



01674
31
UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
DE MEXICO

MAESTRIA EN CIENCIAS DE LA
PRODUCCION Y DE LA SALUD ANIMAL

ESTUDIO GENETICO MOLECULAR Y ENDOCRINOLOGICO
DEL ENANISMO EN EL PERRO CHIHUAHUENO

T E S I S

PARA OBTENER EL GRADO DE MAESTRO EN CIENCIAS

PRESENTA:

SILVIA REYES MAYA

TUTOR:

DR. ROGELIO A. ALONSO MORALES

COMITE TUTORAL:

DR. CARLOS G. GUTIERREZ

DRA. MARIA TERESA TUSIE LUNA

MEXICO D.F.

2003

1

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN



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.

PAGINACIÓN DISCONTINUA

**No dejes que termine el día sin haber crecido un poco,
sin haber sido feliz, sin haber aumentado tus sueños.
No te dejes vencer por el desaliento.
No permitas que nadie te quite el derecho a expresarte,
que casi es un deber.
No dejes nunca de soñar, porque en sueños es libre el hombre.
No caigas en el peor de los errores: el silencio.
Disfruta del pánico que te provoca tener la vida por delante.
Aprende de quienes puedan enseñarte.
No permitas que la vida te pase a ti sin que la vivas.**

Walt Whitman

I

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

DECLARACIÓN

El autor da consentimiento a la División de Estudios de Posgrado e Investigación de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la Universidad Nacional Autónoma de México para que la tesis esté disponible para cualquier tipo de reproducción e intercambio bibliotecario.



Silvia Reyes Maya

DEDICATORIA

CON RESPETO DEDICO EL PRESENTE TRABAJO:

A mi Mami **Silvia Yolanda Maya Mendoza**, porque todo que logremos en la vida lo debemos a tu apoyo y esfuerzo sin límite.

Al **Lic. Gerardo Reyes Maya**.

A la memoria de quienes recuerdo con cariño y me acompañan siempre.

Al **Dr. Everardo Barojas Weber** por su infinita generosidad.

De manera especial dedico a mis amigas:

Gabriela Maldonado Robledo con todo mi cariño y admiración.

Irene González Calderón y **Maribel Hernández Ortiz** por nuestra sincera amistad.

A:

Manuel Callejas, Noé Reyes, Mario Espinosa, Verónica Ocampo, Beatriz Salas, Felicitas Vázquez, Iván Leyva, Addi Oropeza, Nora Arellano, Claudia Castillo, Ana Delia Rodríguez, Laura Martínez, Luz Maria Granados, Margarita Robledo, Wendy García, Esperanza García y Claudia Alcázar por compartir momentos inolvidables.

A mis tesoros:

Borli, Chiquis, Roby, Nicky, Vaquita, Shelby, Bebe, Preciado, Oso, Bambina, Jacky, Kitty, Rocky, Paloma, Cuauhtémoc, Yeyo, Maui, Berny, Nena, Botitas, Fisher, Nene, Sydney, Timothy y sus tres hermanitos por compartir su magia conmigo y ayudarme a encontrar un camino, así como una razón de vida.

En especial dedico mi trabajo hoy y siempre a los perritos y gatitos del mundo, sobre todo para aquellos que sufren la incapacidad de amar del ser humano y sobreviven en la calle, con la firme promesa de ayudarlos y el sueño de poner fin al dolor injusto de todos los animalitos que no merecen nacer condenados.

Para ti, con todo mi amor.

AGRADECIMIENTOS

- ❖ A **Dios** por darme la oportunidad de vivir para creer en su infinito amor.
- ❖ A la **Universidad Nacional Autónoma de México** por sus puertas abiertas y a la **Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia** por brindarme un espacio para crecer.
- ❖ Al **Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT)** por la beca crédito que me fue otorgada en el periodo comprendido entre agosto 2000 a julio 2002, apoyo fundamental para obtener el grado de Maestría.
- ❖ Cordialmente al **Dr. Rogelio A. Alonso Morales** como tutor, y al **Dr. Carlos G. Gutierrez** como asesor, porque siempre impulsaron la realización de este trabajo.
- ❖ Al H. Jurado por sus acertados comentarios: **Dr. Javier Valencia Méndez, Dra. María Teresa Tusié Luna, Dr. Carlos G. Gutiérrez, Dr. Hugo Montaldo Valdenegro y Dr. Rogelio Alonso Morales.**
- ❖ Al **Dr. José Luis Uribe Rubio** por confiar en mí, y ser la mano que necesitaba para subir al tren en el cual encontré el camino de mi vida.
- ❖ Al **Laboratorio de Genética Molecular** de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la Universidad Nacional Autónoma de México por la disponibilidad total de personal e infraestructura.
- ❖ A la **Biol. Amanda Gayosso** por su valioso apoyo técnico.
- ❖ Mi más sincero agradecimiento a quienes ayudaron a superar cada peldaño de la fase experimental: **Biol. Noé Reyes, Dra. Refugio Cortés, M en C Belem Huerta, M en C Carmen Castro y Dr. Simón Martínez.**
- ❖ Al **Dr. Raúl Ulloa Arvizú** por su participación académica en los análisis estadísticos.
- ❖ A la **Dra. Refugio Cortés** por tu confianza y apoyo cuando más lo necesitaba y siempre.
- ❖ Al **Departamento de Reproducción** de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la Universidad Nacional Autónoma de México, en especial al Jefe del Departamento **Dr. Carlos G. Gutiérrez** como parte fundamental del Comité Tutoral de este trabajo; Así como al **Dr. Gerardo Perera Marín** y a la **Dra. Clara Murcia** por su valiosa colaboración determinante en las evaluaciones endocrinológicas de la presente investigación.
- ❖ A los **MVZ Maribel Hernández, Irene González, Alberto Benítez y Patricia Borges** por su disposición y entusiasmo en la realización de esta investigación.
- ❖ Al **Dr. Javier Flores Covarrubias** y su equipo en reconocimiento a su esfuerzo.

- ❖ A todos los profesores con quienes tuve la oportunidad de aprender, con especial cariño a los maestros **Dr. Pablo Pérez Espino, Dr. Francisco Alonso Pesado y Dr. Arturo Olguín.**
- ❖ A quienes impulsaron el desarrollo de este trabajo sin escatimar esfuerzos.

RESUMEN

SILVIA REYES MAYA " Estudio genético molecular y endocrinológico del enanismo en el perro Chihuahueño ". Asesor Dr. Rogelio A. Alonso Morales. Laboratorio de Genética Molecular, Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia. Universidad Nacional Autónoma de México. 2003.

El presente trabajo tuvo como propósito de caracterizar el tipo de enanismo existente en el perro Chihuahueño, como punto de partida para emplear la diversidad de conformación y tallas entre razas, como modelo animal en el estudio de la genética molecular del crecimiento en mamíferos. Con base a sus características clínicas, se puede considerar que el fenotipo del perro Chihuahueño, probablemente corresponde a un síndrome de insensibilidad a la Hormona de Crecimiento (GH) descrito en humanos como síndrome Laron, el cual se caracteriza por ser un enanismo con concentraciones plasmáticas altas de GH, concentraciones bajas de Factor de Crecimiento Similar a la Insulina tipo I (IGF-I) y alteraciones en el gen del receptor de Hormona de Crecimiento (GHR) en el cual por análisis molecular se han detectado deleciones, mutaciones puntuales y defectos de procesamiento de RNA mensajero. En este estudio se evaluaron las concentraciones plasmáticas de GH y de IGF-I en varias razas caninas (Mastín Inglés, Pastor Alemán, Beagle y Pug) y en el Chihuahueño. Por un análisis de Covarianza, se encontró una correlación positiva entre niveles plasmáticos de IGF-I y la talla, siendo los valores más bajos los del perro Chihuahueño; mientras que las concentraciones de GH de ésta misma raza no fueron diferentes con relación a las otras razas. Se obtuvo la secuencia de nucleótidos del DNA complementario del gen de GHR de un Chihuahueño y un Pastor Alemán, encontrándose en el primero una mutación en la posición 727 que cambia A por G, que resulta de un cambio en la secuencia de aminoácidos de una Lisina por Arginina en el sitio 242 de la proteína. Cambios en esta posición no han sido descritos en pacientes Laron en humanos.

Palabras clave: Receptor de Hormona de Crecimiento, Hormona de Crecimiento, IGF-I, Síndrome Laron, perro Chihuahueño.

SUMMARY

This work has the purpose of define the type of dwarfism present in the Chihuahua dog, as a starting point to characterize the dog as a model for the study of the molecular genetics of growth taking advantage of the conformational and size diversity between dog breeds. Based in his clinical characteristics the Chihuahua's phenotype probably corresponds to Laron Syndrome described in humans. Laron phenotype is characterized for high plasmatic concentrations of Insulin like growth factor type I (IGF-I), low plasmatic concentrations of Growth Hormone (GH) and alterations in the Growth Hormone Receptor gene (GHR) in which by molecular analysis have been detected deletions, point mutations and splicing defects. Plasmatic concentrations of GH and IGF-I were evaluated for Chihuahua and other dog breeds (Mastiff, German shepherd, Beagle, Pug) finding a positive correlation between IGF-I plasmatic levels and size, being the Chihuahua's levels the lowest. The Chihuahua's GH plasmatic levels were no significant different from the other breeds. The complete GHR gene cDNA sequence was obtained and sequenced in one Chihuahua and one German Shepherd dogs finding a point mutation in the Chihuahua's gene in the position 727 that changes A (adenine) for G (guanine) resulting in an amino acid substitutions of Lysine for Arginine at position 242 of the protein. Changes in this site have not been reported in human Laron patients.

Key words: Growth hormone receptor, Growth hormone, IGF-I, Laron Syndrome, Chihuahua dog.

CONTENIDO

	PÁG
DECLARACIÓN.....	II
DEDICATORIA.....	III
AGRADECIMIENTOS.....	IV
RESUMEN.....	VI
SUMMARY.....	VII
ÍNDICE DE CUADROS.....	XI
ÍNDICE DE FIGURAS.....	XII
I. INTRODUCCIÓN.....	1
II. ANTECEDENTES.....	3
2.1. HORMONA DEL CRECIMIENTO.....	3
2.1.1. Descripción.....	3
2.1.2. Secreción.....	3
2.1.3. Deficiencia de GH.....	4
2.1.3.1. Signos clínicos.....	4
2.1.3.2. Diagnóstico.....	5
2.2. SÍNDROME LARON.....	5
2.2.1. Nomenclatura.....	5
2.2.2. Introducción.....	5
2.2.3. Distribución geográfica.....	6
2.2.4. Presentación clínica.....	6
2.2.5. Proporciones corporales y crecimiento lineal.....	7
2.2.6. Concentraciones hormonales.....	8
2.2.7. Tratamiento.....	9
2.2.8. Etiología.....	9
2.2.9. Modelo animal: el ratón Laron.....	10
2.3. RECEPTOR DE HORMONA DE CRECIMIENTO.....	10
2.3.1. Definición.....	10
2.3.2. Estructura.....	10
2.3.3. Localización.....	11
2.4. RECEPTOR DE HORMONA DE CRECIMIENTO EN EL SÍNDROME LARON.....	11
2.4.1. Defectos moleculares.....	11
2.4.1.1. Deleciones de GHR.....	12
2.4.1.2. Mutaciones puntuales.....	12
2.4.1.3. Codones de paro.....	12
2.4.1.4. Defectos de procesamiento de RNAm.....	12
2.5. PROTEÍNAS LIGADORAS DE HORMONA DE CRECIMIENTO (GHBP).....	15
2.6. FACTORES DE CRECIMIENTO DE AMPLIO ESPECTRO.....	15
2.6.1. Antecedentes.....	15
2.6.2. Descripción.....	15
2.6.3. Acción biológica.....	16
2.6.3.1. Efecto sobre el crecimiento y la diferenciación celular.....	16

	PÁG
2.6.3.2. Efectos metabólicos.....	16
2.6.3.3. Acción sobre cartílago.....	17
2.6.4. Regulación de la síntesis.....	17
2.7. EL PERRO COMO MODELO ANIMAL DEL CRECIMIENTO.....	17
2.7.1. Descripción y antecedentes.....	17
2.8. ENANISMO EN EL PERRO.....	19
2.8.1. Patofisiología.....	19
2.8.2. Signos clínicos.....	20
2.9. RECEPTOR DE HORMONA DEL CRECIMIENTO EN EL PERRO.....	21
2.9.1. Descripción.....	21
2.9.2. Estructura.....	22
III. OBJETIVOS, HIPÓTESIS, METAS Y JUSTIFICACIÓN.....	23
3.1. Objetivos.....	23
3.2. Hipótesis.....	23
3.3. Metas.....	23
3.4. Justificación.....	24
IV. MATERIALES Y MÉTODOS.....	25
4.1. DETERMINACIÓN DE LAS CONCENTRACIONES PLASMÁTICAS DE IGF-I Y GH.....	25
4.1.1. Material biológico.....	25
4.1.2. Determinación de GH.....	25
4.1.3. Análisis estadístico.....	26
4.2. GENÉTICA MOLECULAR DEL cDNA DEL GEN DE GHR CANINO.....	27
4.2.1. Secuenciación de GHR.....	27
4.2.2. Análisis de la secuencia.....	28
V. RESULTADOS.....	29
5.1. DETERMINACIÓN DE LAS CONCENTRACIONES PLASMÁTICAS DE GH Y DE IGF-I.....	29
5.2 GENÉTICA MOLECULAR DEL cDNA DEL GEN DE GHR CANINO.....	33
5.2.1. Obtención del cDNA de GHR de Chihuahueño y Pastor Alemán.....	33
5.2.2. Clonación de GHR.....	33
5.2.3. Secuenciación del cDNA de GHR.....	33
VI. DISCUSIÓN.....	41
6.1. Concentraciones de GH por raza.....	41
6.2. Relación de la concentración plasmática de IGF-I con el tamaño de la raza.....	41
6.3. Secuencia de cDNA de GHR de Chihuahueño.....	42
VII. CONCLUSIONES.....	45
VIII. BIBLIOGRAFÍA.....	47
ANEXOS.....	53
ANEXO I. DETERMINACIÓN DE LAS CONCENTRACIONES PLASMÁTICAS DE IGF-I Y DE GH.....	53
1. MEDICIÓN DE IGF-I POR EL MÉTODO DE INMUNORADIOMETRÍA.....	53
1.1. Descripción de la prueba.....	53
1.2. Procedimiento.....	54
2. RADIOINMUNOANÁLISIS PARA LA HORMONA DE CRECIMIENTO CANINA.....	55
2.1 Descripción de la prueba.....	55

	PÁG
2.2. Procedimiento.....	55
2.2.1 Marcaje de la proteína.....	55
2.2.2. Titulación del anticuerpo anti-cGH.....	56
2.2.3. Desarrollo de la curva estándar de GH.....	57
2.2.4. Procedimiento de Radioinmunoanálisis de GH.....	57
ANEXO II. TÉCNICAS DE BIOLOGÍA MOLECULAR.....	59
1. PURIFICACIÓN DE RNA.....	59
1.1. Aislamiento de RNA.....	59
1.2. Cuantificación espectrofotométrica de RNA total.....	59
1.3. Separación electroforética de RNA total en geles de agarosa – formaldehído.....	60
2. Obtención de cDNA de GHR.....	60
3. Amplificación del cDNA para GHR.....	60
4. Secuenciación del cDNA de GHR.....	61
4.1. Clonación de GHR en pUC19/ <i>Sma</i> I TA.....	61
4.2. Transformación.....	61
4.3. pUC19/ <i>Sma</i> I.....	62
4.4. Marcadores de selección.....	62
4.5. α Complementación.....	63
4.6. Examinación de bacterias por α Complementación.....	63
4.7. Extracción de DNA de plásmido de bacterias transformadas (minipreparaciones de DNA).....	64
ANEXO III. SECUENCIACIÓN DE GHR.....	65
ANEXO IV. INICIADORES.....	66
ANEXO V. RESUMEN DE ANÁLISIS ESTADÍSTICO.....	67
ANEXO VI. CONCENTRACIONES PLASMÁTICAS DE GH Y IGF-I POR INDIVIDUO.....	68
ANEXO VII. ABREVIATURAS.....	70

ÍNDICE DE CUADROS

	PÁG
Cuadro 1. Mutaciones descritas en individuos con síndrome Laron.....	13
Cuadro 2. Causas de crecimiento retardado en perros (Norman, 1998).....	21
Cuadro 3. Número de individuos analizados por raza para obtener las concentraciones plasmáticas de GH e IGF-I.....	25
Cuadro 4. Medias de mínimos cuadrados y error estándar de las concentraciones plasmáticas de GH [ng/ml] en las razas estudiadas.....	29
Cuadro 5. Medias de mínimos cuadrados y errores estándar de las concentraciones plasmáticas de IGF-I [ng/ml] en las razas estudiadas.....	31
Cuadro 6. Protocolo para la titulación del anticuerpo Anti-cGH.....	56
Cuadro 7. Protocolo para la curva estándar de cGH.....	57
Cuadro 8. Protocolo para Radioinmunoanálisis de cGH en plasma.....	58
Cuadro 9. Iniciadores utilizados.....	66
Cuadro 10. Análisis de varianza para las concentraciones plasmáticas de GH.....	67
Cuadro 11. Análisis de varianza para las concentraciones plasmáticas de IGF-I.....	67

ÍNDICE DE FIGURAS

	PÁG
Figura 1. Transcritos del Gen del Receptor de Hormona de Crecimiento Canino.....	22
Figura 2. Iniciadores de GHR y la posición donde se localizan en la secuencia.....	27
Figura 3. Medias de mínimos cuadrados y error estándar de las concentraciones plasmáticas de GH [ng/ml] por raza.....	30
Figura 4. Medias de mínimos cuadrados de las concentraciones plasmáticas de IGF-I [ng/ml] por raza.....	31
Figura 5. Peso promedio de las razas estudiadas y medias de mínimos cuadrados de las concentraciones plasmáticas de GH [ng/ml].....	32
Figura 6. Peso promedio de las razas estudiadas y medias de mínimos cuadrados de las concentraciones plasmáticas de IGF-I [ng/ml].....	32
Figura 7. Producto de PCR de cDNA de GHR de Chihuahueño y Pastor Alemán. Electroforesis en gel de agarosa 1% teñido con bromuro de etidio.....	33
Figura 8. Gráfico de la estrategia de secuenciación de GHR de Chihuahueño mostrando los iniciadores utilizados.....	34
Figura 9. Gráfico de la estrategia de secuenciación de GHR de Pastor Alemán mostrando los iniciadores utilizados.....	34
Figura 10. Localización de la mutación encontrada en el cDNA de GHR de Chihuahueño comparada con la secuencia de Pastor Alemán y la reportada por van Garderen <i>et al.</i> (1999).....	35
Figura 11. Secuencia de pares de bases del cDNA de GHR de Chihuahueño y Pastor Alemán comparadas con la secuencia reportada por van Garderen <i>et al.</i> (1999).....	37
Figura 12. Secuencia de aminoácidos del cDNA de GHR de Chihuahueño y Pastor Alemán comparadas con la secuencia reportada por van Garderen <i>et al.</i> (1999).....	40

I. INTRODUCCIÓN

En el campo de la investigación biomédica toma gran importancia el estudio de enfermedades genéticas en humanos, su diagnóstico, epidemiología, patofisiología, mapeo cromosómico, tratamiento y prevención. El estudio comparado de las enfermedades genéticas humanas en animales domésticos se está desarrollando ampliamente, proporcionando modelos experimentales, lo que proporciona nuevas perspectivas para el conocimiento integral de la acción de los genes en rasgos complejos como el crecimiento.

De acuerdo al conocimiento actual, el genoma en la mayoría de los mamíferos es aproximadamente del mismo tamaño al del ser humano. Esto consiste en alrededor de 3.5×10^9 pares de bases de DNA, codificando entre 30,000-40,000 genes. Se conocen que las funciones de los genes incluyen todas las enzimas del metabolismo intermedio, proteínas estructurales y de tejidos conectivos, proteínas de transporte, hormonas, receptores e inmunoglobulinas. Estudios comparados a nivel de DNA, demuestran que la estructura de estos genes se ha conservado durante la evolución de los mamíferos. La utilización de modelos animales tiene un papel vital en los numerosos avances dentro del campo de la medicina experimental. Proveen un conocimiento importante de condiciones patológicas que eventualmente pueden guiar el desarrollo de tratamientos clínicos de enfermedades en animales y en el ser humano. La investigación basada en modelos animales mamíferos es el puente entre los estudios *in vitro* y la aplicación práctica en el hombre o en animales productivos.

El enanismo se describe como un trastorno de crecimiento caracterizado por una talla inferior a la media poblacional en mamíferos. La acción conjunta de diferentes hormonas y sus receptores asegura el normal crecimiento de todas las partes del cuerpo, de ahí que si ocurre alguna falla puede aparecer una forma cualquiera de enanismo. Para el estudio del enanismo en humanos han sido utilizados ratones, bovinos, ovinos, caprinos y perros como modelos animales favoreciendo el estudio de alteraciones en el crecimiento. En bovinos se han descrito 7 formas de enanismo y en el pollo 4 formas, mientras que en ovinos y caprinos se describe solo un tipo de enanismo como tal.

El perro en particular tiene probablemente la condición *in vivo* más cercana al humano a excepción de otros primates (Yuehuel, 1999). Proviene de la domesticación de cánidos salvajes (lobos), con inclusión de genes antiguos y de varios orígenes. La amplia gama de razas se han desarrollado desde hace 250 años, muchos de estos muestran uniformidad fenotípica sugestiva de su alto grado de homogeneidad genética, esto implica que un número relativamente pequeño de *loci* claves son responsables de las características particulares que definen a cada raza. El perro entonces presenta una combinación de diversidad y uniformidad genética entre razas que lo hacen

1

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

un organismo muy favorable en la búsqueda de las bases moleculares y genéticas que determinan diversas características complejas en mamíferos.

En el estudio de rasgos complejos, el perro presenta amplias ventajas sobre otros modelos animales. Es la única especie dentro de los mamíferos con variación en características morfológicas como son estatura, peso, masa muscular y forma correspondiente a cada raza. Al paso del tiempo, las razas caninas se han definido con base a sus características deseables como son tamaño, conformación muscular y ósea, carácter y hasta color del pelaje por citar algunas. Con respecto al tamaño podemos encontrar desde el pequeño Chihuahueño que mide 20 cm de altura, hasta un Pastor Alemán que mide un metro. En cuanto a conformación el Collie, por ejemplo, tiene una cabeza alargada y compacta como una zorra, mientras el Pug tiene cabeza grande y redonda. Ninguna otra especie de mamíferos presenta una escala natural de variabilidad que pueda rivalizar con las características del perro (Paterson, 1988; Ostrander, 1997).

II. ANTECEDENTES

2.1. HORMONA DE CRECIMIENTO

2.1.1. Descripción

El complejo sistema del crecimiento en los mamíferos se rige por la interacción de diferentes hormonas que actúan armónicamente. La Hormona de Crecimiento (Somatotropina, Growth Hormone, GH) es esencial para el desarrollo posnatal normal. Es una proteína de 191 aminoácidos, sintetizada por los somatotropos y liberada por la pituitaria anterior, bajo la estimulación de la Hormona Liberadora de Hormona de Crecimiento (GHRH), factor producido por el hipotálamo. Actúa en tejidos blanco, principalmente en el hígado donde causa la síntesis y liberación del Factor de Crecimiento Similar a la Insulina tipo I (Insulin like Growth Factor type I, IGF-I) a la circulación sistémica que actúa directamente en el cartílago para promover el crecimiento de los huesos. La deficiencia de producción de GH causa alteraciones metabólicas y falla del crecimiento. La mayoría de la GH producida en la pituitaria corresponde a 22 kDa y hay otras 4 variantes de 45 kDa, dos de 24 kDa y una de 20 kDa (Scriver *et al.*, 2001).

2.1.2. Secreción

Su secreción a la circulación periférica es controlada al menos por dos factores hipotalámicos: GHRH y Somatostatina (SS). La secreción de GH a la circulación general es promovida por GHRH, péptido de 44 aa y la secreción pulsátil de GHRH es la principal causa del patrón pulsátil de GH. La somatostatina es un neuropéptido de 14 aa que inhibe la secreción de GH. Asimismo, GHRH y SS son modulados por los efectos de varios factores ambientales y biológicos incluyendo estrés, sueño, hipoglucemia y químicos como L-dopa, clorpromazina y la misma GH en sistema nervioso central e hipotálamo. A parte del sueño, la mayoría de los estímulos fisiológicos liberadores de GH son inhibidos por agentes bloqueadores alfa adrenérgicos como fentolamina y estimulados por alfa adrenérgicos agonistas como clonidina. Las complejas interacciones de los factores que modulan la síntesis y secreción de GH resultan en un patrón de secreción pulsátil (Scriver *et al.*, 2001).

Debido a que GH no es esencial para el desarrollo fetal, los recién nacidos con deficiencia completa son usualmente normales en longitud y peso. La presencia de micropene o hipoglucemia pueden ser claves para el diagnóstico temprano. El crecimiento lineal de los afectados continua en

rango bajo llegando a ser subnormal a los seis meses y progresivo. La mayoría de los casos de deficiencia de GH son esporádicos y se presumen secundarios a diferentes etiologías incluyendo defectos o daño al sistema nervioso central como trauma craneal, meningitis, edema cerebral, infecciones congénitas, anomalías cromosómicas y tumores craneales (Scriver *et al.*, 2001).

2.1.3. Deficiencia de GH

En el ser humano existen 17 desordenes mendelianos reconocidos que causan la deficiencia de GH en producción y acción (Goodman, 1986). Los principales Síndromes de Enanismo Hipofisiario son:

- a) El panhipopituitarismo
- b) La ausencia congénita de Hipófisis
- c) El déficit aislado de Hormona de Crecimiento (GH)
- d) El enanismo tipo Laron

2.1.3.1. Signos clínicos

Las características principales comunes a todas estas clases de síndromes en el ser humano son la existencia de un crecimiento esencialmente normal durante los primeros 6 meses a 2 años, episodios de hipoglucemia con coma (excepto en el déficit aislado de GH, autosómico dominante) o sin él, la obesidad del tronco y la voz en tono agudo (Goodman, 1986). La frente es amplia y el maxilar superior e inferior son hipoplásicos, lo que crea una sensación de desproporción craneofacial. Generalmente, hacia la edad de 30 años, la piel de la cara se arruga y se vuelve flácida, junto con un aumento de tejido celular subcutáneo a este nivel, lo que da al individuo joven una apariencia de envejecimiento (excepto en el déficit aislado de GH autosómico dominante). Si las gonadotropinas son deficientes, no llegan a presentarse los cambios puberales (Goodman, 1986). El enanismo panhipofisiario familiar se refiere al déficit de GH, con carencia de una o más de las hormonas trópicas hipofisiarias, que por orden de frecuencias son: gonadotropinas, Hormona adrenocorticotrópica (ACTH) y Hormona estimulante de la tiroides (TSH); las características clínicas dependen del déficit específico de la hormona trópica de que se trate, por ejemplo, el déficit de gonadotropinas produce inmadurez sexual, amenorrea primaria y falta de características sexuales secundarias en la mujer, mientras que en el hombre los testículos y el pene son pequeños y falta pelo en la barba. El déficit aislado de GH se caracteriza por la normalidad del desarrollo sexual y de las funciones tiroidea y suprarrenal. En la forma autosómica recesiva, el paciente presenta piel

arrugada, ataques hipoglucémicos e hipersensibilidad a la insulina, características todas ellas que son normales en la forma autosómica dominante. Los pacientes con el tipo Laron presentan un enanismo importante y proporcionado. Al contrario de lo que ocurre en los casos de panhipopituitarismo, existen concentraciones plasmáticas normales o elevadas de GH inmunorreactiva (Goodman, 1986).

2.1.3.2. Diagnóstico

Algunas formas genéticas raras de enanismo hipofisiario en el ser humano demuestran la multiplicidad de efectos potenciales en el metabolismo de la GH. La supresión y la función inadecuada del gen de hormona de crecimiento, la secreción de hormona estructuralmente anormal, la deficiencia de receptor de hormona de crecimiento en el hígado y de receptor de IGF-I en cartílago, se han señalado como causa de varias formas genéticas de deficiencia de hormona de crecimiento. El signo para sospechar que un paciente sufre uno de estos defectos genéticos incluye los signos clínicos de hipopituitarismo en más de un miembro del árbol genealógico, valor plasmático persistentemente elevado de GH sin estimulación farmacológica, valor plasmático bajo de IGF-I a pesar de valores altos de GH, o incapacidad del paciente para responder al tratamiento con GH (Mahoney, 1987).

2.2. SÍNDROME LARON

2.2.1. Nomenclatura

Desde su descripción el nombre de este síndrome ha cambiado, de enanismo pituitario con concentraciones altas de GH a enanismo Laron o enanismo tipo Laron. Cuando se demostró la resistencia a GH se denominó como resistencia o insensibilidad a GH (Growth Hormone Insensitivity, GHIS) o síndrome Laron (Laron Syndrome, LS) para distinguirlo de estados de resistencia a GH secundarios (Laron, 2002).

2.2.2. Introducción

Se trata de un cuadro clínico semejante al enanismo hipofisiario, aunque es más frecuente la asociación de otras anomalías somáticas. La primera descripción se debe a Laron *et al.* en 1966 con el reporte de tres hermanos con signos bioquímicos de deficiencia de GH pero con

concentraciones séricas altas de GH dentro del rango de acromegalia. En dos años reunieron 22 pacientes, todos ellos judíos orientales. La primera hipótesis sobre un defecto en la molécula de GH se descartó por el hallazgo de que la GH circulante en estos pacientes era normal por análisis de radiorreceptores utilizando GHR preparados de membranas hepáticas humanas (Eshet y Peleg, 1985).

La insensibilidad a GH se diagnosticó por las concentraciones séricas bajas de IGF-I en presencia de niveles endógenos altos de GH y la incapacidad de generar IGF-I a la administración de GH exógeno (Daughaday y Laron, 1969; Laron *et al.*, 1971). La causa de la resistencia de GH también se demostró por el grupo de Eshet y Laron en 1984 mostrando que los preparados de GHR provenientes de membranas hepáticas de dos pacientes con síndrome Laron no se unían con GH marcada radioactivamente. La subsiguiente clonación por Leung *et al.* (1987) de GHR, así como su caracterización por Godowski y Leung (1989) y la introducción de nuevas técnicas de biología molecular llevaron a la localización de los defectos moleculares de gen de GHR (Laron, 2002).

2.2.3. Distribución geográfica

Desde la primera descripción de pacientes con síndrome Laron en Israel de judíos de origen oriental (Yemen, Irán, Afganistán, África media, del este y del norte), más y más pacientes se han diagnosticado, la mayoría de origen Mediterráneo, del norte de África, España, Italia, Arabia, Turquía, Pakistán o descendientes de individuos de estas regiones. En Ecuador se identificaron casos posiblemente originados de grupos de judíos (Roosenbloom *et al.*, 1990) y un grupo pequeño en la Bahamas (Baumbach *et al.*, 1997). Existen numerosos pacientes en Turquía, Pakistán y la India. En la mayoría de las poblaciones de donde proceden los afectados se conservan las prácticas consanguíneas. Casos aislados de personas no descendientes de áreas del Mediterráneo o de Oriente se han reportado en Dinamarca, Holanda, Eslovaquia, Rusia, Eslovenia, Japón y los Estados Unidos. En el presente, algunos cientos de pacientes han sido diagnosticados y el número se incrementa constantemente. El análisis de la cohorte integrada por individuos de etnia israelí llevó a la conclusión de que el síndrome Laron es causado por un mecanismo autosómico recesivo de penetrancia completa (Laron, 2002). También se han descrito formas de presentación esporádica y con las mismas alteraciones bioquímicas (Goodman, 1986).

2.2.4. Presentación clínica

Se ha identificado que la GH no puede actuar en las células blanco (fallo del órgano

efector) y así se produce toda la sintomatología, como en la carencia de GH; es decir, enanismo con obesidad de distribución característica en pubis, tórax y abdomen. Asimismo, el aspecto craneofacial es muy característico con nariz roma, abombamiento frontal, voz aguda, escaso pelo, dientes irregulares y defectuosos, hipoglucemia durante la lactancia, malformaciones congénitas (sobre todo defecto septal, luxación congénita de la cadera), genitales hipoplásicos en el varón y maduración sexual en la pubertad tardía (Goodman, 1986). La cabeza tiene apariencia de ser larga, debido al poco desarrollo de los huesos faciales y acromicria de la barbilla, pero la circunferencia es menor al tamaño normal por edad (Laron, 1995). Esto les da a los pacientes una apariencia típica de protrusión frontal, nariz curva y barbilla pequeña. Los casos de origen Mediterráneo o de Este medio presentan esclera azul. El pelo es escaso, suave y fácilmente depilable. Los hombres adultos tienen tendencia a calvicie. La erupción de los dientes es tardía y comúnmente defectuosa, presentando apiñamiento de las piezas debido a una mandíbula pequeña (Laron, 1968). Los niños presentan obesidad desde el nacimiento que progresa durante la infancia hasta la edad adulta llegando a ser excesiva (Laron, 2001b). Se ha evidenciado por rayos X que los huesos son delgados y los músculos poco desarrollados. Los infantes y algunos adultos tienen voz aguda debida a una orolaringe estrecha (Kornreich *et al.*, 2002). En recién nacidos y niños se presenta sudoración profusa a causa de hipoglucemia, con llanto durante la noche hasta que reciben una bebida dulce.

2.2.5. Proporciones corporales y crecimiento lineal

Las proporciones de los segmentos superior e inferior del cuerpo se encuentran debajo de lo normal por sexo y edad, denotando miembros cortos para el tamaño del tronco (Laron, 1999). Las manos y los pies son pequeños (acromicria). Desde la infancia el crecimiento lineal es lento; el déficit de altura fluctúa entre 4 a 8 desviaciones estándar debajo de la media normal. Si no hay tratamiento la mayoría de los pacientes con síndrome Laron llegan a una altura final de 119 a 142 cm en hombres y 108 a 136 cm en mujeres (Laron, 1995). Presentan pobre desarrollo muscular y debilidad, así como endurecimiento de extremidades inferiores y superiores. El corazón es pequeño y tienen poca resistencia al ejercicio (Brat y Ziv, 1997). La maduración esquelética es retardada y lenta comenzando desde el útero. El cierre del cartílago epifisiario en los huesos largos ocurre de los 16 a los 18 años en niñas y de los 20 a 22 años en niños. Las fontanelas y las suturas del cráneo también cierran tardíamente (Laron, 1999). Los huesos faciales están subdesarrollados. Los huesos largos y el diploe del cráneo son delgados y aun en jóvenes la osteoporosis es evidente (Laron, 1999).

Los genitales y las gónadas son pequeños desde el nacimiento, evidenciado por ultrasonido

en las niñas; mientras que en los niños se presenta un pene pequeño. La pubertad es tardía, mas en hombres que en mujeres y no presentan crecimiento propio de la etapa. Ambos sexos alcanzan eventualmente un desarrollo sexual completo en la edad adulta temprana y no presentan problemas reproductivos. La mayoría de las pacientes tienen de 1 a 3 hijos normales; un padre afectado tuvo dos niños con síndrome Laron y la madre era portadora de una mutación en GHR (Laron, 2002).

El desarrollo del cerebro es menor a lo normal, evidenciado por ultrasonido al medir la circunferencia de la cabeza en el útero y el desarrollo motor es lento durante la infancia (Laron, 1999). Utilizando imágenes de resonancia magnética se encontraron daños en el tejido del sistema nervioso central, estenosis espinal, cambios degenerativos en la articulación atlanto axial y orofaringe estrecha, lo cual explica la apnea al dormir en algunos pacientes (Dagan y Abadi, 2001). Evaluaciones psicológicas repetidas en pacientes de varias edades no tratados, revelaron un patrón bajo en pruebas de inteligencia en comparación con la población normal. Se encontraron deficiencias en las pruebas de coeficiente intelectual más que en las pruebas verbales que mejoran con la edad. Existe una gran variabilidad en el desarrollo mental de pacientes con síndrome Laron, desde inteligencia normal hasta retraso mental severo (Laron, 2002).

2.2.6. Concentraciones hormonales

Las concentraciones plasmáticas de GH son elevadas, las de IGF-I son bajas y se encuentran anomalías de las proteínas ligadoras de GH (Growth Hormone Binding Proteins, GHBP); así como resistencia a GH exógena. Los niveles de GH ascienden después de la estimulación con insulina o arginina (Goodman, 1986). Los neonatos y bebés con síndrome Laron sufren hipoglucemia severa. Los niveles bajos de glucosa continúan toda la infancia hasta la edad adulta temprana, los pacientes pueden ser asintomáticos o presentar signos de hipoglucemia que mejora con la edad por el desarrollo de mecanismos compensatorios (Laron, 2002). La regulación de la secreción de GH es normal, evidenciada por el número normal de pulsos diurnos de GH, la respuesta a agentes estimulantes como arginina y a drogas supresoras como la somatostatina. La administración de IGF-I exógeno suprime los niveles de GH probando el mecanismo de retroalimentación normal (Laron, 1993b). Las concentraciones séricas de IGF-I son muy bajas, casi indetectables y no se elevan por la administración de GH exógena, demostrando el estado de resistencia de estos pacientes. Las funciones tiroideas son normales, así como la secreción adrenal. Las gonadotropinas y hormonas sexuales se encuentran bajas pero dentro de los rangos normales correlacionando con la edad (Laron, 1999). La prolactina puede estar elevada debido a un

fenómeno derivado de la alta secreción de GH por células somatotrópicas (Silbergeld, 1992).

A pesar de los niveles bajos de glucosa, la insulina sérica es relativamente alta denotando un estado de resistencia a insulina (Laron, 1999). Este estado incrementa conforme avanza la edad y el progresivo incremento de la obesidad. En pacientes adultos la hiperinsulinemia persistente puede llevar a agotamiento de insulina y diabetes.

2.2.7. Tratamiento

El único tratamiento efectivo para la insensibilidad a GH es la administración exógena de IGF-I disponible desde 1986 (Laron, 2001a). Se han tratado un número restringido de pacientes en Europa, Estados Unidos, Japón e Israel. La dosis recomendada de IGF-I es de 180 a 200 $\mu\text{g}/\text{kg}$ vía subcutánea en una o dos aplicaciones diarias. A pesar de que IGF-I es un estimulante efectivo del crecimiento lineal, la respuesta de crecimiento no es tan intensa como es el tratamiento con GH en casos de deficiencia de ésta misma hormona (Backeljauw y Underwood, 2001). El tratamiento con IGF-I afecta el crecimiento del cerebro y mejora el desequilibrio metabólico causado por la deficiencia prolongada de IGF-I. Los principales cambios observados, consisten en la normalización de los niveles sanguíneos de glucosa por la supresión de los niveles altos de insulina, la reducción del colesterol sérico, incremento de la fosfatasa alcalina sérica, fósforo sérico, reducción de los depósitos grasos y un incremento en la fuerza muscular.

2.2.8. Etiología

En este síndrome se han reportado 220 casos. El defecto primario que ocasiona la enfermedad son mutaciones en el GHR (Zhou *et al.*, 1997). La ausencia de GHBP y GHR en el hígado se ha demostrado en dos pacientes. Se han reportado 30 mutaciones distintas que afectan la expresión o funciones de GHR y GHBP. Se incluyen deleciones, mutaciones sin sentido, de cambio de marco de lectura, cambio de sentido, siendo la mayoría encontradas en el dominio extracelular de GHR, resultando en una proteína incompleta, así como procesamientos anormales o incapacidad de unirse al ligando. Otras mutaciones inhabilitan la dimerización de GHR o bien cortan su porción intracelular que resulta en incapacidad de transducir la señal (Zhou *et al.*, 1997).

Se han reportado dos tipos de disfunción de GHR: La primera, llamada Tipo I está asociada con defectos de GHR; mientras que la segunda, llamada Tipo II es debida aparentemente a defectos en la señal de transducción para producir IGF-I o posiblemente alteraciones en el gen de IGF-I o su receptor (Scriver *et al.*, 2001).

2.2.9. Modelo animal: el ratón Laron

La deficiencia de GHR no ha sido reportada en otros mamíferos aparte del humano. Algunos aspectos de la disfunción de GHR permanecen desconocidas, debido a las limitaciones éticas y prácticas de estudios en humanos. Para crear un modelo mamífero de la enfermedad se generó un ratón transgénico con disrupción del gen GHR/GHBP. El ratón homocigoto knock-out para GHR/GHBP muestra crecimiento posnatal retardado, enanismo proporcionado, ausencia de GHR y GHBP, concentraciones séricas muy bajas de IGF-I y elevadas de GH. Estas características representan el fenotipo típico de individuos con síndrome Laron. Los animales heterocigotos de GHR/GHBP muestran mínimo retardo de crecimiento pero tienen un fenotipo bioquímico intermedio con niveles disminuidos de expresión de GHR y GHBP y niveles levemente disminuidos de IGF-I. Estos hallazgos indican que el ratón deficiente de GHR/GHBP (Ratón Laron) es utilizable como modelo de síndrome Laron que provee material para elucidar aspectos de la función de GHR/GHBP que no pueden obtenerse en humanos (Zhou *et al.*, 1997).

2.3. RECEPTOR DE HORMONA DE CRECIMIENTO

2.3.1. Definición

Es miembro de la superfamilia de receptores citosina/hematopoyetina. GHR se activa por su unión a GH para estimular el crecimiento y metabolismo en músculo, hueso y células de cartílago (Vos, 1992). Los receptores de citosinas se asocian con protein-cinasas. En el caso de GHR al dimerizarse activa a tirosin-cinasas citosólicas de la familia de cinasas Janus 2 (JAK 2). La ocupación del receptor lleva a la autofosforilación de las JAK2, asociación de JAK2 con GHR y la subsecuente fosforilación del mismo receptor. La cascada de señalización intracelular incluye la activación de las protein-cinasas mitógeno-activadas (Mitogen-activated protein-kinase, MAPK) y de factores latentes de transcripción conocidos como Activadores y señaladores de transcripción (Signal transducers and activators of transcripción, STAT's). El final de la cascada de transducción es la transcripción de genes específicos como IGF-I / IGFBP-3 (Horseman, 1994).

2.3.2. Estructura

El GHR es una proteína transmembranal sencilla consistente en una parte extracelular de unión al ligando, una pequeña parte membranal y una larga cola citoplásmica que esta involucrada

en la señal de transducción. Además de unirse a GH, el receptor se dimeriza. En la mayoría de los mamíferos incluyendo al perro, se ha detectado en el suero una proteína ligadora de Hormona de Crecimiento (GHBP), que es homóloga a la parte extracelular de GHR (Amit, 1992 y Edens, 1998). Inicialmente se pensaba que las GHBP eran resultado de la proteólisis del receptor, pero recientemente se han encontrado transcritos alternativos de GHR que codifican para GHBP en ratas, ratones, humanos y monos (Edens, 1998).

2.3.3. Localización

El gen de GHR se localiza en el brazo corto del cromosoma 5 en humanos (p13-p12). Tiene 620 aminoácidos, precedido de una secuencia señal de 18 aminoácidos, consiste en 9 exones codificantes (exones 2-10) que se extienden 87 kb.

El exón 2 codifica 11 pb finales de la región no traducida (UTR), los 18 aminoácidos de secuencia señal y los primeros 5 aminoácidos del dominio extracelular de unión a la hormona. Los exones 2 al 7 codifican el dominio extracelular (EC) de 246 aminoácidos. El exón 8 corresponde al dominio transmembranal (TM) de 24 aminoácidos, codifica el final de 3 aminoácidos del dominio de unión a la hormona, los 24 aminoácidos del dominio hidrofóbico transmembranal, y los 4 primeros aminoácidos del dominio intracelular hidrofóbico. Los exones 9 y 10 forman el dominio citoplásmico (IC, intracelular) de 350 aminoácidos. La última parte del exón 10 es no codificante aproximadamente 2 kb (Edens, 1998).

2.4. RECEPTOR DE HORMONA DE CRECIMIENTO EN EL SÍNDROME LARON

2.4.1. Defectos moleculares

La patología de la forma clásica de síndrome Laron se debe a defectos moleculares en el gen de GHR o en sitios cercanos al mismo en la cascada de señalización posterior (Laron, 2002). Comprenden deleciones y varios tipos de mutaciones en exones e intrones (Godowski, 1989; Amelsem *et al.*, 1991). Solo en dos reportes se describen mutaciones que afectan el dominio transmembranal, en el exón 8 (Silbergeld, 1997) y otras cuatro mutaciones reportadas en el dominio citoplásmico en el exón 9 o 10 (Iia, 1998; Ayling, 1997; Amselem *et al.*, 1989). A pesar de la gran variabilidad de defectos moleculares en el gen de GHR, todos resultan en falla de la señal de transmisión de GH. Una simple sustitución de aminoácido en el dominio extracelular del GHR previene la unión con GH y lleva a una expresión defectuosa (Duchesnoy *et al.*, 1991).

En 1993, Laron *et al.* describieron el primer paciente con un defecto posterior al receptor muy cercano no identificado, que resultaba en la generación de IGFBP-3 pero no de IGF-I, denotando separación de señales para la transcripción de los dos genes (Laron, 1993a).

2.4.1.1. Deleciones de GHR

Los primeros ejemplos de mutaciones reportados fueron deleciones de porciones del gen de GHR que codifica para el dominio extracelular. Por análisis de Southern blot se encontraron patrones de restricción alterados de GHR en pacientes con síndrome Laron que no presentaban GHBP detectables y con niveles muy bajos de IGF-1. Así se ubicaron deleciones en los exones 3,5,6 y parte del 4 (Hull, 1999).

2.4.1.2. Mutaciones puntuales

Amselem *et al.* (1991) detectaron un cambio de T (timina) por C (citosina) en el residuo 96 del dominio extracelular que cambia fenilalanina por serina. Duquesnoy *et al.* (1991) demostraron que en células transfectadas con este cDNA no hay unión a GH (Hull, 1999).

2.4.1.3. Codones de paro

Los codones de término cortan la proteína de GHR y eliminan casi todo el dominio de GHBP así como dominios transmembranales o intracelulares (Hull, 1999).

2.4.1.4. Defectos de procesamiento de RNAm

Rosenbloom *et al.* (1990) identificaron 20 pacientes Laron en una población cerrada de origen español en el sur de Ecuador con una cambio de A (adenina) por G (guanina) que no causa sustitución de aminoácidos, pero ocasiona un procesamiento de RNAm aberrante y la deleción de 8 aminoácido del extremo 3' del exón 6. Otras mutaciones encontradas en pacientes con enanismo Laron se refieren en el cuadro 1¹.

¹ The Human Gene Mutation Database, <http://archive.uwcm.ac.uk/uwcm/mg/search/119984.html>

Cuadro 1. Mutaciones descritas en individuos con síndrome Laron

SUSTITUCIÓN DE NUCLEÓTIDOS: CAMBIO Y PÉRDIDA DE SENTIDO			
CODÓN	NUCLEÓTIDO	AMINOÁCIDO	FENOTIPO
38	TGC-AGC	Cys-Ser	Enanismo Laron
38	TGC-TGA	Cys-TERM	Enanismo Laron
40	TCA-TTA	Ser-Leu	Enanismo Laron
43	CGA-TGA	Arg-TERM	Enanismo Laron
44	GAG-AAG	Glu-Lys	Enanismo Laron
50	TGG-CGG	Trp-Arg	Enanismo Laron
65	CAG-TAG	Gln-TERM	Enanismo Laron
71	AGG-AAG	Arg-Lys	Enanismo Laron
80	TGG-TAG	Trp-TERM	Enanismo Laron
96	TTT-TCT	Phe-Ser	Enanismo Laron
122	TGT-TGA	Cys-TERM	Enanismo Laron
125	GGT-GCT	Val-Ala	Enanismo Laron
131	CCA-CAA	Pro-Gln	Enanismo Laron
144	GTC-GAC	Val-Asp	Enanismo Laron
144	CCA-CAA	Pro-Gln	Estatura corta
152	GTC-GAC	Val-Asp	Enanismo Laron
153	ATC-ACC	Ile-Thr	Enanismo Laron
154	CAA-CCA	Gln-Pro	Enanismo Laron
155	GTG-GGG	Val-Gly	Enanismo Laron
157	TGG-TGA	Trp-TERM	Enanismo Laron
161	CGC-TGC	Arg-Cys	Enanismo Laron
183	GAA-TAA	Glu-TERM	Enanismo Laron
211	CGT-GGT	Arg-Gly	Enanismo Laron
211	CGT-CAT	Arg-His	Enanismo Laron
217	CGA-TGA	Arg-TERM	Enanismo Laron
224	GAG-GAC	Glu-Asp	Enanismo Laron
224	GAG-TAG	Glu-TERM	Enanismo Laron
422	TGC-TTC	Cys-Phe	Enanismo Laron
561	CCT-ACT	Pro-Thr	Enanismo Laron

Continuación del Cuadro 1...

DEFECTOS EN EL PROCESAMIENTO DEL RNAm		
INTRÓN	SUSTITUCIÓN	FENOTIPO
2	G-A	Enanismo Laron
3	G-A	Enanismo Laron
3	T-C	Enanismo Laron
4	G-A	Enanismo Laron
5	G-C	Enanismo Laron
5	A-G	Enanismo Laron
6	G-T	Enanismo Laron
6	A-G	Enanismo Laron
7	C-T	Enanismo Laron
8	G-C	Enanismo Laron
8	G-C	Estatura corta
9	G-A	Enanismo Laron
DELECCIONES PEQUEÑAS		
CODÓN	DELECCIÓN	FENOTIPO
35	TTCacCAAGTGCCGT	Enanismo Laron
45	ACTTttTCATGCCACT	Enanismo Laron
229	CTCtaTGTAACACT	Enanismo Laron
281	CCCCcagttccagttccAAAGATT	Enanismo Laron
308	TTAGCcATTTCATGATA	Enanismo Laron
DELECCIONES GRANDES		
DESCRIPCIÓN	FENOTIPO	
1.3 Kb Entre el intrón 4 y el exón 5. Descrito a nivel de DNA genómico	Enanismo Laron	

2.5. PROTEÍNAS LIGADORAS DE HORMONA DE CRECIMIENTO (GHBP)

Entre el 30 al 50% de la GH circula ligada a proteínas del suero capaces de unirse con alta afinidad. Estas proteínas ligadoras de GH (GHBP) han mostrado tener una estructura idéntica al dominio extracelular de GHR (Laron y Klinger, 1989). La determinación en suero de GHBP puede ser utilizada como indicador de la localización del defecto molecular de GHR en síndrome Laron. Una concentración baja de GHBP en parientes o en pacientes con síndrome Laron ayuda a identificar portadores heterocigotos. Concentraciones normales o elevadas de GHBP en pacientes con síndrome Laron típico, denota un defecto en las áreas transmembranal, intracelular o posteriores a GHR (Silbergeld, 1997).

2.6. FACTORES DEL CRECIMIENTO DE AMPLIO ESPECTRO

2.6.1. Antecedentes

En 1957 se demostró la presencia de ciertos factores del crecimiento en los extractos del suero, los cuales han sido aislados, purificados y caracterizados, mostrando que tienen la actividad mitótica del suero y la capacidad para inducir la síntesis de DNA, RNA, proteínas y la proliferación celular (Daughday, 1989). Estos factores han sido conocidos durante años con el nombre genérico de somatomedinas, término propuesto por Daughday en 1972 para designar un grupo de compuestos que comparten las siguientes características: su concentración en el suero se regula por GH, tienen actividad mitogénica en cultivos de fibroblastos, inducen la incorporación de sulfato o proteoglicanos al cartílago, y presentan una acción metabólica semejante a la insulina sobre los tejidos adiposo y muscular (Fonseca, 1993).

2.6.2. Descripción

Los factores de crecimiento semejantes a la insulina (IGF-I e IGF-II) son péptidos incluidos en la familia de la insulina y la relaxina, por compartir algunas características estructurales, en especial con la proinsulina. Estos péptidos han sido aislados, purificados y caracterizados en el plasma humano. El IGF-I/Sm C es una proteína básica con peso molecular de 7 649 d, tiene una sola cadena polipeptídica de 70 aminoácidos y tres puentes disulfuro que son de importancia para la estructura secundaria. Se caracteriza por presentar zonas de marcada homología con la molécula de proinsulina, sobre todo en las áreas correspondientes a las cadenas A y B, 45% de cuyos

aminoácidos son idénticos. En cambio, las moléculas son muy diferentes en la fracción correspondiente al péptido C, que en las diferentes insulinas tienen 30 a 45 residuos de aminoácidos, mientras que el IGF-I solamente tiene 12, y los aminoácidos que lo forman también son diferentes. El IGF-I tiene además un octapéptido en la fracción COOH terminal que no se encuentra en las proinsulinas, fracción denominada "dominio D". El núcleo no polar de la insulina monomérica, indispensable para la estructura terciaria y la unión a los receptores, se conserva en el IGF-I al igual que los residuos de cistina, lo que en conjunto determina una estructura tridimensional muy semejante a la de la insulina. Con base en estas semejanzas, se ha sugerido que ambas hormonas provienen de un ancestro común, y que la divergencia del gen que codifica para las dos moléculas ocurrió probablemente en la época de aparición de los primeros vertebrados, siendo la molécula de la proinsulina un producto de más reciente evolución (Fonseca, 1993).

2.6.3. Acción biológica

2.6.3.1. Efectos sobre el crecimiento y la diferenciación celular

Los factores del crecimiento IGF-I e IGF-II promueven el crecimiento y la diferenciación de muchos tejidos, la proliferación celular y la síntesis de múltiples proteínas. Tienen una acción importante en el crecimiento de las células derivadas de las tres capas embrionarias, fibroblastos, mioblastos, hepatocitos, células de tumores ováricos y pituitarios, epitelio del cristalino, condrocitos, tejidos muscular hematopoyético y epitelial (Fonseca, 1993).

2.6.3.2. Efectos metabólicos

Las somatomedinas pueden repetir los efectos de la insulina; los efectos de tipo insulinoide implican su unión a receptores localizados en la membrana celular, pero su acción es mucho menor que la de la insulina. Se piensa que en condiciones fisiológicas las somatomedinas tienen poco efecto sobre la homeostasis de la glucosa. Sin embargo, se han descrito algunos casos de hipoglucemia en pacientes con tumores productores de somatomedinas, por lo que se apoya el concepto de que las acciones metabólicas que realizan el IGF-I y el IGF-II se ejercen a través de su interacción con los receptores de insulina.

2.6.3.3. Acción sobre el cartilago

La acción de las somatomedinas sobre el cartilago es muy específica, estimula el transporte de aminoácidos, síntesis de RNA, DNA y proteínas, incorporación de sulfato de proteoglicanos y de prolina a la colágena. La sensibilidad del cartilago a la acción de las somatomedinas esta aumentada en los animales hipofisectomizados y en los desnutridos; en cambio está disminuida en los animales adultos; aunque la insulina a elevadas concentraciones puede estimular el cartilago, las somatomedinas muestran mayor potencia y especificidad de respuesta (Fonseca, 1993).

2.6.4. Regulación de la síntesis

Los niveles de las somatomedinas son regulados por la concentración de GH. Los individuos de baja estatura con deficiencia de GH tienen niveles bajos de somatomedinas; también se han encontrado concentraciones bajas en los casos de hipopituitarismo y por el contrario se observan elevadas en casos de acromegalia y gigantismo. La desnutrición y una dieta calórica y proteica baja tienen un efecto adverso sobre el crecimiento y las somatomedinas, a pesar de existir concentraciones normales o elevadas de hormona de crecimiento. Así, los animales sometidos a dietas restringidas, muestran una rápida caída en los niveles de IGF-I, la cual no se corrige con la administración de GH, sugiriendo la importancia de la nutrición en la actividad de las somatomedinas. Mas aun, la composición de la dieta también es importante, ya que animales tratados con dietas bajas en proteínas disminuye la incorporación de sulfato al cartilago, similar a lo que ocurre en los diabéticos, en quienes la falta de insulina y la utilización inadecuada de los combustibles metabólicos como la glucosa, determina un efecto adverso sobre la concentración de somatomedinas (Fonseca, 1993).

2.7. EL PERRO COMO MODELO ANIMAL DEL CRECIMIENTO

2.7.1. Descripción y antecedentes

En ninguna otra especie de mamíferos existe tanta variación en tamaño corporal y talla como en las razas de perros domésticos, por ejemplo entre adultos las razas pueden diferir en peso hasta 10 veces. Igualmente las diferencias existentes se pueden observar fácilmente desde forma de la cabeza, proporciones corporales, cubierta de pelo y conducta (Favier *et al.*, 2001). Stockard y Vicari (1941) colocaron esta idea dentro de un contexto endocrinológico para conocer las bases de estas diferencias en forma y comportamiento. Este concepto está basado en las similitudes

entre algunas enfermedades endocrinas conocidas en el humano y algunas características de razas caninas. Por ejemplo, la postura, la voz, el tamaño alargado y el sobrecrecimiento de la piel en razas como el San Bernardo y el Bloodhound hicieron a Stockard y Vicari pensar en acromegalia. En su primera aproximación para demostrar una base morfológica, encontraron que no existe correlación entre el tamaño de la pituitaria en proporción con el tamaño del perro, únicamente encontraron que las razas grandes mostraron un número mayor a lo normal de células acidófilas en el lóbulo anterior (Stockard y Vicari, 1941). Los primeros datos bioquímicos que dan bases endocrinológicas para las diferencias en tamaño corporal entre razas de perros fueron presentados por Eigenmann y Patterson (1984). En un estudio en perros adultos de diferentes razas, correlacionaron las concentraciones circulantes de IGF-I con el tamaño corporal. Entre subgrupos de razas como son los Poodle miniatura, toy y estándar; Eigenmann y Patterson (1984) encontraron que los niveles plasmáticos de IGF-I en adultos eran paralelos al tamaño corporal, mientras que en las concentraciones plasmáticas basales de GH en pruebas de estimulación con clonidina eran similares entre perros de diferentes tamaños.

Nap y Mol (1993) reportaron cambios en los niveles plasmáticos de GH e IGF-I durante el crecimiento prepuberal en cachorros Gran Danés y Poodle miniatura. Las concentraciones basales de GH en los cachorros Gran Danés fueron inicialmente altas y declinaron hasta niveles bajos en edad adulta cuando llegaron al año y medio de edad. En los cachorros Poodle los niveles plasmáticos basales de GH fueron bajos y no cambian significativamente con el tiempo (Nap y Mol, 1993). En concordancia con las observaciones de Eigenmann y Patterson (1984), las concentraciones plasmáticas de IGF-I en el Gran Danés fueron más altas que las observadas en Poodle miniatura.

Existe evidencia de que el eje GH-IGF-I es importante en la determinación del tamaño corporal en perros de diferentes razas. Las observaciones de Nap y Mol (1993) sugieren que el largo del cuerpo y las diferencias entre algunas razas caninas son el resultado de un exceso juvenil transitorio de GH o en las palabras de Stockard y Vicari (1941) "Que la modificación temporal glandular actúa solo por un corto tiempo durante el desarrollo y tiene un gran impacto sobre ciertos órganos que están en un periodo crítico altamente sensibles".

Para explorar estas aseveraciones Favier *et al.* (2001) estudiaron los patrones de secreción y las concentraciones plasmáticas de GH, IGF-I e IGF-II en perros jóvenes en crecimiento Gran Danés como raza grande, y Beagle como raza mediana. Los resultados demostraron que las diferencias entre el tamaño corporal final entre razas medianas y grandes de perros están asociados con diferencias en la liberación de GH a edad temprana y no con diferencias de niveles circulantes de IGF-I o de IGF-II. En ambas razas existió un periodo inicial de hipersomatotropismo

juvenil. La persistencia relativamente larga de la liberación elevada de GH en el Gran Danés puede estar causada por la maduración tardía de los factores de la liberación de GH (Favier *et al.*, 2001).

2.8. ENANISMO EN EL PERRO

2.8.1. Patofisiología

El enanismo pituitario en el perro se presenta cuando hay una falla en la secreción de GH en un animal joven descrito en el Pastor Alemán y ocasionalmente en otras razas; se define como una enfermedad autosómica recesiva (Carlyle, 1997). Los cachorros afectados (dd) son normales al nacimiento pero crecen muy poco en comparación con sus hermanos. A los seis meses un perro normal pesa seis veces más que los animales afectados. Los cachorros homocigotos conservan el lanugo o pelo de cachorro por meses y presentan fallas de desarrollo sexual (Carlyle, 1997). Una de las causas sugeridas es la atrofia por presión que ocasiona la distensión quística del ducto cráneo faríngeo embrionario en la adenohipófisis (Hendidura de Rathke). De cualquier manera esta teoría es cuestionable porque estos quistes son comunes, particularmente en razas braquicéfalas y solo en algunas ocasiones el alargamiento ocasiona enanismo (Norman, 1998). El enanismo pituitario es raro pero ha sido reportado en varias razas caninas y felinas (Feldman y Nelson, 1998). No hay predisposición de sexo (Nikholas, 1978).

Resultados de estudios inmunohistoquímicos ofrecen una explicación para el desarrollo de enanismo pituitario, sugieren que las células embrionarias cráneo faríngeas no se diferencian en células adenohipofisiarias funcionales, su secreción anormal ocasiona la formación de estructuras quísticas que oprimen zonas adyacentes resultando en disfunción (Capen, 1993). Independientemente de cuál sea la causa del desarrollo pituitario anormal, hay una falla de secreción de GH, ya sea sola o acompañada de falla en la secreción de otras hormonas incluyendo la hormona folículo estimulante (FSH), hormona Luteinizante (LH), tiotropina (hormona estimulante de la tiroides TSH), hormona adrenocorticotrópica (ACTH) y sus órganos blanco. (Norman, 1998). El panhipopituitarismo implica una deficiencia de todas las hormonas pituitarias. La insensibilidad a GH a nivel celular produce enanismo pituitario secundario en humanos pero no ha sido comprobado en perros y gatos (Feldman y Nelson, 1996).

2.8.2. Signos clínicos

- Crecimiento y anomalías dermatológicas. La falla en el crecimiento es usualmente fácil de apreciar cuando a una edad de 2-3 meses el animal mantiene un tamaño proporcionalmente pequeño, en comparación con sus hermanos. La capa suave de pelo se conserva y no se desarrolla el folículo piloso de adulto. El pelo es fácilmente depilable y resulta en una alopecia truncal, iniciando en puntos separados y afectando cabeza y extremidades. Con el tiempo la piel se vuelve delgada e hiperpigmentada, así como arrugada. En algunos casos hay retraso en la erupción dental y cierre de placas de crecimiento (Norman, 1998).
- Otras anomalías. Los enanos pituitarios son usualmente activos y permanecen alerta inicialmente, aunque la conducta agresiva se ha observado en algunos perros. A pesar de poder mantener una función reproductiva normal, es típico encontrar anestro en hembras y atrofia testicular con azoospermia en machos (Feldman y Nelson, 1996). El retraso mental, enanismo desproporcionado y disgenesia epifisaria sugiere la complicación con hipotiroidismo secundario explicando la baja actividad que ocurre en etapas avanzadas (Norman, 1998). Las infecciones respiratorias y de la piel son complicaciones comunes a largo plazo (Feldman y Nelson, 1996). Un desarrollo anormal de los glomérulos debida a la deficiencia de GH puede afectar la función renal disminuyendo la filtración acompañado de deficiencia de glucocorticoides y tiroxina (T4) desencadenando azotemia (Rijneberk, 1996). La signología nerviosa es ocasionada por el alargamiento de los quistes en hipófisis (Norman, 1998). Los signos clínicos de enanismo pituitario son altamente sugestivos del diagnóstico sin embargo otras causas deben ser excluidas (Cuadro 2). Distinguir entre hipotiroidismo congénito y enanismo pituitario puede ser difícil porque los signos son similares y las dos enfermedades ocurren con frecuencia (Norman, 1998).

Cuadro 2. Causas de crecimiento retardado en perros (Norman, 1998)

<p>Nutricionales</p> <ul style="list-style-type: none"> • Subalimentación • Calidad pobre en la dieta 	<p>Hepáticas</p> <ul style="list-style-type: none"> • Puentes portosistémicos • Hepatitis
<p>Fisiológicas</p> <ul style="list-style-type: none"> • Cruza accidental entre razas muy diferentes • Variación de tamaño entre razas 	<p>Renales</p> <ul style="list-style-type: none"> • Displasia renal • Enfermedad poliquística de los riñones • Defectos tubulares • Glomerulonefropatías • Pielonefritis
<p>Endocrinas</p> <ul style="list-style-type: none"> • Hipotiroidismo • Diabetes mellitus • Hipoadrenocorticismo 	<p>Infecciosas / inflamatorias</p> <ul style="list-style-type: none"> • Enfermedad crónica inflamatoria
<p>Gastrointestinales</p> <ul style="list-style-type: none"> • Parasitismo • Megaesófago • Anormalidades de anillos vasculares • Insuficiencia pancreática exógena • Obstrucción intestinal crónica 	<p>Iatrogénicas</p> <ul style="list-style-type: none"> • Administración inapropiada de glucocorticoides
<p>Cardiacas</p> <ul style="list-style-type: none"> • Enfermedad cardíaca congénita • Endocarditis 	<p>Otras</p> <ul style="list-style-type: none"> • Enfermedad de almacén lisosomal • Displasia esquelética/condrodistrofia • Mucopolisacaridosis • Inmunodeficiencias • Hidrocefalia

2.9 RECEPTOR DE HORMONA DEL CRECIMIENTO EN EL PERRO

2.9.1. Descripción

El GHR es miembro de la superfamilia de receptores citosina/hematopoyetina. Esta familia incluye además del GHR, a los receptores de prolactina, las interleucinas -2 a -7, -9, -11 a -13 y -15, los interferones, y receptores para varios factores de crecimiento como el factor neurotrópico ciliar, eritropoyetina, factor estimulante de las colonias de granulocitos, factor estimulante de

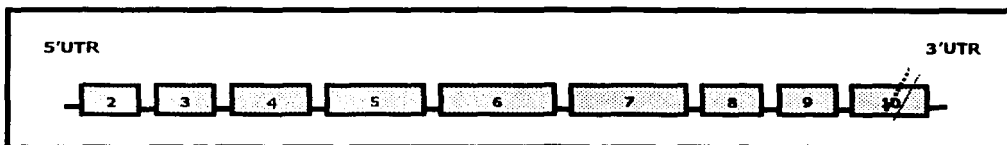
las colonias de granulocitos-macrófagos, factor inhibidor de leucemia y oncostanina M (Cosman, 1990; Finidori, 1995).

A pesar de haber sido estudiado en diversas especies (conejo, humano, ratón, rata, oveja, vaca, pollo, cerdo y mono) el gen de GHR tiene pocos reportes en el perro (Van Garderen *et al.*, 1999). El grupo de investigación de Evert van Garderen *et al.* (1999) ha estudiado las características de GHR, identificando que la glándula mamaria canina expuesta a progesterona y progestinas es el mayor sitio de producción extra pituitaria de hormona del crecimiento (Selman y Mol, 1994; Van Garderen *et al.*, 1997). Además, la expresión de GH se encontró en tumores mamaros malignos y benignos, indicando que la producción local puede tener un papel patobiológico en la organogénesis y tumoración de la glándula mamaria. Debido a que la GH en perro no se une al receptor de prolactina, la producción de GH solo es efectiva en presencia de GHR (Rutterman, 1986).

2.9.2. Estructura

Para su estudio, el GHR canino es similar con el de humano, numerando los exones correspondientes (Figura 1). El codón de inicio (ATG) en la secuencia del perro está localizado en la posición 12 y el codón de paro se encuentra en la posición 1926, resultando en una secuencia codificante de 1914 pb, produciendo una proteína de 638 aminoácidos. Es consistente en similitud con las características de GHR humano incluyendo el péptido señal de 18 aminoácidos, y comparado con el GHR de conejo y porcino tienen alta homología en nucleótidos y aminoácidos (Van Garderen *et al.*, 1999).

Figura 1. Transcritos del Gen del Receptor de Hormona de Crecimiento Canino



III. OBJETIVOS, HIPÓTESIS, METAS Y JUSTIFICACIÓN

3.1. OBJETIVOS

3.1.1. Objetivo principal

- Definir el tipo de enanismo que presentan los individuos de la raza Chihuahueño en comparación con otras razas caninas, y establecer su similitud con el síndrome Laron en seres humanos.

3.1.2. Objetivos particulares

- Establecer los perfiles endocrinológicos presentes en el perro Chihuahueño en comparación con razas de distintas tallas.
- Identificar las bases genéticas que participan en el fenotipo de enanismo en el perro Chihuahueño.

3.2. HIPÓTESIS

- El perro Chihuahueño presenta concentraciones plasmáticas normales de GH y bajas de IGF-I en comparación con otras razas caninas y presenta mutaciones en la secuencia del cDNA del gen de GHR como ocurre en humanos con síndrome Laron.

3.3. METAS

- Obtención, clonación y secuenciación del gen de Receptor de Hormona de Crecimiento como principal gen candidato para detectar posibles mutaciones responsables del fenotipo de talla pequeña en el perro Chihuahueño.
- Evaluación de las concentraciones plasmáticas de Hormona de Crecimiento y de IGF-I en perros de raza Chihuahueño y otras razas caninas.

3.4. JUSTIFICACIÓN

- El estudio del perro Chihuahueño con base en las alteraciones moleculares y endocrinológicas presentes en el síndrome Laron en humanos, permitirá definirlo como modelo animal de esta enfermedad.

IV. MATERIALES Y MÉTODOS

4.1. DETERMINACIÓN DE LAS CONCENTRACIONES PLASMÁTICAS DE IGF-I Y GH

4.1.1. Material biológico

Se utilizó una muestra de 70 perros sanos de las siguientes razas puras: Chihuahueño, Pug, Beagle, Pastor Alemán y Mastín Inglés provenientes de diferentes criaderos (Cuadro 3). La edad de los animales fluctuó entre los 2 a 72 meses (Anexo VI). Los animales fueron puncionados en la vena cefálica, observando todas las medidas de asepsia, con una aguja calibre 21 ó 22 y las muestras sanguíneas fueron colectadas por vacío en tubos Vacutainer con EDTA. El horario de colección fue por la mañana y con los perros en ayuno mínimo de 12 horas. Las muestras fueron centrifugadas a 3000 rpm por 10 minutos a 4°C y el plasma recuperado fue mantenido en congelación (-20°C) (Favier *et al.*, 2001).

Cuadro 3. Número de individuos analizados por raza para obtener las concentraciones plasmáticas de GH e IGF-I

Raza	Hembras	Machos	Total
Chihuahueño	20	10	30
Pug	4	1	5
Beagle	7	2	9
Pastor Alemán	8	5	13
Mastín Inglés	9	4	13
Total	48	22	70

4.1.2. Determinación de GH y de IGF-I

La valoración endocrinológica consistió en la determinación de las concentraciones plasmáticas de IGF-I por Inmuno radiometría (IRMA) y de GH por Radioinmunoanálisis homólogo (RIA) en el Chihuahueño y en diferentes razas caninas (Cuadro 3).

La determinación de IGF-I en plasma se realizó mediante el ensayo comercial DSL-2800

ACTIVE™ Non-Extraction Insulin-Like Growth Factor-I Coated-tube IRMA (Diagnostic Systems Laboratories, Inc. Texas USA). Jensen y Hoier (1995) refieren la utilización de un ensayo comercial de IRMA para determinar concentraciones plasmáticas de IGF-I en perros con resultados favorables. El procedimiento se describe en el Anexo I.

La determinación de las concentraciones plasmáticas de GH se realizó por RIA homólogo con GH canina (cGH) altamente purificada, proteína utilizada como referencia y para el proceso de iodinar, que junto con el anticuerpo específico Anti-cGH fueron obtenidos del Dr. A. F. Parlow (Pituitary Hormones and Antisera Center, Torrance CA, USA). Rigamonti (1999, 2001) refiere la utilización de los reactivos antes mencionados para cuantificar concentraciones plasmáticas de GH en el perro en estudios de liberación de GH. El procedimiento se describe en el Anexo I.

4.1.3. Análisis estadístico

Para el análisis preliminar de las concentraciones plasmáticas de IGF-I y de GH se utilizó un modelo de efectos fijos que incluyó los efectos de raza, sexo, así como la interacción raza por sexo y la covariable edad de los animales.

Se verificaron los supuestos del modelo de normalidad y homogeneidad de varianzas con un análisis exploratorio de Levene que mostró que existía heterogeneidad de varianzas por lo que se realizó la transformación de Box y Cox (Montgomery, 1997), utilizando la rutina incluida en el paquete estadístico JMP versión 3.1.2.

La transformación de Box y Cox se realizó con la formula siguiente:

$$\begin{aligned} \text{Para GH: } & \ln(\text{GH (ng/ml)}) * 10.000237399 \\ \text{Para IGF-I: } & ((\text{IGF-I ng/ml})^{-2}) - 1/.0067463144122 \end{aligned}$$

Dicha transformación corrigió la heterogeneidad de varianzas observadas. A partir del análisis de los datos transformados se estableció que solo el efecto de raza para la variable IGF-I fue significativo, por lo que se procedió a realizar una prueba de Tukey DHS (Gill, 1978), comparando las medias de mínimos cuadrados ponderados por número de observaciones por subclase.

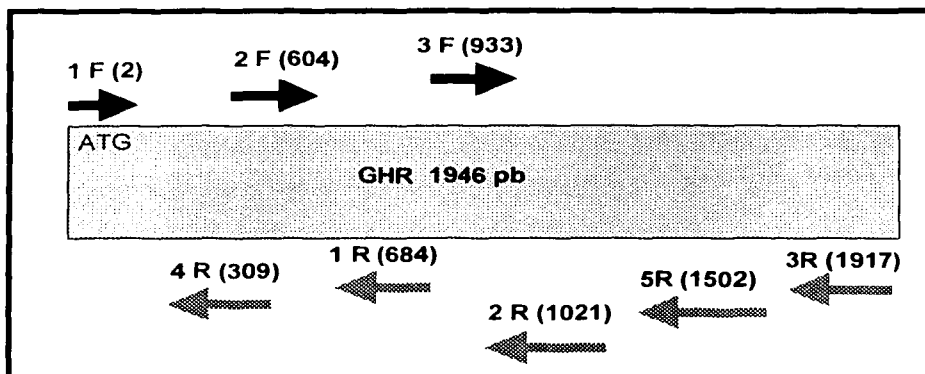
4.2. GENÉTICA MOLECULAR DEL cDNA DEL GEN DE GHR CANINO

4.2.1. Secuenciación de GHR

Consistió en el análisis de la secuencia del gen del receptor de la Hormona de Crecimiento (GHR) en el perro Chihuahueño en comparación con el perro Pastor Alemán y la secuencia del gen de GHR del perro previamente reportada por van Garderen *et al.* (1999) referida en GenBank N° AF133835 *Canis familiaris* growth hormone receptor precursor (GHR) RNAm. De un perro Chihuahueño y de un Pastor Alemán se obtuvo el DNA complementario (cDNA) para el gen de GHR por Transcripción Reversa seguido de Reacción en Cadena de la Polimerasa (RT-PCR), a partir de RNA purificado de hígado (Anexo II). El producto de amplificación se clonó en el vector pUC 19/*Sma I* (Anexo II).

La secuenciación se efectuó mediante el sistema Big Dye™ Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit (PE Applied Biosystems), usando como molde DNA purificado del plásmido de las clonas para el GHR utilizando diferentes iniciadores que permitieron leer las cadenas en 2 direcciones (Anexos III y IV). Los iniciadores empleados se diseñaron basándose en la secuencia de GHR del perro reportada por van Garderen *et al.* (1999) (GenBank N° AF133835 *Canis familiaris* growth hormone receptor precursor (GHR) RNAm), abarcando el total de la misma (1942 pb). Los productos de la reacción de secuencia fueron leídos en un secuenciador automático (ABI PRISM® 377, PE Applied Biosystems). En la figura 2 se muestra la estrategia de avance sobre el gen para su secuenciación y entre paréntesis las posiciones de los iniciadores utilizados en dirección 5'-3'.

Figura 2. Iniciadores de GHR y la posición donde se localizan en la secuencia



4.2.2. Análisis de la secuencia

El resultado de la secuenciación automática fue analizado mediante programas de cómputo especializados. La secuencia fue corregida con el programa Chromas (Versión 1.62, Technelysium) que permite verificar el electroferograma y determinar las bases que no fueron reconocidas claramente por el secuenciador automático. La secuencia corregida fue comparada con la base de datos GenBank (NCBI, Home Page National Center for Biotechnology Information) con la aplicación BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) donde se observa la similitud de la secuencia obtenida con secuencias de GHR de otros organismos. En este paso, las secuencias de GHR de Chihuahueño y de Pastor Alemán siempre fueron similares en primer lugar a la secuencia de GHR de perro reportada por van Garderen *et al.* (1999).

Conforme se obtenían las partes de la secuencia total del GHR los datos se integraban con el programa Contig Manager del paquete DNASIS® For Windows® (Version 2.6 DNA and Protein Sequence Analysis System, Hitachi Software Engineering America LTD), para ser comparadas, ensambladas y obtener un consenso de la secuencia. Los consensos finales de las secuencias de GHR de Chihuahueño y Pastor Alemán; así como la secuencia de GHR reportada por van Garderen *et al.* (1999) fueron comparados en el programa con el cual se observaron las similitudes y diferencias de pares de bases entre las tres secuencias.

A partir de la secuencia de nucleótidos se obtuvo la traducción deducida de aminoácidos encontrando un solo marco de lectura que se extendió a lo largo de toda la secuencia. Para esto se utilizó el programa CLONE (Versión 1.01, Scientific and Educational Software). El programa ALIGN (Versión 1.01, Scientific and Educational Software) se empleó para identificar diferencias entre las tres secuencias y así, verificar algún cambio de bases que pudiera afectar la lectura de aminoácidos y posiblemente la estructura de la proteína.

V. RESULTADOS

5.1. DETERMINACIÓN DE LAS CONCENTRACIONES PLASMÁTICAS DE GH Y DE IGF-I

Las concentraciones plasmáticas tanto de GH y de IGF-I por individuo se muestran en el Anexo VI.

Las medias aritméticas y las medias de mínimos cuadrados en nanogramos por mililitro, así como el error estándar de las concentraciones plasmáticas por raza de GH se presentan en el cuadro 4 y de las concentraciones de IGF-I se muestran en el cuadro 5.

Al analizar las concentraciones de GH con relación al efecto de raza y sexo, no se encontraron diferencias significativas; al igual que la interacción raza por sexo (Anexo V); debido a que al analizar previamente la variable edad no fue significativa y por lo tanto, fue eliminada del modelo. La concentración más alta se observó en el Mastín Inglés (16.087 ± 1.27 ng/ml) y la menor concentración plasmática en el Pastor Alemán (6.122 ± 1.27 ng/ml).

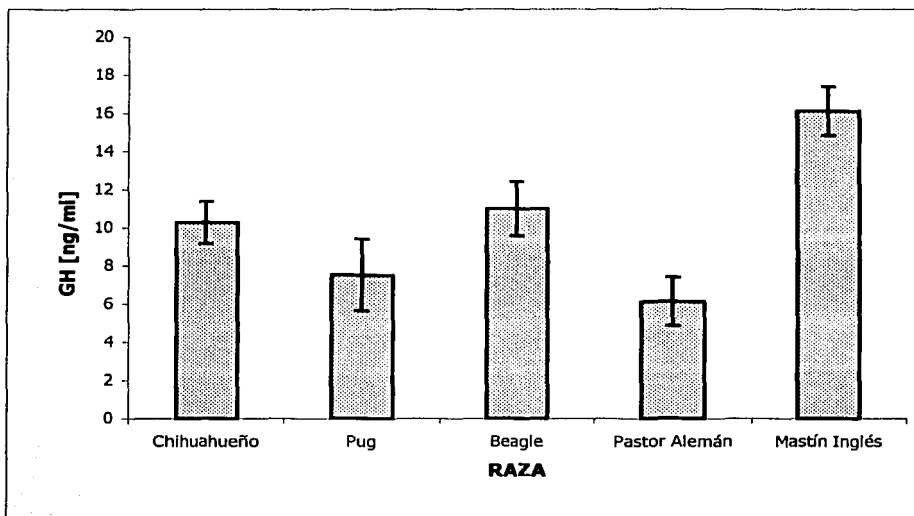
Cuadro 4. Medias de mínimos cuadrados y error estándar de las concentraciones plasmáticas de GH [ng/ml] en las razas estudiadas

RAZA	n	GH $X \pm ee^*$ [ng/ml]	GH $MMC \pm ee^{**}$ [ng/ml]
Chihuahueño	30	12.39 ± 1.28	10.266 ± 1.11
Pug	5	8.02 ± 1.51	7.513 ± 1.87
Beagle	9	12.91 ± 2.94	10.980 ± 1.41
Pastor Alemán	13	9.34 ± 2.56	6.122 ± 1.27
Mastín Inglés	13	20.85 ± 4.78	16.087 ± 1.27

* Media Aritmética y error estándar

** Media de mínimos cuadrados y error estándar, datos retransformados

Figura 3. Medias de mínimos cuadrados y error estándar de las concentraciones plasmáticas de GH [ng/ml] por raza



Para IGF-I el efecto de raza fue altamente significativo ($P < 0.0001$). Los efectos de sexo y la interacción raza por sexo no fueron significativos (Anexo V). El efecto de la edad si fue significativo ($P < 0.05$). La comparación de medias de concentraciones plasmáticas de IGF-I de las razas Chihuahueño, Beagle, Pastor Alemán y Mastín Inglés mostró diferencias significativas ($P < 0.05$). En el caso del Pug la diferencia no fue significativa en comparación con las concentraciones plasmáticas de Beagle y del Pastor Alemán. Las concentraciones plasmáticas más altas las presentó el Mastín Inglés (610.843 ± 1.56 ng/ml) y las más bajas el Chihuahueño (15.275 ± 1.22 ng/ml).

Cuadro 5. Medias de mínimos cuadrados y errores estándar de las concentraciones plasmáticas de IGF-I [ng/ml] en las razas estudiadas

RAZA	N	IGF-I $\bar{X} \pm ee^*$ [ng/ml]	IGF-I MMC $\pm ee^{**}$ [ng/ml]
Chihuahueño	30	19.52 \pm 3.49	15.275 \pm 1.22 ^d
Pug	5	178.67 \pm 48.56	156.464 \pm 2.96 ^{cb}
Beagle	9	98.50 \pm 27.04	83.140 \pm 1.88 ^c
Pastor Alemán	13	301.76 \pm 44.04	270.425 \pm 1.56 ^b
Mastín Inglés	13	628.43 \pm 47.58	610.843 \pm 1.56 ^a

* Media Aritmética y error estándar

** Media de mínimos cuadrados y error estándar, datos retransformados
Literales distintas indican diferencias significativas (P<0.05)

Figura 4. Medias de mínimos cuadrados de las concentraciones plasmáticas de IGF-I [ng/ml] por raza

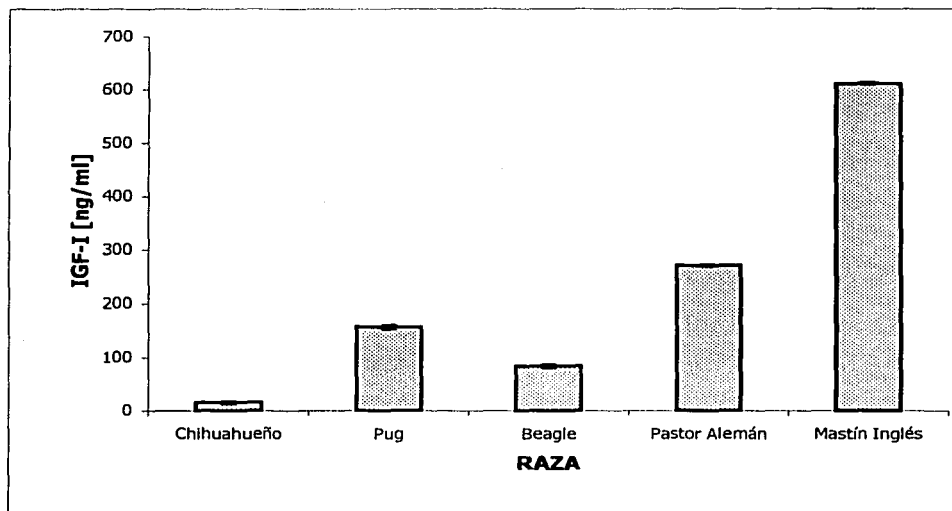


Figura 5. Peso promedio de las razas estudiadas y medias de mínimos cuadrados de las concentraciones plasmáticas de GH [ng/ml]

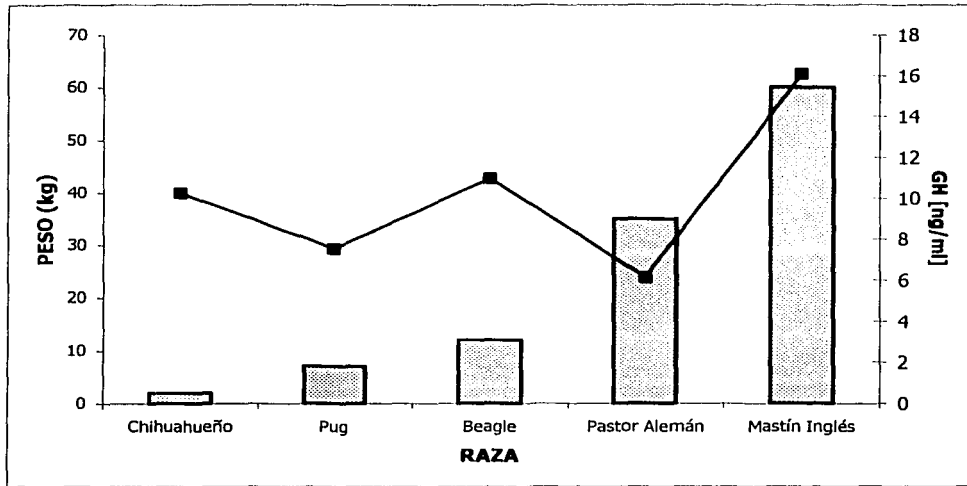
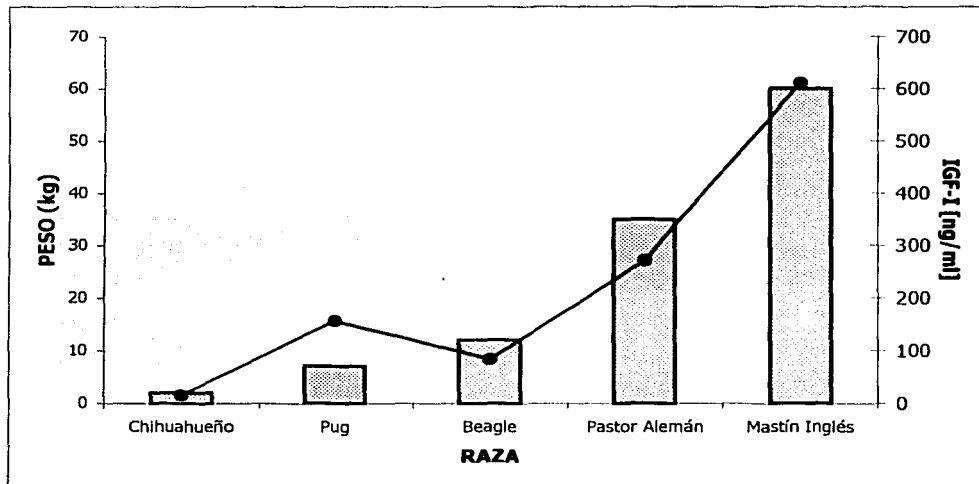


Figura 6. Peso promedio de las razas estudiadas y medias de mínimos cuadrados de las concentraciones plasmáticas de IGF-I [ng/ml]

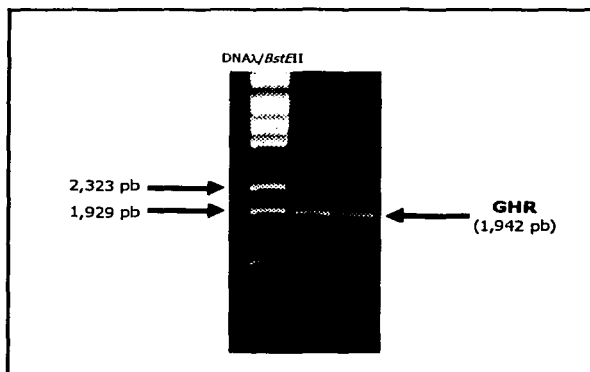


5.2. GENÉTICA MOLECULAR DEL cDNA DEL GEN DE GHR CANINO

5.2.1. Obtención del cDNA de GHR de Chihuahueño y Pastor Alemán

Mediante RT-PCR se obtuvo un producto de amplificación de 1942 pb correspondiente al cDNA del gen de GHR en el Chihuahueño y en el Pastor Alemán (Figura 7).

Figura 7. Producto de PCR de cDNA de GHR de Chihuahueño y Pastor Alemán. Electroforesis en gel de agarosa 1% teñido con bromuro de etidio



5.2.2. Clonación de GHR

El cDNA de GHR del Chihuahueño y del Pastor Alemán fue clonado en el vector pUC19/*Sma* ITA obteniendo cinco colonias recombinantes de cada individuo que fueron verificadas con los iniciadores M13 y GHR1F3R comprobando la presencia de GHR.

5.2.3. Secuenciación del cDNA de GHR

Se obtuvo la secuencia total del cDNA del gen GHR de Chihuahueño y Pastor Alemán. En las Figuras 8 y 9 se muestra como la secuencia consenso se obtuvo en fragmentos que al final fueron empalmados resultando en la secuencia total de GHR.

Figura 8. Gráfico de la estrategia de secuenciación de GHR de Chihuahueño mostrando los iniciadores utilizados

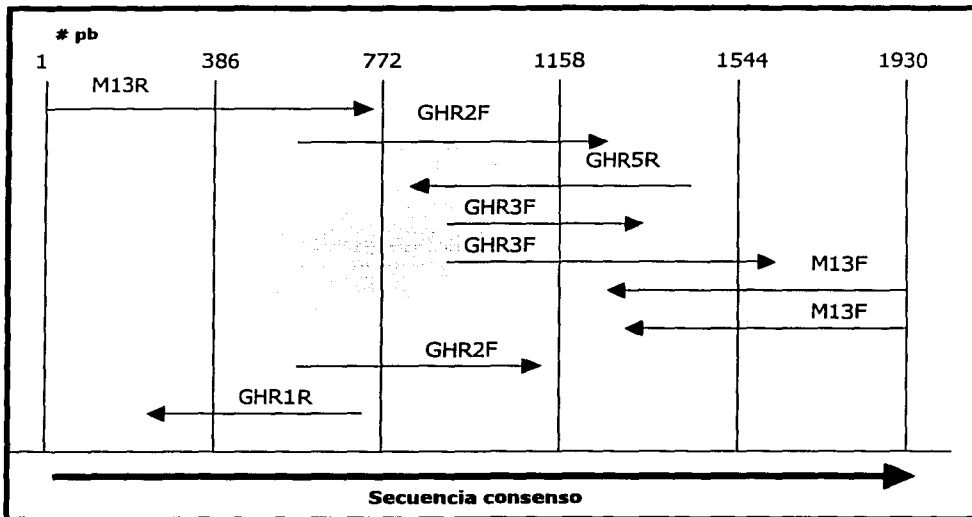
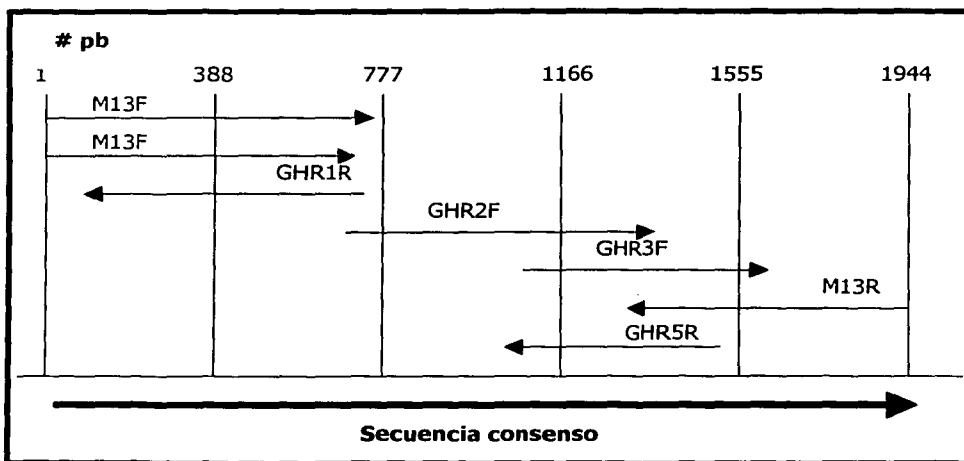


Figura 9. Gráfico de la estrategia de secuenciación de GHR de Pastor Alemán mostrando los iniciadores utilizados



El codón de inicio ATG en la secuencia canina se encontró en la posición 12 y el codón de paro TAG en la posición 1926 resultando en una secuencia codificante de 1914 pb y 638 aminoácidos concordante con las características de la secuencia de GHR de perro descrito por van Garderen *et al.* (1999) (Figuras 11 y 12).

Al comparar las secuencias obtenidas en un individuo de Pastor Alemán y un individuo de Chihuahueño con la secuencia reportada por van Garderen *et al.* (1999) se encontraron diferencias. En lo referente al Pastor Alemán se encontraron 9 cambios de base que resultan en el cambio de 9 aminoácidos. En la secuencia del Chihuahueño hubo 7 cambios de base que modificaron 3 aminoácidos. De estos dos perros se encontraron 3 diferencias de base compartidas que resultaron en el cambio de 2 aminoácidos.

En la secuencia de GHR de Chihuahueño se encontró una mutación en la posición 727 de adenina por guanina en un triplete AAA por AGA que cambia el aminoácido de lisina por arginina, lo cual no se observa en la secuencia del mismo fragmento en el Pastor Alemán ni en la secuencia de GHR reportada por van Garderen *et al.* (Figura 10).

Figura 10. Localización de la mutación encontrada en el cDNA de GHR de Chihuahueño comparada con la secuencia de Pastor Alemán y la reportada por van Garderen *et al.* (1999)

	727
	*
GHR	CTGAAA AA TATGGCGAGTTCAGTGAG
PASTOR ALEMÁN
CHIHUAHUEÑOG.....
	242
	*
GHR	EKYGEFSE
PASTOR ALEMÁN
CHIHUAHUEÑO	.R.....

El cambio de adenina por guanina en esta posición, no se encuentra dentro de las mutaciones reportadas de cambio de pares de bases en pacientes con síndrome Laron. Las mutaciones reportadas más cercanas a este sitio son dos referidas en el codón 224, la primera cambia GAG por GAC, resultando en ácido glutámico por ácido aspártico (Goddard, 1995) y la segunda, cambia GAG por TAG resultando en ácido glutámico por un codón de terminación (Kaji, 1997). En las mutaciones de la secuencia de pares de bases de GHR en individuos con síndrome Laron no se ha reportado hasta el momento un cambio de lisina por arginina.

En el Chihuahueño se encontraron 2 mutaciones al final de la secuencia de GHR. En la posición 1920 se cambia el codón de CCG a CGG resultando en prolina por arginina y en la posición 1923 se cambia de ATG a AAG resultando en metionina por lisina. Estas mutaciones no se han reportado en pacientes con síndrome Laron.

Figura 11. Secuencia de pares de bases del cDNA de GHR de Chihuahueño y Pastor Alemán comparadas con la secuencia reportada por van Garderen *et al.* (1999)

	10	20	30	40	50	60
	GHR 1F/5'					
GHR	GT CCTACAGGATGGATCTCTGACAGTCTGTTGACCTTGGCAGTGGCAGGCTCAGGCA					
PASTOR ALEMÁNG					
CHIHUAHUEÑOC					
	70	80	90	100	110	120
GHR	GTGCTTTTCTGGGAGTGAAGCCACACCAACTATCCTTGGCAGGCCATCCCAGAGTCTAC					
PASTOR ALEMÁN					
CHIHUAHUEÑOC					
	130	140	150	160	170	180
GHR	AAAGAGTTAATCCAGGCCCTAGGGACAAATCTCTGAGAAGCCTAAGTTCACCAAGTGGC					
PASTOR ALEMÁN					
CHIHUAHUEÑO					
	190	200	210	220	230	240
GHR	GTTACCTGAACTAGAGACTTTTCATGCCACTGGACAGATGGGGTTCGCATGGTCTAA					
PASTOR ALEMÁN					
CHIHUAHUEÑO					
	250	260	270	280	290	300
GHR	AGAACGCAGGATCCGTACAGCTGTTCTATATTAGAAGGAGCACGAAGATGGACTCAAG					
PASTOR ALEMÁN					
CHIHUAHUEÑO					
	310	320	330	340	350	360
GHR	AGTGAAAGAATGCCCGATTATGTCTCTGCCGGAGAAAACAGCTGTTACTTTAATTCAT					
PASTOR ALEMÁNC					
CHIHUAHUEÑO					
	370	380	390	400	410	420
GHR	CTTATACCTCCATTTGGATACCCTACTGTATCAAGCTAACCAGCAATGGTGGTACCGGTGG					
PASTOR ALEMÁN					
CHIHUAHUEÑO					
	430	440	450	460	470	480
GHR	ATCAAAAAGTGTTCCTCTGTTGAGGAAATAGTCAACCAGACCCACCCATCGGCCTCAACT					
PASTOR ALEMÁN					
CHIHUAHUEÑO					
	490	500	510	520	530	540
GHR	GGACTTTACTGAACATCAGTTTAACGGGAATCCATGCAGATATCCAAGTGAGATGGGAAC					
PASTOR ALEMÁN					
CHIHUAHUEÑO					
	550	560	570	580	590	600
GHR	CACCACCAATCGCGATGTTCAGAAGGGATGGATAGTCTCAAGTATGAACFACAATACA					
PASTOR ALEMÁNG					
CHIHUAHUEÑO					
	610	620	630	640	650	660
	GHR 2F					
GHR	AAGAAGTGAATGACTCCAGTGAATAATGATGGACCTGTATCGGCAACATCAGTTCACG					
PASTOR ALEMÁN					
CHIHUAHUEÑOA					

Continuación de Figura 11...

	670	680	690	700	710	720
GHR	TTFACTCGTTGAGACTGGATAAAGAATATGAAGTCGCTGTGAGATCTAGACAACGAAACT					
PASTOR ALEMÁN					
CHIHUAHUERO					
	730	740	750	760	770	780
GHR	CTGAAAAATATGGCGAGTTCAAGTGAGCGCTCTATGTAACACTTCCTCAAATGAGTCCAT					
PASTOR ALEMÁN					
CHIHUAHUERO					
	790	800	810	820	830	840
GHR	TTGCATGTGAAGAAGACTTCCAGTTCCATGGTCTTAATTATTATCTTTGGAATATTTG					
PASTOR ALEMÁN					
CHIHUAHUERO					
	850	860	870	880	890	900
GHR	GGCTAACGATGATATTATTTTATTTCATATTTCTAAACAACAAAGGATTAAAGATCTGA					
PASTOR ALEMÁN					
CHIHUAHUERO					
	910	920	930	940	950	960
				GHR 3F		
GHR	TTCTTCCCCCGGTTCCAGTTCCAAAGATTAAGAAATTCATCCAGATCTCCTCAAGGAAG					
PASTOR ALEMÁN					
CHIHUAHUERO					
	970	980	990	1000	1010	1020
GHR	GAAAAATTAGAAGAGGTGAATACAATCTTAGCCATTTCATGACAACATAAACCTGAATCTCT					
PASTOR ALEMÁN					
CHIHUAHUERO					
	1030	1040	1050	1060	1070	1080
				GHR 2R		
GHR	ACUACGATGACTCTTGGGTTGAATTCATTGAGCTGGATATTGATGACCTAGATGAAAAGA					
PASTOR ALEMÁN					
CHIHUAHUERO					
	1090	1100	1110	1120	1130	1140
GHR	CCGAAGGATCAGACACAGACAGACTTCTAAGCAACGACCATGAGAAATCACTTAACATCC					
PASTOR ALEMÁN					
CHIHUAHUERO					
	1150	1160	1170	1180	1190	1200
GHR	TTGGGGCAAAGGATGATGACTCTGGAGTACCAGCTGTATGAACCTGACATCTGGAGA					
PASTOR ALEMÁN					
CHIHUAHUERO					
	1210	1220	1230	1240	1250	1260
GHR	CTGATTTTAATGCCAGTGATGTGGTGATGGTACTTCAGAGGTTGCTCAGCCACAGAGGT					
PASTOR ALEMÁN					
CHIHUAHUERO					
	1270	1280	1290	1300	1310	1320
GHR	TAAAAAGGGGAAGTAGATCTCTTSTGGCTTGACCAGAGAAGAAATCAAATAACTCACCTCTA					
PASTOR ALEMÁN					
CHIHUAHUERO					

TESIS CON FALLA DE ORIGEN

Continuación de Figura 11...

	1330	1340	1350	1360	1370	1380
GHR	CTGATACCTACCCCTACCACCTCAGCAGCCAGCATTTATCCTGGCGAAGGAAAAACAACATA					
PASTOR ALEMÁNC.....					
CHIHUAHUENSE					
	1390	1400	1410	1420	1430	1440
GHR	GACCACTTCTAATTAGTGGAACTGAGTCAACTCAGCAAGCTGCCGATCTCAGCTAAGTA					
PASTOR ALEMÁNA.....A.....					
CHIHUAHUENSEC.....					
	1450	1460	1470	1480	1490	1500
GHR	ATCCGAGTTCACCTGGCAAAACATTGACTTTTATGCCAGGTAAGCGACATFACTCTAGCGG					
PASTOR ALEMÁNC.....C.....					
CHIHUAHUENSEC.....					
	1510	1520	1530	1540	1550	1560
	GHR 5R					
GHR	GGACTCTACTCCCTTCCCCAGCCCAAAAGAATAAGCCAGGGATATCTCCATGTGACATGC					
PASTOR ALEMÁN					
CHIHUAHUENSE					
	1570	1580	1590	1600	1610	1620
GHR	CTCCAGAAGTGGCCCTCACTCTGCCAAGCTAACTTCATCATGGCAATGGCTACTCTGTGG					
PASTOR ALEMÁNG.....					
CHIHUAHUENSE					
	1630	1640	1650	1660	1670	1680
GHR	AGCCAGATGCCAAAAGTGCATCACTGTGCCCCCTCAGTCCGAGGCTGAATCACGGTAG					
PASTOR ALEMÁNG.....					
CHIHUAHUENSE					
	1690	1700	1710	1720	1730	1740
GHR	AGCCAAAGCTTTAAACAGGAAGACATTTACATCACCACAGAAAAGCCTTACCACTACCGCTG					
PASTOR ALEMÁN					
CHIHUAHUENSE					
	1750	1760	1770	1780	1790	1800
GHR	GCCAGTCTGGGACAAC TGAGAGGGCTGTGAGTTCTGAGATGCCTGTCCGACAGTATACCT					
PASTOR ALEMÁNT.....G.....					
CHIHUAHUENSE					
	1810	1820	1830	1840	1850	1860
GHR	CCATTACATCATCCAGTCTCCGCGGGCCCTGTGCTCAATGCAACTGGCTTGCCTTGC					
PASTOR ALEMÁNC.....					
CHIHUAHUENSE					
	1870	1880	1890	1900	1910	1920
GHR	CTGACAAAAGAGTTTCTCTCATCATGTGGCTACGTGAGCACAGACCAACTGAACAAAATCA					
PASTOR ALEMÁN	A.....C.....					
CHIHUAHUENSE					
	1930	1940				
	GHR 3R/3'					
GHR	TGGCGTAGCCCTTCTTTGCTTCCCA					
PASTOR ALEMÁN	A.....G.....					
CHIHUAHUENSE					

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Figura 12. Secuencia de aminoácidos del cDNA de GHR de Chihuahueño y Pastor Alemán comparadas con la secuencia reportada por van Garderen *et al.* (1999)

	10	20	30	40	50	60
GHR PASTOR ALEMÁN CHIHUAHUEÑO	ETGMDLWQQLLLTLAVARRGRSAERGRSEATPTILGSAKQVLDQKRVNIGRQVNSSEKPEFTQR					
	70	80	90	100	110	120
GHR PASTOR ALEMÁN CHIHUAHUEÑO	SPELETFSCHWTDGVRHIGLKNAGRSVQLFYTRSTQEWTVQWKELCFDYVSAGENSQCYFNSS					
	130	140	150	160	170	180
GHR PASTOR ALEMÁN CHIHUAHUEÑO	YTSIWI PYCIKLTSSNGGTVQKQCFSVVEIVQPDFPIGLHWTLNLSLTGISADIQVRWEP					
	190	200	210	220	230	240
GHR PASTOR ALEMÁN CHIHUAHUEÑO	PPNADVQKGIWLVKYLQYKEVNESQWKMMDPVSATSPVPVYSLRLDKEYEVRVRSRQRNS					
	250	260	270	280	290	300
GHR PASTOR ALEMÁN CHIHUAHUEÑO	EKYGEFSEALYVTLQMSPFACEEDFQPPWFLLIIIFGIFGLTMI LFLFI FSKQQR IKMLI					
	310	320	330	340	350	360
GHR PASTOR ALEMÁN CHIHUAHUEÑO	LPPVVPKIKGIDPDLKKEGKLEEVNTILAIDNYKPEFYNDSSWVEFIELDIDDLDEKT					
	370	380	390	400	410	420
GHR PASTOR ALEMÁN CHIHUAHUEÑO	EGSDTDRLLSNDHEKSLNILGAKDDSGRTSCYEPDILETDFNASDVCDDGTSEVAQPCRL					
	430	440	450	460	470	480
GHR PASTOR ALEMÁN CHIHUAHUEÑO	KGEVDLLCLDQKNQNSPSTDTTFTTQQPSII LAKENKPRLLISGTESTQQAHTQLSN					
	490	500	510	520	530	540
GHR PASTOR ALEMÁN CHIHUAHUEÑO	PSSLANIDFYAQVSDITLGSVVLSPGQKNKAGISPCMPPEVASLQAHFIMDNAYFCE					
	550	560	570	580	590	600
GHR PASTOR ALEMÁN CHIHUAHUEÑO	ADAKKICITVAPHVEASRVENSFQEDIIYITTESITTTAQQSGTTERAVSSEMPVPDYTS					
	610	620	630	640		
GHR PASTOR ALEMÁN CHIHUAHUEÑO	III LQSRGLVLNATALPLDREFLESQGVSTQKQIIFIM					

VI. DISCUSIÓN

6.1. Concentraciones de GH por raza

Al comparar las concentraciones plasmáticas de GH en las diferentes razas estudiadas (Chihuahueño, Beagle, Pug, Mastín Inglés y Pastor Alemán), no se encontraron diferencias significativas, con esto, se deduce que no presenta efecto la variable raza sobre las concentraciones de GH en razas de diferentes tallas.

El punto importante a destacar es que el perro Chihuahueño presenta concentraciones plasmáticas de GH que no difieren con las otras razas de diferente talla como el Beagle, Pug, Pastor Alemán y el Mastín Inglés; lo cual concuerda con la descripción de síndrome Laron en humanos, donde las concentraciones de GH son normales o elevadas (Laron, 2002). En las razas estudiadas no existió diferencia en las concentraciones plasmáticas de GH por efecto de la edad.

Los resultados de Chihuahueño (10.26 ± 1.1 ng/ml), Beagle (10.98 ± 1.4 ng/ml) y Mastín Inglés (16.08 ± 1.27 ng/ml) se encuentran dentro de los valores de referencia normales, que son GH >10 ng/ml para perros sanos, reportados por Norman (1998).

6.2. Relación de la concentración plasmática de IGF-I con el tamaño de la raza

Las concentraciones plasmáticas de IGF-I concordaron con el tamaño de las razas, encontrándose en ambos rubros de menor a mayor: el Chihuahueño, el Beagle, el Pastor Alemán y el Mastín Inglés; a excepción del Pug que se ubicó entre el Beagle y el Pastor Alemán. Al comparar los resultados obtenidos con las referencias existentes de Eigenmann (1981) para IGF-I, se encontraron concordancias. Para el Beagle, la referencia es 87 ± 33 ng/ml (54 a 120 ng/ml) y el valor obtenido fue 83.140 ± 1.88 ng/ml. En cuanto al Pastor Alemán, la referencia es 280 ± 23 ng/ml (257 a 303 ng/ml), siendo el valor obtenido 270.425 ± 1.563 ng/ml. Con respecto al Chihuahueño y al Mastín Inglés no hay hasta el momento valores de referencia reportados. Norman (1998) cita valores menores de 50 ng/ml de IGF-I para perros y gatos con deficiencia de GH; y Eigenmann (1981) en estudios con perros Pastor Alemán con enanismo pituitario, reportó valores de 11 ± 2 ng/ml (9 a 13 ng/ml). Con esto, y con las bajas concentraciones encontradas en el Chihuahueño (15.27 ± 1.22 ng/ml) con relación a las otras razas estudiadas en este trabajo, el Chihuahueño se define como una raza de tamaño pequeño y con niveles bajos de IGF-I.

Si se comparan las concentraciones plasmáticas de IGF-I del Chihuahueño con las del

Pastor Alemán como referencia de ser un perro de conformación normal, se tiene que las concentraciones del chihuahueño representan el 5.7% de las encontradas en el Pastor Alemán. En pacientes humanos con síndrome Laron las concentraciones de IGF-I son muy bajas, casi indetectables lo que llevaba a pensar a los primeros investigadores de este padecimiento que la producción de IGF-I estaba abatida en estos individuos (Laron, 2002). La evaluación de IGF-I es una valoración indirecta de GH porque cuando se secreta en forma normal, al llegar al órgano blanco su efecto puede ser alterado, ya sea por falta del receptor para Hormona de Crecimiento, problemas en la expresión de IGF-I o de ambos, resultando en una pobre producción de IGF-I, y como consecuencia hay deficiencias del crecimiento.

Al comparar el peso de las dos razas, existe una gran diferencia. Los adultos del Pastor Alemán alcanzan de 61 a 66 cm del piso a la región de la cruz y un peso de 34 a 39 Kg; mientras que los adultos de Chihuahueño pesan entre 0.5 a 2.5 Kg (Payró, 1981) y alcanzan de 15 a 25 cm a la cruz como máximo. Con esto, se relaciona el peso con el tamaño de los animales, encontrando que los niveles de IGF-I presentaron una fuerte asociación con la talla de los perros de las razas estudiadas.

En todas las razas la edad tiene un efecto sobre las concentraciones de IGF-I las que disminuyen conforme el animal crece, es decir en los perros jóvenes las concentraciones son mayores que cuando alcanzan la edad adulta. Este aspecto no lo encontramos en GH donde la edad no mostró efecto sobre las concentraciones de la misma hormona.

Los resultados presentados son un punto de partida dentro del estudio endocrinológico del crecimiento en razas miniatura, debido a la escasez en reportes de valores de referencia de concentraciones plasmáticas de GH y de IGF-I en la raza Chihuahueño o en otros perros de raza pequeña.

6.3. Secuencia de cDNA de GHR de Chihuahueño

La mutación observada en la secuencia de GHR de Chihuahueño no encontró correspondencia en las descritas en pacientes con síndrome Laron. Las mutaciones por sustitución de aminoácidos en diferentes regiones del gen de GHR son las que se presentan más comúnmente en humanos con síndrome Laron, por lo tanto es necesario llevar a cabo la comprobación de esta mutación en otros individuos de raza Chihuahueño para determinar si está relacionada con el enanismo o se debe a un polimorfismo sin efecto funcional. Dentro del mismo contexto, los cambios en la secuencia del GHR encontrados en el Pastor Alemán, y el hecho de haber sido un número mayor que los encontrados en el GHR del Chihuahueño, acentúan la importancia de

profundizar en la secuenciación del GHR de otros individuos de las razas antes mencionadas y de otras razas miniatura como son el Yorkshire, Pinscher miniatura, Pomerania, etc.

El perro Chihuahueño como modelo animal de síndrome Laron ha concordado fuertemente en dos aspectos: concentraciones plasmáticas normales de GH y bajas de IGF-I. En cuanto a la mutación encontrada en el GHR, la misma sugiere la secuenciación de GHR en más individuos de la raza con una gran probabilidad de encontrarla en otros animales, o bien, de hallar diferentes mutaciones. Esto se apoya en el hecho de que las concentraciones plasmáticas de GH no se están reflejando en las concentraciones de IGF-I, ni en la talla de la raza, puntualizando el estudio en el intervalo de producción de GH y respuesta de IGF-I, colocando al gen de GHR como objetivo principal para identificar qué sucede con la GH al unirse con su receptor, y posteriormente con la cadena de señalización.

Actualmente, dentro de los modelos animales de enanismo están las aves, bovinos, cerdos y ratones en los cuales no se han realizado estudios a nivel molecular del gen de GHR como en el ratón knock-out para GHR/GHBP (Ratón Laron). Este animal como único modelo animal de síndrome Laron, se ha venido utilizando para llevar a cabo tratamientos a largo plazo con IGF-I con miras a obtener metodologías aplicables en pacientes Laron; sin embargo, dentro de las mutaciones reportadas en GHR humano en individuos con este tipo de enanismo, sólo se ha descrito una mutación a nivel del codón de inicio en un paciente donde se inactiva todo el gen. El resto de las mutaciones reportadas se encuentran a lo largo del gen, principalmente en la secuencia que codifica para el dominio extracelular, resultando en una proteína incompleta o afectando su funcionalidad, más no en una delección total.

Así, el Chihuahueño como modelo animal de enanismo permite el estudio de las posibles mutaciones al nivel del gen de GHR y sus implicaciones en la talla pequeña que presenta. Los hallazgos encontrados en el perro Chihuahueño lo proponen como un organismo idóneo para continuar la investigación de la regulación del crecimiento, involucrando mecanismos endocrinológicos como concentraciones de GH y de IGF-I; al igual que fenómenos a escala molecular para encontrar y estudiar posibles genes candidatos.

Este modelo de enanismo se desarrolló de forma natural desde unos cien años antes de nuestros días, donde se tienen las primeras referencias de criadores especializados en Chihuahueño que comenzaron a definir las características deseables de la raza, principalmente su tamaño pequeño. El polimorfismo del gen de GHR estudiado en pacientes Laron es una interrogante dentro del estudio del gen de GHR del Chihuahueño con las posibles similitudes o diferencias con los reportes en humanos, si consideramos que los rasgos fenotípicos en perros de esta raza se han fijado al paso del tiempo en manos de los criadores. Estos hechos pueden llevar a un número

reducido de mutaciones determinantes de un fenotipo dentro de una población, en este caso la talla del perro que es considerado como el más pequeño del planeta.

VII. CONCLUSIONES

Dentro del complejo sistema del crecimiento de los seres vivos, conforme se conoce sobre los factores reguladores de la talla de los individuos se vislumbran nuevas expectativas. En lo referente a mamíferos, la diversidad de conformaciones corporales, presenta una amplia gama de posibilidades en el estudio de los determinantes de su tamaño y forma. Dentro de este ámbito, las diferentes razas de perros, son buenos modelos animales para estudiar el crecimiento comparados con otras especies de mamíferos, como cerdos, ratones o bovinos, que presentan una menor diversidad de tamaños. Con este marco en el presente trabajo se estudió a la raza más pequeña, el perro Chihuahueño como posible modelo de enanismo y confrontar sus características de tamaño y conformación con razas medianas y grandes. Comprendido dentro de las razas miniatura o de compañía por su corta talla, se estudió al Chihuahueño con base a lo descrito en síndrome Laron en humanos, referido como un enanismo debido a alteraciones en el gen de GHR, con concentraciones plasmáticas de GH normales o elevadas y concentraciones bajas de IGF-I. Los hallazgos en el Chihuahueño son más que alentadores. Este perro de estatura corta tiene concentraciones plasmáticas de GH similares a otras razas de talla mayor que él, como son el Pug, el Beagle, el Pastor Alemán y el Mastín Inglés, las mismas que no se ven reflejadas en las concentraciones plasmáticas de IGF-I como sucede en las otras razas donde éstas concentraciones se relacionan fuertemente con el tamaño.

La mutación encontrada en la posición 727 del cDNA del gen del GHR en una primera aproximación al estudio de este gen que ante la evidencia de que las concentraciones normales de GH no están resultando en concentraciones normales de IGF-I, es posible la existencia de diferentes alteraciones en el gen de GHR en el Chihuahueño que no permiten la correcta función del sistema de la hormona con su receptor y la cadena de señalización posterior al receptor que lleva a la producción de IGF-I. La secuenciación del gen de GHR en otros individuos de raza Chihuahueño y el hallazgo de otras mutaciones, permitirá definirlo como modelo animal de enanismo. Hasta el momento se propone que el perro Chihuahueño posiblemente presenta una forma de enanismo similar a lo descrito en síndrome Laron, sin presentar las alteraciones orgánicas inherentes a la enfermedad en humanos.

El estudio del enanismo en el perro Chihuahueño se realizó en dos áreas importantes como endocrinología y biología molecular para abordar el enanismo como un problema de crecimiento. Las determinaciones endocrinológicas lo definieron como fuerte candidato de ser un modelo animal de síndrome Laron. Los hallazgos moleculares en el cDNA del gen de GHR soportan la aseveración a reserva de obtener mayores evidencias que seguramente reforzaran la percepción del

Chihuahueño como modelo animal.

"De todas las razas, ésta es la que presenta ejemplares más pequeños; su reducido tamaño, sin embargo no acusa deformidad o falta de armonía en cualquiera de sus partes. Su tipo está determinado por su gran cabeza amanzanada; hocico corto, grandes orejas desplegadas, ojos notablemente expresivos y estructura sólida sin sugerencia de debilidad o fragilidad. Es compacto, balanceado, ágil y vigoroso. De gran temperamento, se muestra siempre inquisitivo, alerta y vivaz; muy pegado al amo, es valiente hasta la temeridad, que sorprende en su tamaño. Es importante la correcta relación de su longitud a su altura, la espalda recta y a nivel, patas de longitud media, andar enérgico, cola en alto y expresión picaresca. El conjunto de características citadas determina la apariencia del Chihuahueño". Tomado del libro El Perro y su Mundo, Tratado de Zootecnia Canina. MVZ. José Luis Payró Dueñas. México: Loera Chávez Hnos. CIA Editorial S.A. 1981.

VIII. BIBLIOGRAFÍA

1. Amselem S, Duquesnoy P. Laron dwarfism and mutations of the growth hormone receptor gene. *N Engl J Med* 1989; 321:989-995.
2. Amselem S, Sobrier ML, Duquesnoy P. Recurrent nonsense mutations in the growth hormone receptor from patients with Laron dwarfism. *J Clin Invest* 1991; 87:1098.
3. Amit T. Growth Hormone and prolactin binding proteins in mammalian serum. *Endocrinology* 1992; 131:1793-1803.
4. Ayling RM, Ross R. A dominant negative mutation of the growth hormone receptor causes familial short stature. *Nature Genet* 1997; 16:13-14.
5. Backeljauw PF, Underwood LE. The GHIS Collaborative Group. Therapy for 6.5-7.5 years with recombinant insulin like growth factor I in children with growth hormone insensitivity syndrome: A clinical research center study. *J Clin Endocrinol Metab* 2001; 86:1504-1510.
6. Baumbach L, Schiavi A, Bartlett R. Clinical, biochemical and molecular investigations of a genetic isolate of growth hormone insensitivity (Laron's syndrome). *J Clin Endocrinol Metab* 1997; 82:444-451.
7. Baxter RC. High molecular weight insulin like growth factor binding protein complex. *J Biol Chem* 1989; 264:11843-11848.
8. Brat O, Ziv I. Muscle force and endurance in untreated and human growth hormone deficiency or Laron syndrome. *Horm Res* 1997; 47:45-48.
9. Campbell KL. Growth hormone related disorders in dogs. *Compendium on Continuing Education for the Practicing Veterinarian* 1998; 10:477-481.
10. Capen CC. The endocrine glands. In: *Pathology of Domestic Animals*. 4th ed. San Diego: Academic Press KVF Jubb 1993: 267-347.
11. Carlyle T. *Veterinary Pathology. USA: Williams and Wilkins* 1997: 1223-1227.
12. Cosman D. A new cytokine receptor super family. *Trends Biochem Sci* 1990; 15:265-270.
13. Dagan Y, Abadi O. Severe obstructive sleep apnoea syndrome in an adult patient with Laron syndrome. *Growth Hormone and IGF Res* 2001; 11:247-249.
14. Daughaday WH, Laron Z. Defective sulfation factor generation: A possible etiological link in dwarfism. *Trans Assoc Am Phys* 1969; 82:129-138.
15. Daughaday E. Insulin like growth factors I and II. Peptide messenger ribonucleic acid and gene structures, serum and tissue concentrations. *Endocrin Rev* 1989; 10:68-91.

16. Duquesnoy P, Sobrier ML, Amselem S, Goossens M. Defective membrane expression of human growth hormone (GH) receptor causes Laron type GH insensitivity syndrome. *Proc Natl Acad Sci USA* 1991; 88:10272-10276.
17. Edens A. Alternative processing of growth hormone receptor transcripts. *Endocr Rev* 1998; 19:559-582.
18. Eigenmann JE. Diagnosis and treatment of dwarfism in a German Shepherd dog. *JAAHA* 1981; 17:798.
19. Eigenmann JE, Patterson DF. Growth Hormone deficiency in the mature dog. *JAAHA* 1984; 20:741.
20. Eshet R, Laron Z, Pertzalan A, Dintzman M. Defect of human growth hormone in the liver of two patients with Laron type dwarfism. *Isr J Med Sci* 1984; 20:8-11.
21. Eshet R, Peleg S. Some properties of the plasma hGH activity in patients with Laron type dwarfism determined by a radio receptor assay using human liver tissue. *Horm Res* 1985; 22:276-283.
22. Favier RP, Mol JA, Kooistra HS, Rijnberk A. Large body size in the dog is associated with transient GH excess at a young age. *Journal of Endocrinology* 2001; 170:479-484.
23. Feldman EC. *Endocrinología y Reproducción en Perros y Gatos*. México: Mc Graw Hill-Interamericana 2000.
24. Feldman EC, Nelson RW. Disorders of Growth hormone. In: *Canine and Feline Endocrinology and Reproduction*. 2nd ed. USA: Saunders Philadelphia 1996.
25. Finidori J. Cytokine receptor signaling through two novel families of transducer molecules: Janus kinases, and signal transducers and activators of transcription. *J Endocrinol* 1995; 147:11-23.
26. Fonseca M. Factores de Crecimiento. En *Fundamentos de Neuroendocrinología*. Biblioteca de la Salud. México: Fondo de Cultura Económica 1993:123-147.
27. Fraker PJ, and JC Speck JR. Protein and cell membrane iodinations with a sparingly soluble chloroamide, 1,3,4,6-tetrachloro-3 α , 6 α -diphenylglycouril. *Biochem Biophys Res Commun* 1978; 80:849-857.
28. Gill L. Design and analysis of experiments in the Animal and Medical Sciences. Iowa USA: The Iowa State University Press 1978.
29. Goddard AD, Covello R, Luoh SM, Clackson T, Attie KM. The growth hormone insensitivity group. *N Engl J Med* 1995; 17:1093-8.

30. Godowski PJ, Leung DW. Characterization of the human growth hormone receptor gene and demonstration of a partial gene deletion in two patients with Laron type dwarfism. *Proc Natl Acad Sci USA* 1989; 86:8083-8087.
31. Goodman L. *Malformaciones en el Lactante y el Niño*. España: Salvat 1986.
32. Guevara-Aguirre J, Rosenbloom AL. Growth hormone receptor deficiency in Ecuador: Clinical and biochemical phenotype in two populations. *J Clin Endocrinol Metab* 1993; 76:417-423.
33. Hoier R. An improved radioimmunoassay for the determination of canine growth hormone based on commercially available reagents. *J Vet Med A* 1995; 42:521-530.
34. Horseman NS. Growth hormone and prolactin signal transducers. *Endocrinology* 1994; 135:1280-1291.
35. Hull KL. Growth Hormone Resistance: clinical states and animal models. *J Endocrinol* 1999; 163:165-172.
36. Iida K, Takashi Y, Kaji H. Growth hormone insensitivity syndrome with high serum GH binding protein levels caused by a heterozygous splice site mutation of the GH receptor gene producing a lack of intracellular domain. *J Clin Endocrinol Metab* 1998; 83:531-537.
37. Jensen AL, Hoier R. Determination of IGF-I in dogs using a commercially available Immunoradiometric assay. *Eur J Clin Chem Clin Biochem* 1995; 12: 939-945.
38. Kaji H, Nose O, Tajiri H. Novel compound heterozygous mutations of growth hormone (GH) receptor gene in a patient with GH insensitivity syndrome. *J Clin Endocrinol Metab* 1997; 11:3705-3709.
39. Kornreich L, Horev G, Schwarz M, Karmazyn B, Laron Z. Laron syndrome abnormalities: Spinal stenosis, os odontoideum, degenerative changes of the atlanto-odontoid joint, and small oropharynx. *Am J Neuroradiology* 2002; 23:625-631.
40. Laron Z, Pertzalan A. Genetic pituitary dwarfism with high serum concentration of growth hormone. A new inborn error of metabolism? *Isr J Med Sci* 1996; 2:152-155.
41. Laron Z, Pertzalan A, Karp M. Pituitary dwarfism with serum levels of growth hormone. *Isr J Med Sci* 1968; 4:883-894.
42. Laron Z, Pertzalan A, Karp M. Administration of Growth hormone to patients with familial dwarfism with high plasma immunoreactive growth hormone. Measurement of sulfation factor, metabolic and linear growth responses. *J Clin Endocrinol Metab* 1971; 33:332-342.
43. Laron Z, Klingler B. Serum GH binding protein activity identifies the heterozygous carrier for Laron type dwarfism. *Acta Edocrinol* 1989; 121:603-608.
44. Laron Z, Klingler B. Laron syndrome due to a post-receptor defect: Response to IGF-I

- treatment. *Isr J Med Sci* 1993; 29:757-763a.
45. Laron Z, Lilos P. Growth hormone curves for Laron syndrome. *Arch Dis Chil* 1993; 68:768-770b.
 46. Laron Z. Prismatic cases: Laron syndrome (primary growth hormone resistance). From patient to laboratory to patient. *J Clin Endocrinol Metab* 1995; 80:1526-1531.
 47. Laron Z. Natural history of the classical form from of primary growth hormone (GH) resistance (Laron syndrome). *J Pediatr Endocrinol Metab* 1999; 12:231-249.
 48. Laron Z. Insulin like growth factor (IGF-I): A growth hormone. *J Clin Pathol* 2001; 54:311-316a.
 49. Laron Z. Consequences of not treating children with Laron syndrome (primary growth hormone insensitivity). *J Pediatr Endocrinol Metab* 2001;14 Suppl 5. 1243-1248b.
 50. Laron Z. Growth Hormone insensitivity (Laron Syndrome). *Reviews in Endocrine & Metabolic Disorders* 2002; 3:347-355.
 51. Lee PDK, Ronsfeld RG. Clinical utility of insulin like growth factor assays. *Pediatrician* 1987; 14:154-161.
 52. Lee PDK, Wilson DM. Efficacy of insulin like growth factor I levels in predicting the response to provocative growth hormone testing. *Pediatr Res* 1990; 27:45-51.
 53. Leung DW, Spencer SA. Growth hormone receptor and serum binding protein: Purification, cloning and expression. *Nature* 1987; 330:537-543.
 54. Mahoney C. Valoración del niño de estatura corta. En *Endocrinología Pediátrica. Clínicas pediátricas de Norteamérica. Tomo 4.* 1987.
 55. Montgomery DC. Design and analysis of experiments. New York USA: John Wiley and sons 1997.
 56. Nap RC, Mol JA. Age related plasma concentration of Growth Hormone (GH) and insulin like growth factor I (IGF-I) in Great Dane pups fed different dietary levels of protein. *Domestic Animal Endocrinology* 1993; 10:237.
 57. Nikholas F. Pituitary dwarfism in German shepherd dogs: a genetic analysis of some Australian data. *Journal of Small Animal Practice* 1978; 19:167-174.
 58. Norman E. En *Manual of small animal endocrinology.* UK: British Small animal Veterinary Association 1998: 207-210.
 59. Ostrander E. Insights from Model Systems. *Semper fidelis: What man's best friend can teach us about human Biology and Disease?* *Am J Hum Genet* 1997; 61:477-480.
 60. Paterson D. Research on genetic diseases: Reciprocal benefits to animals and man. *JAVMA* 1988; 193(9):1131-1144.

61. Payró JL. El perro y su mundo. México: Loera Chávez 1981.
62. Rechler M. Insulin like growth factor binding proteins. *Vit Horm* 1993; 47:1-114.
63. Rigamonti A. Six-week treatment with hexarelin in young dogs: evaluation of the GH responsiveness to acute hexarelin or GHRH administration, and of the orexigenic effect of hexarelin. *European Journal of Endocrinology* 1999; 141:313-320.
64. Rigamonti A. Growth hormone (GH) rebound rise following somatostatin infusion withdrawal: studies in dogs with the use of GH-releasing hormone and GH-releasing peptide. *European Journal of Endocrinology* 2001; 145:635-644.
65. Rijnberk A. Disturbed release of growth hormone in mature dogs: A comparison with congenital growth hormone deficiency. *Vet Rec* 1993; 133:542.
66. Rijnberk A. Hypothalamus pituitary system. In: *clinical endocrinology of Dogs and Cats. An illustrated text*, Netherlands: A Rijnberk - Kluwer 1996: 11-34.
67. Rosenfeld RG, Wilson DM. Insulin like growth factors I and II in evaluation of growth retardation. *J Pediatr* 1986; 109:428-433.
68. Rosenbloom AL, Guevara Aguirre J, Rosenfeld RG, Fielder PJ. The little woman of Loja- Growth hormone receptor deficiency in an inbreed population of southern Ecuador. *N Engl J Med* 1990; 323:1367.
69. Rutterman GR. Prolactin binding in benign and malign mammary tissue of female dogs. *Anticancer Res* 1986; 6:829-835.
70. Sambrook J. *Molecular Cloning. USA: Cold Spring Harbor Laboratory Press* 1989.
71. Sriver CR, Banger AL, Sly WS. The metabolic and molecular bases of inherited disease In Joy D. Cogan et al. *Inherited defects in growth hormone synthesis and action*. New York: Mc Graw Hill Co 2001:4159-4180.
72. Selman PJ, Mol JA, Rutterman GR, van Garderen E, Rijnberk A. Progesterin inducen growth hormone excess un the dog originates in the mammary gland. *Endocrinology* 1994; 134: 287-292.
73. Selman PJ, Mol JA. Progesterins and Growth Excess in the dog. *Acta Endocrinol* 1991; 125 Suppl 1:42-7
74. Silbergeld A, Destot F. Intronic mutation in the growth hormone receptor gene from a girl with Laron syndrome and extremely high serum GH binding protein: Extended phenotypic study in a very large pedigree. *J Pediatr Endocrinol Metab* 1997; 19:265-274.
75. Silhavy T, Berman ML, Enquist LW. Experiments with gene fusion. *Cold Spring Harbour Laboratory* 1984.

76. Stockard CR, Vicari EM. Variations in proportional size and modifications in histologic quality of endocrine glands in relation to body types as found among dog breeds. Section V. In the Genetic and Endocrine Basis for Differences in Form and Behavior. Philadelphia: The Wistar Institute of Anatomy and Biology The American Anatomical Memoirs 1941: 399-522.
77. Underwood LE, Murphy MG. Radioimmunoassay of the somatomedins. IN Patrono C: Radioimmunoassay in Basic and Clinical Pharmacology. Handbook of Experimental Pharmacology. Heidelberg Springer Verlag. 1987 vol 82: 561-574.
78. Van Garderen E, De Wit M, Voorhout WF, Rutterman GR, Mol JA. Expression of growth hormone in canine mammary tissue and mammary tumors. Evidence for a potential autocrine/paracrine stimulatory loop. Am J Pathol 1997; 150:1037-1047.
79. Van Garderen E, van der Poel HJA, Swennenhuis JF. Expression and molecular characterization of the growth hormone receptor in canine mammary tissue and mammary tumors. Endocrinology 1999; 140:5907-14.
80. Vos de A. Human Growth Hormone and Extracellular Domain of its Receptor: Crystal Structure of the Complex. Science 1992; 255:306-312.
81. Yuehuel H. Animal Models in Orthopaedic Research. USA: AN CRC Press 1999.
82. Zapf J. Acute metabolic effects and half-lives of intravenously administered insulin like growth factors I and II in normal and hypophysectomized rats. J Clin Invest 1986; 77:1768-1775.
83. Zhou Y. A mammalian model for Laron Syndrome produced by targeted disruption of the mouse growth hormone receptor/binding protein gene (The Laron Mouse). Proc Natl Acad Sci. USA. November 1997; 94:13215-13200.

ANEXOS

ANEXO I. DETERMINACIÓN DE LAS CONCENTRACIONES PLASMÁTICAS DE IGF-I Y DE GH

1. MEDICIÓN DE IGF-I POR EL MÉTODO DE INMUNORADIOMETRÍA

El ensayo DSL-2800 ACTIVE™ Non-Extraction Insulin-Like Growth Factor-I Coated-tube IRMA provee materiales para la medición cuantitativa de IGF-I en suero o plasma/EDTA. Este ensayo es auxiliar en el diagnóstico *in vivo* de desordenes relacionados con el crecimiento.

1.1. Descripción de la prueba

El factor de crecimiento parecido a la insulina tipo I (IGF-I) es un péptido de 7.6 K Da. Con 70 aminoácidos que interviene en la acción de GH. El IGF-I se sintetiza como una prohormona, consistente en cadenas A, B, C, D y E. El péptido maduro consiste en las cadenas A, C y B siendo homólogo estructuralmente a IGF-II y a insulina (Daughday, 1989).

In vivo el IGF-I es secretado por el hígado y otros tejidos y se postula que tiene efectos mitogénicos y metabólicos cercanos a su sitio de síntesis. Aparece en la circulación periférica en un complejo terciario de alto peso molecular que forma con la Proteína Ligadora 3 de IGF-I (IGFBP-3) y una Subunidad Ácido Lábil (ALS) (Baxter, 1989; Rechler, 1993). Una menor proporción de IGF-I circula unido a otras proteínas ligadoras (Rechler, 1993). Se ha estimado que menos del 5% del IGF-I plasmático circula sin uniones (Zapf, 1986). *In vivo* la síntesis de IGF-I es estimulada por GH, y depende de otros factores como adecuada nutrición (Daughday, 1989). El IGF-I podría inhibir la producción pituitaria de GH pero el mecanismo de retroalimentación no ha sido completamente definido.

En humanos los niveles plasmáticos de IGF-I son bajos durante la vida fetal y neonatal, se incrementan gradualmente durante la infancia, alcanzan su pico en la mitad de la pubertad y declinan gradualmente en la vida adulta (Daughday, 1989; Lee, 1987; Ronsfeld, 1987; Lee, 1990). Los niveles promedio de IGF-I son ligeramente mayores en mujeres de cada edad. Los niveles maternos en plasma se elevan durante la gestación (Daughday, 1989). Las proteínas ligadoras de IGF-I estabilizan los niveles plasmáticos de IGF-I con ligeras variaciones diurnas (Lee, 1987).

El nivel de IGF-I en plasma son relativamente menores relacionados con edad y sexo en deficiencias de GH, malnutrición y el Síndrome de Deficiencia de GHR (Enanismo Laron) (Guevara-

Aguirre, 1993). Niveles anormales en plasma se han utilizado como indicadores en el diagnóstico de deficiencias de GH, además una proporción significativa de niños con deficiencia de GH tienen niveles bajos de IGF-I (Daughday, 1989; Ronsfeld, 1987; Lee, 1990). Los niveles plasmáticos de IGF-I son también utilizados para el monitoreo de respuestas *in vivo* a corto y largo plazo en tratamientos con GH (Lee, 1987). Niveles anormalmente elevados de IGF-I en Acromegalia (exceso de GH) son armas de diagnóstico y en el seguimiento de los tratamientos (Daughday, 1989; Lee, 1987).

El ensayo de suero o plasma para medir IGF-I es complicado por la presencia de Proteínas Ligadoras, las cuales lo sequestran en la reacción (Daughday, 1989). Varios métodos se han diseñado para separar el IGF-I de las Proteínas Ligadoras previo al ensayo. La exclusión por tamaño en Cromatografía Ácida en Gel se ha considerado óptima, pero este procedimiento no es factible en uso rutinario (Daughday, 1989; Underwood, 1987).

La acidificación seguida de precipitación con etanol de la fracción de IGFBP da resultados similares a la cromatografía ácida (Underwood, 1987).

1.2. Procedimiento

Se tomaron 20 μ l de plasma y se adicionó 1 ml de solución diluyente de muestras (Sample Diluent A, DSL Active® Non Extraction IGF-I Coated Tube IRMA kit, Catalog No 2850). Se agitó y se incubó por 30 min a temperatura ambiente. A la solución de lavado (Wash Concentrate B, DSL Active® Non Extraction IGF-I Coated Tube IRMA kit, Catalog No 10-9730) se le agregaron 1500 μ l de agua desionizada. Se rotularon los tubos cubiertos con Anti-IGF-I (Anti IGF-I Coated Tubes DSL Active® Non Extraction IGF-I Coated Tube IRMA kit, Catalog No 2810) y se colocaron en una gradilla de esponja. Se adicionaron 50 μ l de los estándares reconstituidos (IGF-I Standard A, IGF-I Standard B, IGF-I Standard C, IGF-I Standard D, IGF-I Standard E, IGF-I Standard F, DSL Active® Non Extraction IGF-I Coated Tube IRMA kit, Catalog No 2801, 2802, 2803, 2804, 2805, 2806), 50 μ l de los controles (IGF-I Control Level I, IGF-I Control Level II DSL Active® Non Extraction IGF-I Coated Tube IRMA kit, Catalog No 2851, 2852) y 50 μ l de las muestras diluidas a cada tubo correspondiente.

Se adicionaron 200 μ l de Anti-IGF-I [I^{125}] (Anti IGF-I [I^{125}] Reagent, DSL Active® Non Extraction IGF-I Coated Tube IRMA kit Catalog No. 2820) a todos los tubos. Se agitó suavemente y se incubó a temperatura ambiente por 2 horas. Los tubos se decantaron, excepto los correspondientes a cuentas totales, en un receptáculo indicado para desechos radioactivos. Los tubos se colocaron invertidos sobre papel absorbente para permitir el drenaje del material

restante por dos minutos. Se adicionaron 3 ml de solución de lavado (Wash Concentrate B, DSL Active® Non Extraction IGF-I Coated Tube IRMA kit, Catalog No 10-9730) a cada tubo excepto cuentas totales. Se decantaron todos los tubos excepto cuentas totales. Se repitió el lavado dos veces más.

La cuantificación se llevó a cabo en un contador γ (Soucerer RIA Counter SD12, Oakfield Health Care Products) por un minuto para obtener los resultados.

2. RADIOINMUNOANÁLISIS PARA LA HORMONA DE CRECIMIENTO CANINA

2.1. Descripción de la prueba

La medición de GH por RIA se ha descrito en diferentes especies, siendo reportados los resultados experimentales y de diferentes condiciones clínicas. La determinación de Hormona de Crecimiento canina (cGH) es muy importante cuando se evalúa el estado de GH en perros por ejemplo en el diagnóstico de enanismo pituitario y acromegalia (Hoier, 1995). Se han reportado diferentes métodos para la determinación de cGH con preparaciones comerciales disponibles con anticuerpos específicos contra la molécula (Eigenmann, 1981). Existen pocos reportes concernientes a la medición de cGH disponibles, y su cuantificación se restringe a estudios experimentales de regulación y secreción en perros.

Eigenmann (1981) desarrolló un RIA homólogo específico y sensible para GH. Reportó los aspectos técnicos de RIA para GH y los niveles plasmáticos en perros normales y acromegálicos, así como los resultados de pruebas de estimulación.

2.2. Procedimiento

2.2.1. Marcaje de la proteína

El antígeno para iodación (cGH AFP1938B, Pituitary Hormones and Antisera Center, Harbour-UCLA Medical Center) se disolvió en un volumen de 123 μl de NaHCO_3 (0.05 M) para obtener una concentración final de 1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ que se almacenó en alícuotas de 5 μl a -70°C . El radiomarcaje de la proteína se realizó con el método de Iodogen (Pierce Chemical Company, Rockford Illinois), de acuerdo a lo descrito originalmente por Fraker y Speck (1978): para ello, la hormona (5 μg) se colocó en viales de vidrio recubiertos con Iodogen (1.5 μg) en un volumen de 20 μl con amortiguador PB 0.05M (Na_2HPO_4 0.05 M pH 7.4) y se adicionó el material radioactivo

(Iodine-125, Amersham Pharmacia Biotech), con una actividad de 0.5 *mCi* y se agitó manualmente durante 8 min.

La mezcla de la reacción se detuvo, adicionando 200 μ l Metabisulfito de sodio (1.0 mg/ml) y 200 μ l de Yoduro de Potasio (1.0 mg/ml). Finalmente, se adicionaron 200 μ l de PB 0.05 M. La mezcla de reacción se transfirió a una columna de Sephadex G50-150 saturada con Albúmina sérica bovina al 3% pH 7.34 (BSA Albumin bovine, Sigma) y equilibrada con PB 0.05 M, con flujo constante de 3 ml/hora.

Las fracciones se recuperaron (Fraction Collector Spectra/Chrom®) en tubos de vidrio, que contenían 1 ml de PB-BSA al 1%. Para el análisis del cromatograma se tomaron 10 μ l de cada fracción y la incorporación del ¹²⁵I a la proteína. Se realizó colocando 500 μ l de PB 0.05 M -BSA 1% y 500 μ l de Ácido tricloroacético (TCA) al 30% y cada fracción se centrifugó a 1500x g/15 min. Al término de este paso, se cuantificaron los tubos en el contador γ (Socerer RIA Counter SD12, Oakfield Health Care Products) para verificar la precipitación de la proteína.

2.2.2. Titulación del anticuerpo anti-cGH

La inmunoreactividad o titulación del primer anticuerpo, se realizó en un ensayo de unión, entre el trazador o ¹²⁵I-cGH con diferentes diluciones del anticuerpo (anti-canine GH, Monkey, #AFP21452578 Pituitary Hormones and Antisera Center, Harbour-UCLA Medical Center) que se describen en el cuadro 6.

Cuadro 6. Protocolo para la titulación del anticuerpo Anti-cGH

IDENTIFICAC.	PBS-BSA 1% (μ l)	1 ^o Ac (μ l)	¹²⁵ I-cGH (μ l)	INCUBACIÓN	PANSORBINA (ml)	INCUBACIÓN	CENTRIFUGAC.
CT	-	-	100	24 hrs / T° ambiente	-	15 min / T° ambiente	3000 rpm / 15 min/4°C
UNE	400	-	100		1		
1:50,000	200	200	100		1		
1:100,000	200	200	100		1		
1:200,000	200	200	100		1		
1:400,000	200	200	100		1		

CT = cuentas totales / tubo = 20,000 cpm; UNE = unión no específica. El sistema de separación de la fracción unida de la fracción libre se realizó con Proteína A de *Staphylococcus aureus* (Pansorbina, Pansorbin@cells, Callbiochem®).

2.2.3. Desarrollo de la curva estándar de GH

La hormona de referencia GH, correspondió a Canine Growth Hormone Reference Preparation AFP 1983B (Pituitary Hormones and Antisera Center, Harbour - UCLA Medical Center), proporcionada por el Dr. A F Parlow. El contenido del vial (5 µg), se resuspendió en 1.0 ml de H₂O desionizada, con lo que se obtuvo una concentración final de 5 ng/µl; se almacenó en alícuotas de 100 µl y se conservó a -70°C. Para el desarrollo de la curva estándar, se utilizaron las siguientes concentraciones: 0.25, 0.5, 1, 2.5, y 5 ng/tubo respectivamente, bajo el procedimiento que se describe en el cuadro 7.

Cuadro 7. Protocolo para la curva estándar de cGH

IDENTIFICAC.	PBS-BSA 1% (µl)	cGH estándar (µl)	1" Ac (µl)	I ¹²⁵ -GH (µl)	INCUBACIÓN	PANSORBINA (ml)	INCUBACIÓN	CENTRIFUG.
CT	-	-	-	100	24 hrs / T° ambiente	-	15 min / T° ambiente	3000 rpm / 15 min / 4°C
UNE	400	-	-	100		1		
Bo	200	-	200	100		1		
0.1 ng	100	100	200	100		1		
0.25 ng	100	100	200	100		1		
0.5 ng	100	100	200	100		1		
1 ng	100	100	200	100		1		
2.5 ng	100	100	200	100		1		
5 ng	100	100	200	100		1		

CT = cuentas totales / tubo = 20,000 cpm; UNE = unión no específica. El sistema de separación de la fracción unida de la fracción libre se realizó con Proteína A de *Staphylococcus aureus* (Pansorbina, Pansorbin@cells, Callbiochem®).

2.2.4. Procedimiento de Radioinmunoanálisis de GH

De cada una de las muestras de plasma, se tomaron 100 µl y se agregaron 400 µl de amortiguador PBS 0.05 M/BSA 1% para obtener una dilución 1:5. Cada muestra se trabajó en duplicado. Para el radioinmunoanálisis de GH se describe en el cuadro 8.

Cuadro 8. Protocolo para Radioinmunoanálisis de cGH en plasma

IDENTIFICAC.	PBS-BSA 1% (μ l)	cGH estándar (μ l)	1° Ac (μ l)	PLASMA (μ l)	I ¹²⁵ GH (μ l)	INCUBACIÓN	PANSORBINA (ml)	INCUBACIÓN	CENTRIFUG.
CT	-	-	-	-	100	24 hrs / T° ambiente	-	15 min / T° ambiente	3000 rpm / 15 min / 4°C
UNE	400	-	-	-	100		1		
Bo	200	-	200	-	100		1		
0.1 ng	100	100	200	-	100		1		
0.25 ng	100	100	200	-	100		1		
0.5 ng	100	100	200	-	100		1		
1 ng	100	100	200	-	100		1		
2.5 ng	100	100	200	-	100		1		
5 ng	100	100	200	-	100		1		
70 Muestras	175	-	200	25	100		1		

CT = cuentas totales / tubo = 20,000 cpm; UNE = unión no específica. El sistema de separación de la fracción unida de la libre se realizó con Proteína A de *Staphylococcus aureus* (Pansorbina, Pansorbin®cells, Callbiochem®).

Después de ser centrifugados los tubos, se decantaron y se cuantificó la fracción unida (Ag-Ac) en un Contador γ (Soucerer RIA Counter SD12, Oakfield Health Care Products) para obtener la curva estándar de GH y las concentraciones de GH en todas las muestras de plasma.

ANEXO II. TÉCNICAS DE BIOLOGÍA MOLECULAR

1. PURIFICACIÓN DE RNA

1.1. Aislamiento de RNA

El aislamiento de RNA se realizó a partir de 0.5 gr de hígado de perro Chihuahueño y Pastor Alemán. El tejido se pulverizó triturándolo en nitrógeno líquido y se homogeneizó en 1 ml de TRIZOL (GIBCO BRL). Se incubó durante 10 min a 4°C. Se agregaron 200 µl de Cloroformo 100% frío; se agitó vigorosamente por 15 seg en el vortex y se incubó 5 minutos a 4°C. Se procedió a centrifugar a 12,000 rpm por 15 min a 4°C. La fase acuosa se recuperó y se mezcló con un volumen de isopropanol 100% frío. Las muestras se incubaron a -20°C por 30 min. Posteriormente se centrifugaron a 12,000 rpm por 10 min a 4°C para obtener la pastilla de RNA. Los tubos se decantaron para eliminar los restos de isopropanol y la pastilla fue lavada con 50 µl de etanol 70%-H₂O DEPC. Se centrifugó a 12,000 rpm por 10 minutos a 4°C. Se decantó todo el etanol y se resuspendió la pastilla en 80 µl de H₂O DEPC 0.1%. Se conservó a -80°C.

1.2. Cuantificación espectrofotométrica de RNA total

Se tomaron 2 µl de RNA total de cada una de las muestras y se realizó una dilución 1:100 con H₂O DEPC al 0.1 %. Se determinó la absorbancia a 260 y 280 nm en un espectrofotómetro. La cantidad total de RNA recuperada se calculó con la siguiente formula:

$$\text{RNA total } \mu\text{l/ml} = (A_{260 \text{ nm}})(40)(\text{FD})$$

Siendo: A₂₆₀= Absorbancia 260 nm

40= Factor de conversión

FD= Factor de dilución = 100

Cociente A₂₆₀/A₂₈₀ = Cociente entre las lecturas del espectrofotómetro a 260 y 280 nm.

Este valor da una estimación de la pureza del RNA, considerándose preparaciones adecuadas las que presentan una relación 260/280 entre 1.9-2.0.

1.3. Separación electroforética de RNA total en geles de agarosa - formaldehído

Para la observación del RNA se prepararon geles de agarosa 1.5 %, Formaldehído 6 %, en amortiguador MEN 1 X (MOPS 200 mM pH 7, NaOAc 50 mM, EDTA 10 mM) y se tomaron 10 ng de RNA total, adicionando buffer de corrida 1 X (50 % formamida, 6 % formaldehído al 37 %, MEN I X) y se desnaturalizó a 65°C por 10 minutos. Las muestras se colocaron en los pozos del gel, utilizando como marcador molecular DNA Lambda digerido con la enzima de restricción *BstEII* (λ /*BstEII*, BIOTECSA). El corrimiento electroforético fue por 12 horas en MEN 1X con una bomba de flujo peristáltico (Easy-load Masterflex, Millipore).

El gel fue teñido con bromuro de etidio (5 μ g/ml) y se observó con Luz ultravioleta (UV); además se obtuvo un registro fotográfico en un fotodocumentador White UV Transilluminator Modelo GDS7500 (UVP Upland, CA).

2. OBTENCIÓN DE cDNA DE GHR

Para obtener el cDNA de GHR se realizó una Reversa Transcriptasa - Reacción en Cadena de la Polimerasa (RT-PCR) en un termociclador Techne (FT GENE 2D, Techgene), a partir de RNA total de Chihuahueño y Pastor Alemán con las siguientes condiciones:

- Primer Ciclo: RNA 5 μ g, DTT 0.01 M (GIBCO BRL), dNTP's 1 mM (BIOTECSA), Amortiguador Comercial (GIBCO BRL) 1x, RNAsin (GIBCO BRL) 20 U, H₂O DEPC cbp 20 μ l. Se incubó 80°C/5 min/4°C/1 min.
- Segundo Ciclo: Iniciador GHR 3R 250 ng. Se incubó 65°C/15 min y 4°C/1 min.
- Tercer Ciclo: 1 μ l de SuperScript II Reversa Transcriptasa (GIBCO BRL) 200 U/ μ l. Se incubó 45°C/50 min - 95°C/5 min.

3. Amplificación del cDNA para GHR

La amplificación del gen GHR se realizó por la técnica de Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) a partir de cDNA, utilizando un termociclador Techne (Techgene) con el siguiente protocolo:

- cDNA (4 μ l), Iniciadores GHR 1F3R 0.5 μ M, Buffer C 1x (BIOTECSA), Tritón 0.1%, BSA 0.15 mg/ml, dNTP's (BIOTECSA) 0.2 mM, Taq Polimerasa (BIOTECSA) 2.5U, H₂O cbp 20 μ l.

- Las condiciones de la reacción fueron: 1 ciclo 94°C/ 3 min. 30 ciclos 94°C/30 seg, 60°C/30 seg, 72°C/2 min 1 ciclo 72°C/3 min

Una vez realizada la PCR, se tomaron 5 µl de la reacción y se realizó una electroforesis en gel de agarosa 2% TBE 1X aplicando un voltaje de 70 V durante 2 horas. El gel se tñió con bromuro de etidio (5 µg/ml) y fue visualizado en un fotodocumentador White UV Transilluminator (Modelo GDS7500 UVP Upland, CA) con luz ultravioleta para obtener un registro fotográfico.

4. SECUENCIACIÓN DEL cDNA DE GHR

4.1. Clonación de GHR en pUC19/*Sma*I TA

El vector de clonación utilizado fue pUC19 digerido con *Sma*I y modificado con adición de timinas en los extremos 3'. El producto de PCR de GHR requiere una extensión de 15 min a 72°C para adicionarle un extremo de adenina y así, hacerlo complementario al vector. El producto de amplificación del cDNA de GHR se obtuvo de un gel de agarosa 1% y fue purificado mediante NaI 6 M y perlas de sílica.

Del producto de purificación, se ligaron 10 ng en 100 ng del vector pUC19/*Sma*I, mediante T4 DNA Ligasa (New England BIOLABS®) durante 12 hrs a 4 °C.

4.2. Transformación

Para recuperar en *E. coli* los plásmidos recombinantes, se utilizaron 100µl células competentes DH10b en las cuales fueron transformados 40 ng de pUC19/*Sma*I del producto de ligación, incubando durante 30 min a 4 °C. Posteriormente se realizó un choque térmico a 42°C por un minuto y 4 °C por dos minutos. Se adicionó LB (Medio de Luria) y se incubó 1 hora a 37°C.

Del producto de la transformación, 100 µl fueron espatulados en placas LB agar, Ampicilina (100 µg/ml), X-gal (266 µg/ml), IPTG (266 µg/ml). Se incubó 12-16 hrs a 37°C. Se verificó el crecimiento bacteriano y se obtuvieron las colonias blancas como posibles recombinantes, transfiriéndolas a placas de LB agar con Ampicilina (100 µg/ml). Parte de estas colonias fueron colocadas 50µl de H₂O dd y lisadas a 90°C/10 min para obtener el DNA que fue utilizado para reacciones de PCR y de esta manera verificar la presencia de plásmidos recombinantes. Para esto, se utilizaron los iniciadores M13F y M13R localizados en la secuencia de pUC19 flanqueando el sitio múltiple de clonación, y la utilización de los iniciadores GHR-5' y GHR-3' específicos de GHR. Las clonas ó células recombinantes obtenidas fueron preservadas en LB/Ampicilina (100 µg/ml)/ glicerol

16 % a -70°C.

4.3. pUC19/*Sma*I

Los plásmidos pUC19 y pUC18 son idénticos, excepto que contienen sitios de policlonación en direcciones opuestas. Tienen el gen *rop* que normalmente está localizado cerca del origen de replicación de DNA y se involucra en el número de copias. Como resultado, estos plásmidos se replican en un gran número de copias que otros plásmidos que portan pMB1 (o ColE1) como origen. Los vectores pUC expresan el fragmento amino-terminal del producto del gen *lacZ* (β -galactosidasa) y despliega α -complementario en huéspedes apropiados. Las recombinantes pueden identificarse por tamizaje histoquímico (Sambrook, 1989).

4.4. Marcadores de selección

En el laboratorio los plásmidos DNA pueden ser introducidos a las bacterias por un proceso artificial de transformación. En este, la bacteria es tratada con mezcla de cationes divalentes para hacerla temporalmente permeable a moléculas pequeñas de DNA. Aun en las mejores condiciones los plásmidos se vuelven estables. Para identificar las bacterias transformadas se utilizan marcadores selectivos codificados por el plásmido. Estos marcadores confieren un fenotipo, el cual permite seleccionar a la bacteria que está transformada. Los marcadores más comunes son genes que confieren resistencia a antibióticos como ampicilina, tetraciclina, cloranfenicol y kanamicina. La ampicilina inhibe un número de enzimas de membrana bacteriana que se involucran en la síntesis de la pared celular. El gen de resistencia a ampicilina (*amp^r*) portado por el plásmido, codifica para una enzima que es secretada en el espacio periplásmico de la bacteria en donde cataliza la hidrólisis del anillo β -lactámico con la concomitante detoxificación del fármaco.

Los vectores pUC desarrollados por Messing *et al.* (1982) permiten la identificación bioquímica de clonas recombinantes. Estos vectores portan un segmento de DNA derivado del operón *lac* de *E. coli* que codifica el fragmento amino-terminal de la β galactosidasa. Este fragmento, cuya síntesis puede inducirse por isopropil β -D-galactosido (IPTG), es capaz de α -complementación intra-alélica con una forma defectiva de β -galactosidasa codificada por el huésped. La bacteria expuesta a el inductor gratuito IPTG sintetiza ambos fragmentos de la enzima y forma colonias azules que cuando son plaqueados en medios que contengan el sustrato cromogénico 5-bromo-4-cloro-3-indol- β -D-galactosido (X-gal).

La inserción de un DNA externo al sitio de policlonación del plásmido inactiva el fragmento amino-terminal de β -galactosidasa y no permite la α -complementación. Las bacterias portadoras de los plásmidos recombinantes resultan en colonia blancas (Sambrook, 1989).

Algunos vectores plasmídicos han sido construidos con un origen de replicación del genoma de cadena sencilla del bacteriófago filamentoso M13. Esto permite tener copias de una o dos cadenas del plásmido y ser producidos en cantidades suficientes para secuenciar o para preparación de sondas (Sambrook, 1989).

4.5. α Complementación

Los vectores de la serie pUC portan un pequeño segmento de DNA de *E. coli* que contiene las secuencias reguladoras y que codifican la información para los primeros 146 aminoácidos del gen β galactosidasa (*lacZ*). Embebido en esta región codificadora, existe un sitio múltiple de clonación que no modifica el marco de lectura pero resulta en la interpolación de un pequeño número de aminoácidos en el fragmento amino-terminal de β galactosidasa. Vectores de este tipo son utilizados en células huésped que codifican para la porción carboxiterminal de β galactosidasa. A pesar de que los no codificados por el huésped y los fragmentos sintetizados por el plásmido son activos por si mismos, se asocian para formar una proteína enzimáticamente activa, la cual es llamada α complementación, en la cual, la deleciones mutantes del segmento operador proximal del gen *lacZ* son complementados por las mutantes negativas de β galactosidasa que tienen su región operador-proximal intacta. Las bacterias *Lac⁺* que resultan de α complementación son fácilmente reconocidas porque forman colonias azules en presencia del sustrato cromogénico 5-bromo-4-cloro-3-indol- β -D-galactosido (X-gal). La inserción de un fragmento de DNA en el sitio de policlonación del plásmido resulta en la producción de un fragmento amino-terminal que no es capaz de realizar la α complementación. La bacteria portadora de los plásmidos recombinantes forma colonias blancas. El desarrollo de esta prueba de color simplifica la identificación de células recombinantes, por lo que facilita el tamizaje de miles de colonias para visualizar y reconocer recombinantes (Sambrook, 1989).

4.6. Examinación de bacterias por α Complementación

1. Se lleva a cabo en placas de LB agar conteniendo los antibióticos indicados en este caso Ampicilina (100 μ g/ml), X-gal (266 μ g/ml), IPTG(266 μ g/ml).

2. Utilizando una asa de cristal estéril o una pipeta Pasteur sellada, se inocula la placa con las bacterias a examinar. Se permite su absorción y se incuban invertidas 12-16 horas a 37°C.
3. Las placas se mantienen a 4°C por algunas horas para permitir un desarrollo completo de la coloración azul. Las colonias que contienen β galactosidasa activa presentan una coloración azul pálido en el centro y azul fuerte en la periferia (Sambrook, 1989).

4.7. Extracción de DNA de plásmido de bacterias transformadas (minipreparaciones de DNA)

A partir de las colonias recombinantes se obtuvo una mayor cantidad de DNA plasmídico recombinante, de acuerdo al método descrito por Silhavy y Col. (1984) para realizar la secuenciación de GHR.

Se cultivó la cepa en 3 ml de LB-Ampicilina (100 μ g/ml) durante toda la noche a 37°C en agitación constante. Al día siguiente se centrifugó a 12,000 rpm por 6 minutos, el sobrenadante se decantó y la pastilla se resuspendió en 200 μ l de Solución de Lisis (Sacarosa 8 %, 5% Tritón X-100, 50 mM EDTA, 50 mM Tris-HCl pH 8). Se adicionó 1.5 μ g/ml final de Lisozima y se incubó a 98°C por un minuto. Se agregó 10 μ g/ml de RNasa incubando a 37°C por 30 minutos. Se adicionó 50 μ g/ml final de Proteinasa K y se incubó a 55°C por 30 minutos y después a 65°C por 30 minutos. Posteriormente se centrifugó a 12,000 rpm durante 10 minutos. Se recuperó el sobrenadante y se adicionaron 2 volúmenes de etanol frío. Se centrifugó a 14,000 rpm por 5 minutos. A la pastilla se le agregaron 100 μ l de etanol 70 % y se centrifugó a 14,000 rpm por 5 minutos. Se decantó el etanol y la pastilla se resuspendió en 50 μ l de H₂O.

ANEXO III. SECUENCIACIÓN DE GHR

La estrategia de secuenciación de GHR consistió en utilizar los iniciadores Forward y Reverse de M13 (Anexo IV) que se localizan en la secuencia de pUC19, flanqueando el sitio múltiple de clonación y avanzar sobre la secuencia de GHR mediante el diseño de iniciadores que abarcaran su totalidad.

La reacción de secuencia se realizó mediante el ensayo comercial Big Dye™ Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit (PE Applied Biosystems) que contenía nucleótidos finalizadores marcados con los siguientes aceptadores de dRhodamina: Adenina dR6G (verde), Citosina dROX (rojo), Guanina dR110 (azul), Timina dTAMRA (negro).

- El protocolo de la reacción de secuencia fue el siguiente: Mezcla de reacción Big Dye™ 4µl, DNA de Plásmido recombinante 150 ng, Iniciador 1 pmol (se utilizaron M13F, M13R, GHR2F, GHR2R, GHR 5R, GHR3F) y H₂O cbp 20 µl.
- Las condiciones de la reacción fueron 96°C/10 seg, 50°C/5 seg, 60°C/4 min por 30 ciclos.

ANEXO IV. INICIADORES

Los iniciadores se diseñaron sobre la base de la secuencia de GHR del perro reportada por van Garderen *et al.* (AF133835 *Canis familiaris* growth hormone receptor precursor (GHR) mRNA) abarcando el total de la misma (1942 pb).

Cuadro 9. Iniciadores utilizados

INICIADOR	SECUENCIA	SITIO DE ALINEACIÓN	CONDICIONES DE PCR
GHR 1F/5'	5' CCT ACA GGT ATG GAT CTC TG 3'	2	94°C/3 min 30 ciclos (94°C/30 seg, 60°C/30 seg, 72°C/1 min) 72 °C/3 min
GHR 2F	5' GAA GTG AAT GAG TCC CAG TG 3'	604	94°C/3 min 30 ciclos (94°C/30 seg, 55°C/30 seg, 72°C/1 min) 72 °C/3 min
GHR 3F	5' GGA ATT GAT CCA GAT CTC CT 3'	933	94°C/3 min 30 ciclos (94°C/30 seg, 60°C/30 seg, 72°C/1 min) 72 °C/3 min
GHR 1R	5' CTC ACA CGC ACT TCA TAT CT 3'	684	94°C/3 min 30 ciclos (94°C/30 seg, 60°C/30 seg, 72°C/1 min) 72 °C/3 min
GHR 2R	5' CCC AAG AGT. CAT CGT. TGT AG 3'	1021	94°C/3 min 30 ciclos (94°C/30 seg, 55°C/30 seg, 72°C/1 min) 72 °C/3 min
GHR 3R/3'	5' GGA AAC CAA AGA AAG GCT AC 3'	1917	94°C/3 min 30 ciclos (94°C/30 seg, 60°C/30 seg, 72°C/1 min) 72 °C/3 min
GHR 4R	5' CTT TCC ACT CTT GAG TCC AT 3'	309	94°C/3 min 30 ciclos (94°C/30 seg, 60°C/30 seg, 72°C/1 min.) 72 °C/3 min
GHR 5R	5' CTG GGG AAA GGA CTA CAC C 3'	1502	94°C/3 min 30 ciclos (94°C/30 seg, 58°C/30 seg, 72°C/1 min) 72 °C/3 min
M13 F-R	5' GTA AAA CGA CGG CCA GT 3' 5' CAG GAA ACA GCT ATG AC 3'	-	94°C/3 min 30 ciclos (94°C/30 seg, 58°C/30 seg, 72°C/1:30 min) 72°C/3 min

ANEXO V. RESUMEN DE ANÁLISIS ESTADÍSTICO**CUADRO 10. Análisis de varianza para las concentraciones plasmáticas de GH**

FUENTE DE VARIACIÓN	G.L.	CUADRADOS MEDIOS	F	Sig.
Raza	4	1054.820243	2.18	.0818
Sexo	1	366.619868	.70	.4073
Raza*sexo	4	648.931609	1.34	.2648
Error	60			
Total	69			

CUADRO 11. Análisis de varianza para las concentraciones plasmáticas de IGF-I

FUENTE DE VARIACIÓN	G.L.	CUADRADOS MEDIOS	F	Sig.
Raza	4	54.6966399	94.05	<.0001
Sexo	1	0.8432043	1.45	.2333
Raza*sexo	4	.6101356	1.05	.3896
Error	60			
Total	69			

ANEXO VI. CONCENTRACIONES PLASMÁTICAS DE GH Y IGF-I POR INDIVIDUO

Nº Identificación	RAZA	SEXO	EDAD (meses)	[GH] (ng/ml)	[IGF-I] (ng/ml)
1	Chihuahueño	Hembra	24	17	8
2	Chihuahueño	Hembra	24	9,7	8
3	Chihuahueño	Hembra	24	6	8
4	Chihuahueño	Hembra	24	3,9	16.51
5	Chihuahueño	Hembra	20	8,4	8
6	Chihuahueño	Hembra	9	6,9	11.15
7	Chihuahueño	Hembra	24	20,8	13.35
8	Chihuahueño	Hembra	18	6,6	38.77
9	Chihuahueño	Hembra	12	12,1	14.7
10	Chihuahueño	Hembra	12	13,1	8
11	Chihuahueño	Hembra	24	22,8	8
12	Chihuahueño	Hembra	18	6,6	8
13	Chihuahueño	Hembra	12	18,8	15.91
14	Chihuahueño	Hembra	12	10,7	8.73
15	Chihuahueño	Hembra	18	24,9	8
16	Chihuahueño	Hembra	8	14,7	3.54
17	Chihuahueño	Hembra	8	4	12.08
18	Chihuahueño	Hembra	24	7,9	9.86
19	Chihuahueño	Hembra	18	12,9	8
20	Chihuahueño	Hembra	8	13,4	20.14
21	Chihuahueño	Macho	24	14,1	17.47
22	Chihuahueño	Macho	18	8,1	50.55
23	Chihuahueño	Macho	12	16,8	15.78
24	Chihuahueño	Macho	24	2,3	11,9
25	Chihuahueño	Macho	12	17,6	18.97
26	Chihuahueño	Macho	12	3,8	29.96
27	Chihuahueño	Macho	36	29,5	51.26
28	Chihuahueño	Macho	18	15,1	15.88
29	Chihuahueño	Macho	12	20,3	41.94
30	Chihuahueño	Macho	5	2,8	95.02
31	Mastín Inglés	Hembra	7	10,1	830.5
32	Mastín Inglés	Hembra	10	12,1	660.76
33	Mastín Inglés	Hembra	8	40,6	939.95
34	Mastín Inglés	Hembra	72	60,91	391.81
35	Mastín Inglés	Hembra	24	15,6	723.48
36	Mastín Inglés	Hembra	12	20	564.83
37	Mastín Inglés	Hembra	48	17,3	402.33
38	Mastín Inglés	Hembra	24	6,2	446.78
39	Mastín Inglés	Hembra	9	6,8	803.69
40	Mastín Inglés	Macho	72	11,9	709.11
41	Mastín Inglés	Macho	72	8,9	622.64
42	Mastín Inglés	Macho	48	14,3	477.43

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Continuación...

N° Identificación	RAZA	SEXO	EDAD (MESES)	[GH] (ng/ml)	[IGF-I] (ng/ml)
43	Mastín Inglés	Macho	24	46.4	596.33
44	Pastor Alemán	Hembra	2	16.6	598.68
45	Pastor Alemán	Hembra	24	32.2	282.83
46	Pastor Alemán	Hembra	48	6.5	130.31
47	Pastor Alemán	Hembra	36	7.7	138.2
48	Pastor Alemán	Hembra	3	21.7	438.32
49	Pastor Alemán	Hembra	4	13.7	422.32
50	Pastor Alemán	Hembra	2	5.3	178.82
51	Pastor Alemán	Hembra	48	3.1	112.25
52	Pastor Alemán	Macho	2	2.6	481.48
53	Pastor Alemán	Macho	3	4.2	439.88
54	Pastor Alemán	Macho	2	4	202.83
55	Pastor Alemán	Macho	48	1.1	306.77
56	Pastor Alemán	Macho	18	2.7	190.24
57	Beagle	Hembra	19	33	48.16
58	Beagle	Hembra	24	20.3	47.25
59	Beagle	Hembra	20	10.1	134.53
60	Beagle	Hembra	24	6.3	65.5
61	Beagle	Hembra	60	9.8	43.75
62	Beagle	Hembra	36	8.9	61.29
63	Beagle	Hembra	48	14.8	79.81
64	Beagle	Macho	6	6.2	299.23
65	Beagle	Macho	7	6.8	106.99
66	Pug	Hembra	48	6.9	57.35
67	Pug	Hembra	30	13.5	105.54
68	Pug	Hembra	37	8.4	341.25
69	Pug	Hembra	18	4.5	203.52
70	Pug	Macho	34	6.8	185.67

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

ANEXO VII. ABREVIATURAS

- GHR** (Growth Hormone Receptor): Receptor de Hormona de Crecimiento.
- GH** (Growth Hormone): Hormona de Crecimiento.
- IGF-I** (Insulin Like Growth Factor type I): Factor de Crecimiento Similar a la Insulina tipo I.
- IGF-II** (Insulin Like Growth Factor type II): Factor de Crecimiento Similar a la Insulina tipo II.
- cGH** (Canine Growth hormone): Hormona de crecimiento canina.
- GHBP** (Growth Hormone Binding Protein): Proteínas ligadoras de hormona de crecimiento.
- PCR** (Polymerase Chain Reaction): Reacción en Cadena de la Polimerasa.
- RT-PCR** (Reverse Transcriptase Polymerase Chain Reaction): Reversa Transcriptasa - Reacción en Cadena de la Polimerasa.
- DNA** (Desoxiribonucleic acid): Ácido Desoxirribonucleico.
- cDNA** (Complementary Desoxiribonucleic acid): Ácido Desoxirribonucleico complementario.
- RNA** (Ribonucleic acid): Ácido Ribonucleico.
- mRNA** (Messenger Ribonucleic acid): Ácido Ribonucleico mensajero.
- GHRH** (Growth hormone releasing hormone): Hormona liberadora de hormona de crecimiento.
- IRMA**: Inmunoradiometría
- RIA**: Radioinmunoanálisis
- ng/ml**: nanogramos por mililitro
- μl**: microlitros
- μg**: microgramos

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN