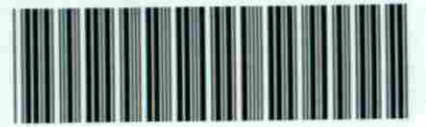


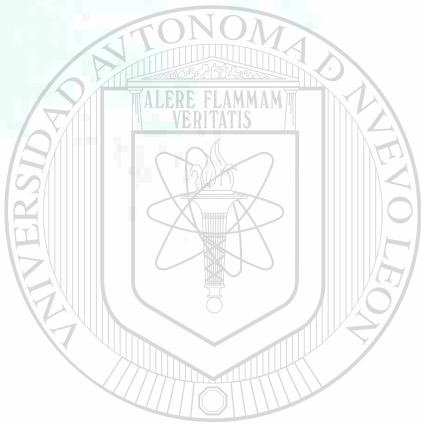
22

TITULO: " EVALUACION DEL EFECTO
ADIPOGENICO DE LAS HORMONAS RE-
COMBINANTES DEL CRECIMIENTO NOR-
MAL Y VARIANTE DE PRIMATES".
Q.F.B. Virgilo Bocanegra García

TM
QP572
.S6
B6
c.1



1080095019



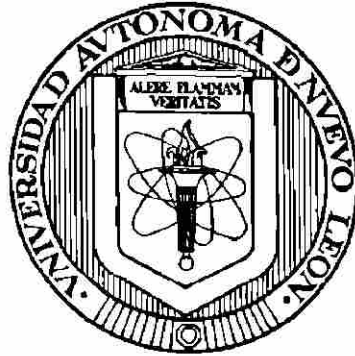
UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

®

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN
FACULTAD DE MEDICINA



"EVALUACIÓN DEL EFECTO ADIPOGÉNICO DE LAS
HORMONAS RECOMBINANTES DEL CRECIMIENTO
NORMAL Y VARIANTE DE PRIMATES"

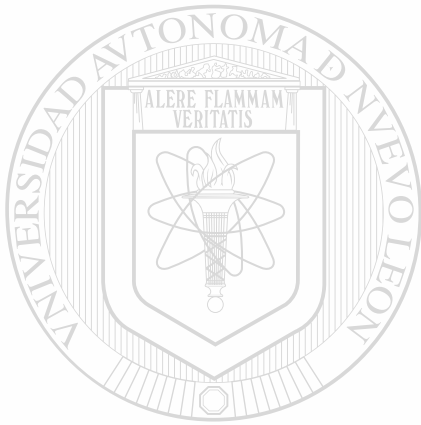
Por

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN
Q. F. B. VIRGILIO BOCANEGRA GARCÍA ®
DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

Como requisito parcial para obtener el Grado de
MAESTRÍA EN CIENCIAS con especialidad en Biología Molecular e
Ingeniería Genética

Noviembre, 2000

QP572
.S6
B6



UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

®

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

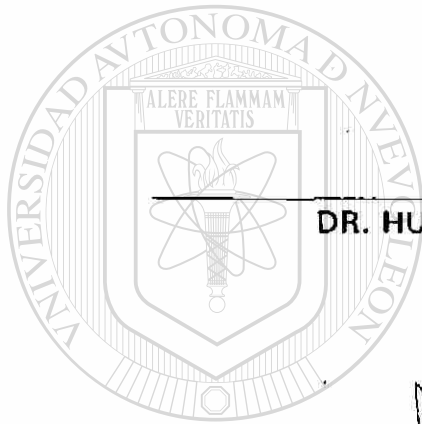


**EVALUACION DEL EFECTO ADIPOGENICO DE LAS HORMONAS
RECOMBINANTES DEL CRECIMIENTO HUMANO**

Aprobación de la Tesis:



DRA. HERMINIA G. MARTÍNEZ RODRIGUEZ
Director de Tesis





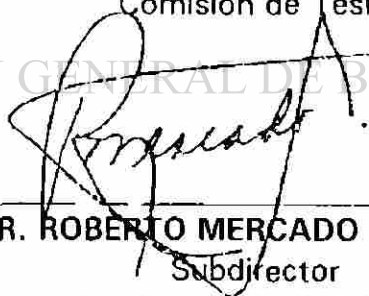
DR. HUGO ALBERTO BARRERA SALDAÑA
Co-Director de Tesis



DRA. AGNES REVOL DE MENDOZA
Comisión de Tesis

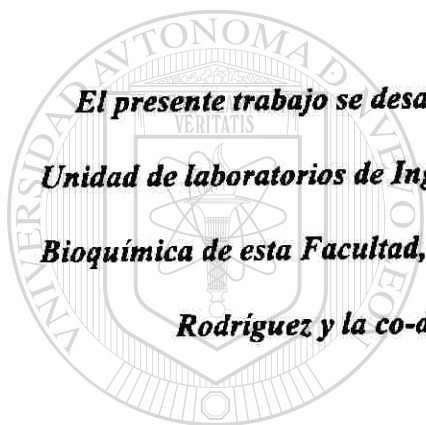
UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS



DR. ROBERTO MERCADO LONGORIA
Subdirector

de Investigación y Estudios de Posgrado



El presente trabajo se desarrolló en el laboratorio del Biología Celular, de la Unidad de laboratorios de Ingeniería y Expresión Genéticas, del Departamento de Bioquímica de esta Facultad, bajo la dirección de la Dra. Herminia Gpe. Martínez Rodríguez y la co-dirección del Dr. Hugo A. Barrera Saldaña.

UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

®

AGRADECIMIENTOS

A mis padres, Manuela y Virgilio, por apoyar mis deseos sobre mi desarrollo profesional y por su cariño incondicional.

...

A la Dra. Herminia Gpe. Martínez Rodríguez, por el apoyo que me brindó durante el tiempo en que se desarrolló este trabajo, sus consejos, sus críticas y su ayuda.

Al Dr. Hugo A. Barrera Saldaña, por darme la oportunidad de ingresar a la U. L. I. E. G. y de iniciarme en el campo de la investigación.

A la Dra. Agnès Revol, por su ayuda a lo largo del desarrollo técnico de este trabajo.

A la Dra. Rocío Ortiz y al Dr. Augusto Rojas, por su apoyo durante mi estancia en la U. L. I. E. G.

Al M.C. Martín Canizales Espinosa, a la M.C. Dolores Esquivel y al M. C. Hugo Gallardo por brindarme su ayuda en los aspectos técnicos que se presentaron a lo largo del desarrollo de esta tesis.

A mis amigos de toda la vida, que a pesar de la diferencia de ideas, de visiones del mundo y de la distancia, me han demostrado siempre que la amistad es incondicional: Francis, Lucy, Luis, Omar, Alejandro, Sergio y Felipe.

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

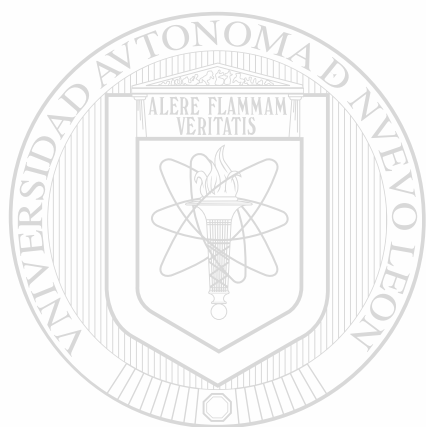
A la generación de los 12, Sergio, Mauricio, Itzel, Leticia, Lourdes, Nancy, Malena, Polo, Prisco, Aurelio y Clarisa, por todo lo que compartimos.

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

A todo el personal de la U.L.I.E.G.

A los maestros que a lo largo de mis estudios me encausaron a seguir el camino de la investigación, Prof. Ema Fuentes, Prof. Eleazar Romo, Prof. Martha Lerma, Q. F. B. Margarita González, L. Q. I. Enrique González, L. Q. I. Juan Lerma, Dr. Mauro Saenz, L. Q. I. Jesús Castrejón, Dr. Humberto Leal, Q. F. B. Rosa Iseel Acosta, Dr. José Alberto Ramírez, Dr. José Navarro, Q. F. B. Efrén Garza, L. Q. I. Arturo Bolaños, L. Q. I. Manuel Trejo.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología por el apoyo económico brindado.



UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN



DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

A la imposibilidad...

***Por todo lo que se ganó,
por todo lo que se perdió***

***por lo que fue,
por lo que no fue
y por lo que no será***

***en la esperanza
de que al final,
la diferencia sea positiva***

TABLA DE CONTENIDO

I. INTRODUCCIÓN.

1.1.	Generalidades sobre la hormona del crecimiento.	.1
1.2	Efectos metabólicos de la hormona del crecimiento.	.2
1.2.1	Efectos Directos.	.3
1.2.2	Efectos Indirectos.	.4
1.3	Mecanismo de interacción de la hormona del crecimiento - receptor.	.6
1.4	Un modelo <i>in vitro</i> para evaluar la actividad biológica de las GHs.	.9
1.4.1	Diferenciación adipocítica de las células 3T3 en respuesta a la GH.	.9
1.5	Hormonas del crecimiento de primates.	.10
1.6	Justificación.	.11

II OBJETIVOS

2.1	Objetivo general.	.12
2.2	Objetivos específicos .	.12

III MATERIALES Y MÉTODOS

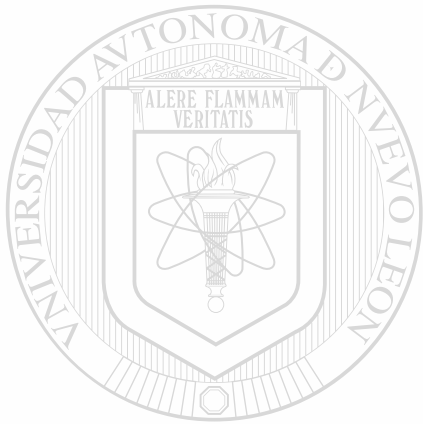
3.1	Origen de los reactivos.	.13
3.2	Origen del material biológico.	.14
3.3	Equipo.	.14
3.4	Métodos.	.16
3.4.1	Subclonación de los genes de MaGHN, MaGHV, CGHN, y HGHV en pAVE.	.18
3.4.1.1	Subclonación de los genes de MaGHN y MaGHV.	.18
3.4.1.1.1	Obtención de los genes.	.18
3.4.1.1.2	Obtención del vector pAVE <i>Bam</i> HI – <i>Sma</i> I.	.18
3.4.1.1.3	Purificación de los fragmentos de interés .	.19
3.4.1.1.4	Ligación.	.20
3.4.1.1.5	Preparación de células competentes. .	.21
3.4.1.1.6	Transformación de células competentes .	.21
3.4.1.1.7	Minipreparación de los plásmidos .	.22
3.4.1.1.8	Caracterización de los plásmidos. .	.23

3.4.1.2	Subclonación de CGHN25
3.4.1.2.1	Obtención del gen CGHN25
3.4.1.2.2	Condiciones de reacción de la T4DNA polimerasa.25
3.4.1.2.3	Ligación, transformación y caracterización de las clonas.26
3.4.1.3	Subclonación de HGHV.27
3.4.1.3.1	Obtención del gen de HGHV.27
3.4.1.3.2	Obtención del vector pAVE <i>Bam</i> HI - <i>Eco</i> RI.28	
3.4.1.3.3	Ligación.28
3.4.1.3.4	Transformación de células competentes. .28	
3.4.1.3.5	Minipreparación de los plásmidos.29
3.4.1.3.6	Caracterización de las clonas pAVEHGHV. .29	
3.4.2	Purificación a gran escala de las construcciones.31
3.4.2.1	Purificación de los recombinantes por el método de gradiente con cloruro de cesio.31
3.4.2.2	Diálisis.32
3.4.2.3	Cuantificación del DNA plasmídico..33
3.4.3	Ensayo de diferenciación adipocítica..33
3.4.3.1	Cultivo de las células 3T3.33
3.4.3.2	Transfección.34
3.4.4	Evaluación de la eficiencia de la transfección.35
3.4.4.1	Cuantificación de la actividad de beta-Galactosidasa.35
3.4.4.2	Normalización de la actividad de beta-Galactosidasa.36
3.4.4.3	Cuantificación de proteínas por el método de Bradford.36
3.4.5	Evaluación de la actividad adipocítica.37
3.4.5.1	Tinción de cultivos celulares por el método del rojo oleoso O.37
3.4.5.2	Cuantificación de lípidos mediante el método del rojo oleoso O.37
3.4.5.3	Actividad de la Glicerol 3 - Fosfato Deshidrogenasa.37

IV RESULTADOS

4.1	Subclonación de MaGHN.39
4.2	Caracterización de las clonas de MaGHV.42
4.3	Subclonación y caracterización CGHN.45
4.4	Subclonación de HGHV.48
4.5	Purificación a gran escala de las construcciones.51
4.6	Ensayo de diferenciación adipocítica.52

4.6.1	Cuantificación de los lípidos por el método del rojo oleoso.	.54
4.6.2	Determinación de la actividad específica de la glicerol 3 fosfato deshidrogenasa.	.55
V	DISCUSION.	.57
VI	CONCLUSIONES.	.60
VII	REFERENCIAS.	.61



UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

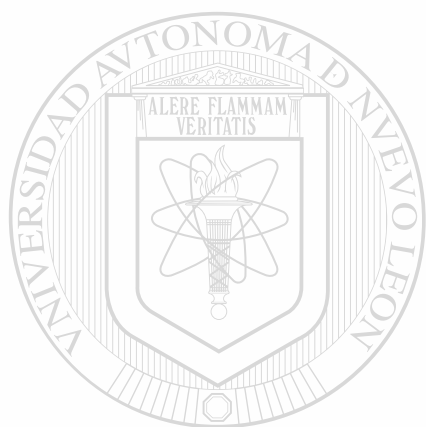
DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS



LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Modelo tridimensional de la hormona del crecimiento humano.	.2
Figura 2	Modelo tridimensional del dominio extracelular del receptor de la GH.	.6
Figura 3	Modelo tridimensional de la interacción GH-Receptor.	.8
Figura 4.	Modelo tridimensional de la dimerización de los receptores de la hormona de crecimiento.	.9
Figura 5.	Esquema de la estrategia general.	.17
Figura 6.	Esquema general de las reacciones de restricción para obtener el vector pAVE.	.19
Figura 7.	Minipreparación de las clonas pAVEMaGHN.	.39
Figura 8.	Linearización de las clonas pAVEMaGHN con la enzima <i>Bam</i> HI.	.40
Figura 9.	Digestión de las clonas con las enzimas <i>Bam</i> HI y <i>Eco</i> RI.	.40
Figura 10.	Caracterización de las clonas pAVEMaGHN.	.41
Figura 11.	Minipreparación de las clonas pAVEMaGHV.	.42
Figura 12.	Linearización de las clonas pAVEMaGHV con la enzima <i>Eco</i> RI.	.43
Figura 13.	Digestión de las clonas con las enzimas <i>Bam</i> HI y <i>Eco</i> RI.	.43
Figura 14.	Caracterización de las clonas pAVEMaGHV.	.44
Figura 15.	Minipreparación de las clonas pAVECHN.	.45
Figura 16.	Linearización de las clonas pAVECGHN con la enzima <i>Eco</i> RI.	.46
Figura 17.	Digestión de las clonas pAVECGHN con las enzimas <i>Bam</i> HI y <i>Eco</i> RI.	.46
Figura 18.	Caracterización de las clonas pAVECGHN.	.47
Figura 19.	Minipreparación de las clonas pAVEHGHV.	.48
Figura 20.	Linearización de las clonas pAVECGHN con la enzima <i>Eco</i> RI	.49

Figura 21.	Digestión de las clonas con las enzimas <i>Bam</i> HI y <i>Eco</i> RI.	.49
Figura 22.	Caracterización de las clonas pAVEHGHV.	.50
Figura 23.	Fotografías de los cultivos celulares observados bajo un microscopio de luz visible.	.52
Figura 24.	Resultados de la extracción con rojo oleoso O.	.54
Figura 25.	Determinación de la actividad de la G3PDH.	.55



UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS



LISTA DE TABLAS

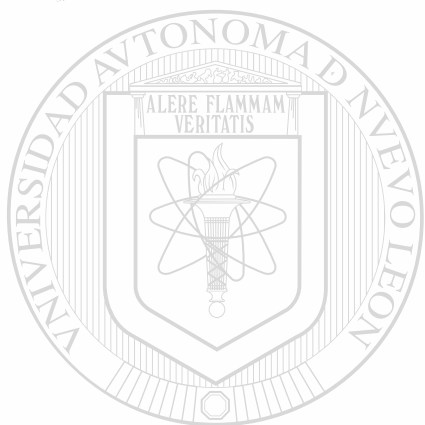
Tabla		Página
Tabla 1	Condiciones de digestión para linearizar las clonas MaGHN y MaGHV.24
Tabla 2	Condiciones de digestión para liberar el inserto de las clonas MaGHN y MaGHV.24
Tabla 3	Condiciones de reacción para comprobar la identidad de las clonas MaGHN y MaGHV.24
Tabla 4	Condiciones de digestión para linearizar la clonas CGHN.26
Tabla 5	Condiciones de digestión para liberar el inserto de la clona CGHN.26
Tabla 6	Condiciones de digestión para comprobar la identidad de la clona CGHN.27
Tabla 7	Condiciones de digestión para la preparación del inserto HGHV.27
Tabla 8	Condiciones de digestión para la obtención del vector pAVE.28
Tabla 9	Condiciones de digestión para linearizar la clona HGHV.30
Tabla 10	Condiciones de digestión para liberar el inserto de la clona HGHV.30
Tabla 11	Condiciones de digestión para comprobar la identidad de la 30 clona HGHV.30
Tabla 12	Resultados de la cuantificación de los productos purificados obtenidos mediante gran escala.51

NOMENCLATURA

μl	Microlitro
$^{\circ}\text{C}$	Grados centigrados
Abs	Absorbancia
amp ^r	Gen de resistencia a ampicilina
BSA	Albúmina sérica bovina
CGHN	Hormona normal del crecimiento del chimpancé
CGHV	Hormona variante del crecimiento del chimpancé
CPRG	Rojo de clorofenol beta-D galactopiranosido
C-terminal	Carboxilo terminal
DMEM	Medio mínimo esencial Dulbecco's
DNA	Ácido desoxirribonucleico
dNTPs	Desoxirribonucleótidos
DTT	Ditiotreitol
EDTA	Ácido etilen-diamino-tetraacético
F.D.	Factor de dilución
G3PDH	Glicerol 3-fosfato deshidrogenasa
GH	Hormona del crecimiento
GHN	Hormona normal del crecimiento
GHV	Hormona variante del crecimiento
h	Horas
HGHN	Hormona normal del crecimiento humano
HGHV	Hormona variante del crecimiento humano
IGF-1	Factor de crecimiento similar a la insulina 1
IGF-2	Factor de crecimiento similar a la insulina 2
IGFs	Factores de crecimiento similares a la insulina
kDa	Kilodaltones
LB	Medio Luria-Bertani
M	Molar

MaGHN	Hormona normal del crecimiento del mono araña
MaGHV	Hormona variante del crecimiento del mono araña
min	Minutos
ml	Mililitros
mM	Milimolar
NADH+H ⁺	Nicotinamida adenina dinucleótido reducido
NEB™	New England Biolabs
ng	nanogramo
nm	nanómetro
N-terminal	Amino terminal
pAVE	Plásmido pAVE
pAVEcGHN	Gen de la GHN del chimpancé en pAVE
pAVEcGHV	Gen de la GHV del chimpancé en pAVE
pAVEhGHN	Gen de la GHN humana en pAVE
pAVEhGHV	Gen de la GHV humana en pAVE
pAVEmaGHN	Gen de la GHN del mono araña en pAVE
pAVEmaGHV	Gen de la GHV del mono araña en pAVE
pb	Pares de bases
PBS	Amortiguador salino de fosfatos
pBS	Plásmido pBS
pBScGHN	Gen de la GHN del chimpancé en pBS
pBSF1	Gen de la GHV del mono araña en pBS
pBSG4	Gen de la GHN del mono araña en pBS
pBSHGhV	Gen de la GHV humano en pBS
pBSmaGHN	Gen de la GHN del mono araña en pBS
pBSmaGHV	Gen de la GHV del mono araña en pBS
pBSN1	Gen de la GHN del chimpancé en pBS
pCMV	Promotor de citomegalovirus
pCMVbetagal	Plásmido con promotor de citomegalovirus para beta galactosidasa.
pH	Potencial de hidrógeno

RNA	Ácido ribonucleico
RNA_m	Ácido ribonucleico mensajero
rpm	Revoluciones por minuto
SBF	Suero bovino fetal
SDS	Dodecil sulfato de sodio
TBE	Buffer tris-boratos
TE	Buffer tris-EDTA
TSS	Solución de almacenaje y transformación
UV	Ultravioleta
V	Voltios



UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN



DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

RESUMEN

Q. F. B. Virgilio Bocanegra García

Fecha de Graduación: Noviembre, 2000

Universidad Autónoma de Nuevo León
Facultad de Medicina
Departamento de Bioquímica

Título del estudio: EVALUACIÓN DEL EFECTO ADIPOGÉNICO DE LAS HORMONAS DEL CRECIMIENTO NORMAL Y VARIANTE DE PRIMATES.


Número de páginas: 62 Candidato al grado de maestría en Ciencias con Especialidad en Biología Molecular e Ingeniería Genética.

Área de estudio: Biología Molecular

Propósito y método de estudio: La hormona de crecimiento tiene funciones fundamentales para el desarrollo y control de muchos de los sistemas vitales en un vertebrado. Los efectos de la GH se dividen en directos e indirectos; los efectos directos son una consecuencia de la unión de la GH a su receptor y los efectos indirectos, son los que se llevan a cabo mediados por las somatomedinas. La hormona de crecimiento tiene aplicaciones veterinarias, como la estimulación de una mayor producción de leche, o de mayor crecimiento, así como aplicaciones médicas, para el tratamiento del enanismo hipofisiario, o en la regeneración de tejidos en individuos que están bajo condiciones de estrés celular e incluso se utiliza como anabólico para el aumento de la masa muscular. Sin embargo también tiene efectos diabetogénicos sobre el individuo en el que se aplica a largo plazo, y mientras que estimula la lipólisis en un periodo a corto plazo, a largo plazo genera adipogénesis. Las propiedades de las GHs han sido estudiadas principalmente en el humano, ovino y bovino, pero no se ha investigado nada en los primates.

Contribuciones y conclusiones: Aprovechando que los genes de las GHs del mono araña y chimpancé han sido clonados recientemente, en este trabajo evaluamos la actividad adipogénica de las hormonas recombinantes del crecimiento normal del mono araña, chimpancé y humano y variante del mono araña y humano. La evaluación de la actividad adipogénica se llevó a cabo por el método del rojo oleoso O y por el método de la glicerol 3-fosfato deshidrogenasa. Encontramos que estas hormonas son capaces de inducir diferenciación adipocítica en cultivos de células 3T3 cuando se cultivan en condiciones no adipogénicas. No encontramos diferencias significativas entre los niveles de diferenciación inducidos por los genes investigados. Ambas técnicas demostraron ser eficaces para evaluar la actividad adipogénica.


Dra. Herminia Martínez Rodríguez
DIRECTOR


Dr. Hugo A. Barrera Saldaña
CO-DIRECTOR

CAPITULO I

1. INTRODUCCIÓN.

1.1. Generalidades sobre la hormona del crecimiento.

En el humano la hormona del crecimiento (GH) es una proteína codificada por un gen (hGH-N) perteneciente a una familia de cinco genes localizada en el brazo largo del cromosoma 17. Los otros cuatro genes codifican dos para el lactógeno placentario (hPL2 y hPL3), otro para la hormona variante del crecimiento expresada en placenta (hGH-V), y el último, es un pseudogen del lactógeno placentario (hPL-1)

La GH que es secretada por células de la pituitaria mantenidas en cultivo, es una mezcla heterogénea de péptidos que pueden ser distinguidos basándose en su carga o tamaño (Bauman, 1991). La principal forma de la GH es un polipéptido de una sola cadena con 191 residuos de aminoácidos y una masa molecular de 22 kDa. Este polipéptido tiene dos puentes disulfuro y no está glicosilado (ver figura 1). Una forma más pequeña de la GH con una masa molecular de 20 kDa, también es secretada y representa aproximadamente el 10% de la GH producida por la pituitaria. Esta forma de la GH se genera por el procesamiento alternativo del transcrito del gen hGH-N y difiere de la de 22 kDa por una delección de los residuos amioacídicos 32 a 46. Su potencia biológica es la misma que la de la GH 22 kDa.

Formas adicionales de la GH que son más grandes o más pequeñas que la de 22 kDa también se ha mostrado que se encuentran en cultivos de pituitaria o en suero. Su significado biológico no está claro todavía. La placenta también produce una GH de 22 kDa que difiere de la GH principal de la pituitaria. Esta última, al igual que la primera también tiene isoformas, las cuales son las de 20, 24, 25, y 26 kDa.

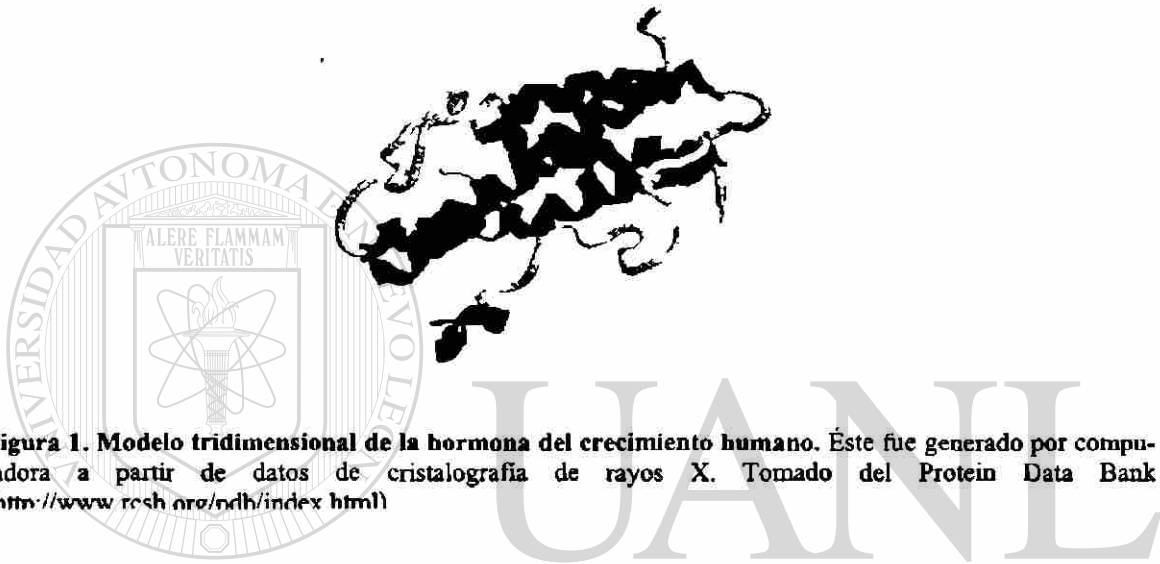


Figura 1. Modelo tridimensional de la hormona del crecimiento humano. Éste fue generado por computadora a partir de datos de cristalografía de rayos X. Tomado del Protein Data Bank (<http://www.rcsb.org/ndb/index.html>)

1.2 Efectos metabólicos de la hormona del crecimiento.

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS
Además de su efecto específico en el crecimiento, esta hormona tiene muchos efectos

metabólicos generales, que pueden clasificarse en efectos directos, que son una consecuencia de la unión de la GH a su receptor así como en efectos indirectos, que son los que se llevan a cabo mediados por las somatomedinas (Davidson, 1987).

1.2.1 Efectos Directos

Los efectos directos, se generan como consecuencia de la unión de la GH a su receptor. Este tipo de efectos varían dependiendo del tejido en el cual se presentan, por ejemplo:

1. Estímulo a la producción de IGF-1 y el IGF-2 por el hígado, los cuales comparten similitud entre sí y con la insulina y tienen efectos análogos a ésta. El IGF-2 tiene un efecto más parecido a la insulina que el IGF-1, pero éste es más dependiente de la GH y mas potente como factor de crecimiento que el IGF-2 (Daughaday et al., 1989). Por lo general, el IGF-1 parece funcionar como el mediador principal de la acción indirecta de la GH.

2. Estímulo al crecimiento de los huesos largos. Aunque la GH estimula la síntesis de proteínas y el crecimiento de casi todos los tejidos del organismo, sus efectos más evidentes tienen lugar en el esqueleto. Ello es debido a múltiples acciones de la GH en los huesos, aumento en el depósito de proteínas en los condrocitos y células osteogénicas que causan el crecimiento óseo; aumento de la velocidad de multiplicación de estas células y la conversión de los condrocitos en células osteogénicas causando la formación específica de hueso nuevo (Frasier, 1983).

3. Estímulo a la hidrólisis de triglicéridos. La GH tiene un efecto específico, induciendo la liberación de ácidos grasos por el tejido adiposo, aumentando en consecuencia, la concentración de éstos en los líquidos corporales (Schwartz, 1984). Además, estimula a nivel tisular la conversión de ácidos grasos en acetil coenzima A, y su subsecuente utiliza-

Evaluación del efecto adipogénico de hormonas recombinantes del crecimiento normal y variante de primates para la obtención de energía. Por lo tanto, por influencia de la GH se utilizan preferentemente lípidos, en lugar de carbohidratos o proteínas, a la hora de obtener energía (Davidson, 1987).

4. Efectos en el metabolismo de los carbohidratos. La hormona tiene cuatro efectos fundamentales en el metabolismo celular de la glucosa: disminuye su utilización para la obtención de energía; disminuye su captación por las células; aumenta los depósitos celulares de glucógeno; aumenta la secreción de insulina y disminuye la sensibilidad a la misma (Wallis, 1980).

5. Inducción de la diferenciación específica de ciertas líneas celulares. La hormona es capaz de inducir diferenciación adipogénica en células no diferenciadas, promoviendo la generación de adipocitos (Green et al., 1985)

1.2.2 Efectos Indirectos

Los efectos indirectos de la GH son aquellos mediados por las somatomedinas (IGFs), entre los que encontramos los siguientes:

1. Estimulación de la proliferación celular. Se ha observado que la GH actúa a través de los IGFs, específicamente el IGF-1, incrementando el número de células, mas que el volumen celular. Estudios realizados en ratas y en humanos han demostrado que a excepción del cerebro y los ojos, la mayoría de los órganos y tejidos responden a la GH con un incremento de tamaño (Davidson, 1987).

2. Inducción de la síntesis de proteínas. Aunque no se conocen con precisión los mecanismos responsables del aumento de la síntesis de proteínas inducidos por la hormona, se conocen una serie de efectos que pueden favorecer una síntesis incrementada de las mismas, como son: estimulación del transporte de aminoácidos a través de las membranas celulares, estimulación de la síntesis de proteínas en los ribosomas, aumento de la transcripción del DNA, y disminución del catabolismo de proteínas y aminoácidos (Froesch et al., 1986). La GH es una hormona anabólica clásica siendo la evidencia más simple de ello el hecho de que los niños con deficiencia de la misma, presentan un aumento en la masa muscular después del tratamiento de restitución de la hormona. Debido a esto, la GH ha despertado interés entre los atletas por su potencial como anabólico (Wallis, 1980)

3. Disminución de la sensibilidad de las células a la insulina. Este efecto es una consecuencia de la homología del receptor de los IGFs con el receptor de la insulina, por lo que los primeros compiten por el receptor de esta última, generando como consecuencia una disminución de la sensibilidad a la insulina (Czech, 1989; Ullrich et al., 1986)

4. Efectos sobre el metabolismo de los minerales. El metabolismo de los minerales también se ve afectado por la GH, aunque a través de una somatomedina (IGF-1), ya que promueve un equilibrio positivo de calcio, magnesio y fosfato y causa la retención de los iones sodio, potasio y cloro (Granner, 1997).

1.3 Mecanismo de interacción de la hormona del crecimiento - receptor.

Todos los efectos de la GH son el resultado último de su unión a un receptor específico presente en la superficie celular y ampliamente distribuido a largo de los tejidos. El receptor, es una glicoproteína transmembranal de 620 residuos aminoacídicos. Contiene un dominio N-terminal extracelular grande (de aproximadamente 250 residuos aminoacídicos), el cual es responsable de la unión a la hormona (figura 2), seguido por un dominio que atraviesa la membrana celular y un dominio C-terminal citoplasmático de aproximadamente 350 residuos aminoacídicos (Leung et al., 1987). En el humano, el dominio extracelular del receptor de la HGH puede ser cortado por proteasas para generar un complejo HGH-receptor, con una masa molecular de aproximadamente 60 kDa. El significado fisiológico de este complejo circulante es desconocido (Campbell et al., 1993)

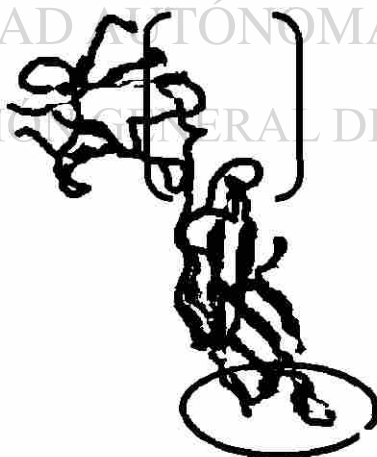


Figura 2 Modelo tridimensional del dominio extracelular del receptor de la GH. Los corchetes muestran el dominio de unión a GH. El círculo indica la región que corresponde al dominio de unión membranar. (<http://www.rcsb.org/pdb/index.html>)

Como se esperaba por la similitud entre la GH y la prolactina, sus respectivos receptores son muy similares en secuencia y en estructura. Lo mismo ocurre con los dominios extracelulares de los receptores de ambas hormonas, similitud que se extiende con una familia creciente de receptores, para varias interleucinas, interferón, factor estimulante de colonias de macrófagos, y eritropoyetina (Kelly et al., 1991; Mathews, 1991).

La estructura tridimensional del complejo formado por la GH y el dominio extracelular de su receptor ha sido elucidado (de Vos y cols., 1994). El complejo consiste de una molécula de hormona unida a dos moléculas de dicho dominio (figura 3). Los sitios en la hormona que interactúan con las dos moléculas del receptor son diferentes, pero los sitios de los dos receptores que interactúan con la hormona son idénticos (figura 4). Los mecanismos de transducción de señal utilizados por la GH no están bien dilucidados todavía, pero parecen involucrar la dimerización del receptor (de Vos y cols., 1994). Evidencia reciente muestra que, a pesar de que el receptor de la GH no tiene actividad de tirosincinasa, la unión de la hormona lleva a un incremento en la fosforilación de proteínas intracelulares en residuos de tirosina.

Los eventos iniciales de fosforilación son mediados por ciertas proteincinasas citoplasmáticas que físicamente se asocian con el complejo hormona - receptor y se activan como consecuencia de esta asociación (Campbell et al., 1993).

El receptor de la GH es un miembro de la superfamilia de receptores hematopoyéticos que se encuentran en varios tipos celulares y están generalmente involucrados en el crecimiento y diferenciación celular. Esta clasificación está basada en la similitud de secuencias en los dominios extracelulares, con un pentapéptido notablemente conservado en todos ellos llamado la caja WSXWS, cuya función todavía no está completamente determinada (De Vos et al., 1994).



Figura 3. Modelo tridimensional de la interacción GH-Receptor. La GH se muestra en gris oscuro y el dominio extracelular del receptor gris claro. El receptor se muestra sin su dominio de unión a membrana, ni su dominio citoplasmático. Tomado del Protein Data Bank. (<http://www.rcsb.org/pdb/index.html>)

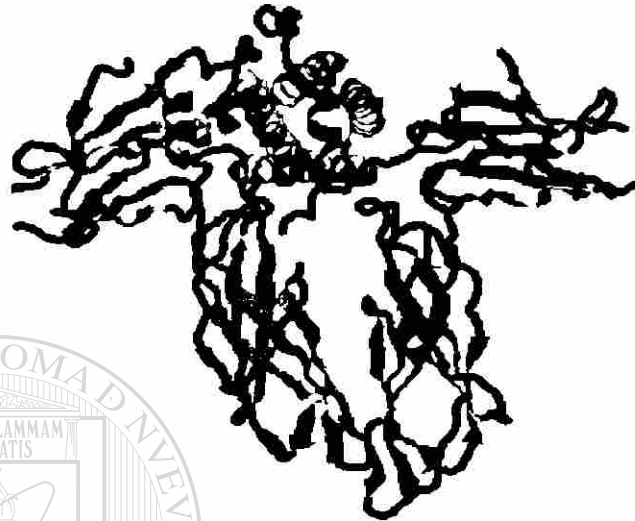


Figura 4. Modelo tridimensional de la dimerización de los receptores de la hormona del crecimiento. Aunque las regiones de la hormona por donde se une a las moléculas de receptor son diferentes, los dominios de unión de estos a la GH son idénticos. La GH se muestra en negro, el dominio extracelular del receptor 1 y el dominio extracelular del receptor 2 en gris. Tomado del Protein Data Bank. (<http://www.rcsb.org/pdb/index.html>)

1.4 Un modelo *in vitro* para evaluar la actividad biológica de las GHs.

1.4.1 Diferenciación adipocítica de las células 3T3 en respuesta a la GH.

Como se mencionó anteriormente, uno de los efectos de la GH, es inducir diferenciación, y la línea celular 3T3 de fibroblastos de ratón es susceptible a este efecto. Estos se diferencian a adipocitos bajo diferentes condiciones, como puede ser el someterlas a un porcentaje aproximado del 15% de suero bovino fetal ó a dos ó tres semanas de confluencia (Kuri-Harcuch et al., 1978). Durante este proceso suceden un gran número de cambios morfológicos, bioquímicos y genéticos. Las células comienzan a almacenar triacilglicéridos

Evaluación del efecto adipogénico de hormonas recombinantes del crecimiento normal y variante de primates en su citoplasma, los cuales pueden ser fácilmente teñidos con rojo oleoso, o se puede cuantificar la actividad de enzimas inducidas durante el proceso que están involucradas en la síntesis de triacilglicéridos. De una manera u otra, el efecto adipogénico puede ser fácilmente evaluado (Gamou et al., 1989).

La diferenciación adipocítica depende estrictamente de los factores adipogénicos encontrados en el suero que se agrega al medio de cultivo. El suero de diferentes especies animales varía en su actividad adipogénica, siendo el suero bovino fetal el que muestra la mayor actividad adipogénica, mientras que el del gato doméstico carece de esta actividad por no tener o poseer bajas concentraciones de factores adipogénicos (Kuri-Harcuch et al., 1978). La GH bovina promueve la adipogénesis en células 3T3 y es responsable de entre un 30 a un 50% de la actividad adipogénica del suero bovino fetal (Nixon et al., 1984)

La conversión adipocítica se ha empleado para medir la actividad biológica de las GHs recombinantes. La técnica que más se ha empleado es la cuantificación de la actividad enzimática de la glicerol-3-fosfato deshidrogenasa, la cual es un marcador bioquímico de diferenciación (Juárez-Aguilar et al., 1995)

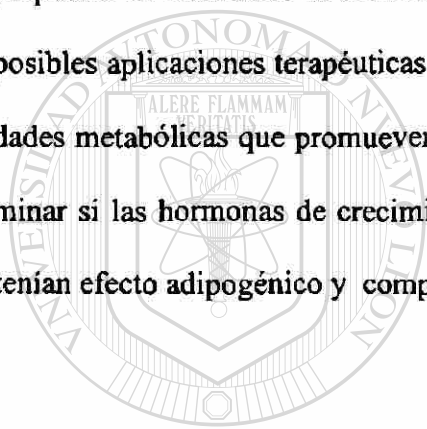
1.5 Hormonas del crecimiento de primates.

Debido a las propiedades que presenta, la GH se ha convertido en un importante modelo de estudio, y esto ha aumentado el interés por el estudio de GHs de otros animales, especialmente, en primates, ya que éstas, tienen un gran porcentaje de similitud con respec-

Evaluación del efecto adipogénico de hormonas recombinantes del crecimiento normal y variante de primates to a la humana y poco se han estudiado a la fecha. Estos estudios pueden abrir nuevas oportunidades de aplicación de las GHs.

1.6 Justificación.

Se conocen bien las propiedades de las GHs humana y bovina, pero nada acerca de las propiedades de las GHs de las especies que se incluyeron en este trabajo. Así que con el propósito de contribuir al conocimiento de las propiedades de estas hormonas y explorar posibles aplicaciones terapéuticas o biotecnológicas, se requieren datos acerca de las actividades metabólicas que promueven a escala celular. Por ello, este trabajo se enfocó a determinar si las hormonas de crecimiento normal y variante del mono araña y del chimpancé tenían efecto adipogénico y compararlo con el efecto de la HGH.



UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN



DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

CAPITULO II

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo general.

Evaluar el efecto adipogénico de las GHs recombinantes normal y variante de primates, y de la GH variante del humano, comparándolas con la GH normal humana.

2.2. Objetivos particulares.

1. Estandarizar los ensayos de diferenciación adipocítica con HGH
2. Subclonar los genes de las GHs normal y variante del mono araña, la GH normal del chimpancé, así como la GH variante del humano en el vector de expresión eucariote pAVE.
3. Evaluar el efecto adipogénico de las GHs recombinantes, generado por la expresión de los plásmidos correspondientes, utilizando como control positivo el plásmido pAVEhGH-N que codifica para la hormona del crecimiento humana.

CAPITULO III

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 Origen de los reactivos.

Los materiales utilizados para el cultivo de células (frascos, cajas, tubos, filtros, pipetas, unidades de filtración, etc.) fueron adquiridos de Falcon™ (Lincoln Park, NJ, E.U.A), Corning (New York, NY, E.U.A.), Costar (Cambridge, M.A. E. U. A.) y de Pro-mega (Madison, Wisconsin, E.U.A.).

Los reactivos para preparación de medios de cultivo, así como suero bovino fetal (SBF), tripsina y el reactivo LIPOFECTAMINE™, se adquirieron en Sigma Chemical Co. (Missouri, MI, E. U. A.), HyClone, Inc. (Logan, Utha, E. U. A.), DIFCO® LABORATORIES (Detroit, Michigan, E. U. A.) y Gibco-BRL BRL Life Technologies, Inc. (Gaithersburg, MD, E. U. A.) respectivamente. Los reactivos para elaborar las soluciones amortiguadoras, medio de cultivo, geles, y demás se obtuvieron de: Sigma Chemical, Co. (Missouri, MI, E. U. A.), Merck (Monterrey, México), y Aldrich Chemical Company (Milwaukee, WI, E.U.A.).

3.2 Origen del material biológico

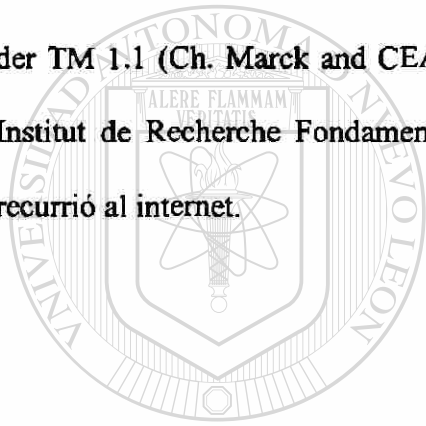
Las construcciones pBSG4, pBSF1', pBSN1, pBSV3, pBSHGHV y pAVE HGH fueron obtenidas de la plasmidoteca, la línea celular 3T3 fue obtenida a partir del banco de células del laboratorio de Biología Celular, y la cepa de *Escherichia coli* XL1-Blue fue obtenida del cepario, de la ULIEG.

3.3 Equipo.

Se utilizó un horno de microondas Goldstar modelo MA-857M, Microcentrífugas Eppendorf modelos 5402 y 5415 (Camibh Göttingen, Alemania), una fuente de poder Gibco BRL, modelo 250, una campana de flujo laminar marca Labconco Corporation (Kansas, City, MO, E. U. A.). Una balanza digital Sartorius modelo 1206 MP, (Camibh Göttingen, Alemania), una balanza analítica OHAUs modelo AP1105 (Florham Park, Suiza), micro-pipetas de Pipetman Gilson de Raining Instruments CO, Inc. (Emeryville, CA, E. U. A.), un agitador G10 marca New Bussines Scientific CO., Inc. (Edison, Mj, EUA), jeringas y agujas Becton Dickinson (Juiz de la Fiora, MG, Brasil), un potenciómetro Beckman O320 (Camibh Göttingen, Alemania), un equipo de video-computadora marca BioRad, modelo GelDoc 1000 (Hércules, CA, E. U. A.), un microscopio invertido Karl Zeiss (Alemania), ultracentrífuga TLX120 obtenida de Beckman Instruments, Inc.

El procesamiento de los datos se realizó en computadoras marca Macintosh modelo Classic II y Power PC marca COMPAQ, PRESARIO, MV500. Se empleó el procesador de textos Microsoft Word versión 1997, procesadores de gráficos Microsoft Power Point versión 1997, Adobe Photoshop Limited Edition 2.5.1 (1989-1993 Adobe Systems Inc.) y Molecular Analyst versión 1.5 de Biorad Laboratories (Hércules, CA, EUA).

Para los análisis relacionados a la Biología Molecular se usó el programa DNA Strider TM 1.1 (Ch. Marck and CEA, 1989, Service de Biochimie-Départament de Biologie-Institut de Recherche Fondamentale-CEA-Francia). Para la búsqueda de información se recurrió al internet.



UANL

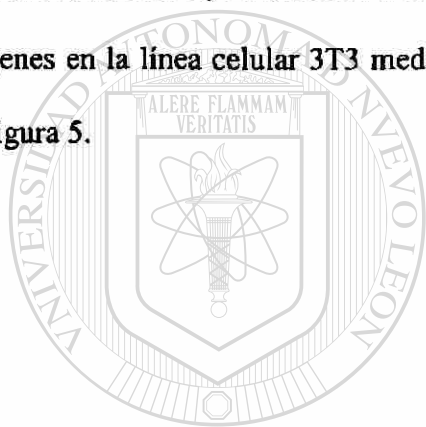
UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS



3.4 Métodos

El trabajo se realizó en las tres etapas principales, que se muestran en la estrategia general, de la figura 5. 1) Subclonación de los genes MaGHN, MaGHV, CGHN, y HGHV en el vector de expresión pAVE. 2) Obtención a gran escala y semicuantificación de las construcciones. 3) Evaluación del efecto adipocítico de las hormonas codificadas por estos genes en la línea celular 3T3 mediante transfección. La estrategia general se muestra en la figura 5.



UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS



3.4.1 Subclonación de los genes de MaGHN, MaGHV, CGHN, CGHV

y HGHV en pAVE. ESTRATEGIA GENERAL

3.4.1.1

Subclonación

Subclonación de los genes
MaGHN, MaGHV, CGHN,
y HGHV en pAVE.

3.4.1.1.1

Obtención

Preparación a gran escala
de las construcciones.

Ensayos de diferenciación
Adipocítica de las hormonas

Figura 5. Estrategia general. Se indican las tres principales etapas de las que constó el presente trabajo.

3.4.1 Subclonación de los genes de MaGHN, MaGHV, CGHN, CGHV y HGHV en pAVE.

3.4.1.1 Subclonación de los genes de MaGHN y MaGHV

3.4.1.1.1 Obtención de los genes de MaGHN y MaGHV

Los genes se obtuvieron a partir de construcciones previas en el vector de clonación pBS denominadas pBSKSG4 (pBSmaGHN) y pBSKSF1' (pBSmaGHV). Estas construcciones contenían la unidad transcripcional mas el promotor de 300 pb, pero carecían de la señal de poliadenilación. Mediante el corte con las enzimas de restricción *Bam*HI y *Hinc*II, se liberaron las unidades transcripcionales correspondientes a cada gen. Los fragmentos conteniéndolas se separaron por electroforesis en gel preparativo al 0.85% de agarosa y se purificaron por el método de la fibra de vidrio.

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

3.4.1.1.2 Obtención del vector pAVE *Bam*HI - *Sma*I

El vector pAVE se obtuvo a partir de una construcción previa existente en el laboratorio de Biología Celular, pAVEHGH, la cual contiene el gen que codifica para la hormona del crecimiento humana y la señal de poliadenilación que faltaba en las construcciones de pBS. La digestión con las enzimas *Bam*HI-*Sma*I (ver figura 6) permitió obtener el vector de expresión completo mas la señal de poliadenilación necesaria para construir una clona completamente funcional. La digestión preparativa se realizó en una reacción de 20 μ L, la

cual se colocó por completo en un gel preparativo de agarosa y de ahí se purificó la banda que contenía el fragmento de interés por el método de la fibra de vidrio.

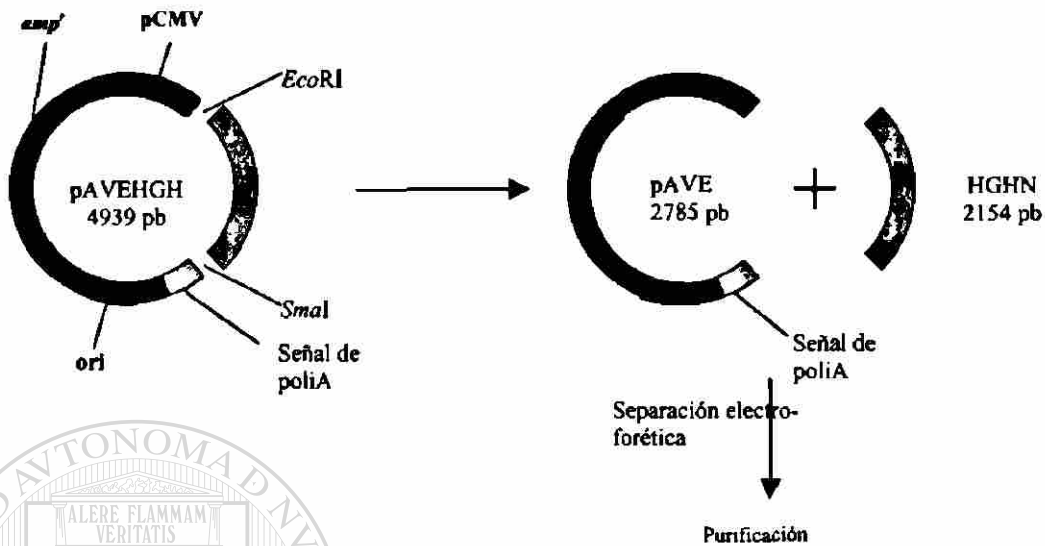


Figura 6. Esquema general de las reacciones de restricción para obtener el vector pAVEpoliA. Los cortes se llevaron a cabo con las enzimas *EcoRI* y *SmaI*. Los fragmentos se separaron en un gel de agarosa al 0.85% y se purificaron por el método de la fibra de vidrio.

3.4.1.1.3 Purificación de los fragmentos de interés por centrifugación sobre fibra de vidrio.

Los productos de la digestión se separaron en un gel preparativo de agarosa al 1%,[®] utilizando para ello 20 µl del DNA digerido (aprox. 2.5 µg de DNA). La muestra se resolvió por electroforesis con buffer TBE a voltaje constante de 100 V. Una vez que el colorante (xilencianol) migró 3/4 partes del largo total del gel, se detuvo la electroforesis y se transfirió con cuidado el gel a un recipiente con solución de bromuro de etidio a una concentración de 2 µg/ml por 5 min. La exposición a luz ultravioleta en el transiluminador del sistema de análisis GelDoc, permitió identificar la banda que correspondía al vector para cortar el fragmento que la contenía con una hoja de bisturí y depositarlo en un tubo Eppen-

dorf de 1.5 ml. El DNA de la banda de interés se purificó por centrifugación sobre fibra de vidrio, el cual se describe a continuación. A un tubo Eppendorf de 0.5 ml se le realizó un orificio pequeño en su parte inferior mediante el empleo de una aguja y se le introdujo fibra de vidrio siliconizada empaquetando una cuarta parte de su interior. El fragmento de agarosa obtenido, fue cortado en pequeños trozos (1-2 mm de grosor), colocándolos dentro del tubo. El tubo de 0.5 ml se introdujo a su vez dentro de un tubo Eppendorf de 1.5 ml y se sometió a centrifugación por 10 min. a una velocidad de 14,000 rpm, con lo cual se recuperó el líquido del gel conteniendo el DNA en este último, solución a la que se le practicó una extracción con medio volumen de Fenol y medio de Sevag. La mezcla se agitó fuertemente por inversión, se centrifugó y la fase superior se recuperó y mezcló con 2.5 volúmenes de etanol absoluto y un 10% de Acetato de Sodio 3 M, con la finalidad de precipitar el DNA. El tubo se incubó a -70°C por 30 min, los flóculos formados (DNA plasmídico) se empastillaron por centrifugación a 14,000 rpm por 15 min. a 4°C , se desechó el alcohol y se lavó la pastilla con una solución de etanol al 70%, centrifugando de nuevo bajo las condiciones ya descritas. La pastilla obtenida se secó en un evaporador centrífugo (SAVANTTM) y se re-suspendió en 20 μl de solución TE (Tris-EDTA pH 8). Se evaluó su pureza y calidad por absorción de luz UV a una longitud de onda de 260 y 280 nm.

3.4.1.1.4 Ligación.

Se montó una reacción de ligación en 20 μl conteniendo los DNAs purificados (3:1, vector inserto), amortiguador de reacción (1X) y ligasa de DNA de bacteriófago T4 (2U de la marca NEB) y se incubó a 16°C por 12 h. Para corroborar la ligación de los productos, se

sometieron 5 µl de la reacción a corrimiento electroforético en gel de agarosa al 0.85%. El gel se tiñó luego en solución de bromuro de etidio y se visualizó en el sistema de análisis GelDoc. El producto de la ligación se utilizó para transformar bacterias *E. coli* XL1-Blue y las clonas candidatas fueron propagadas a pequeña escala con la finalidad de obtener suficiente DNA para llevar a cabo su caracterización tal y como se describe a continuación.

3.4.1.1.5 Preparación de células competentes

Se transfirieron 500 µl de un stock de bacterias XL1 Blue a un matraz de 250 ml que contenía 50 ml de medio LB (0.5 g de NaCl, 0.25 g de extracto de levadura y 0.5 g de bactotripton a en 50 ml de agua MiliQ, sin antibiótico). Se incubó a 37°C agitando a 220 rpm hasta que la densidad óptica a 600 nm (OD) alcanzara 0.5 (aproximadamente entre 2.5 a 3 h). Después, el matraz se incubó en hielo durante 20 min, luego las células se transfirieron a un tubo Falcon de 50 ml y se centrifugaron durante 10 min a 4°C a 3000 rpm. Después de esto se resuspendieron en 5 ml de solución transformante y de almacenamiento (TSS, 20% PEG, 10% de DMSO en medio LB con MgCl₂ 100 mM). Para almacenar las células, éstas se distribuyeron en alícuotas, se sumergieron en nitrógeno líquido durante un min y se mantuvieron a -70°C.

3.4.1.1.6 Transformación de células competentes con los productos de ligación.

Se utilizó la cepa de *E. coli* XL1-Blue, cuya transformación se llevó a cabo probando en paralelo testigos positivos y negativos. Como testigo positivo se utilizó el vector pBS y como negativo agua. Para los experimentos, se utilizaron 5 µl de la reacción de ligación.

El procedimiento se llevó a cabo como sigue: se colocaron 150 μ l de células competentes en un tubo de 1.5 ml en hielo. A cada tubo se le agregó el DNA en un volumen máximo de 10 μ l. La mezcla de células competentes y DNA se incubaron en hielo durante 30 min. Una vez transcurrido el tiempo de incubación, las células se expusieron a un choque térmico a 42°C durante 90 segundos, sin agitación, y se retornaron al hielo de inmediato por otros 2 min. Luego se agregaron a cada tubo 400 μ l de medio LB sin antibióticos y se incubó durante una h a 37°C agitando a 225 rpm. Terminada la incubación, se centrifugó a 2550 rpm por 10 min, se eliminó el sobrenadante hasta dejar 100 μ l aproximadamente y se vació el contenido a un caja con agar LB adicionado con ampicilina (4 μ l / ml de un stock de 25 μ g / μ l) y tetraciclina (2 μ l / ml de un stock de 5 μ g / μ l). Se dispersaron bien las células sobre la superficie de la placa con la ayuda de una varilla de vidrio, dejando reposar durante 10 min e incubando durante 16 h a 37°C.

3.4.1.1.7 Minipreparación de los plásmidos obtenidos a partir de la transformación.

La minipreparación se llevó a cabo por el método de lisis alcalina (Sambrook et al., 1989). En un tubo Eppendor se colocaron 1.5 ml de cultivo de bacterias, se centrifugó 30 segundos a 14000 rpm, se eliminó el sobrenadante y se resuspendió suavemente en 100 μ l de solución I (50 mM de glucosa, Tris-HCl pH 8 y EDTA 10 mM pH 8), luego se agregaron suavemente 200 μ l de solución II (0.2 ml NaOH 2 M, 1 ml de SDS al 10% y 8.8 ml de agua miliQ) mezclando de inmediato por inversión e incubando en hielo por 5 min. Transcurrido el tiempo de incubación, se agregaron de golpe 150 μ l de solución III (6 ml acetato de potasio 5 M, 1.1 ml de ácido acético concentrado y 2.8 ml de agua miliQ), se mezcló

Evaluación del efecto adipogénico de hormonas recombinantes del crecimiento normal y variante de primates de inmediato por inmersión y se centrifugó por 5 min a 14000 rpm. Después de recuperar el sobrenadante en un tubo nuevo, se le agregó un volumen de Fenol-Sevag y se agitó al vortex por un min, se centrifugó de nuevo por 5 min a 14000 rpm. Se recuperó la fase acuosa en un tubo nuevo a la que se le agregaron dos volúmenes de etanol absoluto mezclando perfectamente e incubando a temperatura ambiente por 5 min. Finalmente se centrifugó por 5 min a 14000 rpm, se lavó con etanol al 70%, se secó al aire y la pastilla se resuspendió en 50 µl de agua miliQ. (Sambrook et al., 1989)

3.4.1.1.8 Caracterización de los plásmidos obtenidos.

La caracterización se llevó a cabo mediante tres pruebas. Linearización del plásmido para comprobar su tamaño; liberación del fragmento subclonado, y digestión con una enzima diagnóstica. La linearización se llevó a cabo con la enzima *Bam*HI en una reacción de digestión estándar de 10 µl. La liberación del fragmento se llevó a cabo con las enzimas *Bam*HI-*Eco*RI en una reacción de digestión estándar a 10 µl. En la digestión con la enzima diagnóstica se utilizó *Pvu*II, también en una reacción estándar a 10 µl. Dichas reacciones se describen a continuación en las tablas 1 a 3.

Tabla 1. Condiciones de digestión para linearizar las clonas.

Reacción de digestión para linearizar las clonas pAVEMaGHN y pAVEMaGHV	
Reactivos	Volúmenes de reacción
Enzima <i>Bam</i> HI NEB™ 10 U / μ l	0.3 μ l
Buffer 3 NEB™	1 μ l
DNA 2 μ g / μ l	5 μ l
Agua MiliQ	3.7 μ l

Tabla 2. Condiciones de digestión para liberar el inserto de las clonas.

Reacción de digestión para liberar el inserto MaGHN y MaGHV	
Reactivos	Volúmenes de reacción
Enzima <i>Bam</i> HI NEB™ 10 U / μ l	0.3 μ l
Enzima <i>Eco</i> RI NEB™ 10 U / μ l	0.3 μ l
Buffer 3 NEB™	1 μ l
DNA 2 μ g / μ l	5 μ l
Agua MiliQ	3.4 μ l

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

Tabla 3. Condiciones de reacción para comprobar la identidad de las clonas.

Reacción de digestión con <i>Pvu</i> II NEB™	
Reactivos	Volúmenes de reacción
Enzima <i>Pvu</i> II NEB™ 10 U / μ l	0.3 μ l
Buffer 2 NEB™	1 μ l
DNA 2 μ g / μ l	5 μ l
Agua MiliQ	3.7 μ l

3.4.1.2 Subclonación de CGHN

3.4.1.2.1 Obtención del gen CGHN

El gen se obtuvo a partir de la construcción previa en el vector de clonación pBS denominada pBSKSN1 (CGHN). Esta construcción anterior contenía esta unidad transcripcional mas el promotor de 300 pb, sin embargo no contenía la señal de poliadenilación. Mediante el corte con la enzima de restricción *EcoRI*, se linearizó la clona, después se rellenaron los bordes del extremo *EcoRI* mediante la actividad de la enzima T4DNA polimerasa con las condiciones del apartado 3.4.1.2.2, luego se cortó con la enzima *BamHI* liberando así la unidad transcripcional de su promotor natural, para posteriormente ligar este fragmento en el vector de expresión pAVE cortado en los sitios de restricción *BamHI* - *SmaI*. La reacción de digestión se llevó a cabo de modo preparativo a 20 μ L, la cual se colocó por completo en un gel preparativo y de ahí se purificaron los fragmentos por el método de la fibra de vidrio descrito previamente.

3.4.1.2.2 Condiciones de reacción de la T4DNA polimerasa

Para un volumen de reacción de 50 μ l conteniendo 1 μ g de DNA se utilizaron las siguientes condiciones: 1X buffer de DNA polimerasa de T4; 50 μ g / ml BSA; 100 μ M of cada uno de los 4 dNTPs; 1 unidad de DNA Polimerasa de T4.

Se incubó a 12° por 20 min y se detuvo la reacción inactivando con una extracción fenol / cloroformo, seguida por una precipitación del DNA con etanol absoluto.

3.4.1.2.3 Ligación, transformación y caracterización de las clonas.

La ligación de la región transcripcional del CGHN *Bam*HI - *Sma*I con pAVE *Bam*HI – *Sma*I se llevó a cabo en una reacción estándar de ligación a 20 µl como se describió arriba. El producto de ligación se utilizó para transformar bacterias competentes y las clonas recombinantes se seleccionaron utilizando la misma estrategia descrita anteriormente, las condiciones se describen en las tablas 4 - 6.

Tabla 4. Condiciones de digestión para linearizar la clonas CGHN.

Reacción de digestión para linearizar la clona.	
Reactivos	Volúmenes de reacción
Enzima <i>Eco</i> RI NEB™ 10 U / µl	0.3 µl
Buffer 3 NEB™	1 µl
DNA 2 µg / µl	5 µl
Agua MiliQ	3.7 µl

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

Tabla 5. Condiciones de digestión para liberar el inserto de la clona CGHN.

Reacción de digestión para liberar el inserto	
Reactivos	Volúmenes de reacción
Enzima <i>Bam</i> HI NEB™ 10 U / µl	0.3 µl
Enzima <i>Eco</i> RI NEB™ 10 U / µl	0.3 µl
Buffer 3 NEB™	1 µl
DNA 2 µg / µl	5 µl
Agua MiliQ	3.4 µl

Tabla 6. Condiciones de digestión para comprobar la identidad de la clona CGHN.

Reacción de digestión con <i>PvuII</i> NEB™	
Reactivos	Volúmenes de reacción
Enzima <i>PvuII</i> NEB™ 10 U / µl	0.3 µl
Buffer 2 NEB™	1 µl
DNA 2 µg / µl	5 µl
Agua MiliQ	3.7 µl

3.4.1.3 Subclonación de GHV

3.4.1.3.1 Obtención del gen de GHV

Se obtuvo a partir de una construcción previa en el vector de clonación pBS denominado pBSKShGHV. Esta construcción contiene la unidad transcripcional mas la señal de poliadenilación propia de este gen. Para liberar este último del vector pBS se realizaron dos digestiones, una con las enzimas *BamHI-SacI* y la otra con las enzimas *EcoRI-SacI* (ver tabla 7). Estas digestiones se llevaron a cabo en forma preparativa en una reacción total de 20 µl como se describió anteriormente, los cuales se colocaron en gel preparativo de donde se cortaron las bandas correspondientes y se purificaron por el método de la fibra de vidrio como se describió en el apartado 3.4.1.1.3.

Tabla 7. Condiciones de digestión para la preparación del inserto GHV.

Reacción de digestión para preparación del inserto	
Reactivos	Volúmenes de reacción
Enzima <i>SacI</i> NEB™	0.3 µl
Enzima <i>BamHI</i> NEB™ ó <i>EcoRI</i> ™ 10 U / µl	0.3 µl
Buffer 3 NEB™	1 µl
DNA 2 µg / µl	5 µl
Agua MiliQ	3.4 µl

3.4.1.3.2 Obtención del vector pAVE *Bam*HI – *Eco*RI

La digestión se llevó a cabo de modo preparativo en una reacción de 20 μ l, la cual se colocó por completo en un gel preparativo y de ahí se purificó la banda que contenía el fragmento de interés por el método de la fibra de vidrio descrito anteriormente.

Tabla 8. Condiciones de digestión para la obtención del vector pAVE.

Reacción de digestión para preparar el vector pAVE	
Reactivos	Volúmenes de reacción
Enzima <i>Bam</i> HI NEB™ 10 U / μ l	0.3 μ l
Enzima <i>Eco</i> RI NEB™ 10 U / μ l	0.3 μ l
Buffer 3 NEB™	1 μ l
DNA 2 μ g / μ l	5 μ l
Agua MiliQ	3.4 μ l

3.4.1.3.3 Ligación.

La ligación de los dos fragmentos obtenidos a partir de HGHV mas el vector pAVE se llevó a cabo en una reacción estándar de ligación de 20 μ l de acuerdo a lo descrito anteriormente en el apartado 3.4.1.14.

3.4.1.3.4. Transformación de células competentes con los productos de ligación.

Se utilizaron las cepas de *E. coli* XL1-Blue y la transformación se llevó a cabo probando en paralelo testigos positivos y negativos. Como testigo positivo se utilizó el vector pBS y como negativo, agua. Para las muestras se utilizaron 10 μ l de la mezcla de ligación y se utilizó el método de Sambrook et. al. 1989.

3.4.1.3.5 Minipreparación de los plásmidos obtenidos a partir de la transformación

La minipreparación se llevó a cabo por el método de lisis alcalina, detallado en el apartado 3.4.1.1.7.

3.4.1.3.6 Caracterización de las clonas pAVEHGHV.

La caracterización se llevó a cabo mediante tres pruebas. Linearización del producto para comprobar el tamaño, liberación del fragmento subclonado para comprobar tanto el tamaño del inserto como del vector, y digestión con una enzima diagnóstica. La linearización se llevó a cabo con la enzima *Bam*HI en una reacción de digestión estándar de 10 μ l. La liberación del fragmento se llevó a cabo con las enzimas *Bam*HI-*Eco*RI en una reacción de digestión estándar a 10 μ l. En la digestión con la enzima diagnóstica se utilizó *Pvu*II, también en una reacción estándar a 10 μ l (tablas 9–11)

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

Tabla 9. Condiciones de digestión para linearizar la clona GHV.

Reacción de digestión para linearizar la clona.	
Reactivos	Volúmenes de reacción
Enzima <i>EcoRI</i> NEB™ 10 U / µl	0.3 µl
Buffer 3 NEB™	1 µl
DNA 2 µg / µl	5 µl
Agua MiliQ	3.7 µl

Tabla 10. Condiciones de digestión para liberar el inserto de la clona GHV.

Reacción de digestión para liberar el inserto	
Reactivos	Volúmenes de reacción
Enzima <i>BamHI</i> NEB™ 10 U / µl	0.3 µl
Enzima <i>EcoRI</i> NEB™ 10 U / µl	0.3 µl
Buffer 3 NEB™	1 µl
DNA 2 µg / µl	5 µl
Agua MiliQ	3.4 µl

Tabla 11. Condiciones de digestión para comprobar la identidad de la clona GHV.

Reacción de digestión con <i>PvuII</i> NEB™	
Reactivos	Volúmenes de reacción
Enzima <i>PvuII</i> NEB™ 10 U / µl	0.3 µl
Buffer 2 NEB™	1 µl
DNA 2 µg / µl	5 µl
Agua MiliQ	3.7 µl

3.4.2 Purificación a gran escala de las construcciones pAVEMaGHN, pAVE-MaCGV, pAVECGHN, pAVECGHV, pAVEHGHV, pCMVbetagal y pBS

Debido a que las construcciones se iban a transfectar en células en cultivo, era necesario que este DNA tuviera una alta pureza. Para lograr esto se purificaron a gran escala y por ello se inoculó un litro de medio LB adicionado con ampicilina y tetraciclina, cada uno con la clona recombinante y se incubó toda la noche. Luego se llevó a cabo la extracción del DNA plasmídico por el método de la lisis alcalina descrito en el apartado 3.4.1.1.7 modificando los volúmenes de la solución I a 10 ml, la solución II a 20 ml y la solución III a 15 ml.

3.4.2.1 Purificación de los recombinantes por el método de gradiente con cloruro de cesio (Cab y Barrera, 1988)

La solución de DNA se llevó a un volumen final de 4 ml con agua milliQ estéril y se agregaron a ésta 4 g de cloruro de cesio. El tubo Falcon se cubrió con papel aluminio y se le adicionó 0.5 ml de bromuro de etidio (10 mg / ml en agua). Se obtuvo una densidad final de 1.55 g / ml y la concentración de bromuro de etidio quedó aproximadamente a 740 $\mu\text{g} / \text{ml}$.

La solución se incubó por 30 min para permitir la formación de un complejo proteína-bromuro de etidio, el cual se eliminó por centrifugación a 8000 rpm por 5 min. La solu-

Evaluación del efecto adipogénico de hormonas recombinantes del crecimiento normal y variante de primates

ción acuosa se transfirió a uno de los tubos de ultracentrífuga de 4 ml, se adicionó al tubo aceite mineral y se selló. Para dar lugar a la formación del gradiente, el tubo se centrifugó a 96 000 rpm en un rotor TLA 100.4 por 12 h. Una vez formado el gradiente e identificada la banda de interés se insertó una aguja 20-G en la parte superior del tubo para permitir la entrada de aire y se recuperó la banda del plásmido por succión mediante una jeringa de 3 ml con una aguja 20-G cubierta con vaselina que fue insertada a 1 cm por debajo de la banda y con el bisel hacia arriba. La solución se colocó en un tubo Falcon de 15 ml previamente cubierto con papel aluminio. Se eliminó el bromuro de etidio mediante extracciones sucesivas con 1 volumen de alcohol isoamílico. Para esto, la mezcla se agitó suavemente por inversión, se centrifugó por un minuto a baja velocidad ésto se repitió hasta que desapareció el color del bromuro de etidio.

3.4.2.2 Diálisis

Una vez eliminado el bromuro de etidio, la solución se colocó con ayuda de una pipeta en una membrana para diálisis sellada en ambos extremos, se sumergió en un recipiente con 2 l de agua destilada, para posteriormente llevarse al cuarto frío en donde se diálizó por 2 h sin agitación. Se realizó un cambio de agua y se dejó por 12 h más. El contenido de la bolsa se recuperó y se mezcló con 2.5 volúmenes de etanol al 100% en frío y 1/10 parte de acetato de sodio 3 M pH 5. Se dejó precipitar por 2-3 h a -70°C y se centrifugó a 5000 rpm. La pastilla obtenida se resuspendió en 1 ml de TE.

3.4.2.3 Cuantificación del DNA plasmídico.

Se determinó la cantidad y calidad del DNA obtenido por absorbancia a 260 y 280 nm. Para esto se prepararon diluciones de 1:1000 por triplicado. En la realización de los cálculos se empleó la siguiente fórmula: Concentración de DNA = (F.D.)(50)(Abs), donde F.D. = Factor de dilución y 50 = Factor de conversión a ng / μ l

Finalmente, una vez obtenida la concentración total se diluyó hasta obtener una concentración final de 1 μ g / μ l.

3.4.3 Ensayo de diferenciación adipocítica.

3.4.3.1 Cultivo de las células 3T3

Para el cultivo de la línea celular 3T3, se empleó el medio DMEM, donde se mantuvieron en condiciones no adipogénicas (medio DMEM adicionado con SBF al 2.5%) hasta alcanzar aproximadamente el 80% de confluencia. En este punto, las células se utilizaban para los ensayos de transfección o se resembraban en medio fresco. Para la resiembra, se eliminó el medio de cultivo completamente, se agregaron 2 ml de tripsina y se incubó durante 5 min. Una vez que las células se desprendieron, se recuperaron en un tubo de ensayo estéril y se centrifugaron a 2700 rpm durante 5 min. Se eliminó la solución de tripsina y el botón de células se resuspendió en 3 ml de medio DMEM. Se realizó un conteo celular en un hemocitómetro y se transfirió una alícuota que contenía aproximadamente 7×10^4 células a una nueva caja de cultivo.

3.4.3.2 Transfección.

Se realizaron los ensayos de transfección en cultivos con una confluencia aproximada el 80% en cajas de 24 pozos, de acuerdo a las indicaciones de la casa comercial Gibco-BRL Life Technologies. Este ensayo se estandarizó llevando a cabo la transfección con diferentes cantidades del plásmido pCMVSPORTbetagal. El volumen de la lipofectamina y el reactivo plus se mantuvieron constantes (1.5 y 0.5 μl respectivamente). La transfección se llevó a cabo de la siguiente manera: en un tubo (tubo A) se colocaron 0.8 μg de cada una de las construcciones mezcladas con 0.4 μg del vector pCMVSPORTbetagal que contiene el gen reportero beta-Galactosidasa. Se completó a 500 μl con medio de cultivo Optimem libre de suero y de antibióticos. En otro tubo (tubo B), se adicionaron 1.5 μl de lipofectamina y 0.5 μl del reactivo plus lipofectamina y finalmente se completó a un volumen de 50 μl con medio de cultivo Optimem. Se mezcló el contenido de ambos tubos y se incubó a temperatura ambiente durante 45 min. Una vez transcurrido el tiempo de incubación se agregaron 200 μl de medio Optimem y se vació el contenido en la caja con células. Las placas se incubaron durante 5 h y se sustituyó el medio por medio no adipogénico adicionado con transferrina, biotina e insulina. Se incubó durante 7 días mas. Se utilizó la construcción pAVEHGHN como testigo positivo y pBS como testigo negativo.

3.4.4 Evaluación de la eficiencia de la transfección**3.4.4.1 Cuantificación de la actividad de beta-Galactosidasa.**

Para la determinación de la actividad de beta-Galactosidasa se siguió el protocolo descrito por Eustice y cols. 1991. Una vez terminado el tiempo de incubación de la transfección se recuperó el medio de cultivo para determinar posteriormente la concentración de GH. Por otro lado, la monocapa de células se lavó con 0.5 ml de solución PBS pH 7.4 y se adicionaron 85 µl de buffer de lisis pH 8 (Tris-HCl-0.1% de tritón 100X). Para aumentar la lisis celular, el lisado se sometió a 3 ciclos de congelamiento a -70°C y descongelamiento a temperatura ambiente. Después, las muestras se centrifugaron a 3000 rpm para empastillar los restos celulares. Del sobrenadante obtenido (extracto proteico) se tomaron 50 µl para llevar a cabo una reacción con 150 µl de sustrato para beta-Galactosidasa CPRG (rojo de clorofenol beta-D galactopiranosido) a una concentración de 1 mg / ml. La reacción se llevó a cabo a 37°C en un tiempo de 30 min y se determinó la intensidad del color midiéndose la absorbancia a 580 nm. La actividad de la beta-Galactosidasa se determinó mediante la siguiente fórmula (Carrol et al., 1992):

$$\text{Actividad de beta-Galactosidasa (U)} = \frac{10^9 \times \text{Abs } 580}{(\# \text{ células})(t \text{ de incubación en h})}$$

3.4.4.2 Normalización de la actividad de beta-Galactosidasa

Para calcular la actividad específica de beta-galactosidasa en U / μ g de proteína, se cuantificó la concentración de proteína total en el extracto celular mediante la técnica de Bradford.

3.4.4.3 Cuantificación de proteínas por el método de Bradford. (Bradford et al., 1976)

En tubos Eppendorf de 0.5 ml se colocaron 1.0, 2.5, 5.0, 12.5 y 15 μ l de una solución estándar con una concentración de 0.5 mg / ml de albúmina sérica bovina (BSA), aforando tubo 50 μ l con solución de NaCl 150 mM. Cada solución tenía una cantidad equivalente de 0.5, 1.25, 2.5, 6.25, y 7.5 μ g de proteína respectivamente.

La reacción se llevó a cabo con la adición de 150 μ l de colorante azul brillante de Coomassie G-250, se incubó 5 min a temperatura ambiente. Se midió la absorbancia a una longitud de onda de 595 nm. En paralelo, con la elaboración de la curva de calibración se determinó la concentración de proteína de cada una de las muestras problema mediante diluciones 1:10. Una vez determinada la concentración de proteínas totales para cada muestra problema, se calculó la actividad específica de beta-Galactosidasa.

Actividad de beta-Gal en U = U de Beta-Gal/ μ g de proteína
 μ g de proteínas totales

3.4.5 Evaluación de la actividad adipocítica

3.4.5.1 Tinción de cultivos celulares por el método del rojo oleoso O

Los cultivos celulares se lavaron dos veces con PBS, luego se fijaron con formalina al 10%/PBS durante 30 min. Una vez fijadas las células, se procedió a teñir los cultivos con solución de rojo oleoso O durante 10 min. Después se lavó durante 5 min. Para proteger las células, éstas se cubrieron con glicerol al 50%. Para observación bajo microscopio y para tomar fotos, se tiñieron las células con hematoxilina de Mayer durante 2 o 3 min, luego se lavaron durante 10 min y se cubrieron con glicerol al 50%.

3.4.5.2 Cuantificación de lípidos mediante el método del rojo oleoso O.

A partir de los cultivos teñidos con rojo oleoso O, se les agregaron 500 µl de isopropanol y se extrajo el rojo oleoso. Se recuperó el isopropanol en un tubo de microcentrifuga de 1.5 ml y se agregó a cada pozo 500 µl adicionales de isopropanol, los cuales se mezclaron con los 500 µl en el tubo de 1.5 ml. El espectrofotómetro se ajustó a cero a 510 nm con isopropanol. Luego se determinó la absorbancia de los extractos (Castro Muñoz-Ledo et al., 1996)

3.4.5.3 Actividad de la Glicerol 3 - Fosfato Deshidrogenasa

Se eliminó totalmente el medio de cultivo de cada pozo (en placas de 24 pozos), se agregaron 400 µl de tripsina por pozo, se agitó suavemente y se incubó para desprender las células. Luego se agregaron 600 µl de PBS frío a cada pozo y se recuperó la suspensión en

tubos de microcentrifuga de 1.5 ml. Luego se centrifugó durante 5 min a 4°C y se descartó el sobrenadante. Se agregó 1 ml adicional de PBS frío seguido de 5 min de centrifugación, y se eliminó el sobrenadante. Al botón se le agregaron 100 µl de buffer de extracción helado por pozo (Tritón X-100 0.5%, Tris-HCl 10 mM, MgCl₂ 1mM, KCl 20 mM, DTT 0.2 mM y glicerol 10%) y se resuspendió con una pipeta. Se congeló a -70°C, se descongeló y se volvió a congelar por 10 min a -70°C. Se centrifugó a 12000 rpm y se conservó el sobrenadante. La cuantificación de proteínas se llevó a cabo por el método de Bradford (Bradford et al., 1976). Para determinar la concentración de cada extracto, se pusieron 10 µl de extracto en 2 ml finales. Basándose en las lecturas a 595 nm de las muestras y los estándares se calculó la concentración proteica en cada extracto. Para cuantificar la actividad específica de cada extracto se hicieron mezclas de reacción de 1000 µl de la siguiente manera: se colocaron 800 µl de mezcla de reacción (125 mM de trietanolamina-HCl, pH 7.5, 2.5 mM EDTA, 0.16 mM NADH, 0.36 mM de Dihidroxiacetonafofato, 0.125 mM de 2-Mercaptoetanol) mas el volumen equivalente a 10 mg de proteína mas el volumen necesario de buffer de extracción adicionado con ditioneitol (DTT+) suficiente para completar 1000 µl. Se incubó la mezcla durante 5 min a 25°C y se transfirieron 100 µl a un tubo con 10 µl de SDS 20%. Se completó a 1000 µl, se leyó la absorbancia y esto fue el equivalente al tiempo cero. Los 900 µl restantes se incubaron a 25°C durante 30 min mas. Terminada la incubación, se detuvo la reacción con 100 µl de SDS al 20% y se determinó la absorbancia a 595 nm, Esto correspondió al tiempo final (Castro Muñoz-Ledo et al., 1996)

CAPITULO IV

El análisis de los productos de la mini-preparación se llevó a cabo mediante la liberación de las clones con la enzima BamHI, para corroborar su tamaño (Figura 7).

RESULTADOS

4.1 Subclonación de MaGHN

La subclonación de la GHN del mono araña, se llevó a cabo mediante la ligación de los productos purificados y transformación de bacterias XL1-blue y se analizó el DNA plasmídico de 5 clonas (figura 7)

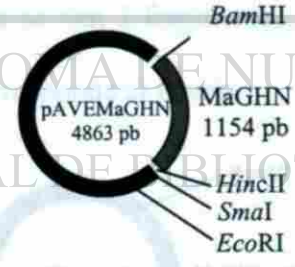


Figura 7. Mini-preparación de las clonas pAVEMaGHN. El vector pAVE digerido con las enzimas BamHI y SmaI y la construcción pBSG4 digerida con las enzimas EcoRI y HincII fueron ligados y con los productos de la ligación se transformaron bacterias E. Coli XL-Blue 1, se extrajo el DNA mediante lisis alcalina, se obtuvieron 5 muestras y los productos se corrieron en un gel de agarosa al 0.85%. El marcador utilizado fue lambda PstI, las muestras van del carril 1 al 5.

El análisis de los productos obtenidos a partir de la minipreparación se llevó a cabo mediante la linearización de las clonas con la enzima *Bam*HI, para corroborar su tamaño (figura 8).



Figura 8. Linearización de las clonas pAVEMaGHN con la enzima *Bam*HI. Las muestras se digirieron con la enzima *Bam*HI para corroborar el tamaño real de la construcción, esperándose un producto de 4863 pb. Los productos de la digestión se corrieron en un gel de agarosa al 0.85%. Se utilizó el marcador lambda *Pst*I. Las muestras van del carril 1 al 5.

La siguiente prueba de caracterización fue la liberación del inserto clonado, con las enzimas de restricción *Bam*HI-*Eco*RI bajo las condiciones detalladas en los métodos. Los resultados se muestran en la figura 9 en la que se ven 2 fragmentos, uno de 3309 pb que corresponde al vector y otro de 1554 pb que corresponde al inserto.

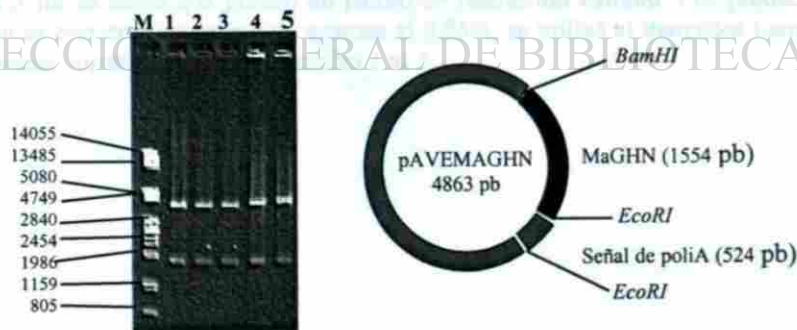


Figura 9. Digestión de las clonas pAVEMaGHN con las enzimas *Bam*HI y *Eco*RI. Las clonas se sometieron a esta digestión para liberar el inserto subclonado y así comprobar su tamaño. Se liberaron tres fragmentos, uno de 3309 pb correspondiente al vector, uno de 1554 pb correspondiente al inserto y uno de 524 pb correspondiente a la señal de poliA, este fragmento final no se apreció en el gel. Los productos de la digestión se corrieron en un gel de agarosa al 0.85%, se utilizó el marcador lambda *Pst*I, las muestras van del carril 1 al 5.

Finalmente se utilizó una enzima de restricción diagnóstica, en este caso, *PvuII*, la cual genera un fragmento de 1016 pb cuando corta esta construcción lo cual puede observarse en la figura 10.

formación, se obtuvieron 6 clones, de los cuales se obtuvo el DNA plasmídico y se caracterizó (figura 10)



Figura 10. Caracterización de las clonas pAVEMaGHN. Las clonas se caracterizaron con la enzima de restricción *PvuII*, con lo que se esperaba la liberación de un dos fragmentos, uno de 3847 pb y otro de 1016 pares de bases. Como se observa en el gel, la muestra 3 fue la única que generó un patrón de restricción extraño. Los productos de la digestión se corrieron en un gel de agarosa al 0.85%, se utilizó el marcador Lambda *PstI*. Las muestras corresponden de los carriles 1 al 5.

Figura 11. Caracterización de las clonas pAVEMaGHN III mediante digestión con la enzima de restricción *PvuII* a 37°C. Se utilizaron los marcadores Lambda *PstI* y *HindIII* como referencia para las posiciones de los fragmentos de restricción. En el ejemplo se muestra el patrón de restricción de la muestra 3, se utilizaron 6 muestras y los productos se corrieron en un gel de agarosa al 0.85%. Se observó un patrón de restricción extraño en el carril 3.

4.2 Caracterización de las clonas de MaGHV

Después de la transformación, se obtuvieron 6 clonas, de las cuales se obtuvo el DNA plasmídico y se caracterizó (figura 11)



Figura 11. Minipreparación de las clonas pAVEMaGHV. El vector pAVE digerido con las enzimas *Bam*HI y *Sma*I y la construcción pBSF1' digerida con las enzimas *Eco*RI y *Hinc*II fueron ligados y con los productos de la ligación se transformaron bacterias *E. Coli* XL-Blue 1, se extrajo el DNA mediante lisis alcalina, se obtuvieron 6 muestras y los productos se corrieron en un gel de agarosa al 0.85%. El marcador utilizado fue lambda *Pst*I, las muestras van del carril 1 al 6.

El análisis de los productos obtenidos a partir de la minipreparación se llevó a cabo mediante la linearización de las clonas con la enzima *EcoRI*, para corroborar el tamaño de la clona (figura 12)

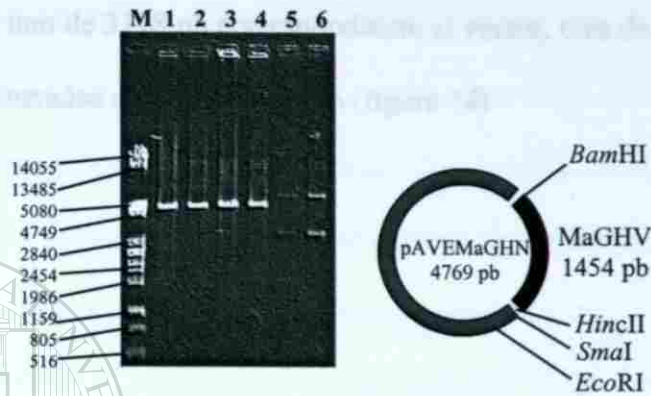


Figura 12. Linearización de las clonas pAVEMaGHV con la enzima *EcoRI*. Las muestras se digirieron con la enzima *EcoRI* para corroborar el tamaño de la construcción, esperándose un producto de 4769 pb. Los productos de la digestión se corrieron en un gel de agarosa al 0.85%. Se utilizó el marcador lambda *PstI*. Las muestras van del carril 1 al 6, como puede observarse en la figura solo las muestras del 1 al 4 mostraron el tamaño de restricción esperado.

La liberación del inserto clonado, se llevó a cabo con las enzimas de restricción *BamHI-EcoRI* bajo las condiciones detalladas en los métodos. La digestión dio como resultado la liberación de 4 fragmentos, uno de 3309 pb, correspondiente al vector, dos a partir de inserto de 1063 pb y 737 pb y uno mas que corresponde a la señal de poliA de 524 pb.



Figura 13. Digestión de las clonas pAVEMaGHV con las enzimas *BamHI* y *EcoRI*. Las clonas se sometieron a esta digestión para liberar el inserto subclonado y así comprobar su tamaño. El inserto contiene un sitio *BamHI* y 3 sitios *EcoRI* se encuentra en el inserto y otro se encuentra en el vector, por lo que se generan cuatro fragmentos a partir de esta digestión, uno que es el vector de 3309 pb, dos a partir del inserto, uno de 1063 pb y otro de 737 pb además del fragmento que corresponde a la señal de poliA del vector de 524 pb. Las digestiones se corrieron en un gel de agarosa al 0.85%. Las muestras corresponden del carril 1 al 4. El marcador de peso molecular utilizado fue lambda *PstI*

4.1. Subclonación y caracterización CCRN

Como una prueba adicional se utilizó una enzima de restricción diagnóstica, *PvuII*, la cual generó tres fragmentos, uno de 3178 pb correspondiente al vector, otro de 961 pb y otro de 630 pb, estos últimos generados a partir del inserto (figura 14)



Figura 14. Caracterización de las clonas pAVEMaGHV. Las clonas se caracterizaron con la enzima de restricción *PvuII*, con lo que se esperaba la liberación de tres fragmentos, uno de 3178 pb, otro de 961 pb y otro de 630 pb. Los productos de la digestión se corrieron en un gel de agarosa al 0.85%, se utilizó el marcador *Lamda PstI*. Las muestras corresponden de los carriles 1 al 6.

Figura 15. Manipulación de las clonas pAVRCHN. El vector pAVR digerido con las enzimas *BamHI* y *XbaI* y la inserción con *PvuII* digerida con las enzimas *BamHI* y *XbaI* fueron ligadas y con los productos de la ligadura se transformaron bacterias E. Coli XL-Blue 1, en un tubo de EMB4 marcado con luz azulada, se sembraron 5 bacterias y los plasmidos se caracterizaron en un gel de agarosa al 0.85%. El marcador utilizado fue *Lamda PstI*. Las muestras son del carril 1 al 5. El tamaño de la construcción involucrada es de 4013 pb.

4.3 Subclonación y caracterización CGHN

Las clonas obtenidas se linearizaron con la enzima *Bam*HI para corroborar que el tamaño. Para obtener el fragmento de la unidad transcripcional de cGHN, se modificó ligeramente la estrategia, ya que el sitio *Hinc*II no estaba disponible, se digirió con *Eco*RI la construcción pBSN1, para después rellenar y dejar un extremo romo compatible con el sitio *Sma*I del vector pAVE. El extremo 5' de la unidad transcripcional, se liberó con *Bam*HI como en los dos casos anteriores. El fragmento *Bam*HI / romo se ligó con pAVE *Bam*HI – *Sma*I. Se obtuvieron 6 clonas, de las cuales se analizó el DNA plasmídico (figura 15).



Figura 15. Minipreparación de las clonas pAVECHN. El vector pAVE digerido con las enzimas *Bam*HI y *Sma*I y la construcción pBSN1 digerida con las enzimas *Eco*RI y *Sma*I fueron ligados y con los productos de la ligación se transformaron bacterias *E. Coli* XL-Blue 1, se extrajo el DNA mediante lisis alcalina, se obtuvieron 6 muestras y los productos se corrieron en un gel de agarosa al 0.85%. El marcador utilizado fue lambda *Pst*I, las muestras van del carril 1 al 6. El tamaño de la construcción calculado era de 4939 pb.

Figura 15. Digestión de las clonas con pAVECHN las enzimas *Bam*HI y *Eco*RI. Las clonas se transformaron y esta digestión para liberar el inserto subclonado y así corroborar su tamaño. El inserto subclonado tiene un tamaño de 1484 pb. Las digestiones se corrieron en un gel de agarosa al 0.85%, se utilizó el marcador lambda *Pst*I. Las clonas correspondientes del carril 1 al 6.

Para la última prueba se utilizó una enzima de restricción diagnóstica, en este caso,

PvuII. Las clonas obtenidas se linearizaron con la enzima *Bam*HI para corroborar que el tamaño de la clona concordara con el tamaño teórico, 4793 pb (ver figura 16)



Figura 16. Linearización de las clonas pAVECGHN con la enzima *Eco*RI. Las muestras se digirieron con la enzima *Bam*HI para corroborar el tamaño real de la construcción, esperándose un producto de 4793 pb. Los productos de la digestión se corrieron en un gel de agarosa al 0.85%. Se utilizó el marcador lambda *Pst*I. Las muestras van del carril 1 al 6, como puede observarse en la figura solo las muestras 2 al 6 mostraron el patrón de restricción esperado.

Después las clonas se digirieron para la liberación del inserto clonado, con las enzimas de restricción *Bam*HI-*Eco*RI bajo las condiciones detalladas en los métodos. Se obtuvieron dos bandas una de 2008 pb y otra de 2785 pb como se muestra en la figura 17.



Figura 17. Digestión de las clonas con pAVECHN las enzimas *Bam*HI y *Eco*RI. Las clonas se sometieron a esta digestión para liberar el inserto subclonado y así comprobar su tamaño. El inserto esperado tiene un tamaño de 2154 pb. Las digestiones se corrieron en un gel de agarosa al 0.85%, se utilizó el marcador lambda *Pst*I. Las clonas corresponden del carril 1 al 5.

44

Subclonación de HGHV

Para la última prueba se utilizó una enzima de restricción diagnóstica, en este caso, *PvuII*, la cual genera un fragmento de 1051 pb cuando corta esta construcción como se puede observar en la figura 18.

Este sitio *PvuII* dentro de la unidad transcripcional, por lo cual esta se inserta en dos fragmentos *PvuII* / *XbaI* y *XbaI* / *EcoRI*. Los dos fragmentos purificados se ligaron con el vector circular con *PvuII* y *EcoRI*. Después de la transformación se seleccionó y clonó (figura 17).

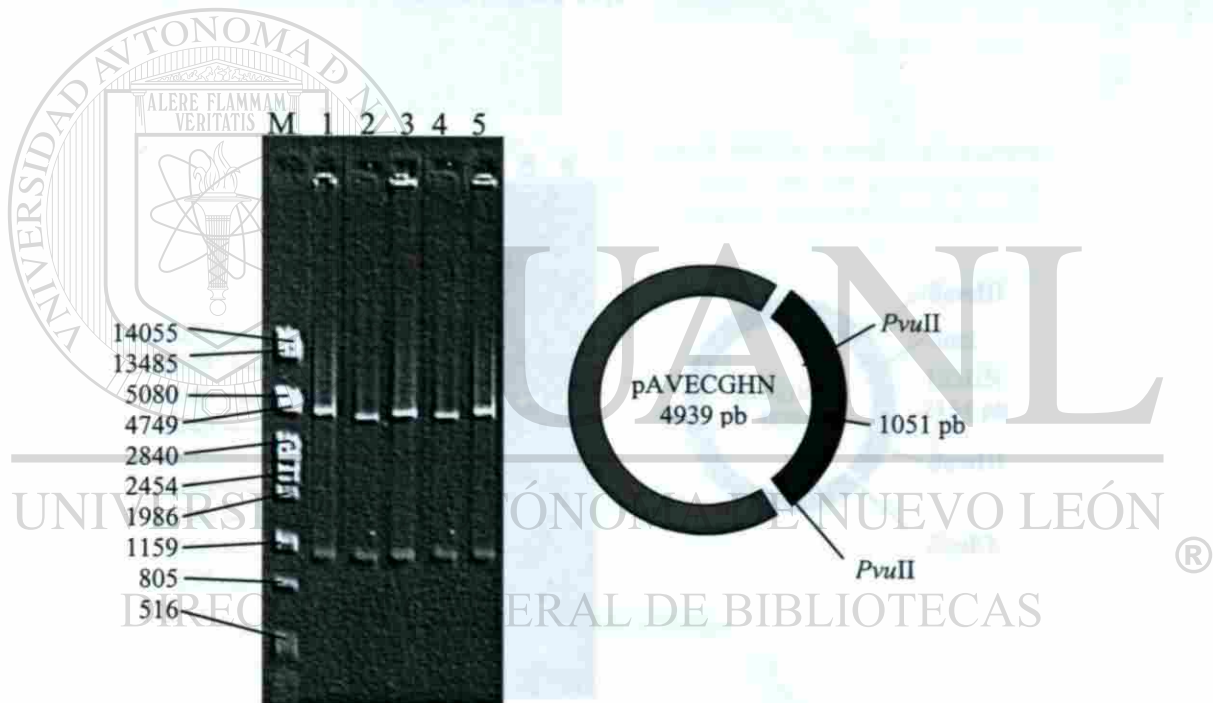


Figura 18. Caracterización de las clonas pAVECGHN. Las clonas se caracterizaron con la enzima de restricción *PvuII*, con lo que se esperaba la liberación de dos fragmentos, uno de 3958 pb y otro 968 pb. Los productos de la digestión se corrieron en un gel de agarosa al 0.85%, se utilizó el marcador Lambda *PstI*. Las muestras corresponden a los carriles 1 al 5.

El análisis de los productos obtenidos a partir de la minipreparación se llevó a cabo

4.4.1. Subclonación de HGHV con la enzima *EcoRI*, para corroborar el tamaño de

En este caso, la clona inicial de hGHV incluye la señal de poliadenilación por lo cual, se utilizó el sitio de restricción *EcoRI* situado en el extremo 3' de la señal de poliadenilación. Sin embargo, existe un sitio *BamHI* dentro de la unidad transcripcional, por lo cual esta se liberó en dos fragmentos *BamHI* / *SacI* y *SacI* / *EcoRI*. Los dos fragmentos purificados se ligaron con el vector cortado con *BamHI* y *EcoRI*. Después de la transformación se obtuvieron 6 clonas (figura 19).



Figura 19. Minipreparación de las clonas pAVEHGHV. El vector pAVE digerido con las enzimas *BamHI* y *EcoRI* y la construcción pBSHGHV digerida en dos reacciones separadas con las enzimas *BamHI* y *SacI* y *EcoRI* y *SacI* fueron ligados en una reacción de 3 fragmentos y con los productos de la ligación se transformaron bacterias *E. Coli* XL-Blue 1, se extrajo el DNA mediante lisis alcalina, se obtuvieron 6 muestras y los productos se corrieron en un gel de agarosa al 0.85%. El marcador utilizado fue lambda *PstI*, las muestras van del carril 1 al 6. El tamaño de la construcción calculado era de 4939 pb.

El análisis de los productos obtenidos a partir de la minipreparación se llevó a cabo mediante la linerarización de las clonas con la enzima *EcoRI*, para corroborar el tamaño de la clona, donde se esperaba un fragmento de 4939 pb como se observa en la figura 20.

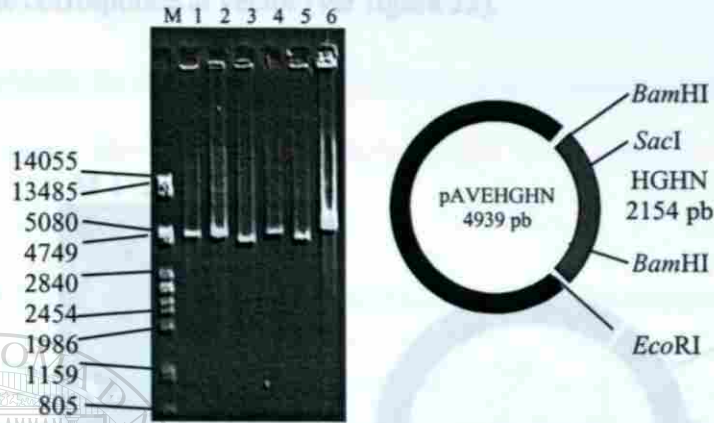


Figura 20. Linearización de las clonas pAVECGHN con la enzima *EcoRI*. Las muestras se digirieron con la enzima *EcoRI* para corroborar el tamaño real de la construcción, esperándose un producto de 4939 pb. Los productos de la digestión se corrieron en un gel de agarosa al 0.85%. Se utilizó el marcador lambda *PstI*. Las muestras van del carril 1 a 6, como puede observarse en la figura solo las muestras 3 y 5 no mostraron el patrón de restricción esperado.

La siguiente prueba de caracterización fue la liberación del inserto clonado, con las enzimas de restricción *BamHI-EcoRI* bajo las condiciones detalladas en los métodos. Se

esperaban tres fragmentos, uno de 3309 pb, otro de 1072 pb y uno de 558 pb (ver figura 21).

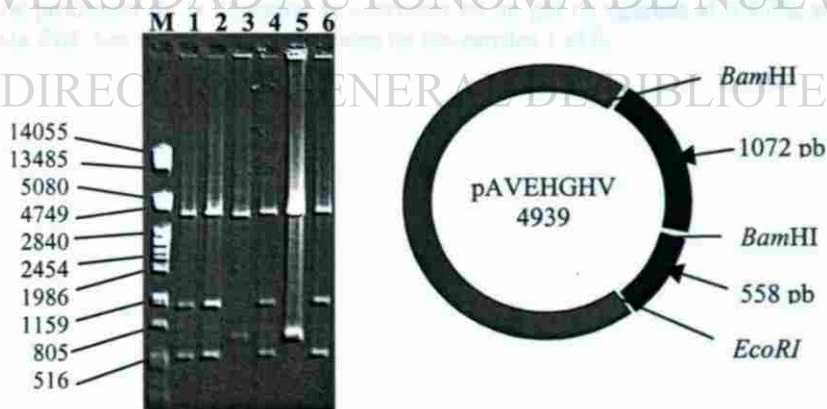


Figura 21. Digestión de las clonas con las enzimas *BamHI* y *EcoRI*. Las clonas se sometieron a esta digestión para liberar el inserto subclonado y así comprobar su identidad y tamaño. El inserto contiene 2 sitios *BamHI* y 1 sitio *EcoRI*, por lo que se generan tres fragmentos a partir de esta digestión, uno que es el vector de 3309 pb, y dos a partir de inserto, uno de 1072 pb y otro de 558 pb. Las digestiones se corrieron en un gel de agarosa al 0.85%. Las muestras corresponden del carril 1 al 6. En esta digestión observamos que las muestras de los carriles 3 y 5 no generan el patrón de restricción esperado.

Finalmente se utilizó una enzima de restricción diagnóstica, en este caso, *PvuII*, la cual genera dos fragmentos de restricción, uno de 1050 pb que se pertenece al inserto y otro de 3958 pb que corresponde al vector (ver figura 22).



Figura 22. Caracterización de las clonas pAVEHGHV. Las clonas se caracterizaron con la enzima de restricción *PvuII*, con lo que se esperaba la liberación de dos fragmentos, uno de 3958 pb y otro 981 pb. Los productos de la digestión se corrieron en un gel de agarosa al 0.85%, se utilizó el marcador Lambda *PstI*. Las muestras corresponden de los carriles 1 al 6.

DIRECCION GENERAL DE BIBLIOTECAS

4.5 Purificación a gran escala de las construcciones pAVEMaGHN, pAVEMaCGV, pAVECGHN, pAVEHGHV, pCMVSPORTBetagal y pBS.

La cuantificación de los DNAs purificados a gran escala, generó los resultados mostrados en la siguiente tabla:

Tabla 12. Resultados de la cuantificación de los productos purificados obtenidos mediante gran escala.

Plásmido	µg totales
PAVEMaGHN	131.92
PAVEMaGHV	154
PAVECGHN	305.34
PAVEHGHV	85.36
pAVEHGHN	396.12
PCMVSportBeta-Gal	507.26
pBS	394.32

4.6 Ensayo de diferenciación adipocítica.

El análisis del efecto adipogénico consistió de dos partes, el reconocimiento cualitativo del perfil de la formación de gránulos de grasa en las células diferenciadas, y la medición cuantitativa de la diferenciación adipocítica mediante el método del rojo oleoso O y la determinación de la glicerol 3-fosfato deshidrogenasa. Del análisis morfológico se obtuvieron los siguientes resultados:

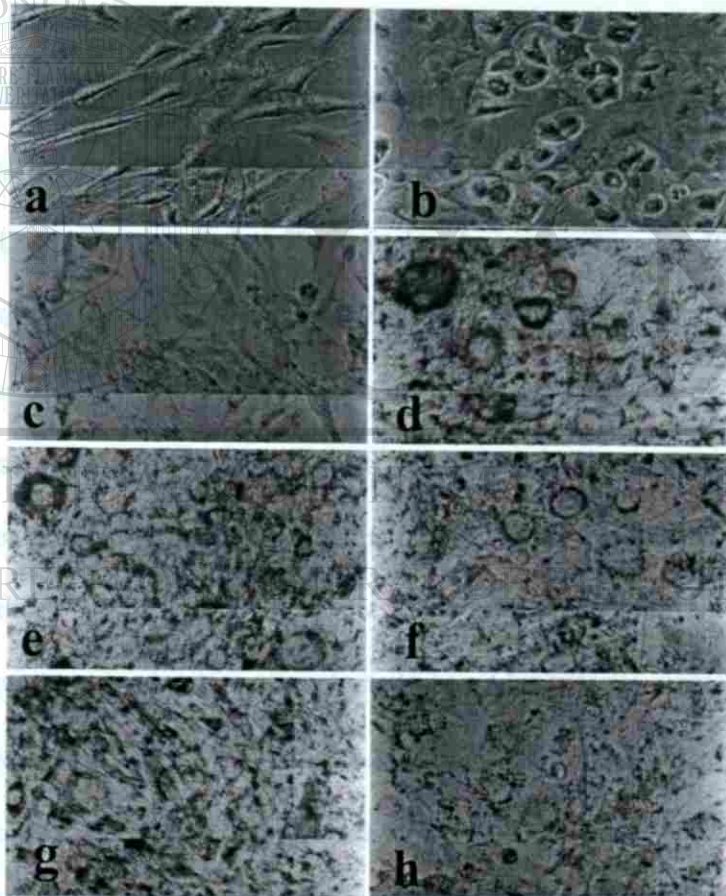


Figura 23. Fotografías de los cultivos celulares observados bajo un microscopio de luz visible. A) Fibroblastos 3T3 en condiciones no adipogénicas. B) Fibroblastos 3T3 después de 10 días de incubación en medio con 10% de SBF. C) Control negativo de transfección. D) Control positivo de transfección con pAVEHGHN. E) pAVEMaGHN. F) pAVEMaGHV. G) pAVECGHN y H) pAVEHGHV. Obsérvese la diferencia del perfil de formación de gránulos de grasa en células incubadas con y suero en comparación con las células transfectadas con las construcciones, mientras que con la exposición a suero los gránulos son mas grandes y no hay 100% de diferenciación, en las células expuestas a las construcciones los gránulos son pequeños, distribuidos por todo el citoplasma y se observa diferenciación en el 100% del campo.

En el inciso a de la figura 23, se muestra un cultivo celular de fibroblastos 3T3 en condiciones estándar de propagación no adipogénica, se observan células en monocapa, alargadas. El inciso b, se muestra un cultivo de células 3T3, que fueron incubadas a una concentración del 10% de suero bovino fatal, lo que ocasionó su diferenciación hacia adipocitos; se pueden observar las vacuolas de grasa, que ocupan la mayor parte del citoplasma. Sin embargo, también se puede notar que no hay 100% de diferenciación en el campo. El inciso c, muestra un cultivo de fibroblastos 3T3 que se utilizaron como control negativo de los experimentos de transfección, estos cultivos fueron mantenidos bajo condiciones no adipogénicas por el tiempo que duró el experimento, podemos observar que después de realizar la tinción con rojo oleoso O se alcanzan a notar vacuolas pequeñas de grasa en el citoplasma de las células. En el inciso d, se muestra el cultivo celular que se utilizó como control positivo, este cultivo fue transfectado con la construcción pAVEHGHN, se puede observar una gran cantidad de vacuolas de grasa, de forma granulada. A pesar que tanto positivo como negativo muestran diferenciación, es muy evidente el menor grado de diferenciación en ambos controles. En los incisos e al g, se muestran los cultivo problema, el inciso e, corresponde al cultivo transfectado con MaGHN; el f, corresponde al cultivo transfectado con MaGHV; el inciso g, corresponde al cultivo transfectado con CGHN; y el inciso h, corresponde a los cultivos transfectados con HGHV. Como se puede observar, la presencia de vacuolas de grasa en un patrón granulada se observa en todos estos cultivos, así como una diferenciación prácticamente del 100% de las células en el campo que se observa.

4.6.1 Cuantificación de los lípidos por el método del rojo oleoso.

4.6.2 Determinación de la actividad específica de la glicerol 3 fosfato dehidrogenasa.

Se llevó a cabo la fijación, tinción y extracción con isopropanol del rojo oleoso atrapado dentro de las vacuolas celulares y a estos extractos se les midió la absorbancia a 510 nm. Como se muestra en la figura 24, todos los genes incluidos en este estudio inducen a la acumulación de triacilglicéridos en las células transfectadas y los niveles de diferenciación no muestran diferencia significativa entre los genes probados y el gen de la HGH que se incluyó como control positivo, pero si hay diferencia significativa con el control negativo que fueron células no transfectadas.

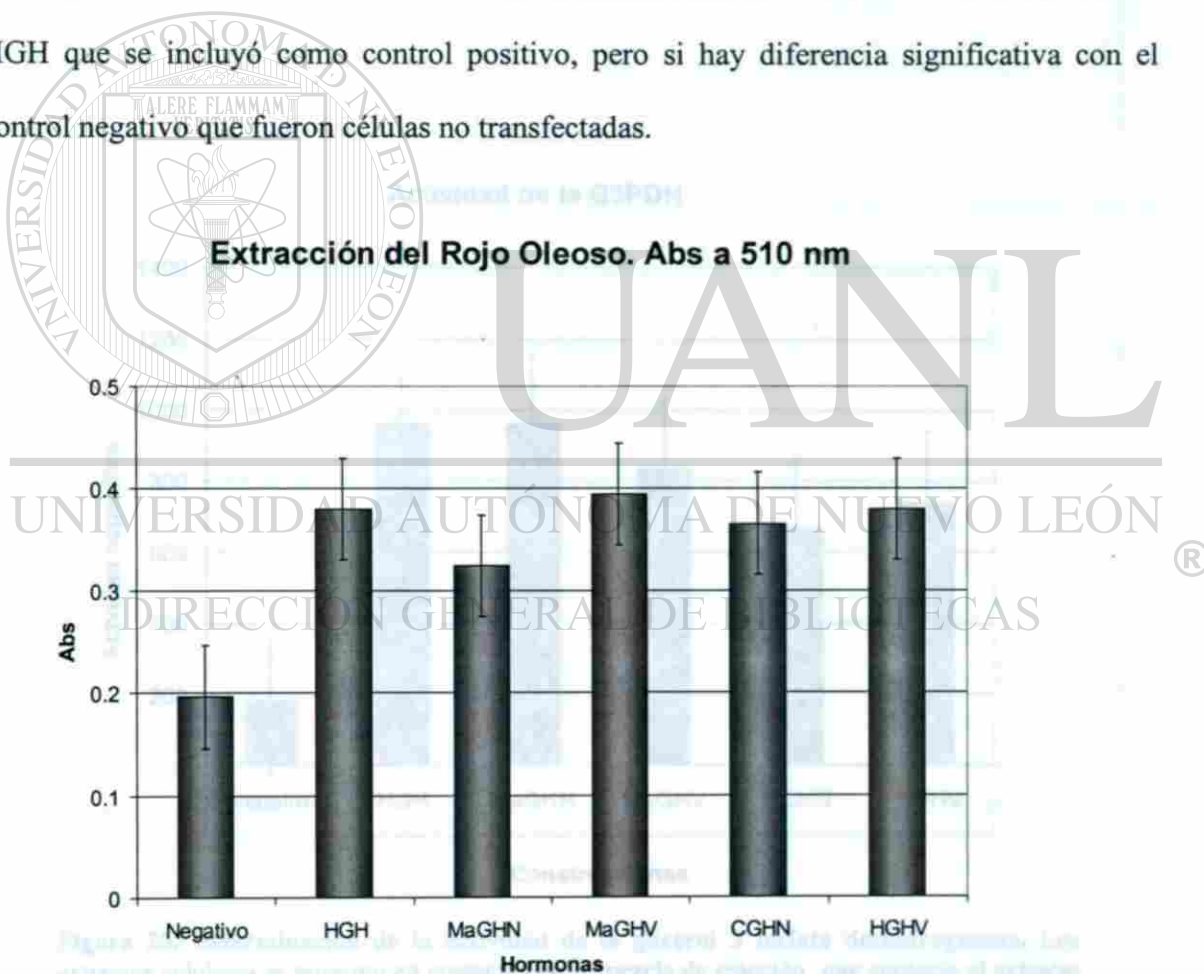


Figura 24. Resultados de la extracción con rojo oleoso O. Células 3T3 transfectadas con los diferentes plásmidos construidos fueron incubadas por 7 días y se tiñeron con rojo oleoso O, después se extrajo el colorante mediante dos extracciones de 500 μ l de isopropanol y se midió la absorbancia a 510 nm. Las barras representan el promedio de tres repeticiones.

4.6.2 Determinación de la actividad específica de la glicerol 3 fosfato deshidrogenasa.

La actividad se determinó midiendo la velocidad de oxidación del $\text{NADH}+\text{H}^+$ en extractos de proteínas totales obtenidos a partir de los cultivos celulares y normalizando las cantidades de proteínas con el método de Bradford. Los resultados se muestran en la figura 25.

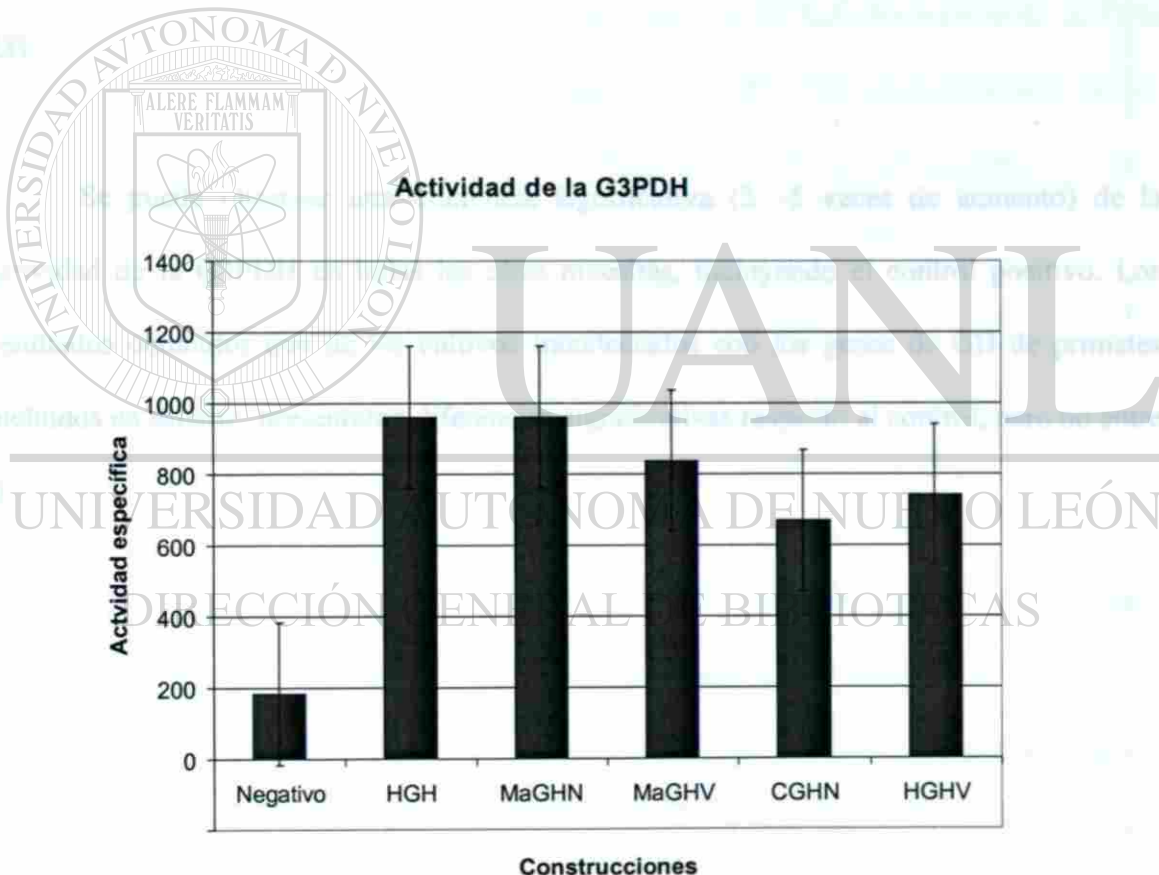


Figura 25. Determinación de la actividad de la glicerol 3 fosfato deshidrogenasa. Los extractos celulares se pusieron en contacto con la mezcla de reacción que contenía el extracto proteico a partir de las células 3T3 y el $\text{NADH}+\text{H}^+$ y se midió la degradación de éste a tiempo cero y 45 min después del tiempo cero.

Los controles negativo y positivo fueron cultivos sin transfectar y transfectados con la construcción pAVEHGHN, respectivamente. Una vez transcurrido el tiempo de incubación se lisaron y este lisado fue el que se utilizó para determinar la actividad específica de la enzima. En el control negativo observamos actividad de la enzima la cual puede considerarse como la actividad basal de la enzima en las células 3T3 en condiciones normales, y / ó a la actividad de las pocas células diferenciadas que se observaron (figura 23)

Se puede observar una diferencia significativa (3 -5 veces de aumento) de la actividad de la G3PDH en todas las otras muestras, incluyendo el control positivo. Los resultados obtenidos con de los cultivos transfectados con los genes de GH de primates incluidos en estudio, presentaron diferencias significativas respecto al control, pero no entre sí.

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

CAPÍTULO 5

DISCUSION

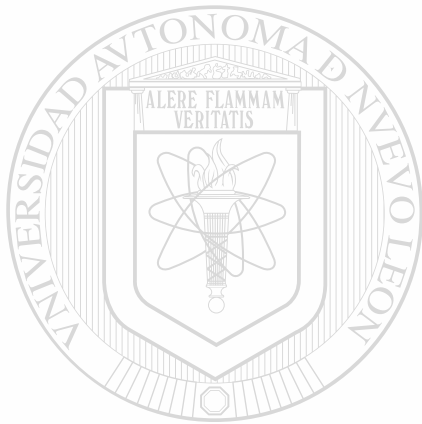
En el presente trabajo nos propusimos evaluar la actividad adipogénica de las GHs de los primates mono araña, chimpancé y humano. Para lograr esto, se subclonaron los genes normal y variante de la GH en el vector de expresión pAVE, el cual contiene el promotor de citomegalovirus, que es un promotor fuerte. Las construcciones se transfectaron en células 3T3 y se incubaron en condiciones no adipogénicas durante 7 días. La efectividad de nuestro modelo dependía de diversos pasos a lo largo del proceso. El primero era la transfección en sí, y lo que va acompañado de ésta, como la cantidad de plásmido que entra a la célula, la toxicidad del DNA sobre los cultivos y la capacidad de estos cultivos para recuperarse del procedimiento empleado. Una vez dentro, las construcciones debían expresarse, el transcrito primario ser procesado, después exportarlo al citoplasma, traducirse a proteína, la proteína sufrir los plegamientos tridimensionales correctos, transportarse dentro de la célula y exportación al medio externo. Finalmente la proteína debía alcanzar las concentraciones adecuadas para interactuar con el receptor de GH y que estas interacciones generaran señales suficientes para disparar los cambios necesarios en el metabolismo de la célula para que comenzara a diferenciarse.

El grado de diferenciación adipocítica fue medido mediante dos métodos diferentes, rojo oleoso O y actividad de la enzima glicerol 3-fosfato deshidrogenasa; y con 7 días de incubación. En las condiciones empleadas los resultados se correlacionaron, no encontramos diferencia significativa en el grado de diferenciación de las muestras frente al control positivo y de las muestras entre sí, aunque si encontramos diferencia entre el control positivo y las muestras con respecto al control negativo. Observamos que la técnica del rojo oleoso O es menos sensible para medir el grado de diferenciación, aunque si mostró ser de utilidad y además involucra menos pasos de manipulación de la muestra y por lo tanto menos error inherente al análisis. Por otro lado, la técnica de la glicerol 3-fosfato deshidrogenasa fue mucho mas sensible para detectar cambios relacionados a la adipogénesis (diferencias de actividad de la glicerol 3-fosfato deshidrogenasa) sin embargo, es una técnica mas compleja, por lo que el grado de error entre las muestras pudiera ser mayor.

Todas las construcciones estudiadas permitieron dirigir la síntesis de un hormona activa. Este resultado es de gran importancia ya que si bien se conoce la actividad biológica de la GH humana variante, no se conoce nada sobre la funcionalidad de las GHs del mono araña y del chimpancé.

Respecto a la similitud de actividades observadas de las diversas hormonas, podemos pensar en varias razones para que esto sucediera.

Una de ellas pudiera ser que el sistema de ensayo se hubiera saturado de GH debido al tiempo de incubación utilizado en el experimento y por lo tanto haya una respuesta mayor de la que se observaría normalmente, lo cual podría investigarse reduciendo el tiempo de incubación de las células con el medio definitivo disminuyendo la cantidad de DNA en los ensayos de transfección.



UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

CAPÍTULO 6

CONCLUSIONES

1. Todas las construcciones realizadas en este trabajo fueron funcionales ya que pudieron expresarse en los ensayos de transfección.
2. Los genes de hormonas del crecimiento que se estudiaron indujeron la diferenciación de los fibroblastos de células 3T3 en adipocitos sin embargo no hubo diferencia significativa entre los niveles de diferenciación inducidos por los genes investigados.
3. Tanto la técnica del rojo oleoso O como la cuantificación de la actividad de la G3FDH fueron adecuadas para medir la diferenciación adipocítica.

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

REFERENCIAS

- Baumann, G. 1991. Growth hormone heterogeneity: genes, isohormones, variants and binding proteins. *Endocrine Rev.*, 12:424-449
- Cab-Barrera E. L., Barrera-Saldaña H. A. 1988. Versatile plasmid vectors for use in studies of eukaryotic gene expression. *Gene*. Oct 30; 70 (2): 411-3.
- Campbell, G. S., Christian, L. J. y Carter-Su, C. 1993. Evidence of involvement of the growth hormone receptor associated tyrosine kinase in actions of growth hormone. *J. Biol. Chem.*, 268:7427-7434.
- Czech, M. P. 1989. Signal transmission by the insulin-like growth factors. *Cell*. 59:235-238.
- Daughaday, W.H., y Rotwein, P. 1989. Insulin-like growth factors I and II. Peptide, messenger ribonucleic acid gene structures, serum and tissue concentrations. *Endocrine Rev.* 10:68-91.
- Davidson, M. B. 1987. Effect of the growth hormone on carbohydrate and lipid metabolism. *Endocrine Rev.*, 8:115-131.
- De Vos, M. A., Ultsch, M. Somers, W., Kossiakoff, A. A. 1994. The X ray structure of a Growth hormone-prolactin receptor complex.
- Frasier S. D. 1983. Human pituitary growth hormone (hGH) therapy in growth hormone deficiency. *Endocrine Rev.* 4:155-170.
- Froesch, E. R., Schmid, C., Schwander, J., y Zapf, J. 1986. Actions of insulin like growth factors. *Annu. Rev. Physiol.* 48:569-591.
- Gamou, S., Shimizu, Y., Shimizu, N. 1989. Adipocytes. Chapter 18. *Animal Cell Culture. Methods in Molecular Biology*. Vol. 5.
- Granner, D. K. 1997. Hormonas de hipófisis e hipotálamo. En: *Bioquímica de Harper*.
- Green, H., Kehinde, O. 1974. Sublines of mouse 3T3 cells that accumulate lipid. *Cell* 1, 113-116.
- Green, H., Morikawa, M. y Nixon, T. 1985. A dual effector theory of Growth-hormone action. *Differentiation*. 29, 195-198.

Juárez-Aguilar, E., Castro -Muñozledo, F. 1995. 22kDa and 20kDa isoforms show differential effects when assayed in 3T3-F44A4 and 3T3-F442A/CA adipocytes. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **217**, 1; 2833

Kelly, P. A., Djiane, J., Postel-Vinay, M. C., y Edery, M. 1991. The prolactin/growth hormone receptor family. *Endocrine Rev.*, **12**:235-251.

Kuri-Harcuch, W., Green, H. 1978. Adipose conversion of 3T3 cells depends on a serum factor. *Proc Natl Acad Sci U S A.* Dec; **75**(12): 6107-9.

Leung, D. W., Spencer, S. S., Cachianes, G., Hammonds, R. G., Collins, C., Henzel, W. J., Barnard, R., Walters, M. J., y Wood, W. I. 1987. Growth Hormone receptor and serum binding protein: purification, cloning and expression. *Nature*, **330**:537-543.

Mathews, L. 1991. Molecular Biology of the growth hormone receptors. *Trends Endocrinol Metab.*, **2**:176-180.

Rud, T. B. 1991. Growth, growth hormone and the somatomedins: a historical perspective and current concepts. *Ann. Clin. Biochem.* **28**: 542-555.

Nixon, T., Green, H. 1984. Contribution of growth hormone to the adipogenic activity of serum. *Endocrinology.* Feb; **114**(2): 527-32.

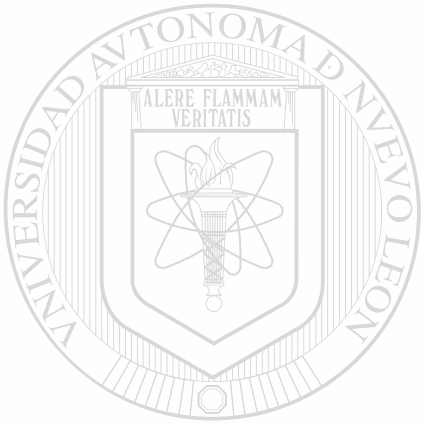
Russel, A., Brent, R., Kingston, R. E., Moore, D. D., Seidman, J. G., Smith, J. A., Struhl, K. 1995. *Short Protocols in Molecular Biology*.

Sambrook, J., Fritsch, E. F., Maniatis, T. 1989. *Molecular Cloning, a laboratory manual*. Second edition. Cold Spring Harbor Laboratory Press.

Schwartz, J. 1984. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **125**, 237-243.

Ulrich et al., 1986. Insulin-like growth factor I receptor primary structure: comparison with the insulin receptor suggest structural determinants that define functional specificity. *EMBO J.* **5**: 2503-2512.

Wallis, M. 1980. Biological characterization of purified native 20kDa human growth hormone. *Nature.* **284**:512



UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN



DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS



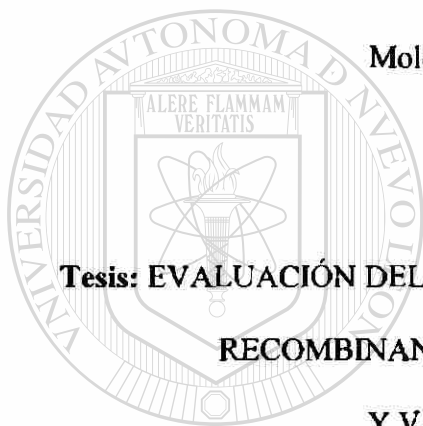
RESUMEN AUTOBIOGRÁFICO

Virgilio Bocanegra García

Candidato para el grado de

Maestro en Ciencias con Especialidad en Biología

Molecular e Ingeniería Genética



**Tesis: EVALUACIÓN DEL EFECTO ADIPOGÉNICO DE LAS HORMONAS
RECOMBINANTES DEL CRECIMIENTO NORMAL
Y VARIANTE DE PRIMATES.**

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

Campo de estudio: Biología Molecular

DIRECCION GENERAL DE BIBLIOTECAS



Biografía:

Datos personales: nacido en Valle Hermoso, Tamaulipas, el 28 de agosto de 1976.

Educación:

Egresado de la Universidad Autónoma de Tamaulipas, grado obtenido Licenciado en Químico Farmacéutico Biólogo el 14 de septiembre de 1998.

