y RACE fueron editadas para obtener la secuencia completa del cDNA de la GH. La secuencia de aminoácidos fue deducida usando el software Expasy-translate-tool (<http://www.expasy.org>). Los dominios presentes en la estructura primaria de la proteína y los posibles sitios de glicosilación se identificaron mediante el uso de PROSITE (<http://www.expasy.org/prosite>) y de InterProScan (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/InterProScan/>). El punto isoeléctrico y el peso molecular teóricos se predijeron usando Compute pI/Mw tool (<http://www.expasy.ch/cgi-bin/protparam>) y la predicción del péptido señal se realizó usando SignalP 3.0 (Bendtsen y cols., 2004).

Para realizar los análisis filogenéticos se obtuvieron del GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Genbank/>) las secuencias de GH de 32 especies (Tabla 2). Dichas secuencias fueron alineadas empleando el software Clustal X con las opciones que por “default” da el programa. La distancia genética entre especies fue calculada con el método Kimura y se generaron dendogramas usando los métodos “neighbor-joining” (N-J) y máxima parsimonia con el software MEGA3.4.

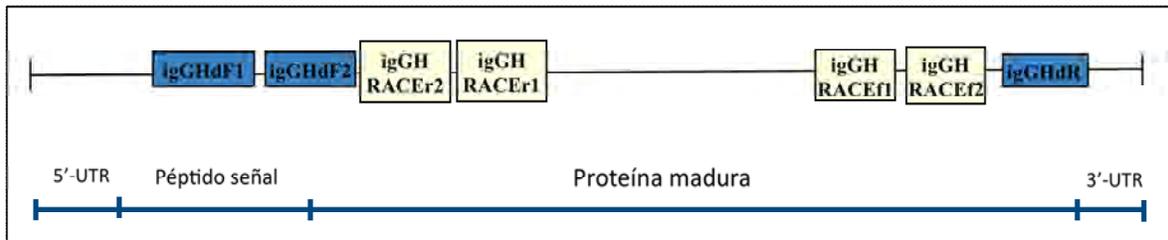


Figura 8.- Representación esquemática de la ubicación de los oligonucleótidos con los que se amplificó en el ADNc del la GH de iguana verde

Tabla 2.- Especies utilizadas para la reconstrucción de relaciones filogenéticas. El número de acceso indica la secuencia de la hormona del crecimiento de cada especie en el Genbank.

| Especie | Nombre Común | No. Acceso | Especie | Nombre Común | No. Acceso |
|--------------------------------|---------------------|-------------------|----------------------------|-----------------------|-------------------|
| <i>Ambystoma barbouri</i> | Ajolote | AAP92705.1 | <i>Ficedula hypoleuca</i> | Papamoscas cerrojillo | ABB70042.1 |
| <i>Anas platyrhynchos</i> | Pato | P11228.1 | <i>Gallus gallus</i> | Gallo doméstico | NP_989690.1 |
| <i>Andrias davidianus</i> | Salamandra | ACE06756.1 | <i>Homo sapiens</i> | Humano | EAW94244.1 |
| <i>Anguilla anguilla</i> | Anguila | AAN61122.1 | <i>Ictiobus bubalus</i> | Cuino blanco | AAR24538.1 |
| <i>Anguilla japonica</i> | Anguila japonesa | P08899.2 | <i>Iguana iguana</i> | Iguana verde | En proceso |
| <i>Anser anser</i> | Ganso | AAN37412.1 | <i>Meleagris gallopavo</i> | Guajolote | P22077.1 |
| <i>Bos indicus</i> | Toro cebú | ABY61234.1 | <i>Mus musculus</i> | Ratón común | NP_032143.1 |
| <i>Bufo marinus</i> | Sapo marino | O73849.1 | <i>Ovis aries</i> | Borrego doméstico | ABO21735.1 |
| <i>Canis familiaris</i> | Perro doméstico | CAA80601.1 | <i>Pan troglodytes</i> | Chimpancé común | ABO21735.1 |
| <i>Capra hircus</i> | Cabra doméstica | ABT17092.1 | <i>Prionace glauca</i> | Tiburón azul | P34006.1 |
| <i>Chelonia mydas</i> | Tortuga verde | P34005.1 | <i>Pygathrix nemaeus</i> | Langur jaspeado | AAU95547.1 |
| <i>Coturnix coturnix</i> | Codorniz | ACJ73931.1 | <i>Rana catesbeiana</i> | Rana toro | AAP04356.1 |
| <i>Crocodylus novaeguineae</i> | Cocodrilo | P55755.1 | <i>Rattus norvegicus</i> | Rata de alcantarilla | NP_001030020.1 |
| <i>Cynops pyrrhogaster</i> | Tritón japonés | CAB55428.1 | <i>Squalus acanthias</i> | Tiburón espinoso | BAF94997.1 |
| <i>Danio rerio</i> | Pez Zebra | NP_001018328.2 | <i>Struthio camelus</i> | Avestruz | Q9PWG3.1 |
| <i>Felis catus</i> | Gato doméstico | AAA96142.1 | <i>Xenopus laevis</i> | Rana africana | AAH77632.1 |

RESULTADOS

Como primer acercamiento para la realización del presente proyecto se probaron las herramientas estandarizadas en el laboratorio para el estudio de la GH de pollo, con el objetivo de dilucidar si los anticuerpos específicos anti-cGH, con los que ya se contaba, cruzaban con las proteínas hipofisarias de iguana y eso permitiría caracterizar a la hormona del crecimiento de iguana. Se probaron dos anticuerpos dirigidos contra la GH de pollo (CAP-1 y C-1) para verificar que reconocían a la hormona del crecimiento de iguana verde. De un extracto proteínico de un conjunto de 3 hipófisis, se cuantificaron las proteínas totales con el método de Bradford y se resolvieron 15 μg de proteínas totales en electroforesis SDS-PAGE al 12.5% bajo condiciones reductoras. Las proteínas separadas se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa para, mediante Western Blot, identificar aquellas que inmunoreaccionaron con el anticuerpo contra GH de pollo. Se corrieron dos muestras por separado para incubar cada una de ellas con un anticuerpo diferente: CAP1, dirigido contra la GH de pollo nativa, y C1, dirigido contra cGH recombinante, a una dilución 1:10,000 y 1:5,000, respectivamente. Con ambos anticuerpos se logró identificar una proteína de aproximadamente 26 KDa (Figura 9) tanto en el extracto hipofisario de iguana como en el de pollo, usado como control positivo. Este resultado sugirió que el anticuerpo si era capaz de cruzar y reconocer a una proteína similar que pudiera considerarse como la hormona del crecimiento de iguana verde.

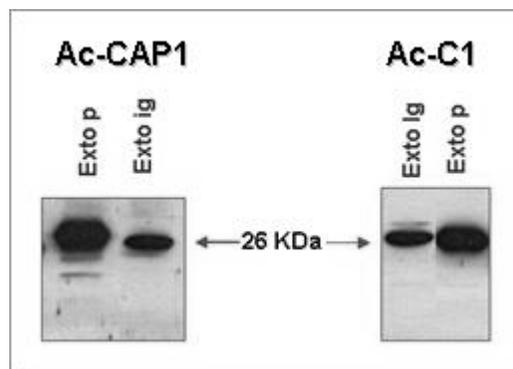


Figura 9.- Luminograma representativo de bandas de hormona del crecimiento en extractos hipofisarios de iguana (Exto ig; 15 μg) y pollo (Exto p; 2 μg) determinado por SDS-PAGE (condiciones reductoras) transferida a membrana de nitrocelulosa e inmunorreconocidas por los anticuerpos CAP-1 (dil 1:10,000) y C-1 (dil. 1:5,000) dirigidos contra las hormonas nativa y recombinante de pollo, respectivamente.

La inmunodetección de la hormona del crecimiento de iguana verde por los anticuerpos contra GH de pollo se corroboró con un ensayo de paralelismo con la técnica de ELISA en la que se usó una curva de referencia realizada con GH de pollo recombinante. El intervalo de la concentración proteínica del extracto hipofisiario de iguana usado para este ensayo fue de entre 1.75 - 114 μg mientras que el de pollo, usado como control positivo, fue de entre 0.05 - 3 μg . A pesar de esta diferencia en órdenes de magnitud de concentración de proteína, en el ensayo se muestra una gráfica paralela tanto a la curva de referencia como al control positivo aunque también se observa el efecto de la concentración, es decir, el anticuerpo reconoce a la hormona del crecimiento de iguana verde pero con menor afinidad que la que se muestra para la hormona del crecimiento de pollo (Figura 10).

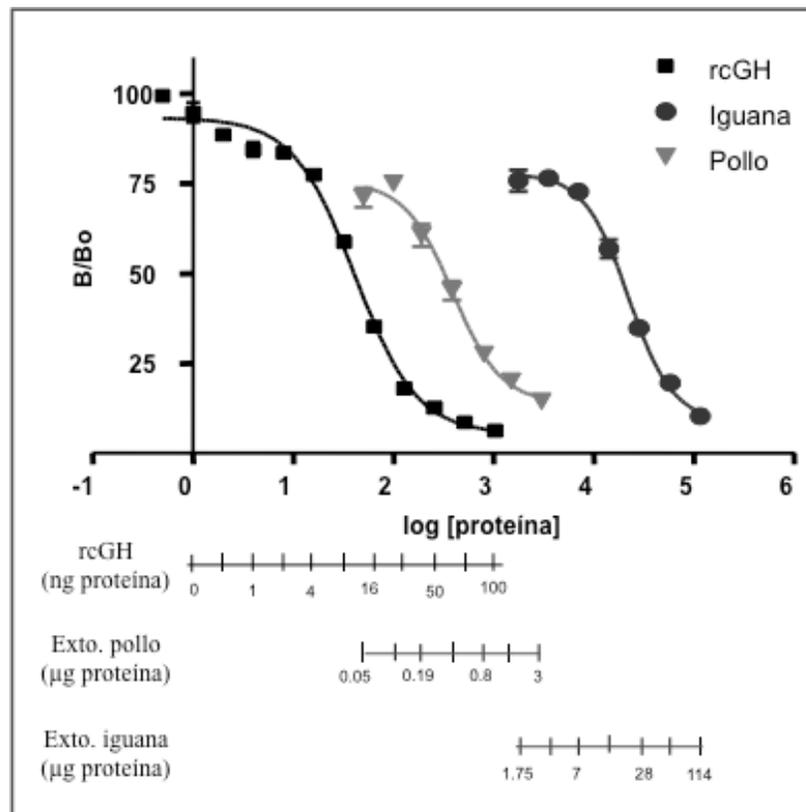


Figura 10.- Ensayo de paralelismo de la GH de iguana respecto a la GH de pollo mediante la técnica de ELISA.

Histología e Inmunoquímica de la Hipófisis de Iguana Verde

Para describir la morfología y la distribución de los somatotropos en la hipófisis de iguana verde se obtuvieron cortes histológicos sagitales de la cabeza completa de organismos juveniles.

Inicialmente se realizó una tinción de hematoxilina-eosina con la finalidad de identificar a los diferentes tipos celulares discerniendo entre las células acidófilas de las basófilas. En la tinción se distinguió una glándula con una longitud aproximada de 1.3 mm donde el 50% del órgano correspondió a la adenohipófisis (con células con características glandulares, de forma redonda y con gran cantidad de gránulos en el citoplasma), el 25% a la neurohipófisis (con tejido principalmente sin núcleo correspondiente probablemente a proyecciones axonales) y el 25% al lóbulo intermedio que separa estas dos estructuras (Figura 11). En un acercamiento (40X) en la región caudal de la adenohipófisis se pudieron diferenciar las células acidófilas de las basófilas (Figura 11 C y D). Ambos tipos celulares presentan la morfología característica glandular y se diferencian a los basófilos por presentar su citoplasma de color más “rosado”, mientras que los acidófilos tienen el citoplasma azul-morado, y estos últimos tienen mayor tamaño en comparación con los basófilos.

Los somatotropos fueron identificados mediante inmunohistoquímica utilizando el anticuerpo CAP-1 (1:200) dirigido contra la GH de pollo que previamente se había concluido que cruza con la GH de iguana verde. Este tipo celular se encontró en mayor abundancia en la región caudal de la adenohipófisis (Figura 12A), mientras que no se obtuvo marca inmunorreactiva evidente ni en la neurohipófisis y ni en el lóbulo intermedio. Cuando se observó a un mayor aumento (Figura 12B y 12C) se distinguieron las células francamente positivas a este anticuerpo con forma redonda, núcleo grande y la inmunomarca restringiéndose a los gránulos. El tamaño de las células fue , en promedio, de 13 μm de diámetro. Los controles negativos, sin primer anticuerpo, sin segundo anticuerpo y con anticuerpo preabsorbido con un exceso de rcGH se muestran en las figuras 12G, H e I, respectivamente, y no se observó ninguna tinción o marcaje. Otro tipo celular con morfología semejante a la de los somatotropos son los lactotropos, identificados mediante inmunohistoquímica usando un anticuerpo anti prolactina (1:100) de pollo, encontrándose su distribución fundamentalmente en la región rostral de la adenohipófisis (Figura 12D). La morfología redonda, de núcleo grande y abundantes gránulos de los lactotropos se observa en las figuras 12E y F (40X). El tamaño de estas células es aproximadamente de 11 μm .

Para describir la ultraestructura de los somatotropos se realizó microscopía electrónica en cortes finos de adenohipófisis de iguana verde. Inicialmente se distinguieron células con gránulos de tamaños diferentes, en un intervalo de 50 a 300 nm (Figura 13A). Para distinguir a los

somatotropos se realizó inmunohistoquímica usando el mismo anticuerpo primario contra GH de pollo (CAP-1) y un segundo anticuerpo acoplado a partículas de oro de 10 nm. Con esto se identificaron células de un tamaño aproximado de $6.5 \times 10 \mu\text{m}$ (Figura 13B y C) que almacenan GH en sus gránulos de 250-300 nm de forma esférica, ovoide y alargados (Figura 13D). Además se observó inmunorreactividad fuera de los gránulos de secreción en lo que probablemente podría ser el retículo endoplásmico. Para comprobar que la marca fuera específica y no un producto de inespecificidad se utilizó como control negativo el primer anticuerpo preabsorbido con un exceso de hormona del crecimiento recombinante de pollo, y con este anticuerpo preabsorbido se incubaron cortes de la misma región observando una disminución casi total en la inmunomarca presente en los gránulos de secreción de los somatotropos (Figura 13H e I).

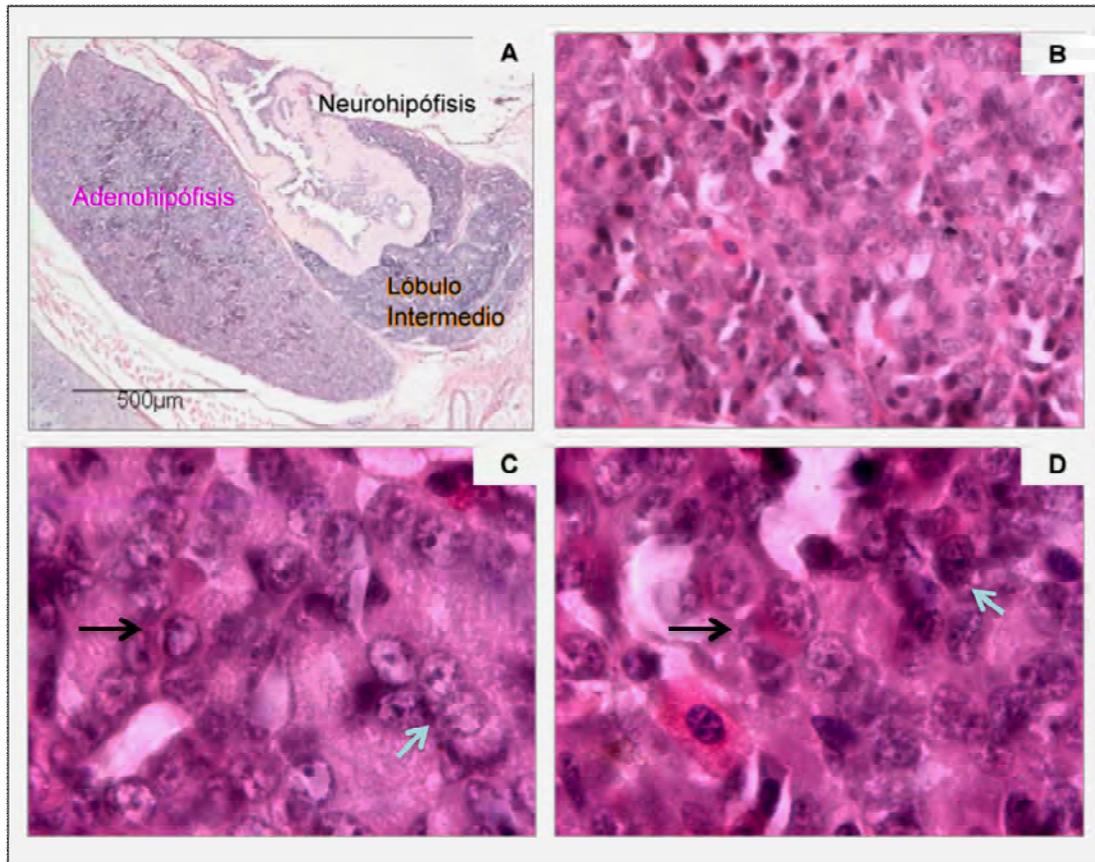


Figura 11.- Tinción de hematoxilina-eosina en cortes sagitales de hipófisis de iguana orientada de una posición rostral a caudal donde se distingue la neuro y la adenohipófisis separadas por un lóbulo intermedio muy desarrollado. A.- vista panorámica de la hipófisis; B.- Aumento a 20X en la región caudal de la adenohipófisis; C y D.- vista en detalle (80X) de la adenohipófisis señalando la células basófilas (flecha negra) y las acidófilas (flecha azul)

La síntesis de la hormona del crecimiento en los somatotropos de iguana verde fue comprobada mediante la detección de la expresión del ARN mensajero producto de la transcripción del gen de GH usando la técnica de hibridación *in situ* en cortes sagitales de hipófisis y utilizando una ribsonda específica para el mensajero de GH de iguana verde. Se utilizó una concentración de sonda de 100 ng y, como se observa en la figura 14, la marca positiva se restringe a la región caudal de la adenohipófisis, coincidiendo con la inmunorreactividad observada cuando se utilizó el anticuerpo anti GH de pollo en la misma región. En la figura 14C se observa el control negativo en el que se utilizó la sonda sentido comprobando con ello la especificidad de la sonda y del marcaje.

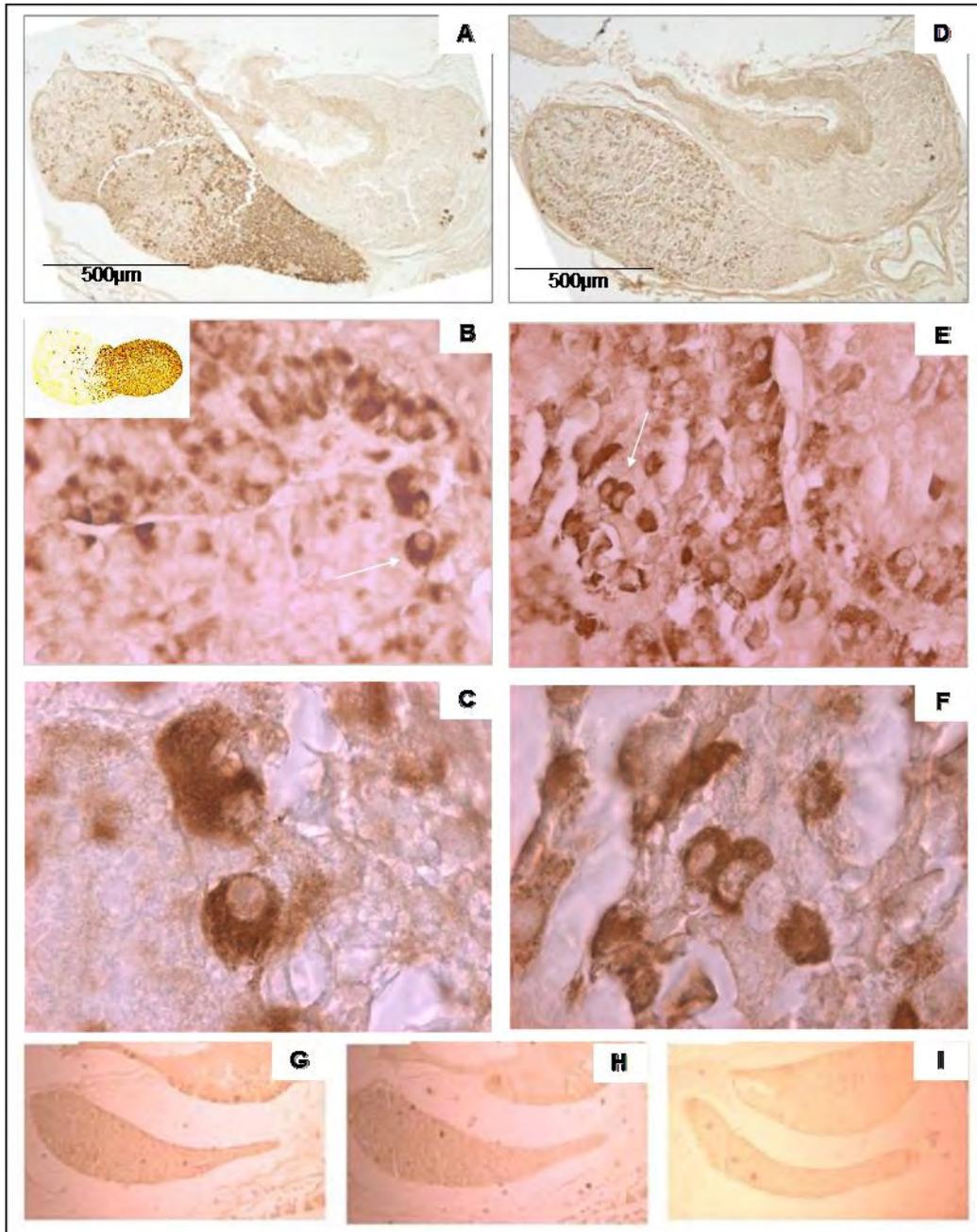


Figura 12.- Inmunohistoquímica con anticuerpo contra GH de pollo (1:200), A, B y C y contra prolactina (1:100), D, E y F. A y D.- Vista panorámica de la hipófisis de iguana verde; B y E.- Aumento a 20X de la región caudal de la adenohipófisis; C y F.- Vista en detalle (80X) de los somatotropos y lactotropos respectivamente; Controles negativos: G.- sin primer anticuerpo; H.- sin segundo e; I.- con anticuerpo preabsorbido. En el recuadro de la figura B se muestra la distribución de los somatotropos (Inmunohistoquímica) en la adenohipófisis de pollo.

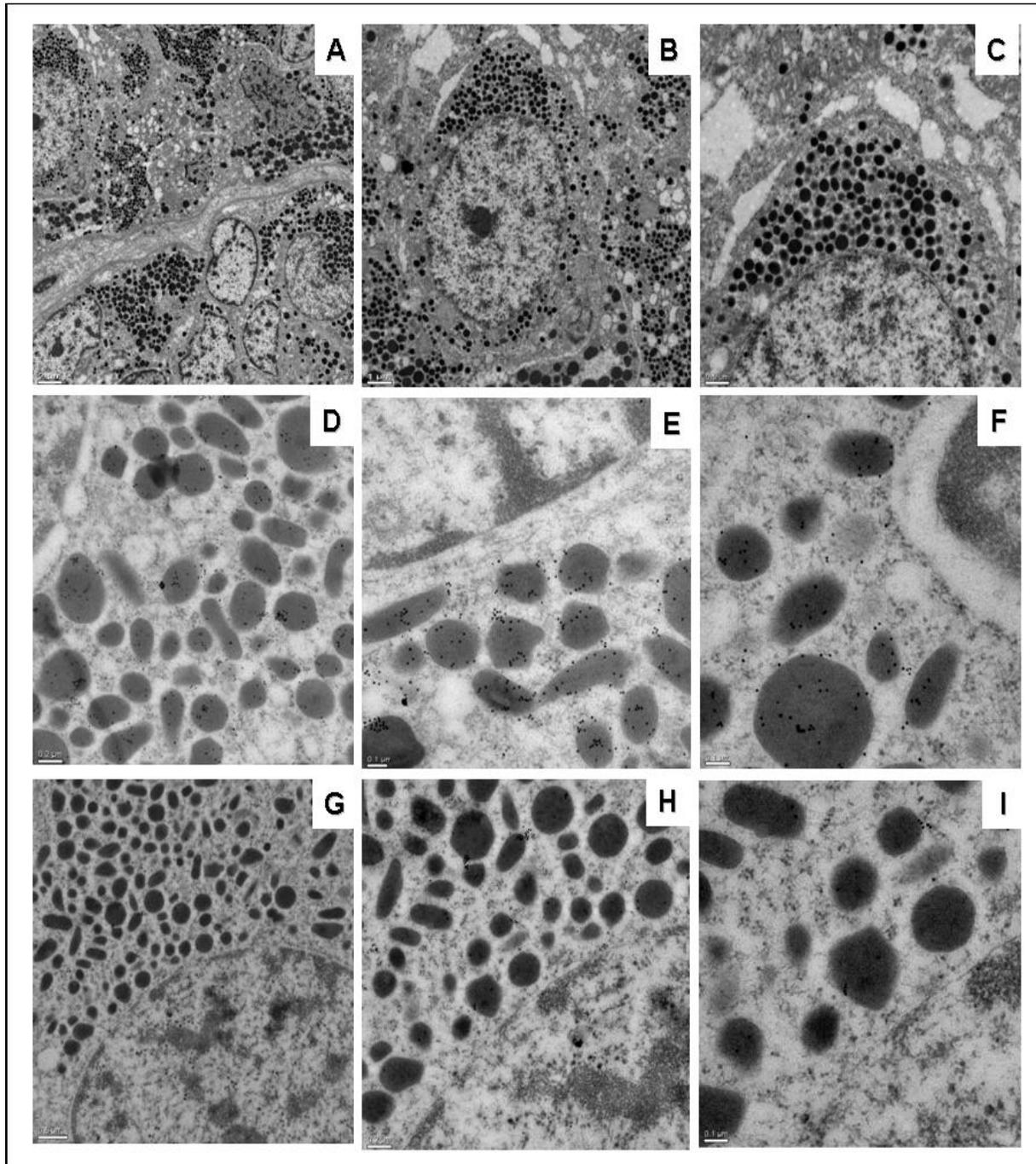


Figura 13.- Micrografías de microscopía electrónica estructural y de inmunohistoquímica de adenohipófisis de iguana verde. A.- aumento a 5,000X de la región caudal de a adenohipófisis donde se observan células con gránulos de diferente tamaño; B.- ampliación a 10,000X de una célula somatotrópica; C.- Aumento a 20,000X de los gránulos del somatotropo; D; E; y F.- vista detallada a 50,000, 80,000 y 100,000X respectivamente de los gránulos inmunorreactivamente positivos. La marca también se observa fuera de los gránulos; G; H; e I.- Controles negativos, a 25,000, 50,000 y 100,000X respectivamente, incubados con anticuerpo primario preabsorbido con un exceso de GH recombinante de pollo.

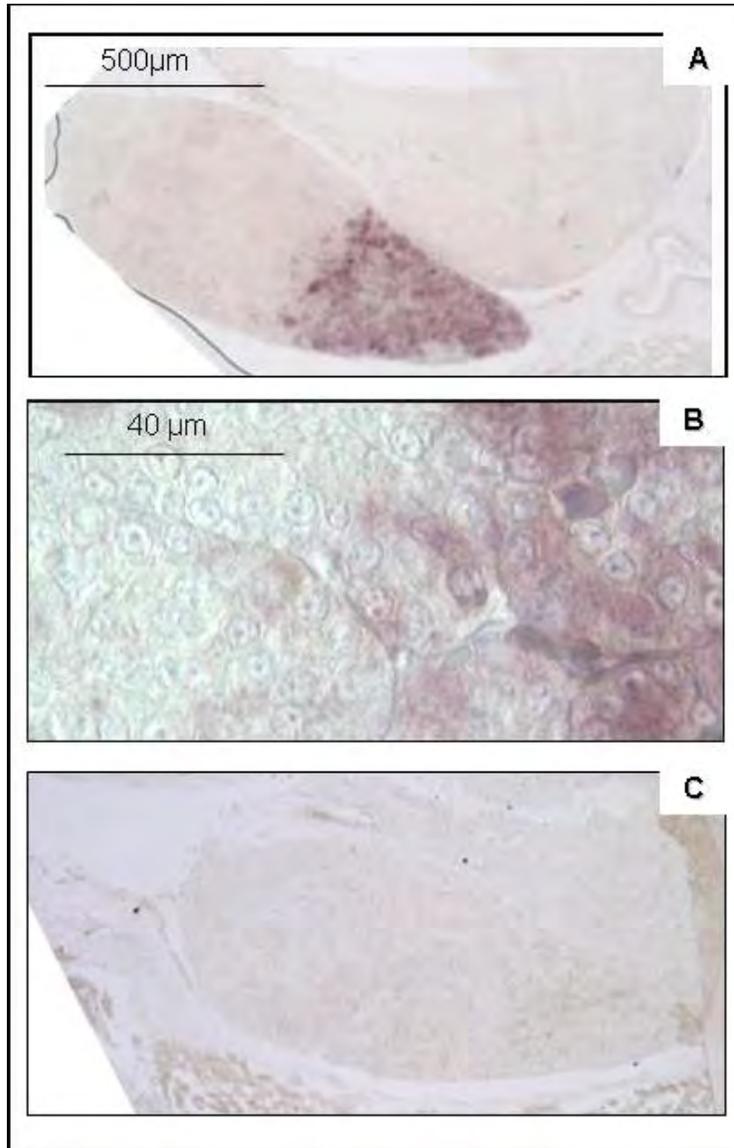


Figura 14.- Hibridación *in situ* en cortes sagitales de hipófisis de iguana verde. A.- marca positiva en la región caudal de la adenohipófisis utilizando una ribosonda antisentido específica de GH de iguana verde (aumento a 10X); B.- Aumento en detalle a 60X en el que se observa una región franca positiva contrastando con la zona negativa correspondiente a la zona rostral; y C.- control negativo usando la ribosonda sentido.

Purificación de Hormona del Crecimiento de Iguana Verde

Mediante cromatografía de inmovilización de afinidad se purificó hormona del crecimiento de iguana verde. Inicialmente se purificó anticuerpo anti-GH de pollo a partir de 3 mL de antisuero de conejo pasándolo por una cromatografía de afinidad en una columna de proteína A sefarosa a fin de obtener las IgG específicas. En la figura 15 se muestra el patrón de elución para el

antisuero. Las fracciones fueron de 3 mL cada una y se colectaron las fracciones 10, 11, 12 y 13 teniendo un volumen final de 12 mL con una concentración de anticuerpo puro de 15.17 $\mu\text{g}/\text{mL}$.

Se acoplaron aproximadamente 180 μg de anticuerpo puro en 1 g de sefarosa 4B activada con bromuro de cianógeno (BrCN). Se obtuvo una eficiencia de acoplamiento del 74%. Esta sefarosa se utilizó para purificar la hormona del crecimiento de iguana verde mediante cromatografía de inmunoafinidad a partir de un extracto proteínico obtenido a partir de un conjunto de 10 hipófisis de iguanas de aproximadamente un año de edad del cual se utilizaron 1.3 mg de proteínas totales para la cromatografía.

Las fracciones en la cromatografía de inmunoafinidad fueron de 10 mL. Se realizaron dos corridas con patrones de elución esquematizados (Figura 15). De la primera corrida se colectaron las fracciones 11, 12 y 13. La fracción no absorbida se sometió a una segunda corrida colectándose las fracciones 12 y 13. El rendimiento de esta purificación fue de 0.35 μg de GH por mg de tejido hipofisiario.

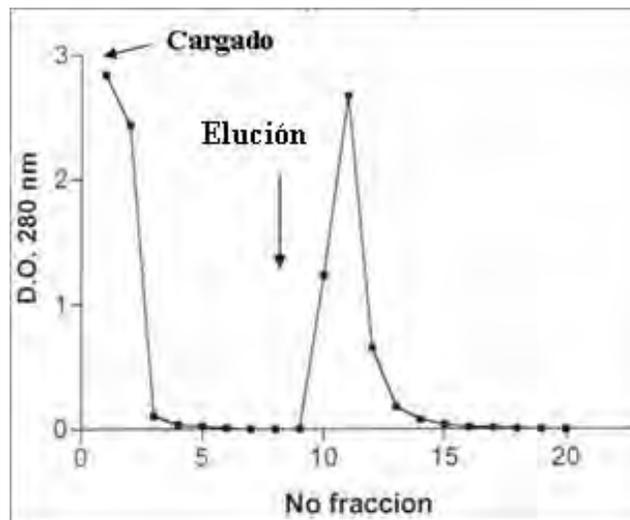


Figura 15.- Purificación del anticuerpo policlonal a partir de antisuero de conejo contra GH recombinante de pollo por cromatografía de afinidad en proteína A sefarosa. La columna se equilibró con glicina 1.5 M, NaCl 3 M pH 8.9, mientras que la elución se llevó a cabo con un amortiguador de citratos 50 mM pH 3.

Caracterización Estructural de la Hormona del Crecimiento de Iguana Verde

Una vez purificada la hormona del crecimiento y como primer acercamiento en la caracterización de esta proteína, se resolvieron en un gel de SDS-PAGE bajo condiciones reductoras las proteínas presentes en el extracto obtenido de la cromatografía de inmunoafinidad.

Estas se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa y, mediante Western-Blot, se determinaron las bandas inmunorreactivas de GH de iguana. En el luminograma (Figura 16) se distingue, en la fracción adsorbida, una proteína inmunorreactiva con peso aproximado de 26 kDa. Proteínas de este mismo peso molecular, cercano a los 26kDa, se encuentran en todas las muestras representando la forma mayoritaria, con excepción del carril correspondiente a la fracción no adsorbida donde disminuye considerablemente. En todos los carriles se distingue una banda inmunorreactiva de alto peso molecular, sin embargo, y debido a que está presente en todos los carriles, se sugiere que es inespecificidad producto del mercaptoetanol utilizado. Como controles positivos se usaron extracto crudo de hipófisis y hormona del crecimiento recombinante, ambos de pollo. Igualmente se corrió un extracto crudo de hipófisis de iguana.

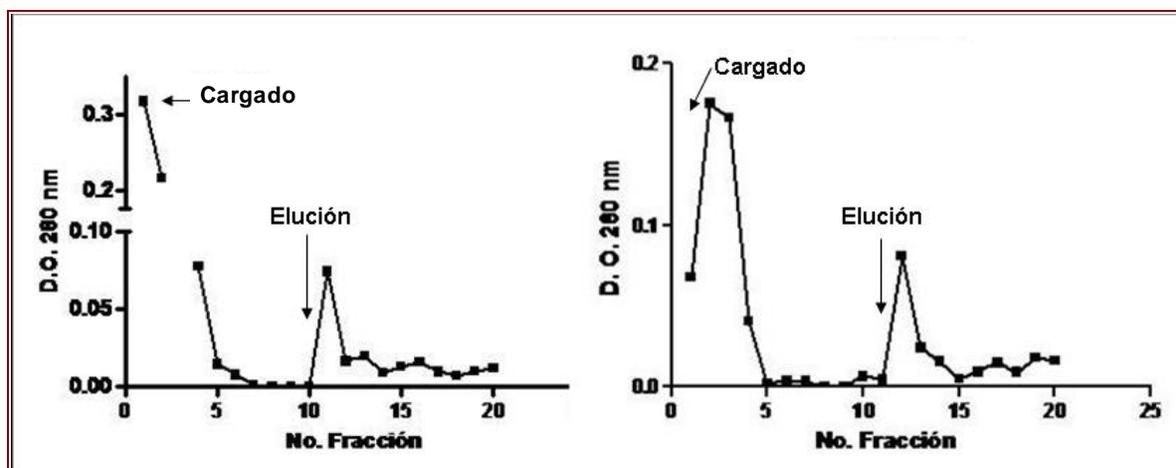


Figura 16.- Purificación de la hormona del crecimiento de iguana verde por cromatografía de inmunoafinidad, equilibrando la columna con Tris-HCl 0.05 M, NaCl 0.15 M pH 7.6; las fracciones retenidas se eluyeron con glicina 0.05 M, NaCl 0.15M pH 3. En la primera corrida (izquierda) se colectaron las fracciones 11, 12 y 13. La fracción no absorbida se volvió a correr (derecha) colectando las fracciones 11 y 12. Se obtuvo un rendimiento de 775 μ g de GH.

En el extracto hipofisiario de iguana verde se distingue el monómero de GH y, aunque el análisis densitométrico generó un valor cercano a los 26 kDa, similar a todas las muestras, en el luminograma (Figura 17) se puede observar que migra ligeramente más que el monómero de la hormona del crecimiento recombinante de pollo. En el extracto de iguana se distinguen dos bandas más con un peso mayor a los 52 kDa, sugiriendo que se trata de formas agregadas del monómero. Esto mismo sucede en el extracto hipofisiario de pollo donde adicionalmente se distingue una variante de menor peso molecular (15kDa) que no está presente en el carril de la

hormona recombinante. Sin embargo, en ambas muestras de pollo se observa una banda de 52 kDa que está ausente en las demás muestras analizadas.

Como se observa en la tabla de la figura 17 existen variaciones respecto al peso molecular del monómero para todas las muestras analizadas y, debido a que previamente se ha caracterizado que la GH para diferentes especies tienen un peso aproximado de 26 kDa en condiciones reductoras, los valores del análisis de pesos moleculares se definen como aproximados.

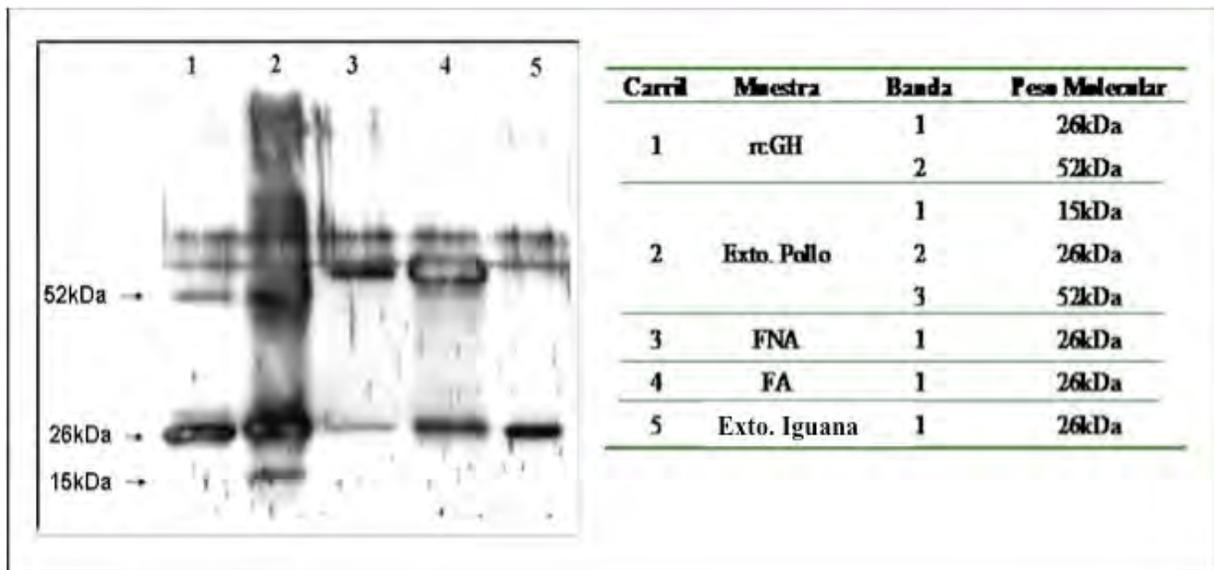


Figura 17.- Análisis electroforético en condiciones reductoras de la fracción adsorbida (FA), no adsorbida (FNA) en la cromatografía de inmunoafinidad y de extracto hipofisiario de iguana (igGH). Como controles positivos se usó hormona recombinante (rcGH) y extracto hipofisiario de pollo (ExtoPollo). En la tabla se muestran los valores del análisis de pesos moleculares para las bandas inmunorreactivas.

Después de realizar un análisis de isoelectroenfoque a extractos hipofisiarios de iguana se observaron diferentes variantes de carga (Tabla 3). Las variantes mayoritarias fueron las de punto isoelectrónico de 7.4 y 6.2. Se utilizó como control positivo un extracto crudo de glándulas hipofisiarias de pollo así como rcGH en los que el intervalo de PI fue de 6.0 a 8.2, siendo las variantes mayoritarias las de 6.6 y 8.2.

Mediante electroforesis de doble dimensión se separó la variante mayoritaria, tanto para la de masa como para la del punto isoelectrónico de la hormona del crecimiento de iguana verde, purificada por cromatografía de inmunoafinidad. En cuanto al peso molecular se observaron dos bandas más abundantes correspondientes, probablemente, al monómero y al dímero de la proteína, mientras que para el punto isoelectrónico se distinguen al menos 4 puntos

inmunorreactivos, correspondientes a 4 variantes de carga. Se corroboró que se tratara de la GH con Western-Blot (Figura 18) y el punto con mayor inmunorreacción se cortó, de un gel resuelto paralelamente y teñido con azul de Coomassie, a fin de que pudiera ser secuenciado.

Tabla 3.- Variantes de carga de hormona del crecimiento.

| Muestra | Banda | Punto isoelectrico |
|-----------------|-------|--------------------|
| Extracto iguana | 1 | 7.4 |
| | 2 | 6.9 |
| | 3 | 6.5 |
| | 4 | 6.2 |
| Extracto Pollo | 1 | 8.2 |
| | 2 | 7.7 |
| | 3 | 7.0 |
| | 4 | 6.6 |
| | 5 | 6.0 |
| rcGH | 1 | 6.8 |

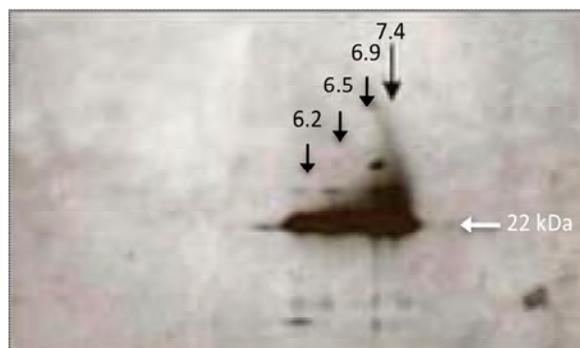


Figura 18.- Luminograma representativo de los puntos inmunorreactivos al anticuerpo anti-cGH en electroforesis bidimensional y Western blot de las proteínas obtenidas mediante cromatografía de inmunoafinidad. La flecha de 7.4 indica el punto con mayor inmunomarca que fue seleccionado de un gel teñido con azul de Coomassie para secuenciarse mediante espectrometría de masas.

A fin de verificar la identidad de la proteína aislada y purificada que posiblemente correspondía a la GH de iguana, ésta se secuenció parcialmente. Mediante electroforesis bidimensional y Western-blot se identificó la proteína con mayor marca inmunorreactiva. Esta proteína fue cortada de un gel teñido con azul de Coomassie. El punto cortado se envió a la Unidad de Proteómica del Instituto de Biotecnología, UNAM y mediante espectrometría de masas usando el método de cromatografía de gases acoplada a espectrómetros de masas capaces de producir espectros en tandem (LC-MS/MS), se obtuvo la secuencia de 3 péptidos internos de la hormona del crecimiento de iguana verde de 13, 10 y 9 aminoácidos, respectivamente. Estos

péptidos se alinearon con la secuencia de la hormona del crecimiento de humano, pollo, tortuga y cocodrilo usando el programa ClustalW (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/clustalw/>). Con dicho alineamiento se corroboró que la proteína purificada podría corresponder efectivamente a la hormona del crecimiento de iguana verde, debido a que los péptidos secuenciados tenían similitud con la secuencia de la hormona de otras especies (33 a 60%). La secuencia obtenida para los péptidos internos de la GH de iguana tiene mayor similitud con las hormonas de otros reptiles y la de pollo, que con la de humano (Figura 19). Los péptidos se ubican en las posiciones 18-30, 96-106 y 133 -142 de las secuencia de GH de las otras especies.

| | | |
|-----------|---|-----|
| | <u>18 - 30</u> | |
| Humano | -FPTIPLSRLFDNAMLRAHRLHQLAFDITYQEFEEAYIPKEQKYSFLQNPQTSLCFSESIP | 59 |
| Pollo | TFFAMPLSNLFANAVLRAQHLHLLAAETYKEFERTYIPEDQRYTNK-NSQAAFICYSETIP | 59 |
| Tortuga | AFFAMPLSSLFANAVLRAQHLHLLAADTYKEFERTYIPEEQRHSNK-ISQSASCYSETIP | 59 |
| Cocodrilo | -FPAMPLSSLFANAVLRAQHLHLLAAETYKEFERSYIPEEQRHSNK-NSQS AFCYSETIP | 58 |
| Iguana | AQHLHLLAAETK | |
| | <u>96 - 106</u> | |
| Humano | TPSNREETQQKSNLELLRISLLLIQSWLEPVQFLRSVFANSLVYGASDSNVYYDLLKDLE | 119 |
| Pollo | APTGKDDAQKSDMELLRFSLVLIQSWLTPVQYLSKVFTNNLVFGTSDR--VFEKLDLE | 117 |
| Tortuga | APTGKDDAEQKSDMELLRFSLIILIQSWLNPVQFLSRVFTNSLVFGTSDR--VYEKLRDLE | 117 |
| Cocodrilo | APTGKDDAQKSDMELLRFSLVLIQSWLNPVQFLSRVFTNSLVFGTSDR--VFEKLRDLE | 116 |
| Iguana | FSNTLVFGNP | |
| | <u>133 - 142</u> | |
| Humano | EGIQTLMGRLEDGSPRTGQIFKQTYSKFDTNSHNDALLKNYGLLYCFRKDMDKVETFLR | 179 |
| Pollo | GGIQALMRELEDGSRPGQLLRPTYDKFDIHLRNEDALLKNYGLLSCFKDLHKVETYLK | 177 |
| Tortuga | EGIQALMRELEDGSLRGFQVLRPTYDKFDINLRNEDALLKNYGLLSCFKDLHKVETYLK | 177 |
| Cocodrilo | EGIQALMRELEDGSHRGPQILKPTYEKFDINLRNEDALLKNYGLLSCFKDLHKVETYLK | 176 |
| Iguana | G--LFRPTYEK | |

Figura 19.- Péptidos internos de la GH de iguana verde secuenciados mediante espectrometría de masas alineados con la secuencia de GH de humano, pollo, tortuga y cocodrilo. Las líneas corresponden a las posiciones de las GHs con las que tienen similitud.

Clonación Molecular del cDNA de la Hormona del Crecimiento de Iguana Verde

Se aisló el ARN total de un conjunto de 10 hipófisis de iguanas juveniles obteniendo un rendimiento total de 8.15 µg. A partir de 1µg de RNA total se sintetizó ADNc usando oligo d(T). Con el ADNc sintetizado se amplificó una secuencia parcial de 663pb del ADNc que codifica para la GH de iguana verde usando los oligonucleótidos degenerados previamente diseñados (*igGHdF1-igGHdR*). Como control positivo se amplificó el cDNA de GH de pollo lográndose

amplificar con los mismos oligonucleótidos degenerados un fragmento del mismo tamaño. El control negativo consistió en las mismas condiciones pero sin ADNc (Figura 20). Se corrió un gel preparativo con 30 μ L del producto de PCR; la banda obtenida se cortó y el amplicón se purificó del gel. Con el amplicón purificado se realizó una ligación al vector de clonación TOPO (Invitrogen) siguiendo las especificaciones del fabricante. Con este producto de ligación se transformaron células competentes de *Escherichia coli* y se cosecharon 7 colonias. Estas fueron cultivadas para extraer el plásmido clonado mediante miniprep.

Para verificar la correcta inserción del fragmento al vector, se realizó una PCR usando como template los plásmidos purificados con las mismas condiciones con las que se amplificó el ADNc de la GH de iguana. En la figura 21A se observa que las 7 colonias aisladas, resultaron positivas a la inserción del fragmento con un amplicón del mismo tamaño que el obtenido en el control positivo correspondiente a una amplificación del ADNc de GH de pollo. De las 7 muestras positivas se eligieron la 1, 6 y 7 para realizar una digestión a los plásmidos purificados con la enzima de restricción *EcoRI*. Con esto se verificó la liberación de un inserto de aproximadamente 660 pb indicando positiva la ligación (Figura 21B). Como control, en el mismo gel se corrió plásmido sin digerir de las mismas muestras observando la ausencia de la banda de 660 pb.

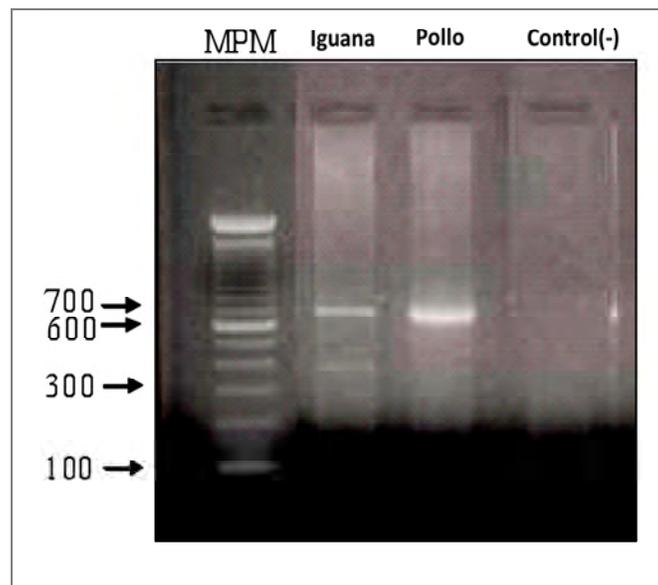


Figura 20.- Amplificación del ADNc de GH de iguana verde. Como control positivo se amplificó el ADNc de la GH de pollo. La corrida se llevo a cabo en un gel de agarosa al 1.5% sobre amortiguador TAE a 80 V.

Los plásmidos confirmados positivamente con el inserto fueron secuenciados en la Unidad de Proteogenómica del Instituto de Neurobiología, UNAM, con el oligonucleótido universal T7. Se obtuvieron 3 secuencias que fueron alineadas con el programa ClustalW (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/clustalw/>) identificando variaciones puntuales en 3 posiciones de la secuencia. Estas variaciones fueron corregidas usando el criterio en el que la base correcta es la que aparece en dos secuencias diferentes.

Se obtuvo una secuencia del ADNc de GH de iguana verde de 658 pb. A partir de ésta se diseñaron oligonucleótidos específicos (*igGHRACEf1*; *igGHRACEf2* – *igGHRACEr1*; *igGHRACEr2*) para, mediante RACE, amplificar los extremos 5' y 3'. Con esta técnica se logró amplificar a dos fragmentos de 75 pb y 283 pb, respectivamente. Las secuencias fueron editadas y se obtuvo una secuencia total del ADNc que codifica para la GH de iguana verde de 1016 pb con el codón de inicio y de término en las posiciones 1 y 657, respectivamente, y presenta la señal de poliadenilación AATAAA en la posición 963-968. El marco de lectura abierto consta de 657 pb que codifican para una proteína de 218 aminoácidos de los cuales 27 forman parte del péptido señal y 191 conforman la proteína madura y la secuencia proteínica presenta un sitio posible de glicosilación en la posición 216 a 218 (Figura 22).

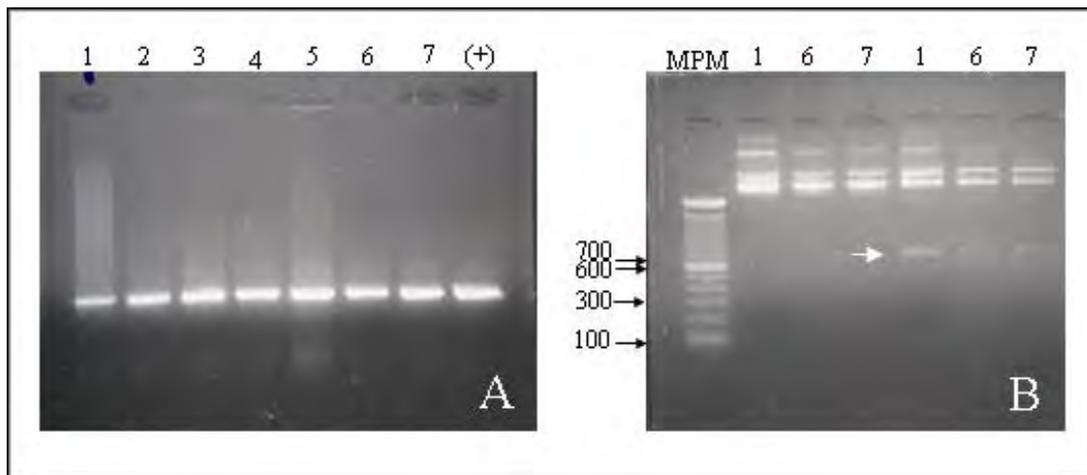


Figura 21.- Clonación del ADNc de GH de iguana verde. A) PCR de plásmidos purificados de las colonias aisladas. El número de la parte superior del gel corresponde a la colonia analizada. El control positivo (+) corresponde a una amplificación del ASDNc de GH de pollo; B) Digestión con la enzima de restricción EcoRI del plásmido purificado de las colonias 1 y 7. La flecha blanca indica el inserto liberado de aproximadamente 660 pb. Los tres primeros carriles corresponden a muestras de plásmido sin digerir.

La secuencia de aminoácidos deducida del ADNc de la GH de iguana verde fue alineada con la de pollo, cocodrilo, y tortuga. En todas las secuencias alineadas se conservan cuatro residuos de cisteína (señalados con flechas en la Figura 23). Las cuatro α -hélices descritas para las demás especies son muy similares a las propuestas para iguana donde existen sólo tres diferencias en aminoácidos en las hélices 1, 2 y 3, y una diferencia en la hélice 4. También se alinearon los 3 péptidos internos secuenciados mediante espectrometría de masas y se observa que en el primer péptido hay 3 aminoácidos diferentes respecto a la secuencia de aminoácidos deducida. El segundo y el tercer péptidos muestran 2 y 1 aminoácido diferentes, respectivamente. El porcentaje de similitud de la hormona del crecimiento de iguana verde respecto al de las otras especies se describe en la Tabla 4. En ella se observa que la mayor similitud de la GH de iguana es con la GH de tortuga, cocodrilo y pollo con 84, 83 y 81%, respectivamente.

Siguiendo el método de “neighbor joining” (N-J) y el modelo de número de diferencias en el software MEGA 4.0, se realizó un análisis filogenético con las secuencias de la proteína madura de la hormona del crecimiento de diferentes especies que representan a los diferentes grupos taxonómicos y se agruparon en un dendograma mostrado en la figura 24. En el dendograma se muestran grupos bien delimitados de los peces, anfibios, reptiles, aves y mamíferos (entre los que se incluye a los roedores, rumiantes y primates). En relación a la GH, la iguana verde se encuentra en una rama intermedia entre las aves y otros grupos de reptiles (el grupo de los cocodrilos y el grupo de las tortugas) sugiriendo una relación de transición entre estos dos grupos taxonómicos. La longitud de los brazos del árbol corresponde a la distancia genética expresada como número de cambios por unidad de tiempo.

Debido a que la hormona del crecimiento ejerce sus efectos a través de la unión a su receptor, se clonó molecularmente una secuencia parcial del ADNc que codifica para el receptor a hormona del crecimiento de iguana verde. Mediante PCR se logró amplificar un fragmento de 750 pb que fue secuenciado y editado para su análisis. El fragmento amplificado codifica para una proteína que consta de 250 aminoácidos y, de acuerdo a un alineamiento con el receptor a GH de otras especies, corresponde a la región extracelular y transmembranal del receptor (164 y 24 aa, respectivamente). Al analizar la secuencia para dilucidar los posibles dominios presentes se encontró un dominio de fibronectina III, característico del receptor a hormona del crecimiento. Se identificaron 3 sitios consenso de glicosilación en las posiciones 18-21, 59-62 y 13-106.

También se identificó una secuencia de 4 aminoácidos en la posición 45-48 denominada “caja b” (del inglés “box B”) asociada a la internalización del receptor (Figura 25).

```

atcgatccatgggtcgacgggggggggggtttgtcaccctattaccctccacaatttttgagggggtattgaac -1
[atg] gct tca gta ctt agc cct tct cct cta ttc acc att gct ttg ttt atc ttg gcc 57
1  M  A  S  V  L  S  P  S  P  L  F  T  I  A  L  F  I  L  A
ctc caa tgg cct gag gga aca aca gct ttc ccc aca atg cct ctc tcc agt ctc ttt 114
20  L  Q  W  P  E  G  T  T  A  F  P  T  M  P  L  S  S  L  F
gcc aac gca gta cta aga gcc cag cat ctt cac ctg ctt gca acg gat acc ttc aag 171
39  A  N  A  V  L  R  A  Q  H  L  H  L  L  A  T  D  T  F  K
gaa ttt gaa cgc tcc tac atc cca gaa gac cag cga cag tcc aac aag aac tct cag 228
58  E  F  E  R  S  Y  I  P  E  D  Q  R  Q  S  N  K  N  S  Q
tct gca ttt tgt tcc tct gaa acc atc cct gca ccc aca ggg aaa gat gat gcc cag 285
77  S  A  F  C  S  S  E  T  I  P  A  P  T  G  K  D  D  A  Q
caa aaa aca gac atg gaa ttg ctc agg ttt tca ctc act ctc att cag tca tgg ctg 342
96  Q  K  T  D  M  E  L  L  R  F  S  L  T  L  I  Q  S  W  L
agt cct gta cag cac ctc agt aga atg ttc agt aat act ctg gtc ttt gga acg tca 399
115 S  P  V  Q  H  L  S  R  M  F  S  N  T  L  V  F  G  T  S
gac aga gtc tat gaa aaa ctt cag gac tta gaa caa gga ata cag gct ctg atg agg 456
134 D  R  V  Y  E  K  L  Q  D  L  E  Q  G  I  Q  A  L  M  R
gaa ctg gag gat ggg agc tct cgg ggc ctt caa ctc ttc aga cct act tat gag aag 513
153 E  L  E  D  G  S  S  R  G  L  Q  L  F  R  P  T  Y  E  K
ttt gaa tcc aac ctc cgg aat gaa ggt tcc ttg cag aaa aat tac ggt ctt ctg tcc 570
172 F  E  S  N  L  R  N  E  G  S  L  Q  K  N  Y  G  L  L  S
tgc ttc aaa aag gac ctg cac aag gtg gag aca tat ctg aaa gtg atg aaa tgc agg 627
191 C  F  K  K  D  L  H  K  V  E  T  Y  L  K  V  M  K  C  R
cat ttt gga gaa att aac tgc acc ata tga gggcagaaaagttttacctctccattgcctcactt +35
210 H  F  G  E  I  N  C  T  I  -
ttttgtgccatcttgacacctgctgaagtgaccgtgctgttgatccctctgctatgacctctgcaagcctgag +110
ccaagtcaagagcagtgactgcatttcctagctctgttgttttgaggaccttctatatataacccttgcatctgt +185
aaaaatatatgggcaattttccctctgaatAATAAAtctgtaagcctagccttatctgactgcaaaaaaaaaaaa +260
aaaagtcgaccatggatcgatg +283

```

Figura 22.- Secuencia nucleotídica y de aminoácidos deducidos del ADNc de GH de iguana verde. La secuencia subrayada corresponde al péptido señal que consta de 27 aminoácidos. En la posición -1 comienza la región 5' y en la 658 la 3' no traducible amplificadas mediante RACE 5' y 3'. Los oligonucleótidos con los que se amplificó están señalados en cursivas. En recuadro está señalado el codón de inicio, con un guión se señala el codón de término, y la señal de poliadenilación se señala con letras en negritas y en mayúsculas. La proteína madura consta de 191 aminoácidos y en recuadro sombreado se señala el sitio posible de glicosilación.

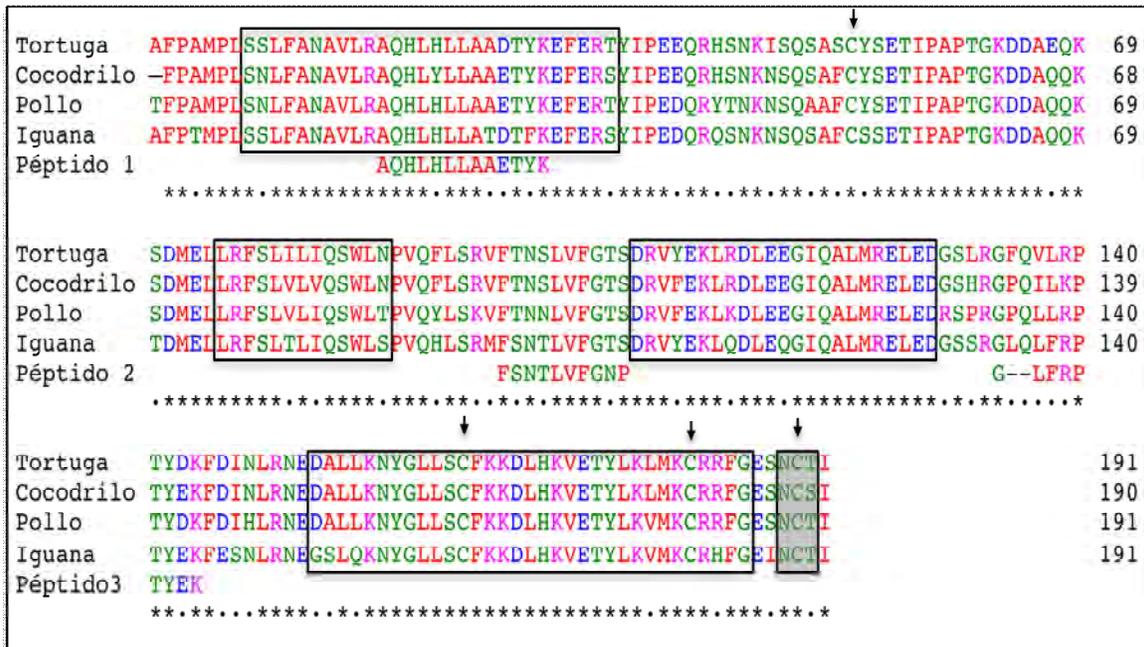


Figura 23.- Alineamiento de la secuencia de aminoácidos deducida del ADNc de GH de iguana verde (igGH) con la secuencia de GH de cocodrilo (crGH), tortuga (tGH) y pollo (cGH). Las flechas indican la posición de los residuos de cisteína conservados para las 4 secuencias. Los aminoácidos encerrados en los rectángulos corresponden a las α -hélices (de la 1 a la 4) de la hormona del crecimiento. El rectángulo sombreado corresponde a un sitio consenso de glicosilación. Los asteriscos bajo las secuencias corresponden a aminoácidos conservados en las GHs de las diferentes especies y los puntos corresponden a sustituciones entre secuencias. Los aminoácidos AVFPMILW (marcados en rojo) son hidrofóbicos; DE (azul), ácidos; RK (rosa), básicos y; STYHCNGQ (verde), hidroxil-amino básicos.

Tabla 4.-Porcentaje de similitud entre las secuencias de aminoácidos de la GH de diferentes especies.

| | Iguana | Cocodrilo | Tortuga | Pollo | Humano |
|-----------|--------|-----------|---------|-------|--------|
| Iguana | 100 | 82 | 84 | 81 | 55 |
| Cocodrilo | 82 | 100 | 93 | 89 | 59 |
| Tortuga | 84 | 93 | 100 | 88 | 60 |
| Pollo | 81 | 89 | 88 | 100 | 57 |
| Humano | 55 | 59 | 60 | 57 | 100 |

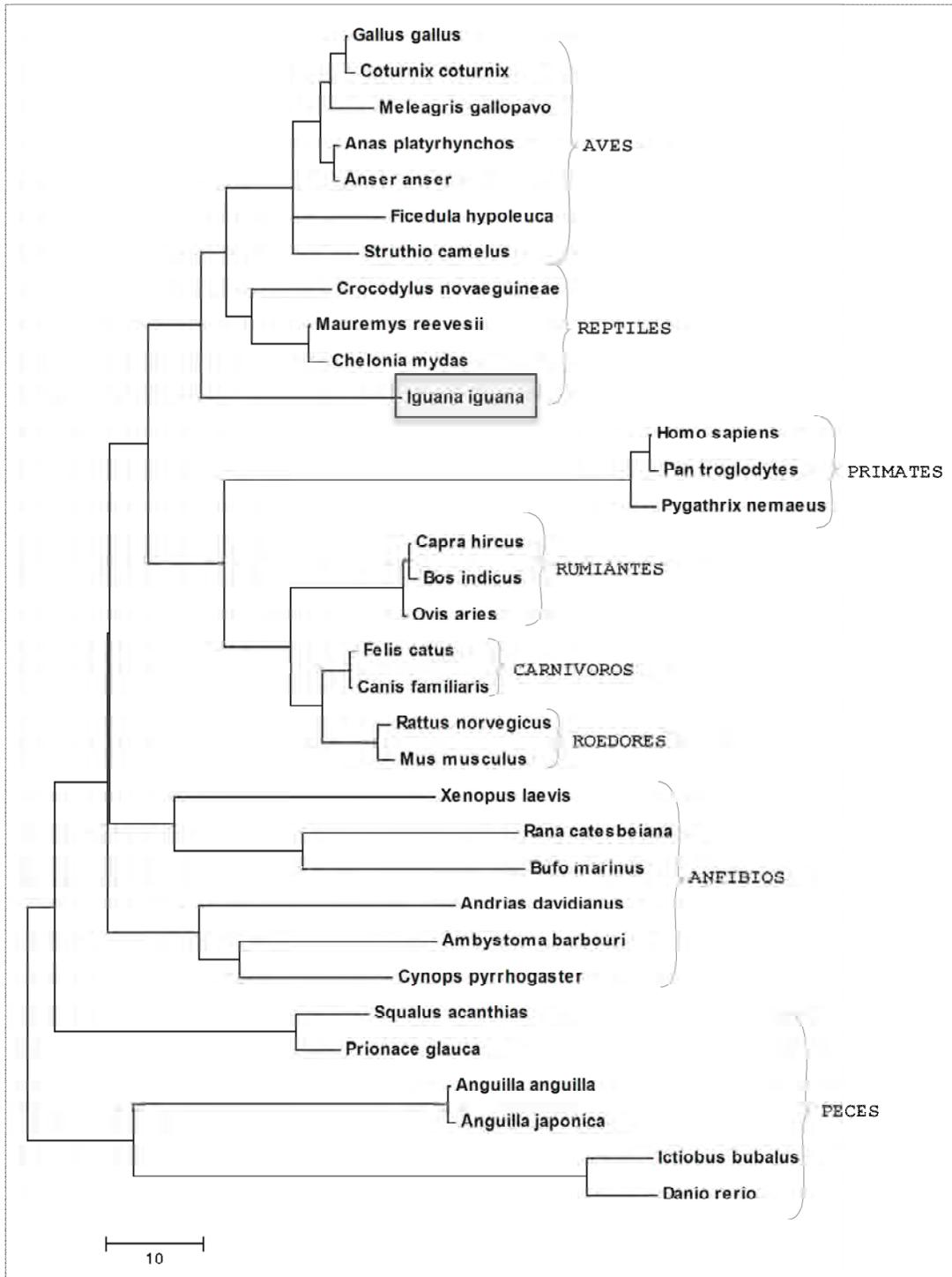


Figura 24.- Dendrograma generado con el método neighbor joining (N-J) usando las secuencias de la proteína madura de la hormona del crecimiento de diferentes especies que representan diversos grupos taxonómicos. La barra indica la distancia genética expresada como el número de aminoácidos diferentes entre secuencias.

```

    tgg aag gag tgt ccg gac tat gta act gct ggt gaa aac agc tgt tac ttc aac acc agc 60
1  W K E C P D Y V T A G E N S C Y F N T S
    tac acc tet gtt tgg gtt ccc tat tgc atc aag ctg ggt gac caa aac cag att tat gat 120
21 Y T S V W V P Y C I K L G D Q N Q I Y D
    gaa aaa tgt ctc cgt gtg gag gac ata gtg ata cca gac cct cct gtt caa ctc aac tgg 180
41 E K C L R V E D I V I P D P P V Q L N W
    act gta ctg aac acc agc cca ata ggc atc tat act gat atc cta gtg acc tgg aag cct 240
61 T V L N T S P I G I Y T D I L V T W K P
    cca ccc tet gca gat gtc aag aat gga tgg atc aca ctc atc tac cac ctc cag tat aga 300
81 P P S A D V K N G W I T L I Y H L Q Y R
    gaa gtc aat gag aca aaa tgg aac gag cgg gaa gca aag gac gcc aca aaa ttc cca gtg 360
101 E V N E T K W N E R E A K D A T K F P V
    tat gct ttg aag aca tgt cgt gat tat gaa ata cga gtc caa caa aag tct cag gag gtg 420
121 Y A L K T C R D Y E I R V Q Q K S Q E V
    ttt atg ggg agt tca gcg aag tac ttt atg ttt ctt ttg gtt caa tgg gac tgg tac cat 480
141 F M G S S A K Y F M F L L V Q W D W Y H
    gcg agg aag aat tcc aag ttc ctt ggc ctt tgg atg atg gcc ttt gga acc ctt ggc ctg 540
161 A R K N S K F L G L W M M A F G T L G L
    atg gtg atg cta tet ctg gtt ctc ttt tet aaa cag cag aag ttg aag ata ctg att ctt 600
181 M V M L S L V L F S K Q Q K L K I L E L
    cct cct gtt cca gta ccc aaa att aat ggc att gat cca gat ctc tta aag aaa gga aaa 660
201 P P V P V P K I N G I D P D L L K K G K
    ctg gat gaa gtc aat tcc atc tta gcc agt cat gga agc tac atg cca cag ctg tat ggg 720
221 L D E V N S I L A S H G S Y M P Q L Y G
    gat gac tet tgg gtc gag ttc atc gaa cta 750
241 D D S W V E F I E L

```

Figura 25.- Secuencia parcial del ADNc que codifica para el receptor de GH de iguana verde. La secuencia de ADNc consta de 750 pb que codifica para una proteína de 250aa. Las letras en minúsculas negritas y cursivas corresponde a los oligonucleótidos con los que se obtuvo el fragmento; en el recuadro blanco se muestra la secuencia correspondiente a la “caja B”; los recuadros sombreados indican sitios consenso de glicosilación; y las letras en mayúsculas y negritas corresponde a la región transmembranal del receptor. La secuencia subrayada indica el dominio de fibronectina III.

DISCUSION

En el presente trabajo se caracterizó por primera ocasión a la hormona de crecimiento de la iguana verde, un reptil del Orden Squamata. Inicialmente se evaluaron las herramientas necesarias para el estudio de esta hormona. Para ello se realizaron ensayos (Western blot y cuantificación de hormona del crecimiento por el método de ELISA) para determinar si los anticuerpos dirigidos contra la hormona del crecimiento de pollo eran capaces de reconocer a su homóloga en extractos hipofisarios de iguana. Los anticuerpos CAP-1 y C-1 fueron inicialmente caracterizados y estandarizados por Arámburo y cols. (1989b). A partir de este trabajo se concluyó que la concentración ideal de anticuerpo para que la GH de pollo fuera inmunorreconocida fue de 1:10,000. Esta concentración fue utilizada para estudiar si existía una proteína del mismo peso molecular en la hipófisis de iguana.

Mediante un ensayo de paralelismo se constató que el anticuerpo anti-cGH reconoce a la hormona del crecimiento, aunque con menor afinidad, ya que la curva obtenida en el ensayo para el extracto hipofisario de iguana fue paralela a la curva estándar de rcGH pero se desplazó 2.5 órdenes de magnitud. Esto significa que se necesitan 2.5 veces más, en escala logarítmica, de proteínas totales para que la GH de iguana sea reconocida adecuadamente. El anticuerpo utilizado es específico para GH de pollo y no presenta reactividad cruzada (<0.001%) con cualquier otra hormona hipofisiaria (Arámburo y cols. 1989b), por lo que se asume que si está reconociendo a la GH de iguana. La menor afinidad podría ser causa de las variaciones estructurales que existen entre las GHs de ambas especies. Esto se ha demostrado para la GH de otros reptiles: tortuga y cocodrilo, que presentan 89 y 90% de similitud con la GH de pollo respectivamente (Yasuda y cols., 1989; Noso y cols. 1995).

Mediante una tinción de hematoxilina y eosina, y basados en los estudios de Wingstrand (1966) y Saint-Girons (1970) se identificó a la hipófisis de iguana y se describieron tres estructuras bien identificadas: la adenohipófisis y la neurohipófisis separados por un lóbulo intermedio. Este último presenta una mayor proporción respecto al tamaño total de la glándula a diferencia de otros grupos taxonómicos, similar a lo reportado por Zuber-Vogeli y cols. (1979) en el lagarto *Uromastix acanthinurus* atribuyendo esto a la capacidad que tiene este lagarto de cambiar repentinamente de color. Un proceso similar ocurre en la iguana verde que se oscurece rápidamente para absorber más eficientemente el calor. Para llevar a cabo este proceso, en la piel de algunos reptiles (como la iguana) se encuentran células encargadas de la pigmentación de la

piel, los melanóforos; estas células se activan por la influencia de la hormona estimuladora de melanóforos (MSH) que se ha comprobado se sintetiza en el lóbulo intermedio del lagarto *Anolis carolinensis* (Taylor y Hadley, 1970). Esto podría explicar el desarrollo de este lóbulo en dichas especies. Asimismo, como se ha reportado para otros reptiles, la neurohipófisis de iguana verde está asociada a la eminencia media y rostralmente a esta última se encuentra el lóbulo tuberal que ha perdido su conexión con la adenohipófisis. Esta región glandular se puede dividir en región cefálica y región caudal, similar a lo reportado por Della Corte y cols. (1968), Milcou y cols. (1971) y Pearson y Licht (1973)

La distribución de los somatotropos dentro de la adenohipófisis difiere entre diferentes especies animales. Mientras que estas células pueden estar ampliamente distribuidas a lo largo de toda la adenohipófisis de mamíferos, en muchos otros vertebrados “menores” (en la escala filogenética) se concentran dentro de regiones específicas de la glándula (Watanabe, 1985). En peces la distribución de éstas células se restringe a la región proximal de la *pars distalis* en asociación con los gonadotropos (Toubeau y cols., 1991) mientras que en aves, más del 90% de los somatotropos están confinados al lóbulo caudal y el resto se ubican en la región ventral del lóbulo cefálico (Mikami y Takahashi, 1985). Una distribución similar se describe en el presente estudio en iguana verde en la que, mediante inmunohistoquímica usando el anticuerpo anti-cGH, se encontró la mayor marca inmunorreactiva en la región caudal de la adenohipófisis, mientras que en la neurohipófisis y en el lóbulo intermedio no se halló inmunorreactividad al anticuerpo, indicando una unión específica en aquella región. Estos resultados coinciden completamente con los reportados en otros reptiles (Doerr-Schott, 1976; y Mohanty y Naik, 1997) donde se concluye que los somatotropos están confinados a la región caudal de las especies estudiadas. De igual manera se describió la distribución de los lactotropos (secretores de prolactina) localizados en la región rostral de la adenohipófisis. Esta misma distribución fue reportada en trabajos realizados en tortuga *Geoclemis reevesi* (Mikami y cols., 1985), en el lagarto *Anolis carolinensis* (Naik y cols., 1980), y en la serpiente *P. Mucosus* (Mohanty y Naik, 1997) corroborando la marcada regionalización de estas células en este grupo de vertebrados.

En hipófisis de iguana verde se describe el típico agrupamiento de las células en cordones característico de un tejido glandular. Ultraestructuralmente se describen a los somatotropos de iguana verde como células con forma globular de aproximadamente 10 μm , con núcleo en la periferia rico en heterocromatina, un prominente nucleólo y el citoplasma lleno de gránulos

secretores de forma esférica u ovoide, de entre 250 y 300 nm de diámetro. Estas características coinciden con las descritas para la mayoría de las especies incluyendo lo reportado para el lagarto *Chalcides chalcides* (Ferrendino y cols., 2001). Los somatotropos fueron identificados mediante inmunohistoquímica, y aunque la inmureactividad al anticuerpo anti-cGH se encuentra primordialmente en los gránulos de almacenamiento de GH, y como lo reportan en otras especies (Harvey y cols., 1995) fuera de éstos también hay inmunorreactividad. Esto podría deberse a la síntesis de la GH en los ribosomas o al transporte de esta proteína en el aparato de Golgi por lo que el anticuerpo reconoce a esta proteína fuera de los gránulos. Además de la inmunorreactividad mencionada, y aunque en menor proporción, en gránulos de menor tamaño a los del promedio (menores a 200 nm) también hay inmunorreactividad presente. Esto podría ser consecuencia de la presencia de subpoblaciones de somatotropos que, aunque no se caracterizaron en el presente estudio, podrían existir, como se describió en el reptil *P. Mucosus* que presenta somatotropos con morfología variable (Mohanty y Maik, 1997). Estas subpoblaciones también han sido caracterizadas en rata, ratón y cabra, lo cual podría reflejar diferencias en la síntesis de hormona, edad de las células, diferencias en la cantidad de receptores para factores reguladores hipotalámicos, diferentes mecanismos de transducción de señales o diferencias en la maduración de las células hipofisiarias (Takahashi, 1991).

Hasta el momento se han realizado estudios que describen la distribución de los somatotropos en distintas especies. En la mayoría de ellos se ha utilizado la técnica de inmunohistoquímica con anticuerpos homólogos o heterólogos; monoclonales o policlonales y son pocos en los que se ha utilizado una técnica de alta especificidad y sensibilidad, la hibridación *in situ* (Herrero-Turrión, 2002). Debido a que en el presente estudio se utilizó un anticuerpo policlonal heterólogo para describir la distribución de los somatotropos, la síntesis de la hormona del crecimiento en estas células se corroboró mediante hibridación *in situ* usando una ribosonda específica. Con esto, se confirmó la distribución de los somatotropos en la región caudal de la adenohipófisis, siendo éste el primer reporte de la expresión de hormona del crecimiento restringida a la región caudal en la hipófisis de un reptil.

Los reptiles ocupan una posición central en la evolución de los tetrápodos. Al igual que en peces, la hipófisis en este grupo de vertebrados presenta una enorme diversidad anatómica existiendo formas evolutivamente más antiguas con características comunes a los anfibios y formas más recientes con características similares a las aves y mamíferos (Saint-Girons, 1970).

Las características morfológicas descritas para la hipófisis de iguana verde: neurohipófisis y adenohipófisis divididas por el lóbulo intermedio mayormente desarrollado, además de la pérdida de la conexión de la neurohipófisis y la adenohipófisis por el lóbulo tuberal, y aunado a la marcada regionalización de los tipos celulares como los somatotropos en la región caudal y los lactotropos en la región rostral de la adenohipófisis, ubican a la hipófisis de iguana verde entre las hipófisis más primitivas como los cocodrilos y tortugas y la de las aves, evolutivamente más recientes.

La hormona del crecimiento de iguana verde fue purificada mediante cromatografía de inmunoafinidad. El rendimiento de la purificación fue muy bajo en comparación con lo descrito por Berghman y cols. (1987). Estos autores, usando la misma técnica, obtuvieron un rendimiento de 20 μg por mg de hipófisis de pollo, mientras que en el presente estudio se obtuvo un rendimiento de 0.35 μg por mg de tejido. Esta diferencia en el rendimiento se debe probablemente a que el anticuerpo dirigido contra la GH de pollo reconoce a la GH de iguana pero de manera menos afín, como se observó en el ensayo de paralelismo realizado mediante ELISA. También puede deberse a que la cantidad de GH de iguana, en la edad en que se sacrificaron los animales podría ser menor, aunque hacen falta estudios para identificar los niveles de GH durante el desarrollo ontogénico en iguanas. Sin embargo, a pesar de la poca cantidad GH de iguana obtenida, ésta fue utilizada para los análisis bioquímicos que permitieron avanzar en su caracterización. La GH purificada se corrió en una electroforesis bidimensional, el punto inmunorreactivo en un western blot se cortó de un gel teñido con azul de comassie y fue secuenciado por espectrometría de masas. Mediante este análisis se identificaron 3 péptidos internos que, al alinearlos con las secuencias de GH de otras especies y por comparación de la similitud obtenida, se pudo corroborar que la proteína purificada correspondía a hormona del crecimiento.

La heterogeneidad molecular y funcional de las hormonas hipofisarias ha sido descrita en diferentes especies de vertebrados. Particularmente en la hormona del crecimiento se han identificado variantes tanto de masa como de carga. La purificación e identificación de la GH de iguana verde realizada mediante análisis electroforético SDS-PAGE y Western-blot mostró una banda mayoritaria de aproximadamente 26 kDa, y otra de mayor peso molecular, bajo condiciones reductoras, lo que sugiere que se trata de una forma agregada dimerica de la misma hormona. En la fracción no adsorbida en la columna de inmunoafinidad, la banda de 26 kDa

disminuyó. Sin embargo, la de alto peso molecular siguió siendo muy evidente. Esto puede ser resultado de una menor afinidad del anticuerpo por la GH dimérica que, probablemente, mantiene ocultos los epítopes debido a la conformación tridimensional que adquiere al agregarse. A diferencia de lo que se ha descrito para la GH de pollo (Arámburo y cols. 1999) en donde se ha reportado la presencia de una variante de menor peso molecular (15 kDa), la GH hipofisiaria de iguana verde no mostró variantes menores a los 26kDa. Sin embargo no se puede descartar la presencia de otras variantes de peso molecular en iguana verde ya que algunas de estas variantes, como la de 15kDa en pollo, se han descrito principalmente en etapas tempranas del desarrollo (Arámburo y cols. 1999). Además los tejidos extrahipofisarios son fuente de otras variantes de la GH, como la variante de 22 kDa generada en la placenta de primates (Forysth y Wallis, 2002) o las variantes moleculares caracterizadas en el sistema inmune, tejido neural y el aparato reproductor de pollo, atribuyéndoles un efecto autócrino-parácrino (Luna y cols., 2004; Luna y cols., 2005; Luna y cols., 2008; Rodríguez y cols., 2010; Alba y cols., 2010), mientras que en el presente estudio sólo se caracterizó a la hormona hipofisiaria.

En cuanto al punto isoeléctrico, se identificaron al menos 4 variantes de carga de la GH en extractos hipofisarios de iguana verde. Las variantes de carga se han descrito en otras especies de vertebrados, atribuyéndole estas variaciones a modificaciones postraduccionales como la acetilación, la desamidación, la glicosilación o la fosforilación (Baumann, 1988; Arámburo y cols., 1989; Arámburo y cols., 1991; Arámburo y cols., 1992; Berumen y cols., 2004). Esta última, se caracterizó como un proceso generador de variantes de carga en GH de pollo haciendo más ácida a esta hormona (Arámburo y cols. 1991), identificando variantes en un intervalo de 5.9 a 8.12 de punto isoeléctrico, de las que 2 presentaron diferente bioactividad en el metabolismo de lípidos (Arámburo y cols. 1990). Este intervalo es similar al que se describe en el presente estudio para la GH de iguana verde (6.2 a 7.4). Estos datos sugieren que la heterogeneidad molecular de esta hormona en la iguana podría reflejarse en una amplia diversidad funcional en dicha especie.

Mediante RT-PCR y RACE se amplificó el cDNA que codifica para la hormona del crecimiento de iguana verde. La secuencia obtenida, por primera ocasión para esta especie, tiene una longitud de 957 pb que codifica para una prohormona de 218 aminoácidos de los cuales se predice que 27 forman parte del péptido señal. Al alinear la secuencia de la proteína madura con la de tortuga, cocodrilo y pollo se encontró un 84, 83 y 81% de identidad, respectivamente

(Yasuda y cols. 1989; Noso y cols. 1995). En la secuencia permanecen conservados los 4 residuos de cisteína con los que se forman las asas grande y pequeña, características de esta hormona (Scanes y Campbell, 1995). En el extremo carboxilo terminal se encuentra el sitio consenso de glicosilación NCT que podría generar una variante molecular de mayor peso como se ha descrito en el pollo (Berumen y cols., 2004); sin embargo, en el análisis de western blot ésta no se visualizó, probablemente debido a que los métodos tradicionales de purificación de proteínas separan las variantes glicosiladas de las no glicosiladas, en fracciones autoexcluyentes (Sinha y cols., 1990). Además, se ha propuesto que las proteínas glicosiladas tienen menor afinidad por los anticuerpos utilizados rutinariamente y aunado a que el anticuerpo anticGH es menos afín a la GH de iguana, es probable que por eso no se visualice una variante glicosilada en extractos de hipofisarios de esta especie. Sin embargo, el análisis bioinformático de la secuencia de aminoácidos muestra varios sitios susceptibles de fosforilación, que se ve reflejado en las variantes de carga obtenidas mediante isoelectroenfoque.

Al alinear la secuencia de la proteína madura de diferentes especies (tortuga, cocodrilo, pollo e iguana) se observó que las secuencias correspondientes a las 4 α -hélices permanecen muy conservadas con 5, 2, 4 y 5 cambios de aminoácidos, respectivamente. Las sustituciones se ubicaron en las posiciones 8, 25, 26, 28 y 34; 74 y 81; 110, 114, 118 y 129; 153, 154, 178, 179 y 183 de las cuatro α -hélices, respectivamente. Sin embargo, los péptidos secuenciados por espectrometría de masas no son 100% idénticos con la secuencia de aminoácidos obtenida mediante la traducción del cDNA. Esto probablemente se deba al método con el cual fueron secuenciados los péptidos, ya que al presentar la muestra ligera contaminación con queratina el análisis de la secuencia se tuvo que realizar de forma manual. En otros estudios, se ha caracterizado, por ensayos de mutagénesis y describiendo la estructura del complejo GH-GHR mediante cristalografía de rayos X, que la hormona tiene dos sitios de unión a su receptor, formado un homodimero (Cunningham y cols., 1991). El sitio 1 de unión al receptor, en GH de humano, se encuentran en la región carboxilo del α -hélice 4 y en las posiciones 54-74, mientras que el sitio 2 incluye a las α -hélices 1 y 3 en las regiones amino y carboxilo, respectivamente (De Vos y cols., 1992). Estos sitios se mantienen muy conservados a lo largo de la escala filogenética, incluyendo la GH de iguana en la que el fragmento 54-74 del sitio 1 de unión al receptor sólo presenta una sustitución en la serina 74 por una treonina, ambos de carácter básico mientras que la región carboxilo de la α -hélice 4 se mantiene prácticamente igual.

Este estudio representa el primer reporte en el que se caracteriza el ADNc total que codifica para la hormona del crecimiento de una especie del Orden Squamata. En esta secuencia de nucleótidos se describe la señal de poliadenilación AATAAA en la posición 963-968, 219 nucleótidos después del codón de término de la transcripción, contrastando con lo reportado para pollo donde la señal de poliadenilación se encuentra sólo 70 pares de bases después del codón de término (Tanaka y cols., 1992), mientras que en tiburón espinoso (*Squalus acanthias*) se encuentra 308 pares de bases después (Moriyama y cols., 2008). Esto se debe a que, a pesar de que la región codificante para la hormona del crecimiento es muy conservada entre especies, las regiones no codificantes son las que presentan mayor variación.

Posteriormente, siguiendo el método Neighbor-Joining y ocupando la secuencia de la proteína madura como blanco, se realizó un análisis filogenético incluyendo la secuencia de 32 especies. En el dendograma generado se puede visualizar el agrupamiento de las especies coincidiendo con el grupo taxonómico en el que se han clasificado: peces, anfibios, aves, reptiles y mamíferos, entre los que se encuentran roedores, rumiantes, carnívoros y primates. Numerosos árboles filogenéticos con diversos métodos basados en la hormona del crecimiento han sido realizados y coinciden con el agrupamiento realizado en el presente estudio (Yasuda y cols., 1988; Noso y cols., 1995; Forshyt y Wallis 2002; Moriyama y cols., 2008). La relación filogenética de la hormona del crecimiento de una especie perteneciente al orden *squamata* (serpientes y lagartos) respecto a otras especies se analizó por primera vez en el presente estudio. Los resultados indican que la proteína se encuentra en la rama de las aves y reptiles; sin embargo, a pesar de pertenecer a la clase *reptilia*, no se agrupa con las tortugas y cocodrilos sugiriendo una diversificación después de tortugas y cocodrilos, pero antes de las aves. Resultados similares reportaron Blair y Poling (1999) al analizar la filogenia de reptiles basados en una secuencia de nucleótidos que codifican para 11 proteínas nucleares. Estos datos se pueden comparar con el porcentaje de identidad que hay entre las secuencias de GH de estas especies y se puede concluir que aunque la GH de iguana verde es más parecida a la de tortuga y cocodrilo, en esta especie se presentó una divergencia antes de las aves.

El receptor a hormona del crecimiento, a través del cual la hormona ejerce sus efectos ha sido bien caracterizado en numerosas especies. En el presente estudio se caracterizó una secuencia parcial de ADNc que codifica para un péptido de 250 aminoácidos. En la secuencia analizada se encontró un dominio transmembranal y un motivo (caja 2) necesario para la

internalización del receptor, que se ha reportado son muy conservados entre especies (De Vos y cols., 1992 ; Clackson y cols., 1998), incluso muy similar al de mamíferos (Govers et al., 1999). Sin embargo este motivo estructural en la mayoría de las especies es SVDE mientras que en iguana la serina (S) es sustituida por arginina (R). La misma sustitución se encontró en la culebra ratonera (*Elaphe quadrivirgata*) que pertenece también al orden *squamata* (Kawai, 2006. Datos no publicados; proteína con número de acceso AB266734.1) indicando una posible sustitución exclusiva de este orden. Además, en la secuencia analizada se encontraron 3 sitios consenso de glicosilación. Para poder estudiar a detalle la relación de GH y su receptor será necesario secuenciar el ADNc que codifique para la proteína completa.

Los resultados obtenidos en esta tesis aportan información acerca de la estructura tanto de la hormona de del crecimiento, como de las células y la glándula que la sintetiza y secreta en una especie perteneciente a un orden, *squamata*, en el que no se había descrito previamente la expresión y presencia de dicha proteína. Esto aporta información original acerca de la filogenia de la GH entre los vertebrados, particularmente relacionando a las aves con los diferentes órdenes de reptiles ubicando a la GH de iguana como un proteína entre la GH de aves, y la de cocodrilos y tortugas. De igual manera, estos resultados apoyan la hipótesis de que los cambios estructurales tienen un impacto en la diversidad funcional de la hormona, como consecuencia de su heterogeneidad molecular, resaltando y enfatizando la diferencias estructurales presentes entre especies que podrían reflejar la bioactividad específica en cada una de ellas. Para corroborar dicha hipótesis, futuros experimentos estarán encaminados a la caracterización del receptor de GH de iguana para correlacionar los cambios estructurales en ambas proteínas a lo largo de la filogenia. Además, los ensayos de bioactividad de la GH de iguana verde se realizarán aportando información del papel de esta hormona en este grupo de reptiles.

El trabajo realizado ha sentado las bases para continuar el estudio de la relación estructura/función de esta hormona en los vertebrados, principalmente entre los reptiles y las aves, y también ha generado herramientas moleculares que podrán ser utilizadas para intentar aplicarlas en el desarrollo de estrategias que impacten en el manejo pecuario de esta especie, la iguana verde, que tiene un creciente interés económico y alimenticio en algunas comunidades de nuestro país.

CONCLUSIONES

- El anticuerpo dirigido contra la hormona del crecimiento de pollo es capaz de reconocer a la GH de iguana verde, aunque con menor afinidad que a la GH de pollo.
- El análisis histológico mostró que la hipófisis de iguana verde se divide en neurohipófisis y adenohipófisis separadas por un lóbulo intermedio más desarrollado, en comparación con el de otras especies de vertebrados, incluyendo al humano.
- Los somatotropos encargados de expresar a la GH se ubicaron fundamentalmente en la región caudal de la adenohipófisis de iguana verde, mientras que en la región rostral se encontraron a los lactotropos que sintetizan a la prolactina.
- Los somatotropos de iguana verde miden aproximadamente $2.6 \times 10 \mu\text{m}$, y contienen gránulos de almacenamiento de GH con un diámetro promedio de 250-300 nm. Estas características son similares a las de somatotropos hipofisarios en otras especies de vertebrados.
- La forma monomérica de la hormona del crecimiento de iguana tiene un peso molecular de 26 kDa, cuando se analizó bajo condiciones reductoras en un sistema electroforético. En este estudio no fue posible identificar la presencia de variantes de masa.
- La hormona del crecimiento de iguana verde mostró, al menos, cuatro variantes de carga cuando se estudio por isoelectroenfoque.
- El ARN mensajero que codifica para la GH de iguana tiene una longitud de 658 nucleótidos, que codifican para una proteína de 218 aminoácidos de los que 27 corresponden al péptido señal y 191 a la proteína madura con un peso teórico de 21964.97 Da.

- La hormona del crecimiento de iguana presentó una similitud de 84, 83 y 81% con sus homólogas en tortuga, cocodrilo y pollo, respectivamente. El análisis filogenético realizado la ubicó entre las tortugas-cocodrilos y las aves.

LITERATURA CITADA

- Agellon L. B., Davies S. L., Lin C. M., Chen T. T. and Powers D. A. 1988. Rainbow trout has two genes for growth hormone. *Molecular Reproductive Development*. 1: 11-17
- Andersen O., Kimwele C., Aulie A. and Kanuit T. 1990. Effects of recombinant human growth hormone in juvenile Nile crocodiles, *Crocodylus niloticus*. *Comparative Biochemistry and Physiology*. 97:607-609
- Arámburo C., Cambphell R. M. and Scanes C. G. 1989a. Heterogeneity of chicken growth hormone (cGH). Identification of lipolytic and non-lipolytic variants. *Life Sciences*. 45: 2201-2207
- Arámburo C., Sánchez-García R., Fenton-Navarro B., Perera-Marín J. G. and Valverde-Rodríguez, C. 1989b. Desarrollo de un radioinmunoensayo homólogo y específico para la determinación de hormona del crecimiento de pollo (cGH). *Veterinaria Mexico*. 20: 397-405
- Arámburo C., Montiel J. L., Perera G., Navarrete S. and Sánchez R. 1990. Molecular isoforms of chicken growth hormone (cGH). Different bioactivities of cGH charge variants. *General and Comparative Endocrinology*. 80: 59-67
- Arámburo C., Navarrete S., Montiel J. L., Sánchez R. and Berghman L. R. 1991. Purification and electrophoretic analysis of glycosylated chicken growth hormone (G-cGH). Evidence of G-cGH isoforms. *General and Comparative Endocrinology*. 84: 135-146
- Arámburo C., Montiel J. L., Sánchez R., Perera G., Navarrete S., Carranza M., García-Moreno J. y Fenton B. 1993. La hormona del crecimiento de pollo: una familia de proteínas con diversidad molecular y funcional, *Memorias del Congreso Conmemorativo del Jubileo del Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM*. 483-499
- Arámburo C., Luna M., Carranza M., Reyes M., Martínez-Coria H. and Scanes C.G. 2000. Growth hormone size variants: changes in the pituitary during development of the chicken. *Proceedings of the Society of Experimental Biology and Medicine*. 223: 67-74
- Baumann G., Davila N., Shaw M. A., Ray J., Libhaber S. A. and Cooke N. E. 1991. Binding of human growth hormone (GH)-variant (placental GH) to GH-binding proteins in human plasma. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*. 73: 1175-1179

- Bendtsen J. D., Nielsen H., von Heijne G., and Brunak S. 2004. Improved prediction of signal peptides: SignalP 3.0. *Journal of Molecular Biology*. 340: 783-795
- Berghman L. R., Grauwels L., Vanhamme L., Proudman J. A., Foidart A., Balthazart J. and Vandesande F. 1992. Immucytochemistry and immunoblotting of avian prolactins using polyclonal and monoclonal antibodies toward a synthetic fragment of chicken prolactin. *General and Comparative Endocrinology*. 85: 346-357
- Berghman L. R., Van B., Decuyper E., Kühn E. R. and Vandesande F. 1988. One-Step purification of chicken growth hormone from a crude pituitary extract by use of monoclonal immunoabsorbent. *Journal of Endocrinology*. 118: 381-387
- Berumen L. C., Luna M., Carranza M., Martínez-Coria H., Reyes M., Cárabez A. and Arámburo C. 2004. Chicken growth hormone: further characterization and ontogenic changes of an N-glycosylated isoform in the anterior pituitary gland. *General and Comparative Endocrinology*. 139: 113-123
- Bouzinba S. H., Moulin S., Bournard S., Augier de Cre' miers C., Kelly P. A., and Finidori J. 2003. Autocrine growth hormone production prevents apoptosis and inhibits differentiation in C2C12 myoblasts. *Cellular Signaling*. 15: 615-623
- Bradford M M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*. 72: 248-254
- Casanueva F. F. 1992 Physiology of growth hormone secretion and action. *Endocrinology Metabolism Clinics of North America*. 21: 483-517
- Chuzhanova N. A., Krawczak M., Nemytikova L. A., Gusev V. D., and Cooper D. N. 2000. Promoter shuffling has occurred during the evolution of the vertebrate growth hormone gene. *Gene*. 254: 9-18
- Cooke N., Ray J., Emery J., and Liebhaber S. 1988. Two distinct species of hGH-variant mRNA in the human placenta predict the expression of novel growth hormone proteins. *Journal of Biological Chemistry*. 263: 9001-9006
- Cunningham B. C., Ultsch M., De Vos A. M., Mulkerrin M. G., Clauser K. R., and Wells J. A. 1991. Dimerization of the extracellular domain of the human growth hormone receptor by a single hormone molecule. *Science*. 5033: 821-825

- Dancasiu M., Cimpeanu L., Petrovici A., and Penea C. 1967. Ultrastructure de l'hypophyse d'*Emys orbicularis* male au tours du cycle annuel. *Revision of Endocrinology*. 5: 125-127
- Davidson M. B. 1987. Effect of growth hormone on carbohydrate and lipid metabolism. *Endocrinology Review*. 8: 115-131
- De Loof A., Schoofs L. and Vanden Broeck J. 1990. Molecular structures of some vertebrate-type Messenger peptides in invertebrates. *Progress in Clinical and Biological Research*. 342: 16-21
- De Vos A. M., Ultsch M., and Kossiacoff A. A: 1992. Human growth hormone and extracellular domain of its receptor: crystal structure of the complex. *Science*. 255: 306-312
- Della Corte F., Galgano M., and Angelini E. 1968. Ultrastructure Della pars distalis dell'ipofisis di *Lacerta simula* Raf. Nei maschi in attivita sesualeed in quelli Z. *zellforsch*. 90:96-615
- Eberhart N. L., Jiang S. W., Shepard A. R., Arnold A. M. and Trujillo M. A. 1996. Hormonal and cell-specific regulation of the human growth hormone and chorionic somatomammotropin genes. *Progress in Nucleic Acid Research and Molecular Biology*. 54: 127-163
- Fawcett D. W. 1995. Hipófisis. En: TRATADO DE HISTOLOGIA (Bloom y Fawcett, eds). McGraw/Hill. Ed 12. 17: 524-532
- Ferrandino I., Viscardi G. and Grimaldi M. C. 2001. An immunohistochemical study of the adenohypophyseal cells in the viviparous reptile *Chalcides chalcides*. *Journal of Histochemistry*. 33: 1-8
- Forbes S. H., Knudsen K. L., North T. W., and Allendorf F. W. 1994. One of two growth hormone genes in coho salmon is sex-linked. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 91: 1628-1631
- Forsyth I. A. and Wallis M. 2002. Growth hormone and prolactin, molecular and functional evolution. *Journal of Mammary Gland Biology and Neoplasia*.3: 291-312
- Frago L., Covadonga S. L., Dickson A. K., Hewson J. A. and Chowen J. A. 2002. Growth hormone (GH) and GH-releasing peptide-6 increase brain insulin-like growth factor-I expression and activate intracellular signaling pathways involved in neuroprotection. *Endocrinology*. 143: 4113-4122
- Gent J., van Kerkhof P., Roza M., Bu G., and Strous G. J. 2002. Ligand-independent growth hormone receptor dimerization occurs in the endoplasmic reticulum and is required for

- ubiquitin system-dependent endocytosis. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*. 99: 9858-9863
- Goffin V., Shiverick K. T., Kelly P. A. and Martial J. A. 1996. Sequence-function relationships with the expanding family of prolactin, growth hormone, placental lactogen and related proteins in mammals. *Endocrine Reviews* . 17: 385-410
- Harvey S.1993. The endocrinology of growth, developmental and metabolism in vertebrates. En THE ENDOCRINOLOGY OF GROWTH, DEVELOPMENT AND METABOLISM IN VERTEBRATES (M. P. Schreibman, C. G. Scannes y P. K. Pang, Eds). New York, Academic Press. 151-182
- Harvey S. 1995. Growth hormone synthesis. En: GROWTH HORMONE (S. Harvey, C. G. Scanes, W.H. Daughaday, Eds.) Florida, CRC Press Inc. 55-78
- Harvey S., Johnson C.D. and Sanders E.J. 2000. Extrapituitary growth hormone in peripheral tissues of early chick embryos. *Journal of Endocrinology*. 166: 489–502
- Herrero-Turrión M. J., Velasco A., Concepcion M., Duran R., Rodríguez R., Aijón J. y Lara J. 2002. Localización de los ARNm de los dos tipos de somatolactina, de la hormona del crecimiento y de la prolactina en hipófisis de dorada *Sparus auratus*. *Boletín del Instituto Español de Oceanografía*. 4: 229-238
- Holmes R. L and Ball J. N. 1974. The pituitary gland: a comparative account London and New York. Cambridge University Press,
- Isaksson O. G., Jansson J. O. and Gause I. A. 1982. Growth hormone stimulates longitudinal bone growth directly. *Science*. 216: 1237-1239
- Juárez E., Castro F, Guerra N., Resendez D., Martínez H., Barrer H. Y Kuri W.1999. Functional domains of human growth hormone necessary for the adipogenic activity of hGH/hPL chimeric molecules. *Journal of Cell Science*. 112: 3127-3135
- Junqueira L.C. 1988. *Histología básica*.. Editorial Salvat. 3ª Edición. México. pp 3-6
- Kansaku M., Hiyama G., Sasanami T. and Zadworny D. 2008. Prolactin and growth hormone in birds: protein structure and genetic variation. *The Journal of Poultry Science*. 45: 1-6
- Kopchick J. J and Andry J. M. 2000. Growth hormone (GH), GH receptor and signal transduction. *Molecular Genetics and Metabolism*.71: 293-314
- Lewis U. J. 1992. Growth hormone: What is it and what does it do?. *Trends in Endocrinology and Metabolism*. 4: 117-121

- Liberti J. P., Antoni B. A. and Chlebowski J. F. 1985. Naturally-occurring pituitary growth hormone is phosphorylated. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 128: 713-720
- Licht P. and Pearson A. K. 1969. Effects of adenohipophysectomy on testicular function in the lizard *Anolis carolinensis*. *Biology of Reproduction*. 1: 107-119
- Licht P. and Nicoll C. S. 1969. Localization of prolactin in the reptilian pars distalis. *General and Comparative Endocrinology*. 13: 526-535
- Luna M., Barraza N., Berumen L., Carranza M., Pedernera E., Harvey S. and Arámburo C. 2005. Heterogeneity of growth hormone immunoreactivity in lymphoid tissues and changes during ontogeny in domestic fowl. *General and Comparative Endocrinology*. 144:28-37
- Luna M., Huerta L., Berumen L., Martínez-Coria H., Harvey S. and Arámburo C. 2004 Growth hormone in the male reproductive tract of the chicken: heterogeneity and changes during ontogeny and maturation. *General and Comparative Endocrinology*. 137: 37-49
- Martens G. J. M. 1986. Expression of two proopiomelanocortin genes in the pituitary gland of *Xenopus laevis*: complete structures of the two pre-prohormones. *Nucleic Acids Research*. 14: 3791–3798
- Matsumoto A. and Ishii S. 1992. Atlas of endocrine organs of vertebrates and invertebrates. Alemania. Springer-Verlag Press. pp 307
- May D., Alrubaian J., Patel R., Dores R. M. and Rand- Weaver M. 1999. Studies on the GH/SL gene family: cloning of african lungfish (*Protopterus annectens*) growth hormone and somatolactin and toad (*Bufo marinus*) growth hormone. *General and Comparative Endocrinology*. 113: 121–135
- McKay S. J., Trautner J., Smith M. J., Koop B. F., and Devlin R.H. 2004. Evolution of duplicated growth hormone genes in autotetraploid salmonid fishes. *Genome*. 47: 714-723
- Mikami S. y Takahashi H. 1987. Immunocytochemical studies on the cytodifferentiation of the adenohipophysis of the domestic fowl. *Nippon juigaku zasshi. The Japanese Journal of Veterinary Science*. 4: 601-611
- Milcou S., Ionesco M. D., Cimpeanu L., Petrovici A. and Dancasiu M. 1971. Les types cellulaires de la pars distalis de l'hypophyse chez *Natrix natrix* *Revision of Endocrinology*. 5:365-369

- Niall H. D., Hogan M. L., Sauer R., Rosenblum I.Y. and Greenwood F.C. 1971. Sequences of pituitary and placental lactogenic and growth hormones: evolution from a primordial peptide by gene reduplication. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. U.S.A. 68: 866–870
- Noble G. K. and Bradley H. T. 1965. The relation of the thyroid and the hypophysis to the molting process in the lizard, *Hemidactylus brookii*. *Biological Bulletin*. 64: 289-298
- Noso T., Valentine A. and Kawauchi H. 1995. Complete aminoacid sequence of crocodile growth hormone. *General and Comparative Endocrinology*. 98: 244-252
- Oetting W. S., Tuazon P. T., Tragh J. A. and Walker A. M. 1986. Phosphorylation of prolactin. *Journal of Biological Chemistry*. 261: 1649-1652
- Ono M., Takayama Y., Rand-Weaver M., Sakata S., Yasunaga T., Noso T. and Kawauchi H. 1990. cDNA cloning of somatolactin, a pituitary protein related to growth hormone and prolactin. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. U. S. A. 87: 4330–4334
- Panigrhy G. K. and Patnaik B. K. 1975. Effect of somatotropin on the collagen contents of bone, cartilage and tendon in young male garden lizard. *Experimental Gerontology*. 10: 85-87
- Pantaleon M., Whiteside E.J., Harvey M.B., Barnard R.T., Waters M.J. y Kaye P.L. 1997. Functional growth hormone (GH) receptors and GH are expressed by preimplantation mouse embryos: a role for GH in early embryogenesis?. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. U.S.A. 94: 5125–5130
- Pearson A. K. and Licht P. 1973. Ultrastructure of the pars distalis of the lizard *Anolis carolinensis*, with special reference to the identification of the gonadotropic cell. *Zoological Zellforsch*. 137: 293-312
- Riley L.G., Hirano T. and Grau E.G. 2003. Effects of transfer from seawater to fresh water on the growth hormone/insulin-like growth factor I axis and prolactin in the tilapia, *Oreochromis mossambicus*. *Comparative Biochemistry and Physiology*. 236: 647-655
- Romeis, B. 1989. Mikroskopische technik. Urban u. Schwarzenberg: München Ed., Wien, Baltimore. pp 697
- Saint-Girons H. 1970. The pituitary gland. In: BIOLOGY OF THE REPTILIA (C. Gans y T. S. Parsons, Eds). London and New York. Academic Press. pp 135-199

- Santos C.R.A., Cavaco J.E.B., Ingleton P.M. and Power D.M. 2003. Developmental ontogeny of prolactin and prolactin receptor in the sea bream (*Sparus aurata*). *General and Comparative Endocrinology*. 132: 304–314
- Scanes C. G. 1995a. Growth hormone action: Lipid metabolism. En: GROWTH HORMONE (S. Harvey S., Scanes C. G. and Daughaday W. H., Eds.) Florida, CRC Press Inc. 379-388
- Scanes C. G. 1995b. Growth hormone action: Protein metabolism. En: GROWTH HORMONE (S. Harvey S., Scanes C. G. and Daughaday W. H., Eds.) Florida, CRC Press Inc. 389-392
- Scanes C. G. 1995c. Growth hormone action: Carbohydrate metabolism. En: GROWTH HORMONE (S. Harvey S., Scanes C. G. and Daughaday W. H., Eds.) Florida, CRC Press Inc. 18-19
- Scanes C. G. 1995d. Growth hormone action: Osmoregulation. En: GROWTH HORMONE (S. Harvey S., Scanes C. G. and Daughaday W. H., Eds.) Florida, CRC Press Inc. 415-422
- Scanes C. G. 1995e. Growth hormone action: Immune Function. En: GROWTH HORMONE (S. Harvey S., Scanes C. G. and Daughaday W. H., Eds.) Florida, CRC Press Inc. 407-414
- Scanes C. G. and Camphell R. M. 1995. Growth hormone chemistry. En: GROWTH HORMONE (S. Harvey S., Scanes C. G. and Daughaday W. H., Eds.) Florida, CRC Press Inc. 1-24
- Scanes C. G. and Daughaday W. H. 1995. Growth hormone action: Growth. En: GROWTH HORMONE (S. Harvey S., Scanes C. G. and Daughaday W. H., Eds.) Florida, CRC Press Inc. 347-350
- Stolar G., M. W., and Buchanan T. A. 1986. The metabolic clearance, distribution, and degradation of dimeric and monomeric growth hormone (GH): implications for the pattern of circulating GH forms. *Endocrinology*. 119: 1497-1501
- Sun Q., Hampson R. K. and Rottman F. M. 1993. *In vitro* analysis of bovine growth hormone pre-mRNA alternative splicing. Involvement of exon sequences and trans-acting factor(s). *Journal of Biological Chemistry*. 268: 15659-15666
- Takahashi S. 1991. Immunocytochemical and immuno-electron-microscopical study of growth hormone cells in male and female rats of various ages. *Cellular and Tissue Research*. 2: 275-284
- Toubeau G., Polive A., Baras E., Nonclercq D., De Morr S., Beckers J. F., Dessy-Doize C., and Heuson-Stiennon J. A. 1991. Immunocytochemical study of cell type distribution in the

- pituitary of *Barbus barbus* (Teleostei, Cyprinidae). *General and Comparative Endocrinology*. 83: 35-47
- Wallis M. 1992. The expanding growth hormone/prolactin family. *Journal of Molecular Endocrinology*. 9: 185–188
- Wallis M. 1996. The molecular evolution of vertebrate growth hormones: A pattern of near-stasis interrupted by sustained bursts of rapid change. *Journal of Molecular Evolution*. 43: 93–100
- Watanabe Y. G. 1985. An immunohistochemical study on the mouse adenohypophysis with reference to the spatial relationship between GH cells and other types of hormone-producing cells. *Anatomy and Embriology*. 3: 277-280
- Wingstrand K. G. 1966. Comparative anatomy and evolution of the hypophysis. In: THE PITUITARY GLAND: ANTERIOR PITUITARY (Harris G. W. and Donovan B. T., Eds.), Vol.1. , Berkeley. University of California Press. 58-126
- Yang B.Y., Arab M. and Chen T.T. 1997. Cloning and characterization of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) somatolactin cDNA and its expression in pituitary and non-pituitary tissues. *General and Comparative Endocrinology*.106: 271–280
- Yasuda A., Yamaguchi K., Papkoff H., Hirata T. and Kawauchi H. 1989. The complete amino acid sequence of growth hormone from the sea turtle. *General and comparative Endocrinology*. 73: 242-251
- Zhang X., Lu X., Jing N. and Zhu S. 2000. cDNA cloning and functional expression of growth hormone receptor from soft-shelled turtle (*Pelodiscus sinensis japonicus*). *General and Comparative Endocrinology*. 119: 265-275
- Zhao R., Muehlbauer E., Decuypere E. y Grossmann R. 2004. Effect of genotype nutrition interaction on growth and somatotropic gene expression in the chicken. *General and Comparative Endocrinology*. 136: 2-11

ANEXOS

Anexo 1.- Tinción de Hematoxilina-Eosina de Harris (Junqueira, 1988)

Soluciones

Hematoxilina de Harris

| | | |
|-----------------------------|----------|--------------|
| Hematoxilina en polvo | 5g | 0.5g |
| Alcohol absoluto | 50ml | 5ml |
| Alumbre de potasio y amonio | 100g | 10g |
| Agua destilada | Aforar a | 1000ml 100ml |
| Óxido rojo de mercurio | 2.5g | 0.25g |

- Disolver la hematoxilina en alcohol y el alumbre en el agua caliente
- Retirar del fuego y mezclar las soluciones poniéndolas a hervir rápidamente con agitación por 1 min.
- Retirar del fuego y agregar al óxido rojo de mercurio lentamente. Volver a calentar hasta que tome un color morado oscuro, retirar del fuego y enfriar sobre hielo.
- El colorante está listo para ser usado en cuanto se enfría agregando de 2-4 ml de ácido acético glacial por cada 100 ml de solución de hematoxilina. Filtrar antes de usar.

Eosina, solución concentrada al 1%

| | |
|----------------------------|------|
| Eosina "Y" soluble en agua | 1g |
| Agua destilada | 20ml |
| Alcohol del 96% | 80ml |

Eosina solución de trabajo (preparar cuando se va a usar)

| | |
|--------------------------------------|-----------------------|
| Solución concentrada de eosina al 1% | 25ml |
| Alcohol al 80% | 75ml |
| Ácido acético glacial | 500ul/100ml de eosina |

Alcohol ácido

| | |
|-------------------------------|--------|
| Alcohol al 70% | 1000ml |
| Ácido clorhídrico concentrado | 10ml |

Agua amoniacal

| | |
|---------------------------------|--------|
| Agua destilada | 1000ml |
| Hidróxido de amonio concentrado | 10ml |

Los cortes montados en el portaobjetos se desparafinan con el siguiente procedimiento en cajas coplin, en intervalos de 5 min cada uno.

Procedimiento

Desparafinar con: Citri-solve 1

Citri-solve 2

Rehidratación:

CH₃CH₂OH absoluto 1

CH₃CH₂OH absoluto 2

CH₃CH₂OH 96% 1

CH₃CH₂OH 96% 2

CH₃CH₂OH 70%

CH₃CH₂OH 70%

CH₃CH₂OH 50%

H₂O

Eliminación del Mg⁺²

Lugol 1

Lugol 2

Eliminación del I

Na₂S₂O₃ 5%

H₂O

Tinción

- H₂Odd 1 min
- Hematoxilina en caja coplin vertical 25 min
- Lavar con H₂Odd 1 min, con agitación
- Diferenciar rápidamente en alcohol acidulado, 10-80% (10%: 210 ml EtOH+30 ml HCl+60 ml H₂Odd).
- Lavar con H₂Odd 1 min en agitación
- Virar en agua amoniacal (5 baños repetidos, cambio a color azul)
- Introducir a eosina por menos de 5 seg
- Lavar en H₂Odd por 1 min
- Montar o dejar en H₂Odd

Montar con resina (entellan)

Deshidratar en serie de alcoholes 50%, 60%, 70%, 96%, 100%, 100%, alcohol-xilol, xilol, no dejar más de 1 min en cada dilución, después del último paso colocar una gota de resina y acomodar el cubreobjetos para que el entellan se distribuya por capilaridad. Dejar secar, preferencia menos de 20h.

Anexo 2.- Inmunohistoquímica

Soluciones

Amortiguador salino de tris (TBS) 10X

| | | |
|-----------|--------|------|
| Tris | 12 g | 20mM |
| NaCl | 90 g | |
| Timerosal | 0.04 g | |

Adicionar 900ml de H₂Odd , mezclar, ajustar el pH a 7.6 y aforar a 1L. Guardar a 4°C, utilizarlo diluido 1X (50ml de stock +450ml H₂Odd, adicionar 5ml tritón X100).

Amortiguador-sustrato de tris (TB) 10X

| | | |
|-----------|--------|------|
| Tris | 60.5g | 50mM |
| Timerosal | 0.04 g | |

Adicionar 900ml de H₂Odd , mezclar, ajustar el pH a 7.6 y aforar a 1L. Guardar a 4°C, utilizarlo diluido 1X (50ml de stock +450ml H₂Odd).

Lugol

| | |
|----------------|------|
| KI | 10 g |
| I ₂ | 5 g |

Mezclar en 1L H₂Odd toda la noche, hasta que se disuelva

Solución de tiosulfato de sodio

Na₂S₂O₃ 5 g+ 100 ml de H₂Odd

Exposición de epítopes (opcional)

Incubación por 20 min en buffer de citratos 10 nM, 0.05% Tween 20 a pH 6, manteniendo una temperatura de 80°C o más.

1er Ac CAP-1 1:200, 2do Ac 1:200 anti igG de conejo hecho en cabra acoplado a peroxidasa de rabano.

Procedimiento

- Preparar preabsorbido: 1:500

100 µg de rcGH + 1 µl de CAP-1 en 250 µl de TTBS con leche al 1%, agitar toda la noche a temperatura ambiente y llevar a 500 µl de TTBS con leche al 1%.

- Se desparafina con el método del anexo 1

Baños en cajas coplin de 5 min c/u

- Exposición de epítopes, 20 min en citratos
- Enjuagar secciones con TBS (menos de 100ml)
- Bloqueo de receptor de peroxidasa endógena: Incubar los cortes con sol. de H₂O₂ al 1% en TBS (3 ml H₂O₂ al 30% + 90 ml TBS 1X). 1 hora
- Lavados con TBS 5-10 min, 3 ocasiones
- Bloqueo de sitios inespecíficos de 1er.Ac: Incubar los cortes con solución de leche descremada al 5% en TBS 1X (5 g leche+100 ml TBS). 1 hora
- Lavados con TTBS 1X, 5-10 min, 3 ocasiones. Evitar secado de laminillas
- Transferir las laminillas a una cámara húmeda (recipiente, pipetas de plástico, trozos de papel, H₂O, burbuja para equilibrar) cuidando cortes hacia arriba, asegurarse de que las laminillas no toquen los bordes de la cámara ni se toquen entre ellas.
- Incubar toda la noche a temp ambiente, las laminillas con Sol 1er Ac: Diluir el 1er. Ac título 1:500 en leche al 1% en TTBS (1g leche+100ml TTBS 1X). 28 µl 1er Ac (Cap1)+6.972 ml, alcanza aprox 10 laminillas.
- Conservar laminilla para control y otra para preabsorbido: (-) incubar con TTBS toda la noche
- Preabsorbido: Adicionar 500 µl del Ac/laminilla preabsorbido, incubar igual que las demás laminillas.
- Lavados con TTBS 1X, 10-15 min, 3 ocasiones. Retirar exceso por un extremo con pedazo de papel.
- Incubar 2 horas con Sol 2do. Ac: Diluir el 2do. Ac (α -IgG acoplado a peroxidasa-rábano hecho en cabra) título 1:200 en TTBS con leche al 1%.
- El control (-) no lleva 2do. Ac, preabsorbido si

- Lavados con TTBS 1X, 10-15min, 3 ocasiones. Retirar exceso por un extremo con pedazo de papel.
- Lavar las laminillas con TB 1X (amortiguador de sustrato, TB 1X) 10 min.
- Sol del sustrato (TB 1X) 500 μ l/placa: (0.0018g DAB+1 ml en tubo eppendorf) +14ml TBS 1X+2 μ l H₂O₂ al 3% (alcanza para 30 laminillas), se puede adicionar sulfato de niquel para dar mayor contraste en la tonalidad de la marca, incubar 20-35 min para hipófisis sólo 10 min.
- Detener la reacción de DAB con H₂O₂, varios lavados.
- Observar al microscopio de luz marcaje, sin que se sequen las laminillas.

Montar con resina (entellan)

Deshidratar en serie de alcoholes 50%, 60%, 70%, 96%, 100%, 100%, alcohol-xilol, xilol, no dejar más de 1 min en cada dilución, después del último paso colocar una gota de resina y acomodar el cubreobjetos para que el entellan se distribuya por capilaridad. Dejar secar, preferencia menos de 20h.

Anexo 3.- Hibridación *in situ*

Soluciones

H2O DEPC 0.1%

Dietyl Pirocarbonato 3mL

Depositar los el DEPC en agua desionizada estéril, aforar a 3 L y dejar en agitación toda la noche. Esterilizar.

Solución TEA (Trietanolamina 0.1M)

Trietanolamina 9.285g

Disolver en 400mL de agua DEPC, ajustar pH a 8 y aforar a 500mL.

20XSSC

NaCl 175.32g

Citrato de Sodio 88.23g

Disolver en 900mL de agua DEPC, ajustar pH a 7 y aforar a 1L

2XSSC

20XSSC 150mL

Aforar a 1.5L con agua DEPC

0.1XSSC

20XSSC 2.5mL

Aforar a 500mL con agua DEPC

PBS DEPC

NaCl 28.8g

Na₂HPO₄ 5.92g

KH₂PO₄ 1.72g

Disolver las sales por separado en agua desionizada. Mezclar las sales disueltas y aforar a 4L. Un día antes de usarse agregar 4mL de DEPC, agitar toda la noche, esterilizar.

Amortiguador de ácido maleico

Acido maleico 11.607g

NaCl 8.766g

Ajustar pH a 7.5 con NaOH sólido (aproximadamente 7g) y aforar a 1L con agua DEPC.

Solución de bloqueo 10X

Blocking reagent (Roche) 5g

Amortiguador de ácido maleico ajustar a 50mL

Se prepara en fresco. Disolver, calentar 15 minutos (sin hervir) y esterilizar.

Amortiguador 1

Tris-HCl 15.76g

NaCl 8.77g

Ajustar pH a 7.5 y aforar a 1L con agua DEPC

Amortiguador 2

Tris-HCl 15.76g

NaCl 8.77g

MgCl₂ 10.165g

Ajustar pH a 9.5 y aforar a 1L con agua DEPC.

Proteinasa K

Se prepara con soluciones ya listas.

Solución 1 Tris 6.06g

Ajustar pH a 8 y aforar a 100mL con agua desionizada.

Solución 2 CaCl₂ 7.351g

Disolver y aforar a 100mL con agua desionizada.

El amortiguador de proteinasa K se prepara con 25mL de la solución 1, 2.5mL de la solución 2 y se afora a 50mL con agua desionizada.

Solución de paraformaldehído

Paraformaldehído 4g

Aforar a 100mL con PBS-DEPC, calentar por 1 hora y enfriar en hielo.

Tris (1M)

Tris 61g

Disolver en agua DEPC, ajustar pH a 8 y aforar a 500mL.

Na₂EDTA (0.5M)

Na₂EDTA 2H₂O 186.12g

Disolver en agua desionizada, ajustar pH a 8 y aforar a 1L

Amortiguador TE

Tris 1M 10mL

Na₂EDTA (0.5M) 2mL

Heparina

Heparina 0.01g

Disolver en 10mL de agua DEPC

Solución de hibridación

Formamida desionizada 5mL

20XSSC 2.5mL

Heparina stock 500 μ L

Solución de bloqueo 2mL

tRNA 2.5mg

Procedimiento

Desparaafinar. Incubar las laminillas en las siguientes soluciones

- Citrisolve 5min
- Citrisolve 5min

- Citrisolve 5min
- Etanol 100% 5min
- Etanol 100% 5min
- Etanol 95% 2min
- Etanol 70% 2min
- Etanol 50% 2min
- Agua DEPC 2min

Tratamiento contra RNAsas. Incubar con las siguientes soluciones.

- PBS-DEPC 5min
- PBS-DEPC 5min
- PBS-DEPC+50 (L DEPC 15min
- PBS-DEPC+50 (L DEPC 15min

Tratamiento con Proteinasa K. Incubar con las siguientes soluciones.

- Solución de proteinasa K 10min a 37°C
- PBS-DEPC 5min
- PBS-DEPC 5min
- PBS-DEPC 5min

Post-fijación. Incubar con las siguientes soluciones.

- PFA 4% 10min
- PBS-DEPC 5min
- PBS-DEPC 5min
- PBS-DEPC 5min

Acetilación. Incubar con la siguientes soluciones.

- TEA 0.1M, 0.25% anh. Acético 10min
- PBS-DEPC 5min
- PBS-DEPC 5min
- PBS-DEPC 5min

Prehibridación. Incubar con las siguientes soluciones

- 2XSSC, 50% formamida 45min a 60°C

- Preparar dos recipientes para la hibridación colocando 50mL de la solución 5XSSC en el fondo y sobre de el una base para las laminillas.
- Preparar diluciones de las sondas (1:200 regularmente).
- Desnaturalizar las sondas a 80°C por 5 minutos y colocarlas en hielo 2 minutos.
- Colocar en cada laminilla 200 μ L de la sonda.
- Cubrir con un trozo de parafilm asegurándose de que cubra todo el tejido.
- Incubar en el horno de hibridación a 60°C de 12-16 horas.

Realizar lavados de las laminillas con las siguientes soluciones.

- 2XSSC 10min
- 2XSSC, 50% Formamida 45min a 45°C
- 2XSSC 15min
- 2XSSC 15min
- 2XSSC 15min
- 2XSSC 15min a 37°C
- 0.1XSSC 60min a 60°C

Para la detección de la sonda se incuban las laminillas en las siguientes soluciones.

- Amortiguador 1 5min
- Solución del anticuerpo (Anti DIG, dil 1:2000) por 2hrs
- Amortiguador 1 15min
- Amortiguador 1 15min
- Amortiguador 2 5min
- Solución NBT/BCIP hasta que se comience a ver la marca positiva
- Amortiguador TE 5min
- Amortiguador TE 5min
- PBS 5min
- PBS 5min
- PBS 5min

Las laminillas se montan con Crystal Mounting asegurándose que no queden burbujas y se observan al microscopio

Anexo 4.- Cromatografía de inmunoafinidad

Soluciones

Amortiguador e bloqueo

Glicina 1.5M, NaCl 3M pH 8

Glicina 56.30g

NaCl 87.66g

Disolver en 400ml de agua desionizada. Ajustar y aforar a 500mL

Amortiguador A (carga)

Tris-HCl 50mM, NaCl 150mM pH 7.6

Tris 6.06g

NaCl 877g

Agregar 900mL de agua desionizada estéril mezclar, ajustar pH y aforar a un litro

Amortiguador B (elusión)

Glicina 50mM, NaCl 150mM pH 3

Glicina 1.88g

NaCl 4.38g

Disolver en 450 mL de agua desionizada, ajustar pH y aforar a un litro

Amortiguador de neutralización

Tris-HCl 3M pH 8

Tris 3.03g

Disolver en 450 mL de agua desionizada estéril, mezclar, ajustar pH y aforar a 500mL. Guardar a 4°C

Procedimiento

Preparación del inmunoadsorbente

- Preparar 1g de sefarosa 4B activada con BrCN (3.5mL de gel hinchado)

- Hincharla en HCl 1mM lavarla con 200mL de HCl/g de sefarosa (en etapas), utilizando una manguera de vacío con trampa. El último lavado realizarlo con amortiguador de acoplamiento (fosfatos 50mM, NaCl 0.5M, pH 7.6)
- Montar en una columna cónica de 0.8x4cm con capacidad de 2ml para lecho y 10 mL eluyente.
- Después de que la resina alcance el pH de 7.6 incubarla con 18mL del anticuerpo purificado agitando a temperatura ambiente durante tres horas. Colectar el líquido en una probeta de 100mL de leer la D.O. contra el amortiguador de acoplamiento como blanco. Calcular la eficiencia de acoplamiento.
- Bloquear los sitios que no reaccionaron con amortiguador pH 8 (1.5M Gly, 3M NaCl, pH 8). Agitar toda la noche a temperatura ambiente.
- Lavar la columna con amortiguador A hasta que el eluido alcance el pH del amortiguador. Después lavar con amortiguador B hasta alcanzar el nuevo pH. Completar este ciclo 3 veces.
- Dejar sedimentar la columna parando la agitación durante 1.5 horas aproximadamente. Abrir y recolectar el amortiguador. Posteriormente continuar lavando como sigue: agregar amortiguador B hasta que el eluido tome el pH del amortiguador. Repetir estos lavados 3 veces.
- Dejar en amortiguador de cargado. El inmunoabsorbente ya esta preparado en un volumen de 3.5mL

Cromatografía

- Aplicar la muestra (sobrenadante neutralizado) en la columna.
- Recolectar en tubos vacutainer, pasando este eluido dos veces por la columna (con el objeto de que se pegue la mayor cantidad posible de hormona a la resina). Posteriormente lavar la columna con amortiguador A (aproximadamente 10 volúmenes).
- Eluir con amortiguador B. Recolectar alícuotas de 1mL en tubos que contengan amortiguador de neutralización.
- Juntar las fracciones de mayor absorbancia a 280nm y dializarlas. Se pueden concentrar usando una membrana spectrapor 3vs PEG 8000 al 20% y posteriormente con agua milliQ.
- Reconstituir la columna con los tres ciclos de lavado descritos anteriormente.

Anexo 5.- SDS-PAGE y Western Blot

Soluciones

Solución A – Acrilamida (30% T, 2.67% C)

30% acrilamida; 0.8 bis-acrilamida

| | |
|-----------------------------|----------------|
| Acrilamida | 30g |
| N’N’-bis-metilem-acrilamida | 0.8g |
| Agua desionizada | Aforar a 100mL |

Disolver y filtrar con papel Whatman No. 1 y conservar a 4°C

Solución B Amortiguador para el gel resoledor

1.5M Tris-HCl, pH 8.8

| | |
|-----------|--------|
| Tris-base | 18.17g |
|-----------|--------|

Disolver en agua desionizada, ajustar pH a 8.8 con HCl, aforar a 100mL y conservar a 4°C

Solución C Amortiguador del gel concentrador

0.5M Tris-HCl, pH 6.8

| | |
|-----------|-------|
| Tris-base | 6.06g |
|-----------|-------|

Disolver en agua desionizada, ajustar pH a 6.8 con HCl, aforar a 100mL y conservar a 4°C

Solución D SDS 10%

| | |
|-----|----|
| SDS | 5g |
|-----|----|

Aforara a 50mL y conservar a 4°C

Solución F Amortiguador de corrida 5X, pH 8.3

| | |
|-----------|-------|
| Tris-base | 7.55g |
|-----------|-------|

| | |
|---------|-----|
| Glicina | 36g |
|---------|-----|

| | |
|-----|------|
| SDS | 2.5g |
|-----|------|

Disolver y aforar a 500mL, almacenar a 4°C. No ajustar pH

Persulfato de amonio 10%

Persulfato de amonio (PSA) 10mg

Disolver en 1mL de agua. Preparar en fresco.

Amortiguador de transferencia

Tris 25mM, glicina 192mM, metanol 20%, pH 8.3

Tris 9.09g

Glicina 43.2g

Disolver en 1L de agua desionizada y agregar 600mL de metanol.

Aforar a 3L con agua desionizada y almacenar a 4°C

Amortiguador salino de tris (TBS) 5X

Tris 100mM, NaCl 2.5M, pH 7.5

Tris 12.11g

NaCl 146.1g

Disolver en 900mL de agua desionizada, ajustar pH a 7.5, aforara a 1L y almacenar a 4°C

Solución de bloqueo

Leche descremada en TBS 5%

Leche descremada 5g

TBS 1X 100mL

Solución de lavado

TTBS, pH 7.5

Agregar 450µL de tween 20 a 900mL de TBS 1X

Solución para anticuerpo

Leche descremada 1% en TTBS

Procedimiento

SDS-PAGE

- Limpiar los vidrios con solución amoniacal al 10% o con alcohol para quitar la grasa ya que ésta impide la polimerización de la poliacrilamida.
- Atemperizar las soluciones metiendo los frascos en un baño de agua tibio. Colocar el ensamblador en la cuneta de la torre con las pestañas hacia arriba, tornillos hacia atrás, empujar con la placa de plástico los separadores hasta que se encuentren en los extremos del ensamblador totalmente verticales; con el acrílico transparente presionar el ensamblado y apretar los tornillos superiores.
- Verificar la alineación y apretar tornillos inferiores, acomodar los ensambles en la torre presionar el acrílico del ensamble sobre el hule hasta que se inserte el ensamble en la pestaña de la torre (45 grados empuje arriba y atrás).

Gel revolvedor o separador

Gel concentrador

| | 7.5% | 10% | 12% | 15% | | 4% |
|--------------------|---------|---------|---------|-----------|--------------------|---------|
| H ₂ Odd | 4.85 ml | 4.35 ml | 3.35 ml | 2.35 ml | H ₂ Odd | 3.05 ml |
| Solución B | 2.5 ml | 2.5 ml | 2.5 ml | 2.5 ml | Solución B | 1.25 ml |
| Solución A | 2.5 ml | 3.0 ml | 4.0 ml | 5.0 ml | Solución A | 0.65 ml |
| | DESGASI | FICAR | POR | CINCO (5) | MINUTOS | |
| Solución D | 100 µl | 100 µl | 100 µl | 100 µl | Solución D | 50 µl |
| TEMED | 5 µl | 5 µl | 5 µl | 5 µl | TEMED | 5 µl |
| PSA 10% | 50 µl | 50 µl | 50 µl | 50 µl | PSA 10% | 25 µl |

- Llenar el espacio entre los vidrios hasta que falten 2 cm de altura, antes del extremo del vidrio más pequeño. Con una jeringa Hamilton cubrir con agua la interfase para evitar la formación de meniscos (puede usar alcohol isopropílico). La polimerización se da en aprox 30 min.
- Retirar el líquido del gel con un pdzo de papel filtro. Preparar paralelamente sol del gel concentrador. Adicionar sobre el gel separador, introducir el peine con el número de pozos seleccionado y rellenar con sol de gel concentrador, esperar 30 min. Retirar el peine y secar los pozos con papel filtro

Preparación de las muestras

- Vol final 20 μ l, de ser posible 10 μ l de muestra y 10 μ l de amortiguador de muestra (CR y CNR). Hervir las muestras 5 min.
- Montar los geles en la cámara electroforética. Preparar 350 ml de sol F (corrida) 1X. Adicionar sol de corrida en el tanque y colocar cámara. Llenar el centro con sol corrida.
- Cerrar el tanque cuidando que el color de electrodos coincida al conectarlos a la fuente de poder, encender ésta y correr a un voltaje cte de 100V los 1eros 20 min hasta que el frente llegue al gel separador, a partir de aquí aplicar 150 V durante 1 h.
- Desconectar la fuente y sacar cámara, despegar vidrios haciendo palanca con los separadores. Sacar el gel, el cual se puede utilizar para transferencia o bien teñir con azul de Coomasie por 1 h y desteñir con ácido acético y metanol hasta que el fondo se aprecie claro, equilibrar con sol de ácido acético, metanol y glicerol para secarlo en papel celofán.

Electrotransferencia e inmunodetección de bandas inmunoreactivas

- Equilibrar geles y membranas de nitrocelulosa en sol de transferencia por 10-15 min, remojar en esta sol las fibras (3/cassette) y papel filtro (2/sándwich).
- Preparar sándwich de la manera siguiente: La placa de plástico se coloca hacia abajo con el lado negro dentro de un recipiente con sol de transferencia. Sobre ésta placa poner fibra y capa de papel filtro, sobre de éste el gel, después una 2da capa de papel filtro y otra fibra, cuidando que no haya burbujas en el paquete. Cerrar el sándwich con cuidado y colocar en cámara de transferencia cuidando que los lados negros coincidan (polo positivo hacia la membrana y el gel hacia el negativo).
- Dentro de la cámara se pone un agitador magnético y un recipiente con hielo, además del volumen suficiente de sol transferencia para tapar sándwich.
- Transferir durante una hora a 200mA (0.20 con el botón verde encendido).
- Al terminar el tiempo desconectar la cámara y sacar el sándwich picando el extremo inferior de la membrana delimitando el gel, colocar las membranas en TBS 1X, pH 7.5 durante 5 min, repetir por 3 ocasiones.
- Bloquear los sitios inespecíficos con 25 ml de TBS al 5% leche descremada por 2 h en agitación cte.
- Lavar las membranas con TTBS 1X, pH 7.5 por 5 min, repetir por 3 ocasiones.

- Incubar cada membrana con 25 ml de sol de 1er Ac dil 1:10,000 durante toda la noche con agitación cte (disolver 0.5 g de leche en 50ml TTBS y 5 μ l de Ac policlonal a GH generado en conejo CAP1).
- Lavar las membranas con TTBS 1X, pH 7.5 por 5 min, repetir por 3 ocasiones.
- Incubar cada membrana con 25 ml de sol de 2do. Ac acoplado a peroxidasa rábano de conejo dil 1:3000 (disolver 0.5 g de leche en 50ml TTBS y 16.7 μ l de Ac conjugado anti-rabbit IgG horseradish peroxidase). Incubar por 2 h, agitación cte.
- Lavar las membranas con TTBS 1X, pH 7.5 por 5 min, repetir por 4 ocasiones.
- Lavar las membranas con TBS 1X, pH 7.5 por 5 min, repetir por 3 ocasiones.
- Revelar las membranas con sol western blotting (ECL), 5 ml de reactivo 1+ 5ml de reactivo2 +5 ml de TBS, incubar con sol por 5 min y colocar las membranas en bolsa ziploc.
- Exponer la bolsa con membranas a film de autorradiografía por 1 min. Introducir el film a sol reveladora por 1 min, H₂O 1min, sol fijadora por 1 min y H₂O 1min.
- Dejar secar y analizar por densitometría.

Anexo 6.- Isoelectroenfoque

Soluciones

Solución de acrilamida

Acrilamida 12.12g

Bis N' N' methylene-bys-acrylamide 0.375g

Disolver, aforar a 50mL y filtrar con papel Whatman No. 1 y conservar a 4°C

Solución de fosfato de 5 rivoalvina

Fosfato de rivoalvina 50mg

Aforar a 50mL, almacenar a 4°C y proteger de la luz

Persulfato de amonio 10%

Persulfato de amonio (PSA) 10mg

Disolver en 1mL de agua. Preparar en fresco.

Solución de glicerol

Glicerol 25g

Disolver en 50ml de agua desionizada y aforar a 100mL

Amortiguador para cátodo

NaOH 1N

Amortiguador para ánodo

H₃PO₄ 1N

Procedimiento

- El gel se prepara con 5.5mL de la solución de acrilamida, 2.0 mL de glycerol y 0.5mL de amfolinas. Se agregan los catalizadores: 15µl de persulfato de amonio, 50 µl de solución de rivoalvina y 3 µl de TEMED.

- Colocar las placas de vidrio sobre la bandeja y con una pipeta pasteur agregar la solución del gel por debajo de la placa de vidrio.
- Colocar el gel junto con la bandeja bajo una lámpara hasta que el gel polimerice (aproximadamente 1 hora).
- Retirar cuidadosamente la placa de vidrio y dejar el gel bajo la luz de la lámpara por 15 minutos mas para que termine de polimerizar.
- El gel puede ser usado inmediatamente o puede ser almacenado a 4°C.
- Mojar el lado que contiene la cerámica de la plataforma de corrida con una gota de agua (0.1% de Tritón) para asegurar un buen contacto.
- Colocar el gel en la plataforma de corrida asegurándose de que no queden burbujas.
- Corta una mecha de isoelectroenfoque 4mm mas pequeña que el ancho del gel.
- Remojar los electrodos en los amortiguadores para electrodo correspondientes (amortiguador para cátodo y amortiguador para ánodo).
- Cargar la muestra de proteínas directamente sin ningún amortiguador de cargado.
- Correr el gel con una corriente inicial de 10 watts seguido de un voltaje constante a 1000V.

Después de correr el gel sacarlo de la plataforma y seguir el procedimiento indicado para la detección de la proteínas.

Anexo 7.- Tinción argéntica de plata para geles de poliacrilamida

Soluciones

Solución fijadora

Isopropanol 10mL

Acido acético 10mL

Aforar con agua bidestilada a 100mL

Solución oxidante

Glutaraldehído 40mL

Aforar con agua bidestilada a 100mL

Solución de plata

NaOH 0.36% 21mL

NH₄OH concentrado 1.4mL

AgNO₃ 20% 4mL gota a gota hasta disolver

Aforar con agua bidestilada a 100mL

Solución reveladora

Acido cítrico 30mg

Formaldehído 37% 150 mL

Solución de paro del revelado

Acido acético 10mL

Aforar con agua bidestilada a 100mL

Procedimiento

- Fijar el gel toda la noche en la solución fijadora.
- Incubar 1 hora con la solución oxidativa.
- Lavar exhaustivamente con agua bidestilada. 1 cambio de agua cada 15 minutos durante 8 horas.

- Incubar el gel durante 15 minutos en la solución de plata.
- Lavar 30 segundos con agua bidestilada.
- Incubar el gel en la solución reveladora hasta que se vean bien las bandas.
- Parar el revelado con la solución.
- Lavar con agua.

Anexo 8.- Extracción de RNA

Soluciones

Mezcla de reacción (Fenol-cloroformo-isoamil alcohol, 1:24:25)

| | |
|-----------------|-------------|
| Fenol | 2.5mL |
| Cloforomo | 2.4mL |
| Isoamyl alcohol | 100 μ l |

Procedimiento

- Pesar 100 mg de cada tejido.
- Adicionar 1 ml de Trizol/100 mg tejido.
- Homogeneizar en el politrón, incubar durante 5 min TA (temperatura ambiente).
- Adicionar 200 μ l de cloroformo/ml Trizol utilizado, mezclar suavemente con punta, incubar 3 min a TA.
- Centrifugar a 12000 xg = 13200 rpm durante 15 min a 4°C. Transferir el sobrenadante a tubos eppendorf nuevos estériles y libres de RNAasas.
- Adicionar a cada tubo 500 μ l de mezcla Fenol/Cloroformo/Alcohol isoamílico (1:24:25), agitar en vórtex durante 2 min.
- Centrifugar a 13200 rpm por 5 min a 4°C, recuperar el sobrenadante en tubos eppendorf nuevos y libres de RNAasas.
- Repetir este paso 2-3 veces.
- Adicionar 500 μ l de isopropanol/ml Trizol utilizado, incubar por 10 min a TA.
- Centrifugar 10000 xg = 12000 rpm durante 10 min a 4 °C. Desechar el sobrenadante invirtiendo el tubo con un solo movimiento.
- Lavar la pastilla 3 veces con etanol frío al 75%, dejar secar sobre un pedazo papel por 5-10 min, resuspender en 50 μ l de agua DEPC 1% v/v.

Pureza e integridad del RNA total

- Preparar una alícuota para leer en espectrofotómetro con 5 μ l de RNA + 995 μ l agua DEPC 1 % v/v (dilución 1:200). Leer a 260 nm en celdas de cuarzo previamente lavadas con hidróxido de sodio.

- Observar la proporción 260/280, que debe ser lo más cercana a 2 ya que esto representa la proporción de ácidos nucleicos en la muestra vs la de proteína.
- Calcular la concentración de RNA presente en la muestra. $[\text{RNA } \mu\text{g}/\mu\text{l}] = \text{Factor de dilución} * 38 \mu\text{g}/\mu\text{l} * \text{DO a } 260 \text{ nm}$.
- Preparar un gel de Agarosa al 1.2 % con 0.3 g de agarosa + 25 ml de TAE 1X, disolver con calor pero sin ebulir, adicionar 8 μl de bromuro de etidio diluído. Verter la mezcla en la cámara para geles, esperar 20 min.
- Buffer de corrida TAE 1X,
- En el primer carril adicionar 5 μl marcadores 1kb Ladder
- 2 μl de muestra+0.5 μl blue juice + 0.5 μl bromuro de etidio 10 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$.
- Someter a electroforesis a voltaje constante de 80 V por aprox. 45 min.
- Analizar bajo luz ultravioleta y tomar foto.

Anexo 9.- RT-PCR

Los amortiguadores usados vienen todos con las enzimas comerciales.

Procedimiento

- Adicionar los siguientes reactivos a cada uno de los tubos:

Oligo dT (20) 1 µl/Tubo

RNA 2 µl/Tubo

dNTPmix 10mM 1 µl/Tubo

H2O2 DEPC 8 µl/Tubo

Considerar dos tipos de control (-):

a) Todo menos superscript*

b) Todo menos muestra

- Incubar por 5 min a 65 °C, al término colocar rápidamente en hielo.
- Preparar mezcla de rxn con excedente de 1 rxn

Buffer PCR 5X 4 µl/rxn

DTT 0.1 M 2 µl/rxn

RNAase Out 1 µl/rxn

Incubar 2 min a 42°C

Adicionar 7 µl/Tubo

- Sacar los tubos y adicionar 1 µl superscript a tubos (+)

Colocar en termociclador por 50 min a 42 °C, inactivar a 70 °C por 15 min

Anexo 10.- Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)

Los amortiguadores usados vienen todos con las enzimas comerciales.

Procedimiento

- En cada tubo de PCR adicionar 1 μL (0.1 a 1 μg) de cDNA.
- Realizar mezcla maestra, dar vortex y dar un spin.

| | |
|----------------------------------|--------------------|
| Buffer Taq (10X) | 2.5 μL |
| dNTP's (10mM) | 0.5 μL |
| Oligo A (25pmol/ μL) | 0.5 μL |
| Oligo B (25pmol/ μL) | 0.5 μL |
| TaqDNApol 85U/ μL) | 0.5 μL |
| H2O ultrapura | 17.5 μL |

- Adicionar 22 μL de la mezcla a cada tubo conteniendo el cDNA con lo que se tendrá un volumen de reaccion de **23 μL**
- Incubar a 94°C por 3 min y a 72°C por otros 3 min.
- Poner inmediatamente en hielo y agregar 2 μL de MgCl₂ 10mM a cada tubo
- Correr en el Termociclador a 94°C 1 min, 54°C 1.5 min y 72°C 1 min por 30 ciclos.
Extensión por 10 min a 72°C