



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE QUERÉTARO

FACULTAD DE QUÍMICA

**“PRODUCCIÓN DE HORMONA DE CRECIMIENTO (GH)
RECOMBINANTE DE IGUANA VERDE (*Iguana iguana*)”**

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

INGENIERO EN BIOTECNOLOGÍA

PRESENTA

LILIANA GÓMEZ PACHECO

DIRIGIDA POR

Dr. CARLOS ARÁMBURO DE LA HOZ

SANTIAGO DE QUERÉTARO, QUERÉTARO, 2019.



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE QUERÉTARO

FACULTAD DE QUÍMICA

**“PRODUCCIÓN DE HORMONA DE CRECIMIENTO (GH)
RECOMBINANTE DE IGUANA VERDE (*Iguana iguana*)”**

TESIS

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
INGENIERO EN BIOTECNOLOGÍA**

PRESENTA

LILIANA GÓMEZ PACHECO

DIRIGIDA POR

Dr. CARLOS ARÁMBURO DE LA HOZ

SINODALES

**Dr. CARLOS ARÁMBURO DE LA HOZ
DIRECTOR**

**Dra. LAURA CRISTINA BERUMEN SEGURA
SINODAL**

**Dra. MINERVA RAMOS GÓMEZ
SINODAL**

**M. en C. MARTHA ELIZABETH CARRANZA SALAS
SINODAL**

ÍNDICE GENERAL

Contenido	Página
ÍNDICE GENERAL	i
ÍNDICE DE CUADROS	iii
ÍNDICE DE FIGURAS	iv
RESUMEN	
1. ANTECEDENTES	1
1.1 Generalidades de la hormona de crecimiento	1
1.2. Fisiología de la hormona del crecimiento	3
1.3 Expresión de GH en tejidos extrahipofisarios	5
1.4 La hormona del crecimiento en reptiles	7
1.5 Iguana verde	10
1.6 Proteínas recombinantes	11
1.7 Vector de expresión pCAG	14
1.8 Línea celular derivada de neuroretinas de codorniz (QNR/D)	15
2. HIPÓTESIS	16
3. OBJETIVOS	17
3.1 General	17
3.2 Específicos	17
4. METODOLOGÍA	18
4.1 Materiales	18
4.1.1 Animales	18
4.2 Métodos	18
4.2.1 Extracción de ARN total	18
4.2.2 Reacción en cadena de la polimerasa acoplada a transcriptasa reversa (RT-PCR)	18
4.2.4 Clonación molecular	20
4.2.5 Miniprep	20
4.2.6 Restricción enzimática	20

4.2.7 Subclonación molecular en vector pCAG	21
4.2.8 Transfección en células QNR/D	21
4.2.9 Western Blot	22
4.2.10 Cuantificación de rgiGH	23
4.2.12 Análisis estadístico	24
5. RESULTADOS	25
6. DISCUSIÓN	35
7. CONCLUSIONES	41
8. REFERENCIAS	42

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro		Página
1	Sistemas de expresión para producir GH recombinante.	12
2	Secuencia de oligonucleótidos empleados para amplificar giGH y la adición de sitios de restricción para su respectivo vector	19
3	Porcentaje de similitud que existe entre las secuencias alineadas utilizando el algoritmo Clustal Omega	30

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura		Página
1	Estructura de aminoácidos que conforman a la hormona de crecimiento humana (hGH)	1
2	Esquema representativo de las diversas funciones que realiza GH en el organismo	5
3	Secuencia de nucleótidos y aminoácidos deducidos de la GH de iguana verde	8
4	Diagrama del vector pCAG	15
5	Producto amplificado por PCR	25
6	Análisis de restricción enzimática de los vectores pGEM-giGH y pCAG-giGH	26
7	Análisis de pGEM-giGH	27
8	Análisis de pCAG-giGH	28
9	Alineamiento de las secuencias de los plásmidos pGEM-giGH y pCAG-giGH comparadas con la secuencia de la región codificante de la hormona de crecimiento de iguana (giGH) utilizando el algoritmo Clustal Omega	29
10	Determinación de la eficiencia de la transfección	31
11	Análisis de la producción de rgiGH	32
12	Cuantificación de medios que expresan rgiGH mediante ELISA indirecto	33
13	Análisis de la proliferación celular de la línea Nb2 inducida al aplicar diferentes tratamientos, mediante MTT	34

RESUMEN

La hormona de crecimiento (GH) es una proteína sintetizada y secretada en la hipófisis, que promueve el desarrollo y crecimiento, además de otras importantes funciones metabólicas, en todos los vertebrados. Sin embargo, en reptiles se sabe poco sobre las funciones que regula la GH; por ello es necesario desarrollar herramientas para estudiar la fisiología de la GH en estos organismos. Este trabajo tuvo por objetivo desarrollar un sistema *in vitro* de expresión constitutiva de GH recombinante de iguana verde (rgiGH), así como también de evaluar su bioactividad. Se amplificó el ARNm de GH hipofisiaria de iguana (giGH), para subclonarse en un vector de expresión constitutivo (pCAG) y posteriormente se transfectó en una línea celular inmortalizada proveniente de neurorretinas de codorniz (QNR/D). El medio de cultivo se recolectó a las 24 y 48 h post-transfección y se analizó por Western Blot utilizando un anticuerpo contra GH de pollo (cGH). Los resultados mostraron una banda inmunorreactiva de 26 kDa (en condiciones reductoras), indicando la presencia de rgiGH, similar al control positivo (rcGH). Los medios con rgiGH demostraron ser bioactivos al incrementar, significativamente, la proliferación en la línea celular Nb2 en comparación con el grupo sin tratar. Los resultados indican que la línea celular QNR/D fue capaz de producir rgiGH. Es necesario purificar a la rgiGH para realizar otros bioensayos. Se desarrolló un proceso que permite producir cantidades importantes de rgiGH, la cual podría utilizarse para el control del crecimiento y desarrollo de la iguana verde con un interés pecuario.

1. ANTECEDENTES

1.1 Generalidades de la hormona de crecimiento

La hormona de crecimiento (GH) es una proteína conformada por 191 aminoácidos, con un peso molecular de aproximadamente 22 kDa, que presenta dos puentes disulfuro en las posiciones 53-165 y 182-189 (Figura 1) (Herman-Bonert, 2011). La estructura secundaria de la GH, determinada mediante cristalografía de rayos X, consta de 4 α -hélices antiparalelas. La hormona es sintetizada y secretada por células somatotropas ubicadas en el lóbulo anterior de la hipófisis (Frohman, 2009). Se sabe que la hormona del crecimiento es producida en todos los grupos de vertebrados, v.gr. en humano (Tanner, 1972), en pollo (Arámburo y col., 1989), en tortuga (Yasuda y col., 1989), en rana (Hayashida y col., 1973) y en tilapia (Ber y Daniel, 1992). Si bien existen diferencias particulares en la secuencia de aminoácidos de la GH entre las diversas especies, la estructura terciaria de la proteína mantiene sus características generales en todos los vertebrados.

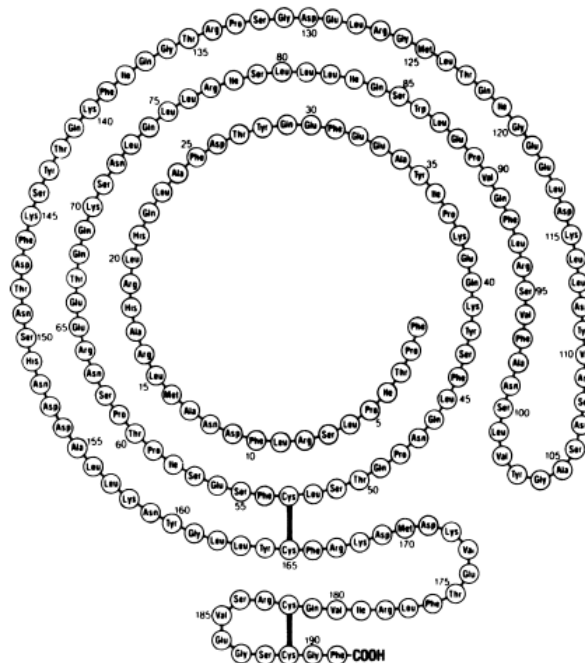


Figura 1. Estructura de aminoácidos que conforman a la hormona de crecimiento humana (hGH), una cadena lineal de 191 con dos puentes disulfuro intramoleculares (Herman-Bonert, 2011).

En la mayoría de los vertebrados, el gen de la GH cuenta con 5 exones divididos por 4 intrones; sin embargo, en el grupo de los teleósteos consta de 6 exones y 5 intrones. La longitud de dicho gen es de aproximadamente 2 kb en mamíferos, aunque es más extensa en el grupo de los peces que en los demás vertebrados, pudiendo llegar a 3 y 5 kb, e inclusive, en el caso de la piraña de vientre rojo, llega a 12 kb (Mazurowski y col., 2015; Liang y col., 2018). A pesar de las diferencias existentes en la estructura del gen de GH entre los grupos de vertebrados, el gen es transcrito en un ARNm precursor que posteriormente se convierte en un ARNm maduro de aproximadamente 650 pb, para ser luego traducido a una proteína precursora que, después de ser procesada proteolíticamente, da origen a la hormona madura de alrededor de 191 aa en distintas especies (Ávila-Mendoza y col., 2014).

A pesar de que la forma más común de la GH es su isoforma de 22 kDa, se sabe que la GH está compuesta de una familia de proteínas de diferentes isoformas y variantes, que son producidas por diversos mecanismos. El splicing alternativo del ARNm de la GH produce una variante de 20 kDa, la cual representa el 10% de la GH circulante (Tong y col., 2012). A través de las modificaciones postraduccionales como la glicosilación se genera la GH glicosilada de 26 kDa, la cual ha sido caracterizada en el pollo (Berumen y col., 2004). Otra variante que es generada mediante proteólisis es el fragmento de 15 kDa, el cual solo es observado al someter en condiciones reductoras a la variante de 22 kDa; en un estudio previo, se generó el fragmento de 15 kDa *in vitro* al tratar a rcGH con trombina, la cual tiene actividad angiogénica (Arámburo y col., 2001). La GH de 22 kDa puede formar tanto oligómeros como dímeros, trímeros, tetrámeros o pentámeros, de los cuales la mayoría están unidas por puentes disulfuro (Arámburo y col., 2000).

La regulación de la expresión y la secreción de GH es controlada, principalmente, por dos neuropéptidos hipotalámicos: la hormona liberadora de la hormona del crecimiento (GHRH) y la somatostatina (SST). La GHRH estimula tanto la síntesis como la liberación de GH, mientras que la SST tiene fundamentalmente una acción inhibitoria sobre la liberación de GH (Jameson y col., 2015) y en algunas especies también sobre su síntesis (Yada y Tetsuya, 1992). Adicionalmente, otros péptidos

participan en la compleja regulación de la expresión de GH hipofisiaria. La ghrelina es un secretagogo de GH sintetizado en el estómago que actúa a través del receptor de secretagogos de la hormona del crecimiento (GHS-R), el cual es un receptor acoplado a proteína G (Yin y col., 2014). La GHRH y ghrelina tienen un efecto sinérgico al aumentar la concentración de GH circulante (Khatib y col., 2014). El factor de crecimiento insulínico tipo I (IGF-I) tiene un efecto negativo sobre la secreción de GH; se ha demostrado que en tratamientos *in vivo* con IGF-I en truchas, se suprimió la secreción de GH (Canosa y col., 2007). La hormona liberadora de tirotrópina (TRH) es un tripéptido sintetizado en las neuronas del área hipotalámica del núcleo paraventricular y tiene una acción estimuladora en la liberación de GH en las células somatotropas de todos los grupos de vertebrados (Gahete y col., 2009). La hormona liberadora de gonadotropina (GnRH) es producida por neuronas del hipotálamo; en estudios realizados en peces se ha mostrado que tiene un efecto en la liberación de GH, así como también en su síntesis (Li y col., 2002).

Cerca del 50% de la GH circulante se encuentra unida a una proteína de unión (GHBP), esta proteína corresponde al dominio extracelular del receptor de GH (GHR) producida mediante proteólisis del receptor (Frystyk y col., 2008). La GHBP ayuda a prolongar la vida media de GH cuando se encuentra en circulación, también inhibe la unión GH-GHR ya que compite con GH por la unión al ligando (Herman-Bonert, 2011).

Las acciones de la GH a nivel celular están mediadas por su receptor. El receptor de la GH (GHR) pertenece a la familia de clase I de receptores de citocinas. Los receptores de esta familia tienen varias características en común: un dominio extracelular involucrado en la unión al ligando, una porción transmembranal y un dominio intracelular (Harvey y col., 2014).

1.2. Fisiología de la hormona del crecimiento

La hormona del crecimiento ejerce una amplia gama de acciones biológicas, tanto de forma directa como indirecta, en un número considerable de tejidos blanco, las cuales promueven, entre otras, la diferenciación y la proliferación celular, lo que lleva

a un aumento en el crecimiento de los tejidos blandos y esqueléticos (Figura 2). Adicionalmente, también tiene un papel importante dentro del metabolismo de proteínas, lípidos, carbohidratos y ácidos nucleicos, así como en la regulación hidromineral (Frohman, 2009).

La GH promueve efectos de crecimiento a través del factor de crecimiento insulínico tipo I (IGF-I); al unirse a sus receptores estimula la síntesis y secreción de IGF-I en el hígado y en otros órganos. A su vez, el IGF-I tiene efectos sobre el crecimiento y diferenciación celular en una gran variedad de tejidos mediante receptores a IGF-I (Bergan-Roller y Sheridan, 2017).

En el caso del metabolismo de lípidos, la GH es capaz de estimular la lipólisis en tejido adiposo e incrementa los niveles de ácidos grasos libres en la sangre. Además, la GH influye en la diferenciación de pequeños pre-adipocitos en adipocitos maduros, los cuales incrementan la capacidad de almacenar triglicéridos y tienen un mayor potencial lipolítico (Herman-Bonert, 2011). Bajo ciertas condiciones, sin embargo, también puede presentar un efecto anti-lipolítico (Arámburo y col., 1990).

La GH es una hormona anabólica, aumenta la síntesis de proteínas, ocasionando un incremento en la retención de nitrógeno en el músculo, lo cual repercute en el crecimiento del tejido muscular (Lieberman y Marks, 2012). Asimismo, la GH aumenta la concentración de glucosa en la circulación y disminuye el consumo de glucosa en el tejido adiposo; estos efectos se deben a que la GH antagoniza los efectos de la insulina (Fanjul y col., 1998). En conjunto, la insulina, GH e IGF-I tienen un papel importante en la regulación de crecimiento y la función de las células β del páncreas. La resistencia a la insulina es superada en cierto grado, al incrementar la secreción de insulina, lo que lleva a una hiperplasia de las células β . Las células β expresan GHR, sin embargo, no se conocen totalmente los efectos directos de GH en las células. En reportes previos se ha mostrado que GH estimula la expresión, biosíntesis y liberación de la insulina en las células β . Se ha demostrado que la delección de GHR en ratones provocó una disminución en la proliferación de células β , teniendo como consecuencia una ausencia de hiperplasia compensatoria en respuesta a la obesidad producida en los animales (Wu y col., 2011; Sperling, 2015).

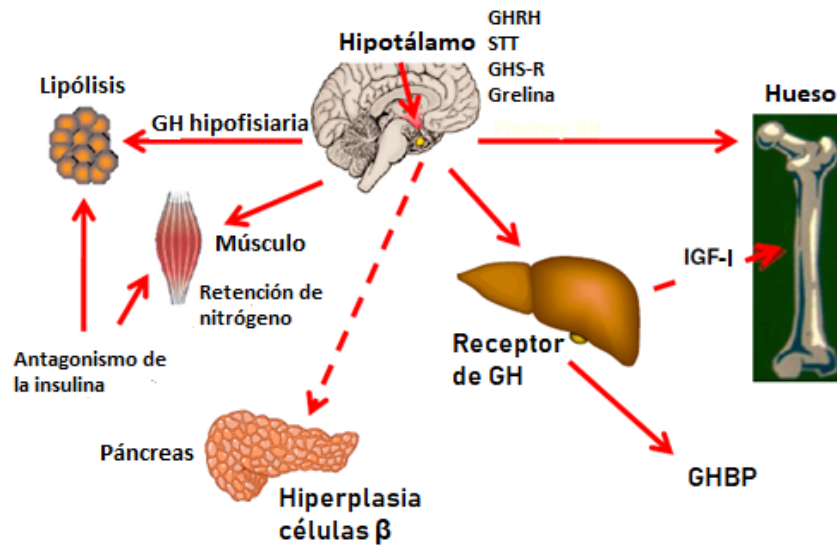


Figura 2. Esquema representativo de las diversas acciones que GH efectúa en el organismo (Sperling, 2015).

La GH tiene diversas acciones en el sistema inmunitario: promueve el desarrollo de linfocitos B y T, modula la producción de citocinas, entre otras; estas acciones pueden ser mediante un efecto directo o indirecto a través de la producción de IGF-I (Hattori, 2009). En el sistema reproductor la GH modula la secreción de gonadotropina la cual ejerce acciones en las funciones de las gónadas como la esteroidogénesis y la gametogénesis (Hull y Harvey, 2014). Además, en estudios previos se ha observado que después de tratamientos con GH en modelos de ratón con esclerosis lateral amiotrófica, la GH tiene efectos neuroprotectores probablemente al promover la supervivencia neuronal a través de sus propiedades antiapoptóticas (Chung y col., 2015).

1.3 Expresión de GH en tejidos extrahipofisarios

La GH se expresa mayoritariamente en la hipófisis y es liberada al torrente sanguíneo; sin embargo, recientemente se ha demostrado que GH también se expresa localmente en diversos tejidos. La expresión de la hormona en diversos sitios refleja el hecho de que todas las células poseen el potencial de expresar cualquier gen que se encuentre presente en el genoma (Harvey y col., 2012), aunque para ello deben existir mecanismos específicos de regulación. En diversos

organismos se ha encontrado que tanto la GH como su receptor (GHR) se expresan en el sistema inmunitario (Luna y col., 2008), en el sistema nervioso (Arámburo y col., 2014; Harvey y col., 2016) y en el aparato reproductor (Luna y col., 2014), entre otros. Esto ha demostrado que la expresión extrahipofisiaria de GH y la co-localización de GHR pueden estar involucrados en mecanismos de regulación paracrina o autocrina. A manera de ejemplo, se ha descrito que en el sistema nervioso del pollo se expresa el gen de GH en varias estructuras, incluido el cerebelo, y que su secuencia es idéntica a la expresada en la hipófisis. En el cerebelo se encontró, en, que la GH se expresaba mayoritariamente en las células de Purkinje y en células de la capa granular (Alba-Betancourt y col., 2011).

En el sistema reproductor se ha descrito que la GH se expresa en las gónadas, tanto en machos (Harvey y col., 2004; Luna y col., 2004) como en hembras (Ahumada-Solórzano y col., 2012). Tanto la GH como su receptor están presentes en los testículos de pollo, principalmente en el núcleo de las células germinales (espermatogonia, espermatoцитos y espermátidas); la co-localización de GH junto con el antígeno nuclear de células en proliferación (PCNA) sugiere que está involucrada en mecanismos de proliferación y diferenciación celular durante el proceso de espermatogénesis (Martínez-Moreno y col., 2011). También se ha mostrado que en el folículo ovárico de gallinas se expresan tanto el ARNm de GH y GHR, como sus productos proteínicos, principalmente en las células de la granulosa; y se describió que el ADNc de GH en estas células es idéntico al de la hipófisis (Ahumada-Solórzano y col., 2012). Por otra parte, se obtuvo evidencia de que la GH fue capaz de estimular la producción de progesterona en cultivos primarios de células de la granulosa (Ahumada-Solórzano y col., 2012).

En el sistema inmunitario de aves se ha descrito la expresión de GH en la bolsa de Fabricio, el timo y el bazo (Luna y col., 2005; Luna y col., 2008; Rodríguez-Méndez y col., 2010). Se ha sugerido que la GH que se produce en la bolsa de Fabricio participa en la diferenciación y maduración de linfocitos B, mediante mecanismos paracrinicos o autocrinicos, en la corteza de la bolsa de Fabricio (Luna y col., 2013).

Asimismo, la GH tiene efectos anti-apoptóticos directos en linfocitos B (Luna-Acosta y col., 2015).

Por otra parte, también se mostró que la GH se expresa en varias estructuras oculares (Harvey y col., 2016). En la retina del embrión de pollo, se observó que la GH producida en las células ganglionares de la retina (RGC) promueve la sobrevivencia de las RGCs durante los períodos de apoptosis que repercuten a las células durante el proceso de proliferación para el establecimiento de una retina madura; esto se concluyó al observar que la inmunoneutralización de GH en cultivos celulares de RGCs provocó un aumento en el nivel de muerte celular (Sanders y col., 2005). Asimismo, se ha mostrado que la GH tiene efectos neuroprotectores que previenen el daño excitotóxico inducido por ácido kaínico en la retina, tanto en aves como en reptiles (Ávila-Mendoza y col., 2016a; Martínez-Moreno y col., 2016; Fleming y col., 2018; Martínez-Moreno y col., 2018).

1.4 La hormona del crecimiento en reptiles

Como se mencionó previamente, la GH es producida en todos los grupos de vertebrados; sin embargo, en los reptiles ha sido poco estudiada. Hasta hace unos pocos años, sólo se conocía la secuencia de GH de la tortuga marina y del cocodrilo de Nueva Guinea; en los dos organismos, está compuesta por 191 aminoácidos (Yasuda y col., 1989; Noso y col., 1995).

Recientemente se caracterizaron tanto la GH hipofisiaria de iguana verde (giGH) como su receptor (GHR) (Ávila-Mendoza y col., 2014). El peso molecular de la isoforma principal de giGH fue de 22 kDa; también se detectaron 2 isoformas adicionales: el dímero de 44 kDa y el tetrámero de 88 kDa. El ADNc de giGH en hipófisis (1015 bp) codifica a una pre-hormona de 218 aminoácidos, de los cuales 191 representan a la proteína madura y 28 al péptido señal, como se observa en la Figura 3, los números de la derecha indican la posición del nucleótido y los números de la izquierda se refieren a la posición del aminoácido; las regiones funcionales son: el codón de inicio ATG en la posición 1 (caja blanca), el codón de paro TGA en la posición 655 (se muestra con un guión). Los oligonucleótidos 3' RACE y 5' RACE se

indican en letras cursivas y negritas. El péptido señal de 28 aa está subrayado, el sitio de poliadenilación en letras mayúsculas y un posible sitio de glicosilación en un rectángulo gris (Ávila-Mendoza y col., 2014).

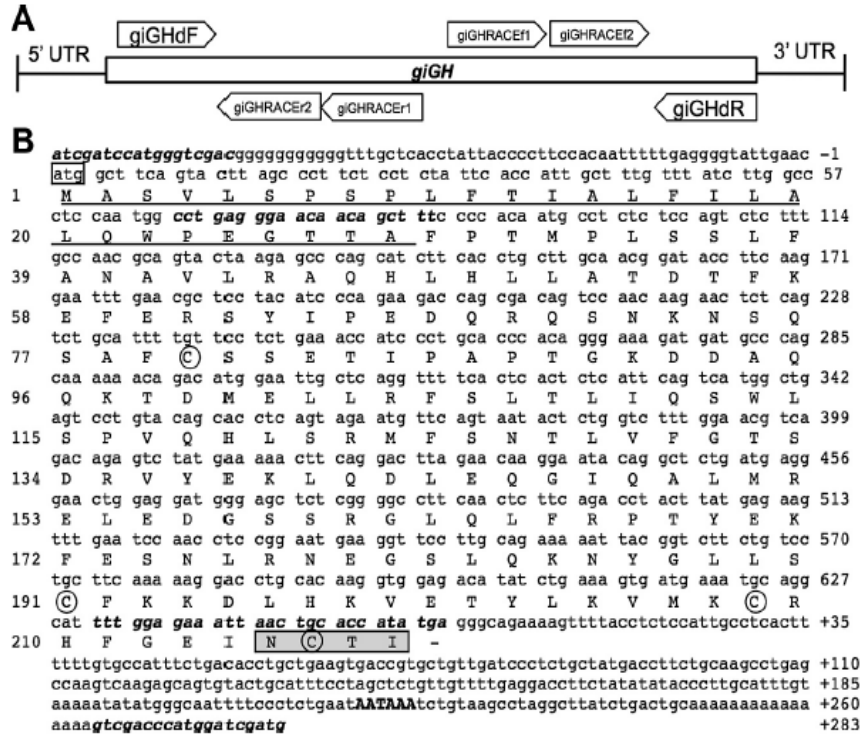


Figura 3. Secuencia de nucleótidos y aminoácidos de la GH de iguana verde. La secuencia obtenida del ADNc fue de 1015 pb de longitud (Ávila-Mendoza y col., 2014).

Aunque la región codificante permaneció razonablemente conservada, la región no codificante de la hormona tuvo variaciones importantes en comparación con la GH de pollo y del tiburón mielga. La estructura primaria de la giGH madura tuvo un 82.1%, 83.2% y un 92.6% de homología en comparación con las de cocodrilo, tortuga y anolis, respectivamente. Mientras que, en otros vertebrados, mostró un 82.1%, 74.2%, 66.3%, 55.2% y 42.3% de homología en pollo, rata, rana, humano y pez cebra, respectivamente.

El ADNc de giGHR fue parcialmente secuenciado, se obtuvo una secuencia de 1065 bp, que codifica para los últimos 547 aminoácidos de la proteína madura; la proteína contiene una porción del dominio extracelular de 166 aminoácidos, un dominio

transmembranal de 23 aminoácidos y un dominio intracelular de 353 aminoácidos (Ávila-Mendoza y col., 2014).

También se encontró que la GH se expresa en diversas estructuras que componen el ojo de la iguana, identificándose dos isoformas: su forma monomérica (26 kDa, en SDS-PAGE, bajo condiciones reductoras) en la córnea, esclera y retina; y una isoforma sub-monomérica de alrededor de 15 kDa, ubicada en la córnea, esclera, iris, vítreo, retina y cristalino (Ávila-Mendoza y col., 2016a).

Por otra parte, en un experimento donde se añadió ácido kainico a la retina de la iguana provocando daño excitotóxico, y se observó que la adición de hormona del crecimiento recombinante de pollo (rcGH) provocaba una reversión en el número de células apoptóticas inducidas por el daño, lo que indica que la GH tiene un efecto neuroprotector, de manera directa o mediada por IGF-I, en neuroretina (Ávila-Mendoza y col., 2016a).

Se conoce que en los reptiles, que son organismos ectotérmicos, la temperatura ambiental ejerce una regulación muy importante sobre la activación de su metabolismo. En la iguana se estudió el efecto de los cambios en la temperatura ambiental sobre los componentes del eje somatotrópico y el eje tiroideo, dado que participan de manera dinámica en diversas actividades metabólicas. Se encontró que cuando las iguanas se sometieron a una disminución en la temperatura ambiental (25 y 18 °C), se indujo un aumento significativo en la síntesis y secreción de GH e IGF-I, mientras que las hormonas tiroideas (T4 y T3) disminuyeron, en comparación al grupo control que se mantuvo en la temperatura óptima (35 °C). También se observó una baja en la regulación del metabolismo, disminuyeron los niveles de glucosa y de ácidos grasos en el suero. Por lo tanto, hubo una respuesta diferencial de los ejes somatotrópico y tiroideo cuando la temperatura ambiental está por debajo de la óptima, lo que sugiere que la GH podría tener un papel importante en mecanismos de adaptación. Las respuestas observadas en estos reptiles fueron diferentes a las reportadas en organismos endotermos (Ávila-Mendoza y col., 2016b).

Por otra parte, también se han caracterizado, en la iguana verde, a los neuropéptidos hipotalámicos involucrados en la regulación de la expresión y secreción de la *gh*GH hipofisiaria, tales como: GHRH, PACAP, STT; así como también al IGF-I (Ávila-Mendoza y col., 2018). Asimismo, se estudiaron las similitudes estructurales de estas moléculas a lo largo de la escala filogenética, encontrándose que, en general, los componentes del eje somatotrópico mantienen una alta conservación de sus secuencias activas en los diversos grupos de vertebrados.

El estudio de la GH, así como también los mecanismos de su síntesis y liberación en reptiles, permite determinar desde un enfoque comparativo, el grado de conservación o divergencia de estos mecanismos a lo largo de la filogenia.

1.5 Iguana verde

La iguana verde (*Iguana iguana*) es un reptil del orden *Squamata*. En su estado adulto puede llegar a pesar de 4 a 8 kilos y medir hasta 2 metros del hocico hasta la punta de la cola (Millefanti, 2016). La iguana verde se encuentra en el Sureste de México, a lo largo de América Central, en Sudamérica hasta Paraguay y el Sureste de Brasil y en islas del Caribe (Arcos-García y col., 2010). Tiene importancia en el ámbito biológico, pecuario y económico. Los reptiles han sido estudiados en cuanto a la evolución de los amniotas, por ello la iguana verde es un modelo ideal (Elinson y col., 2014). La iguana verde es comercializada como mascota, como una fuente de alimento (en ciertas regiones se consume su carne y huevos), o para manufacturar diversos productos con su piel, por estas razones han sido víctimas de la caza, además de que han sufrido la modificación y destrucción de su hábitat; por lo cual ha disminuido la población de esta especie (Muñoz y col., 2003).

Actualmente en México, la iguana verde es una especie sujeta a protección especial gracias a la Norma Oficial Mexicana NOM-059-ECOL-2010. Con el propósito de proteger a esta especie se han implementado Unidades de Manejo para la Conservación de la Vida Silvestre (UMA). Debido a la demanda del consumo de iguanas, se han implementado granjas para la crianza del animal en México y en Centroamérica (Stephen y col., 2012).

El crecimiento de las iguanas es muy lento, a los 5 años pueden llegar a pesar 3 kilos, aunque se ha reportado que pueden llegar a los 3 kilos en 3 años (Arcos-García y col., 2002; Millefanti, 2016). La iguana verde alcanza su talla comercial en 3 años; mientras que, en comparación, un pollo alcanza los 3 kilos en 4 meses (Scherf, 2000).

Aún se conoce muy poco de la fisiología de la iguana verde, sobre todo de los mecanismos que podrían estar involucrados en el desarrollo y crecimiento del reptil. Por ello, la generación de algunas herramientas biotecnológicas permitirían indagar en el estudio de la fisiología de reptiles, así como también utilizarlas con un propósito pecuario.

1.6 Proteínas recombinantes

Las proteínas recombinantes se producen como resultado de la expresión de ADN recombinante que se introduce a células hospederas que naturalmente no expresan el gen de una proteína proveniente de otro organismo (Overton, 2014).

Para la producción de proteínas recombinantes se requiere de un vector de expresión, el cual se diseña con ciertos elementos genéticos necesarios para lograr una expresión eficiente del gen de interés en el organismo hospedero, también conocido como sistema de expresión. Existe una gran variedad de sistemas de expresión, la elección del sistema adecuado dependerá de diversos factores como: el origen biológico, las propiedades químicas y biológicas de la proteína, los costos, el rendimiento de producción y su aplicación posterior. Las bacterias representan el sistema de expresión con una producción veloz y de menor costo, pero una desventaja es que no realizan modificaciones postraduccionales ni llevan a cabo el plegamiento correcto de proteínas complejas ajenas. En contraste, la producción en células eucariotas tiene un mayor costo, pero con la ventaja de que sí se llevan a cabo las modificaciones postraduccionales necesarias de forma adecuada, para generar proteínas recombinantes completamente funcionales (Clark y Pazdernik, 2016).

La producción de proteínas recombinantes es una tecnología que surgió hace más de 30 años. Es una respuesta para proveer proteínas de uso terapéutico, con buena

calidad y sin depender de fuentes animales (Lara, 2011). Una de las primeras proteínas recombinantes que se produjeron fue la GH humana (hGH), con el propósito de ser utilizada como tratamiento para niños con trastornos en el crecimiento. La hGH se produjo mediante un sistema de expresión bacteriano en *E. coli*. En 1981 la compañía Genentech desarrolló la primera hormona de crecimiento recombinante de humano (rhGH), la cual fue aprobada para su uso clínico por la FDA en 1985 (Ayyar, 2011). A partir de la innovación que trajo consigo el desarrollo de proteínas recombinantes, se ha producido la hormona de crecimiento recombinante de diferentes vertebrados, principalmente de mamíferos, en diferentes sistemas de expresión (Cuadro 1). Sin embargo, como se puede observar, el grupo de los reptiles es el menos investigado por lo cual es necesario el desarrollo de nuevas herramientas biotecnológicas para el estudio de la fisiología del crecimiento y desarrollo en estos organismos.

Cuadro 1. Sistemas de expresión utilizados para producir GH recombinante

Proteína	Sistema de expresión	Referencia
GH canina	<i>Pichia pastoris</i>	(Ascacio-Martínez y Barrera-Saldaña, 2004)
GH búfalo	<i>E. coli</i>	(Mukhopadhyay y Sahni, 2002)
GH cabra	<i>E. coli</i>	(Mukhopadhyay y Sahni, 2002)
GH humana	Vaca transgénica	(Salamone y col., 2006)
GH humana	<i>Nicotiana benthamiana</i>	(Rabindran y col., 2009)
GH humana	Semillas de soya transgénicas	(Cunha y col., 2010)
GH murina	<i>E. coli</i>	(Frandsen y col., 2010)
GH tilapia	<i>Pichia pastoris</i>	(Acosta y col., 2008)
GH esturión belga	<i>Pichia pastoris</i>	(Poermehr y Pourkazemi, 2015)
GH pez conejo	<i>E. coli</i>	(Funkenstein y col., 2005)
GH pollo	QNR/D	(Martínez-Moreno y col., 2016)
GH iguana	<i>Pichia pastoris</i>	(Flores, 2014)

Al expresar GH recombinante en *E. coli*, las ventajas que se obtienen son el costo y tiempo de producción; sin embargo, se pueden formar agregados de la proteína,

conocidos como cuerpos de inclusión, los cuales al tratar de deshacer y de obtener un plegamiento adecuado de la misma, disminuye el rendimiento de la proteína total (Mukhopadhyay y Sahni, 2002).

Se ha logrado la correcta expresión de GH bioactiva de tilapia y GH canina en la levadura *Pichia pastoris* como sistema de expresión (Ascacio-Martínez y Barrera-Saldaña, 2004; Acosta y col., 2008). Una de las ventajas de este sistema es el bajo costo y que es capaz de generar modificaciones postraduccionales. En ambos trabajos se sugirió modificar algunas condiciones de cultivo para obtener una mayor producción.

Por otra parte, en un trabajo preliminar utilizando el sistema de expresión de *Pichia pastoris*, fue posible la producción de hormona de crecimiento recombinante de iguana verde (rgiGH), utilizando como vector a pPIC9, el cual es específico para levaduras (Flores, 2014). La presencia de rgiGH se detectó al quinto día de inducción con metanol en el cultivo de las colonias positivas de *Pichia pastoris*, a las que previamente se administró glicerol para su crecimiento. Se analizó la presencia de la proteína recombinante mediante Western Blot, utilizando un anticuerpo heterólogo dirigido contra GH de pollo, el cual reconoce a la GH de iguana, y se observó una banda inmunorreactiva de 26 kDa en condiciones reductoras. Sin embargo, se consideró la necesidad de realizar más estudios para modificar las condiciones de cultivo, a fin de obtener una mayor producción y poder purificarla (Flores, 2014).

En cuanto a otros sistemas de expresión en células eucariotas, se ha reportado la producción de GH humana en la planta del tabaco (*Nicotiana benthamiana*), con un rendimiento de 700 mg de GH humana por cada kilogramo de hoja (Rabindran y col., 2009); en semillas de soya transgénicas tuvieron un estimado de 9 gramos de GH humana por cada kilogramo de semillas maduras (Cunha y col., 2010). La utilización de plantas como sistema de expresión es económica, permite la facilidad de escalar una producción y genera las modificaciones postraduccionales necesarias para la proteína recombinante. Sin embargo, el uso de plantas como sistema de expresión es un proceso lento, además pueden producir metabolitos que afecten la calidad de la proteína (Kawaka y Ngetich, 2017).

Otra alternativa que se ha propuesto para la producción de GH humana recombinante (rhGH) a gran escala es la utilización de animales transgénicos. Así, se ha reportado la producción de GH humana en vacas transgénicas, recolectando la rhGH en la leche que producen, obteniéndose hasta 5 gramos por litro (Salamone y col., 2006). El tiempo de producción suele ser muy largo, ya que la obtención del animal transgénico en sí mismo es un proceso complicado ya que el animal debe producir la proteína conservando su integridad (Sánchez y Gadea, 2014).

Previamente, en nuestro laboratorio se ha utilizado la línea celular derivada de neuroretinas de codorniz (QNR/D) como sistema de expresión para la hormona de crecimiento de pollo (Martínez-Moreno y col., 2016), por lo que se planteó la posibilidad de valorar si estas células podrían expresar y sintetizar a la hormona de crecimiento de iguana verde.

1.7 Vector de expresión pCAG

pCAG (Addgene) es un vector de expresión que consta de 5556 pares de bases (pb), contiene un gen para resistencia a ampicilina, además de múltiples sitios de restricción, dentro de los cuales dos muy importantes son EcoRI ubicado en la posición 1723 y NotI, ubicado en la posición 2495. Al realizar una digestión en los sitios mencionados, se corta el gen para la proteína verde fluorescente (GFP), para así poder insertar el gen de la proteína de interés (Figura 4). Además, cuenta con el promotor CAG, el cual está compuesto por el potenciador CMV, el promotor beta-actina de pollo y el sitio de aceptor de beta-globina, lo cual induce altos niveles de expresión (Matsuda y Cepko, 2004; Alexopoulou y col., 2008).

En un experimento previo realizado en nuestro laboratorio, se comprobó que el vector pCAG, insertado en células QNR/D, fue capaz de expresar la hormona de crecimiento recombinante de pollo (rcGH) y de secretar la proteína al medio de cultivo (Martínez-Moreno y col., 2016).

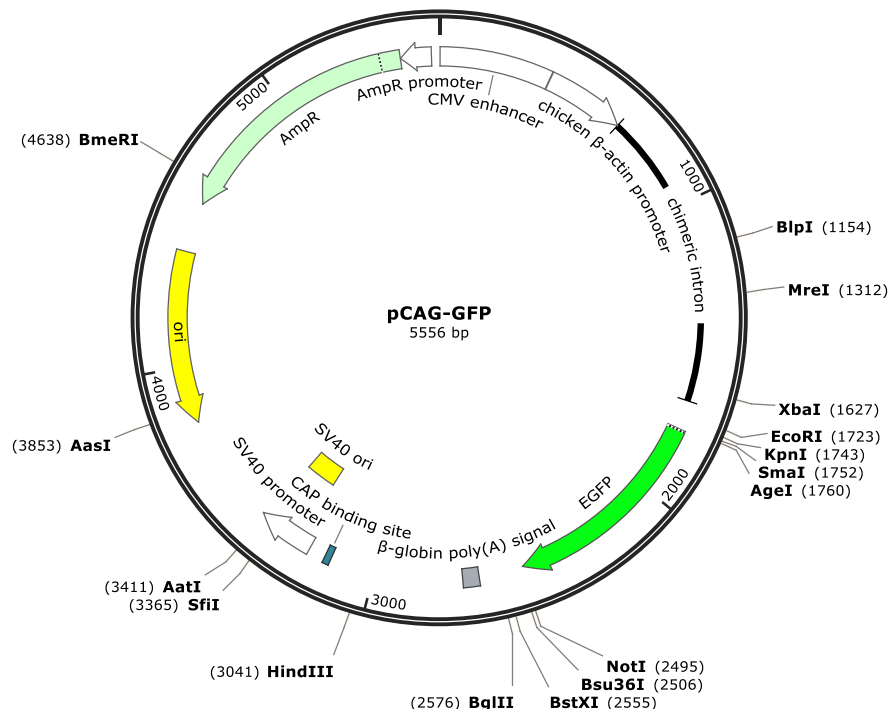


Figura 4. Diagrama del vector pCAG (Addgene).

1.8 Línea celular derivada de neuroretinas de codorniz (QNR/D)

La línea celular QNR/D proviene de neuroretinas de embriones de codorniz (*Coturnix coturnix japonica*). Se trata de células que fueron inmortalizadas con el virus del sarcoma de Rous; las células se mantienen en cultivo a una temperatura de 38.5 a 39 °C (Pessac y col., 1983; American Type Culture Collection No. CRL-2532). La línea celular está conformada principalmente de células ganglionares (80%), pero también contiene células amacrinas (20%). Esta línea celular se ha utilizado como modelo experimental de RGC (células ganglionares de la retina), ya que expresa los mismos marcadores moleculares que las RGCs de retina de pollo, así como también a la GH y su receptor. Además, expresa los genes que codifican para factores de crecimiento como NTF3, IGF-I, BDNF; los cuales aumentan al haber un incremento de GH (Martínez-Moreno y col., 2013). Esta línea celular se ha utilizado en la producción de GH recombinante de pollo (rcGH), obteniendo una expresión eficiente de la proteína (Martínez-Moreno y col., 2016).

2. HIPÓTESIS

La línea celular derivada de células ganglionares de codorniz (QNR/D) puede ser utilizada para sintetizar y secretar de manera eficaz al medio de cultivo la GH recombinante de iguana verde (rjiGH).

3. OBJETIVOS

3.1 General

- Construir un sistema eficiente para la expresión constitutiva, *in vitro*, de GH recombinante de iguana verde.

3.2 Específicos

- Establecer un sistema de células eucariontes para producir GH recombinante de iguana.
- Valorar la funcionalidad biológica de la rgiGH producida por este sistema.

4. METODOLOGÍA

4.1 Materiales

4.1.1 Animales

Se utilizaron ejemplares juveniles de iguana verde, de aproximadamente ocho meses de edad, obtenidos de una donación de parte de una Unidad de Manejo Ambiental para la Conservación de la Vida Silvestre (UMA) ubicada en Oaxaca, México. Los animales se mantuvieron bajo condiciones controladas de temperatura (33 °C), humedad (40 %) y ciclo de luz-oscuridad (12-12) óptimas para la especie y se alimentaron *ad libitum* con zanahoria, calabaza y manzana. Para obtener las hipófisis, las iguanas se sacrificaron mediante decapitación siguiendo el protocolo No. 32: Caracterización estructural y funcional de la hormona de crecimiento en iguana verde (*Iguana iguana*), aprobado por el comité de bioética del Instituto de Neurobiología, UNAM. La decapitación es un método rápido que evita el sufrimiento de estos animales, permitiendo la obtención de diferentes tejidos de la iguana sin la influencia de fármacos o agentes que alteren la estructura química, y por tanto la bioactividad, de la hormona de crecimiento.

4.2 Métodos

4.2.1 Extracción de ARN total

Las hipófisis que se utilizaron para la extracción de ARN se obtuvieron de iguanas decapitadas rápidamente. Para la extracción del ARN, se utilizó el estuche Direct-zol RNA MiniPrep (Zymo Research, Irvine, CA, USA) siguiendo las instrucciones establecidas por el fabricante. Finalmente, se cuantificó el ARN obtenido empleando un espectrofotómetro Nanodrop1000 (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA).

4.2.2 Reacción en cadena de la polimerasa acoplada a transcriptasa reversa (RT-PCR)

Se sintetizó ADN complementario (ADNc) a partir de 150 ng de ARN obtenido previamente, al que se adicionó 1 µL de Oligo-dT, 1 µL de cebadores aleatorios, 1 µL de una mezcla de desoxinucleósido trifosfatos (dNTPs), 8 µL de amortiguador de

reacción 5X y agua estéril para obtener un volumen de 34 μL ; la mezcla se incubó a 65 °C durante 5 min. Se agregaron 4 μL de ditioneitol (DTT) 0.1 mM, 0.25 μL de inhibidor de ribonucleasa (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA), 1 μL de transcriptasa reversa (200 U/ μL , Promega, Madison, WI, USA) y agua estéril para un volumen final de 40 μL . La mezcla se incubó a 42 °C durante 50 min, posteriormente a 70 °C por 5 min y para finalizar a 4 °C.

4.2.3 Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

El ADNc se sometió a una reacción de PCR con la pareja de oligonucleótidos: giGHcagF-giGHcagR que amplifican el ARNm que codifica para la GH de iguana y añaden sitios de restricción para el vector de expresión pCAG (EcoRI y NotI) en las posiciones 5' y 3', respectivamente (Cuadro 2). La amplificación se realizó en una mezcla de reacción con un volumen total de 50 μL , la cual contenía 1 μL de cada oligonucleótido 5 mM, 1 μL de dNTPs 10 mM, 4 μL de MgCl_2 25 mM, 0.25 μL de Taq polimerasa (5 U/ μL , Thermo Fisher Scientific), 10 μL de amortiguador Taq 10x, 2 μL de ADNc y 30.75 μL de agua estéril. Como control negativo se realizó la misma mezcla de reacción mencionada previamente, con excepción de que se añadió agua estéril en lugar del ADNc. Las condiciones de PCR fueron las siguientes: 95°C por 5 min, seguido de 35 ciclos de 93 °C por 30 seg, 58 °C por 30 seg, 72 °C por 30 seg y finalmente una extensión a 72 °C por 7 min. Para visualizar el producto de PCR obtenido, la muestra se analizó en un gel de agarosa al 1% en amortiguador TAE (Tris, Acetato, EDTA) y se tiñó con bromuro de etidio; las condiciones de la corrida fueron de 100 V durante 50 min.

Cuadro 2. Secuencia de oligonucleótidos empleados para amplificar el ARNm de giGH y la adición de sitios de restricción para su respectivo vector.

Nombre	Secuencia
giGHcagF	AAAAAGAATTCACCATGGCTTCAGTACTTAGCCCTTCTCC
giGHcagR	AAAAAGCGGCCGCTCATATGGTGCAGTTAATTTCTCC

4.2.4 Clonación molecular

El producto de PCR obtenido se ligó en el vector pGEM-T Easy (Promega) de acuerdo con las especificaciones del fabricante, a una relación 1:3 (inserto:vector). El vector se insertó en bacterias competentes de *Escherichia coli* de la cepa Blue XL-1 (Thermo Fisher Scientific) mediante choque térmico, el cual consistió en añadir 10 μ L de reacción de ligación a las células competentes, se colocaron en hielo por 30 min, se incubaron a 42 °C por 2 min, posteriormente permanecieron en hielo por 1 min, se agregaron 300 μ L de medio Luria (LB, Sigma-Aldrich, San Luis, MO, USA) y se incubaron a 37 °C, con agitación a 200 rpm durante 1 h. Las bacterias se sembraron en placas de agar LB con ampicilina (Sigma-Aldrich) y se incubaron a 37 °C por 16 h. Posteriormente, las colonias que crecieron se inocularon en medio LB con ampicilina y se incubaron a 37 °C y 200 rpm por 16 h.

4.2.5 Miniprep

Se realizó una extracción de plásmido utilizando el estuche Wizard Plus SV Minipreps DNA Purification System (Promega), siguiendo las instrucciones del fabricante. Se realizó una PCR con los oligonucleótidos previamente utilizados para corroborar que el inserto estuviera presente en los plásmidos. Simultáneamente, se realizó una secuenciación con los oligonucleótidos SP6 y T7, los cuales son los más comúnmente utilizados para secuenciación del inserto deseado en vectores de clonación; para comprobar mediante un análisis informático usando el programa Clustal Omega (EMBL-EBI), que la secuencia de giGH se encontrara insertada dentro del plásmido. Con base en la secuencia obtenida, se realizó un diagrama *in silico* utilizando el software SnapGene (GSL Biotech, Chicago, IL, USA).

4.2.6 Restricción enzimática

Se realizaron dos mezclas para realizar una doble digestión de los plásmidos pCAG-GFP y pGEM-giGH. Las mezclas fueron las siguientes: a partir de 1 μ g de los plásmidos pCAG-GFP y pGEM-giGH se añadieron 3 μ L del amortiguador de las enzimas de restricción (Anza, Thermo Fisher Scientific), 1 μ L de la enzima EcoRI (Anza, Thermo Fisher Scientific), 1 μ L de la enzima NotI (Anza, Thermo Fisher

Scientific) y se completó con agua estéril para un volumen final de 30 μ L. Las mezclas se incubaron a 37 °C durante 1 h; posteriormente las enzimas se inactivaron incubando a 80 °C por 20 min. Para verificar que la digestión se realizó eficazmente, los productos digeridos se analizaron en un gel de agarosa al 1% TAE, el gel se tiñó con bromuro de etidio para visualizar las bandas presentes. Como referencia de peso molecular se utilizaron los marcadores de 1 Kb plus DNA Ladder (Thermo Scientific). Finalmente se purificaron los productos digeridos utilizando PureLink™ Quick Gel Extraction Kit (Thermo Fisher Scientific).

4.2.7 Subclonación molecular en vector pCAG

El inserto obtenido mediante digestión con enzimas de restricción previamente fue clonado en el vector pCAG mediante una reacción de ligación, a una proporción 4:1 (inserto:vector). Las bacterias *Escherichia coli* de la cepa Blue XL-1 (Thermo Fisher Scientific) se transformaron con el producto de ligación mediante choque térmico como se describió previamente. Las células se sembraron en placas con agar LB y ampicilina, se incubaron a 37 °C por 16 h. Se seleccionaron colonias que crecieron en las placas, para luego expandirlas en medio LB con ampicilina, incubándolas a 37 °C y 200 rpm por 16 h. Se realizó un miniprep como se mencionó previamente; el plásmido extraído fue secuenciado para comprobar mediante un análisis bioinformático usando el programa Clustal Omega (EMBL-EBI) que la secuencia de giGH se encontrara insertada dentro del plásmido. Se realizó un diagrama del vector con base en la secuencia obtenida utilizando el software SnapGene. También se realizó un PCR de la colonia con los oligonucleótidos previamente utilizados con el objetivo de observar que el inserto de interés se encontrara dentro del plásmido.

4.2.8 Transfección en células QNR/D

El plásmido pCAGgiGH se transfectó en células QNR/D mediante liposomas, utilizando Lipofectamina 3000 (Invitrogen) en una relación de 1 μ L de Lipofectamina/ μ L de plásmido, utilizando 0.5 μ g de plásmido. Previamente, se sembraron 5×10^5 células en placas de cultivo de 6 pozos y se estabilizaron en medio DMEM con suero fetal bovino (SFB) al 10% y 100 μ L de Primocin (InvivoGen, San

Diego, CA, USA) por cada 50 mL de medio, por 24 h a 39 °C. Se transfectaron las células y después de 24 y 48 h post-transfección se colectó el medio para evaluar la producción de la GH recombinante de iguana (rgiGH). Como control positivo para medir la eficiencia de la transfección, se utilizó el plásmido pCAG-GFP para transfectar en las mismas condiciones previamente descritas. Se utilizó un microscopio invertido de fluorescencia con el objetivo de magnitud 10x (Olympus IX50, Center Valley, PA, USA) y el software Fiji (UW Madison, WI, USA) para contar las células y obtener un porcentaje del número total de células con respecto a las células transfectadas.

4.2.9 Western Blot

A partir del medio recolectado, se analizó la producción de rgiGH mediante un Western Blot utilizando para su identificación un anticuerpo primario anti-GH de pollo, el cual se ha demostrado que es capaz de reconocer a la GH de iguana (Ávila-Mendoza y col., 2014). Se realizó un gel de poliacrilamida en presencia de dodecil sulfato de sodio (SDS-PAGE) a una concentración de 12.5%, bajo condiciones reductoras. Las proteínas separadas mediante SDS-PAGE se transfirieron a membranas de nitrocelulosa empleando un amortiguador con Tris 25 mM, glicina 192 mM, etanol al 20%, pH 8.3 a 200 mA durante 1 h. Posteriormente, se bloquearon los sitios no específicos de unión a la membrana con leche al 5% (Bio-Rad) en TBS (Tris 100 mM, NaCl 2.5 M, pH 7.5) durante 1 h, con una agitación suave y constante. La membrana se lavó 3 veces con TTBS (Tween 20 al 0.05% en TBS); posteriormente, se añadió el anticuerpo primario anti-cGH CAP-2 (diluido 1:10,000) (Ávila-Mendoza y col., 2014) en una solución de leche al 1% en TTBS y se dejó incubar toda la noche con agitación suave. Después de tres lavados con TTBS, la membrana se incubó con el anticuerpo secundario (anti-IgG de conejo hecho en cabra, conjugado con peroxidasa de rábano, Invitrogen) en una dilución 1:6,000. Finalmente, la membrana se colocó dentro de una bolsa de plástico, en donde se agregó el sustrato de quimioluminiscencia (ECL) y se expuso en una película de autorradiografía en el cuarto oscuro. Una vez sensibilizada, la película se introdujo a una solución reveladora, se enjuagó en agua y finalmente se colocó en solución fijadora. Una vez

seco, el luminograma se analizó mediante densitometría utilizando el fotodocumentador Gel Doc EZ Imager (Bio-rad) para capturar la imagen y se utilizó el software ImageLab (Bio-rad) para su análisis.

4.2.10 Cuantificación de rgiGH

Para cuantificar la producción de rgiGH, se realizó un ELISA competitivo indirecto (Martínez-Coria y col., 2002), utilizando un anticuerpo (CAP-2) dirigido contra GH de pollo (anti-cGH), el cual se ha demostrado que también reconoce a la GH de iguana (Ávila-Mendoza y col., 2014). Se forró la placa con 12 ng de GH recombinante de pollo (rcGH) en cada pozo y se dejó incubando por 16 h a 4 °C. Posteriormente, se lavó la placa 5 veces con una solución de TPBS (0.01 M Tween 20, 0.05% pH 7.8). Se bloquearon los sitios inespecíficos utilizando una solución bloqueadora de PBS con leche al 3% durante una hora, después se lavó la placa. Las muestras de medio de cultivo se incubaron por 16 h con la solución del anticuerpo primario (anti-rcGH) en TPBS con 1% de leche, a una dilución de 1:25,000. También se realizó una curva de calibración de rcGH, con concentraciones de 1024 a 0.5 ng/mL, las cuales se incubaron con el mismo anticuerpo durante 16 h a 4 °C. La placa se incubó por 2 h a 25 °C con la curva patrón de GH y con las muestras de medios de cultivo. Después de que se lavó la placa, se agregó la solución del anticuerpo secundario (anti-IgG de conejo hecho en cabra y conjugado a peroxidasa de rábano), en una dilución 1:3,000, se incubó por 2 h a 25 °C. Después de que se lavó la placa, se reveló con los reactivos del estuche de revelado ABTS (Roche), siguiendo las condiciones del fabricante. La placa se leyó en un lector de microplacas (Bio-Rad) a 405 nm.

4.2.11 Ensayo de proliferación celular de Nb2 con MTT

Para analizar si la rgiGH producida era bioactiva, los diversos medios de cultivo y tratamientos se probaron en un bioensayo de proliferación celular empleando la línea celular de linfoma de rata Nb2. Las células se mantuvieron en medio DMEM con suero fetal bovino al 10%, suero de caballo al 10%, 0.1 mM de β -mercaptoetanol y 500 μ l de antibiótico (10,000 unidades/mL de penicilina, 10,000 μ g/mL de estreptomina y 25 μ g/mL de antimicótico Fungizone®). Un día antes del ensayo,

las células se sincronizaron con medio estacionario (DMEM con suero fetal bovino al 1%, suero de caballo al 10%, 0.1 mM de β -mercaptoetanol y 500 μ L de antibiótico). En una placa de 96 pozos se sembraron 15,000 células por pozo, posteriormente se añadió el tratamiento respectivo a cada pozo, la placa se incubó a 39 °C durante 72 h. El estímulo a la proliferación celular se evaluó mediante el ensayo colorimétrico de MTT (bromuro de 3-(4,5-dimetildiazol-2-il)-2,5-difenil tetrazolio); se añadieron 50 μ L de MTT a cada pozo (0.5 mg/mL en PBS estéril) y la placa se incubó por 4 h a 39 °C. Después se añadieron 100 μ L de la solución de paro (10 % SDS en 0.01 M HCl) y la placa se incubó a 39 °C hasta que el precipitado se disolviera (12 horas). Finalmente se leyó la placa a 595 nm en un lector de microplacas (BioRad).

4.2.12 Análisis estadístico

El análisis estadístico de los datos se llevó a cabo utilizando las siguientes pruebas: ANOVA de una vía con un análisis *post hoc* Dunnett y t de Student, dependiendo de la naturaleza de los datos, con el programa PRISM versión 6 (Graph Pad, La Jolla, CA).

5. RESULTADOS

5.1 Clonación del ADNc de la hormona de crecimiento de iguana verde

El gen de la hormona de crecimiento de iguana verde fue amplificado mediante PCR utilizando el ADNc de hipófisis de iguana previamente sintetizado. Se obtuvo un producto de 684 pb aproximadamente (Figura 5). El producto de PCR se purificó mediante extracción de gel para su posterior clonación en el vector pGEM T-Easy; esta construcción se denominó pGEM-giGH y se utilizó para transformar bacterias *E. coli* (Blue XL-1) mediante choque térmico.

Para corroborar la identidad del inserto, se secuenció el plásmido con los oligonucleótidos T7 y SP6, así como también se realizó un PCR con los oligonucleótidos utilizados para amplificar el gen de la giGH (Figura 7)

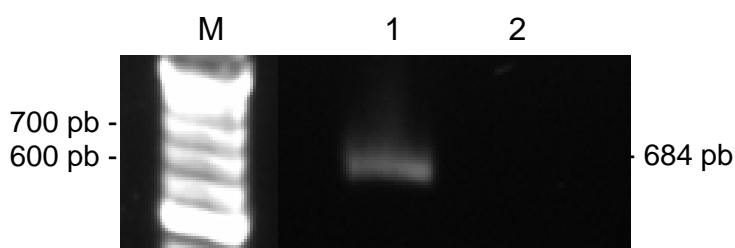


Figura 5. Producto amplificado por PCR. M: marcador de peso molecular; 1: cDNA de hipófisis de iguana; 2: control negativo.

5.2 Subclonación de giGH en pCAG

El vector pGEM T-Easy-giGH (Figura 7) y el vector pCAG-GFP (Figura 8) fueron digeridos con las enzimas de restricción EcoRI y NotI obteniendo dos fragmentos de cada vector: a) uno de 3016 pb y el otro de 684 pb, para el caso de pGEM-giGH; b) uno de 4784 pb y otro de 772 pb, para el caso de pCAG-GFP (Figura 6). Los fragmentos de 684 pb y de 4784 pb fueron purificados mediante extracción de gel para realizar una subclonación.

La construcción pCAG-giGH se utilizó para transformar bacterias *E. coli* Blue XL-1, el plásmido fue secuenciado y analizado mediante PCR con los oligonucleótidos giGHcagF y giGHcagR, previamente utilizados para amplificar el gen de giGH (Figura 8).

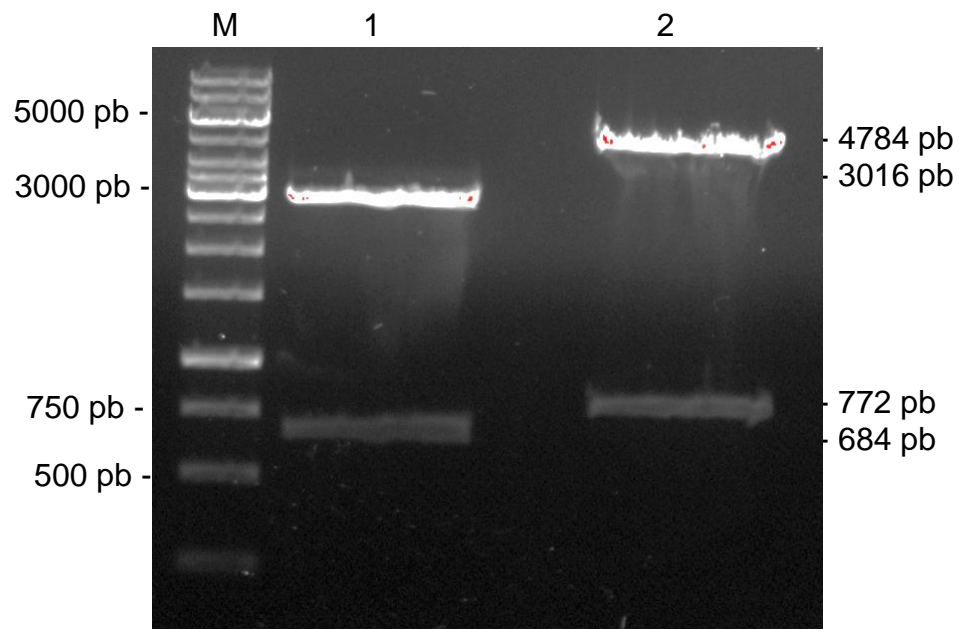


Figura 6. Análisis de restricción enzimática de los vectores pGEM giGH y pCAG-giGH. M: marcadores de peso molecular; 1: vector pGEM-giGH; 2: vector pCAG-GFP; ambos digeridos con EcoRI y NotI.

5.3 Análisis de secuencias de los plásmidos pGEM-giGH y pCAG-giGH

De acuerdo con las construcciones formadas, pGEM-giGH y pCAG-giGH, se realizaron las representaciones esquemáticas *in silico* de ambos vectores utilizando el software SnapGene.

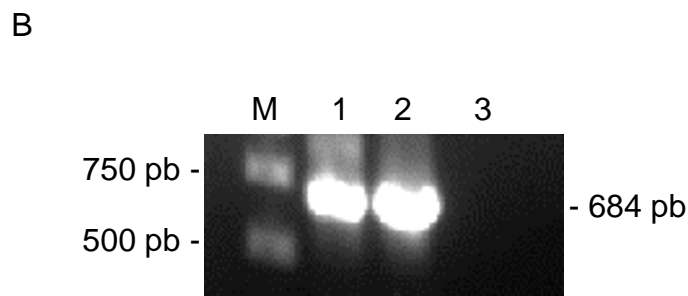
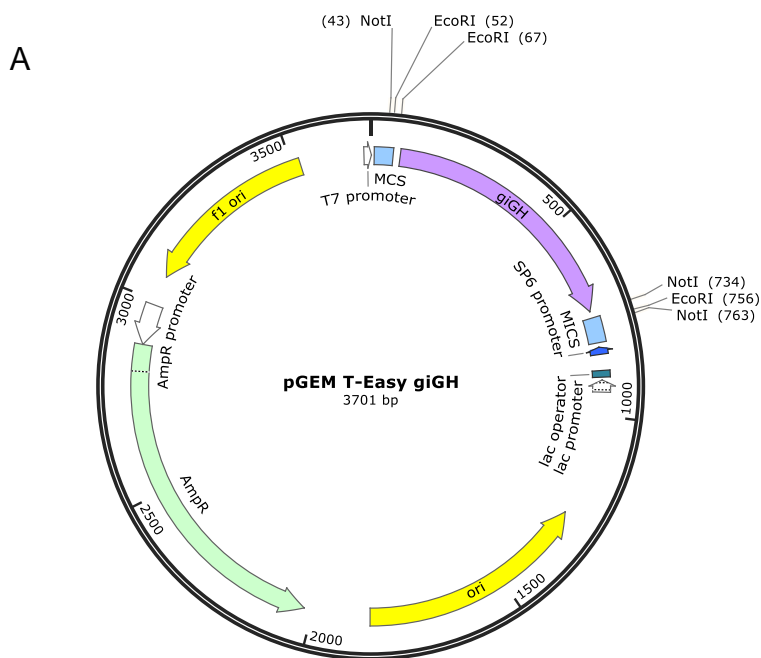


Figura 7. Análisis de pGEM giGH. A) Diagrama del plásmido pGEM-giGH construido con SnapGene. B) PCR de colonias transformadas con el plásmido pGEM-giGH. M: marcador de peso molecular; 1-2: colonias seleccionadas al azar; 3: control negativo.

El vector pGEM T-Easy giGH (Figura 7A) de 3701 pb cuenta con los sitios de restricción para EcoRI y NotI en los nucleótidos 67 y 734 respectivamente. Estos fueron digeridos para subclonar a giGH, encontrándose entre los nucleótidos 76-732 pb. Se realizó un PCR para corroborar que los plásmidos obtenidos tuvieran el inserto de giGH, de las dos colonias analizadas, ambas amplificaron un producto esperado de 684 pb (Figura 7B).

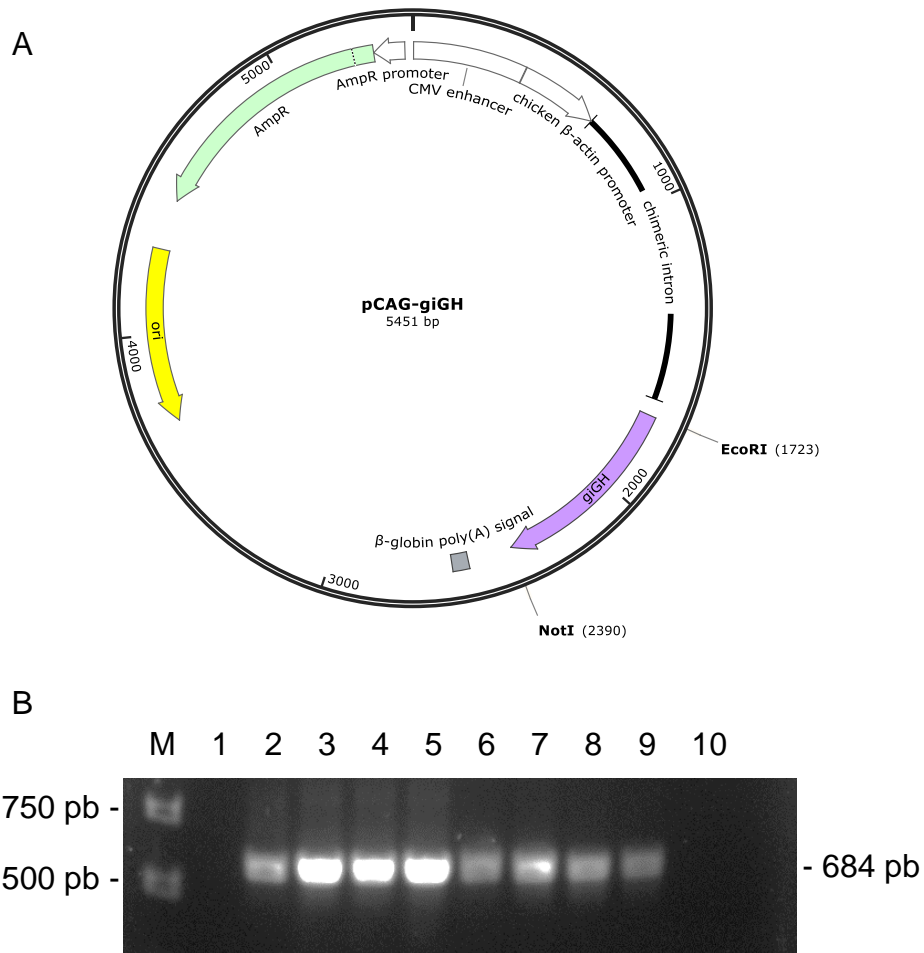


Figura 8. Análisis de pCAG-giGH A) Diagrama del plásmido pCAG-giGH construido con SnapGene. B) PCR del miniprep de colonias transformadas con el plásmido pCAG-giGH. M: marcador de peso molecular; 1-9: miniprep de colonias seleccionadas al azar; 10: control negativo.

El vector pCAG-giGH (Figura 8A) consta de 5451 pb, cuenta con un único sitio de restricción para EcoRI en la posición 1723 y para NotI en la posición 2390. El gen que codifica a giGH se encuentra situado en la posición 1732-2388 pb. Se realizó un PCR a los minipreps de colonias que fueron seleccionadas al azar con el propósito de verificar que estas tuvieran el inserto del gen de giGH; de los nueve plásmidos analizados, ocho amplificaron un producto esperado de 684 pb aproximadamente, mientras que solamente un plásmido no amplificó lo esperado (Figura 8B).

giGH	ATGGCTTCAGTACTTAGCCCTTCTCCTCTATTACCATGCTTTGTTTATCTTGGCCCTC	60
pGEMgiGH	ATGGCTTCAGTACTTAGCCCTTCTCCTCTATTACCATGCTTTGTTTATCTTGGCCCTC	60
pCAGgiGH	ATGGCTTCAGTACTTAGCCCTTCTCCTCTATTACCATGCTTTGTTTATCTTGGCCCTC *****	60
giGH	CAATGGCCTGAGGGAACAACAGCTTTCACCAATGCCTCTCTCCAGTCTCTTTGCCAAC	120
pGEMgiGH	CAATGGCCTGAGGGAACAACAGCTTTCACCAATGCCTCTCTCCAGTCTCTTTGCCAAC	120
pCAGgiGH	CAATGGCCTGAGGGAACAACAGCTTTCACCAATGCCTCTCTCCAGTCTCTTTGCCAAC *****	120
giGH	GCAGTACTAAGAGCCAGCATCTTCACCTGCTTGCAACGGATACCTTCAAGGAATTTGAA	180
pGEMgiGH	GCAGTACTAAGAGCCAGCATCTTCACCTGCTTGCAACGGATACCTTCAAGGAATTTGAA	180
pCAGgiGH	GCAGTACTAAGAGCCAGCATCTTCACCTGCTTGCAACGGATACCTTCAAGGAATTTGAA *****	180
giGH	CGCTCCTACATCCCAGAAGACCAGCGACAGTCCAACAAGAACTCTCAGTCTGCATTTTGT	240
pGEMgiGH	CGCTCCTACATCCCAGAAGACCAGCGACAGTCCAACAAGAACTCTCAGTCTGCATTTTGT	240
pCAGgiGH	CGCTCCTACATCCCAGAAGACCAGCGACAGTCCAACAAGAACTCTCAGTCTGCATTTTGT *****	240
giGH	TCCTCTGAAACCATCCCTGCACCCACAGGAAAGATGATGCCAGCAAAAAACAGACATG	300
pGEMgiGH	TCCTCTGAAACCATCCCTGCACCCACAGGAAAGATGATGCCAGCAAAAAACAGACATG	300
pCAGgiGH	TCCTCTGAAACCATCCCTGCACCCACAGGAAAGATGATGCCAGCAAAAAACAGACATG *****	300
giGH	GAATTGCTCAGGTTTTCACTCACTCTCATTAGTCATGGCTGAGTCTGTACAGCACCTC	360
pGEMgiGH	GAATTGCTCAGGTTTTCACTCACTCTCATTAGTCATGGCTGAGTCTGTACAGCACCTC	360
pCAGgiGH	GAATTGCTCAGGTTTTCACTCACTCTCATTAGTCATGGCTGAGTCTGTACAGCACCTC *****	360
giGH	AGTAGAATGTTTCAGTAATACTCTGGTCTTTGGAACGTCAGACAGAGTCTATGAAAACTT	420
pGEMgiGH	AGTAGAATGTTTCAGTAATACTCTGGTCTTTGGAACGTCAGACAGAGTCTATGAAAACTT	420
pCAGgiGH	AGTAGAATGTTTCAGTAATACTCTGGTCTTTGGAACGTCAGACAGAGTCTATGAAAACTT *****	420
giGH	CAGGACTTAGAACAAGGAATACAGGCTCTGATGAGGGAAGTGGAGGATGGGAGCTCTCGG	480
pGEMgiGH	CAGGACTTAGAACAAGGAATACAGGCTCTGATGAGGGAAGTGGAGGATGGGAGCTCTCGG	480
pCAGgiGH	CAGGACTTAGAACAAGGAATACAGGCTCTGATGAGGGAAGTGGAGGATGGGAGCTCTCGG *****	480
giGH	GGCCTTCAACTCTTCAGACCTACTTATGAGAAGTTTGAATCCAACCTCCGGAATGAAGGT	540
pGEMgiGH	GGCCTTCAACTCTTCAGACCTACTTATGAGAAGTTTGAATCCAACCTCCGGAATGAAGGT	540
pCAGgiGH	GGCCTTCAACTCTTCAGACCTACTTATGAGAAGTTTGAATCCAACCTCCGGAATGAAGGT *****	540
giGH	TCCTTGACAGAAAAATTACGGTCTTCTGTCTGCTTCAAAAAGGACCTGCACAAGGTGGAG	600
pGEMgiGH	TCCTTGACAGAAAAATTACGGTCTTCTGTCTGCTTCAAAAAGGACCTGCACAAGGTGGAG	600
pCAGgiGH	TCCTTGACAGAAAAATTACGGTCTTCTGTCTGCTTCAAAAAGGACCTGCACAAGGTGGAG *****	600
giGH	ACATATCTGAAAGTGATGAAATGCAGGCATTTTGGAGAAATTAAGTGCACCATATGA	657
pGEMgiGH	ACATATCTGAAAGTGATGAAATGCAGGCATTTTGGAGAAATTAAGTGCACCATATGA	657
pCAGgiGH	ACATATCTGAAAGTGATGAAATGCAGGCATTTTGGAGAAATTAAGTGCACCATATGA *****	657

Figura 9. Alineamiento de las secuencias de los plásmidos pGEM-giGH y pCAG-giGH comparadas con la secuencia de la región codificante de la hormona de crecimiento de iguana verde (giGH) utilizando el algoritmo Clustal Omega. Los asteriscos corresponden a los nucleótidos conservados.

Las secuencias obtenidas de pGEM-giGH y pCAG-giGH se alinearon con respecto al gen de giGH utilizando el algoritmo Clustal-Omega con el propósito de analizar el grado de conservación de las bases en los plásmidos (Figura 9). Para el alineamiento se utilizó la secuencia de la giGH que abarca desde el péptido señal hasta el codón de término de la región codificante para giGH.

Los resultados mostraron que ambos vectores, el pGEM-giGH y el pCAG-giGH, tuvieron un 100% de similitud en comparación a la secuencia del gen de giGH (Cuadro 3). Así pues, ambos vectores confirmaron poseer el inserto deseado para su posterior expresión.

Cuadro 3. Porcentaje de similitud que existe entre las secuencias alineadas utilizando el algoritmo Clustal Omega.

	giGH	pCAGgiGH	pGEMgiGH
giGH	100	100	100
pCAGgiGH	100	100	100
pGEMgiGH	100	100	100

5.4 Eficiencia de la transfección en células QNR/D

Los plásmidos pCAG-giGH y pCAG-GFP fueron transfectados en células QNR/D con lipofectamina, cada uno en un pozo independiente. Para determinar la eficiencia de transfección, se contaron las células transfectadas que expresaban GFP con respecto al número de células totales observadas, utilizando el software Fiji (Figura 10).

Se observó que a las 24 h el 26% de las células habían sido transfectadas (Figura 10A), y que a las 48 h la transfección se aumentó a un 45% (Figura 10B), siendo significativamente diferente ($P < 0.001$) en comparación con las células transfectadas a las 24 horas (Figura 10C).

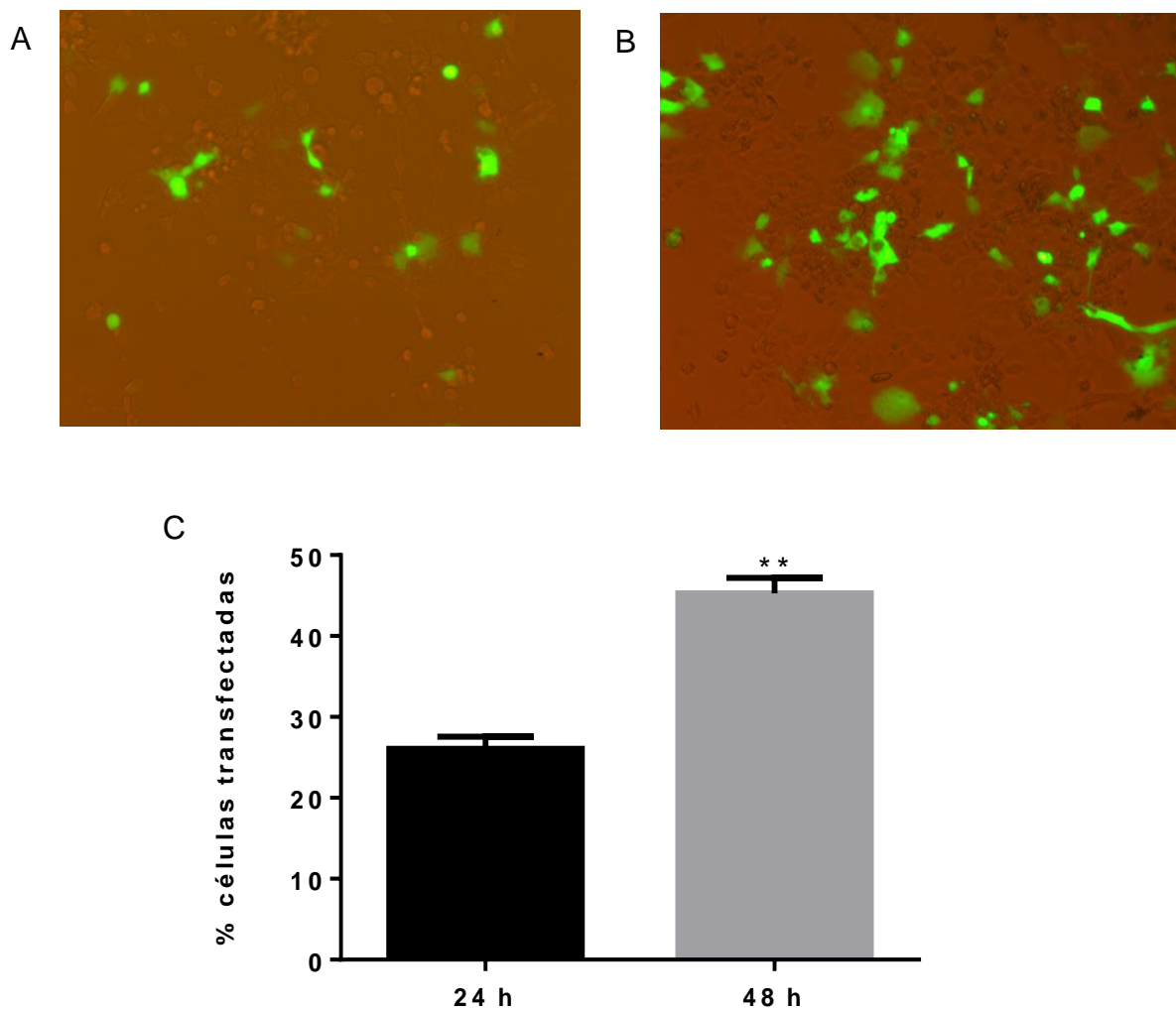


Figura 10. Determinación de la eficiencia de transfección con GFP en células QNR/D. A) Micrografía de los cultivos transfectados durante 24 h. B) Micrografía de los cultivos transfectados durante 48 h. C) Análisis de la eficiencia de transfección determinada por el número de células transfectadas con GFP. Las barras muestran la media \pm error estándar (n=3); los asteriscos indican diferencia significativa, **P<0.001 (t de Student).

5.5 Determinación de la expresión de giGH recombinante

La producción de giGH recombinante por las células QNR/D transfectadas con pCAG-giGH se evaluó en los medios de cultivo mediante SDS-PAGE/Western Blot, en condiciones reductoras, utilizando un anticuerpo dirigido contra GH de pollo, que es capaz de reconocer a la giGH (Figura 11). Se observó la presencia de una banda

inmunorreactiva de 26 kDa; se cree podría ser la rgiGH, dado que esta banda tiene el mismo peso molecular que la rcGH, la cual se utilizó como un control positivo. También se evaluaron mediante SDS-PAGE/Western Blot en las mismas condiciones los medios de células QNR/D transfectadas con pCAG-GFP como control negativo, y en ese caso no se observó ninguna banda presente en el luminograma, lo cual nos indicó que el plásmido pCAG-GFP no induce ninguna expresión de GH (Figura 11A). Se analizó el luminograma mediante densitometría utilizando el software de ImageLab (Bio-rad). Los resultados mostraron un incremento muy significativo ($P < 0.0001$) de la producción de rgiGH a las 48 h con respecto a las 24 h (Figura 11B).

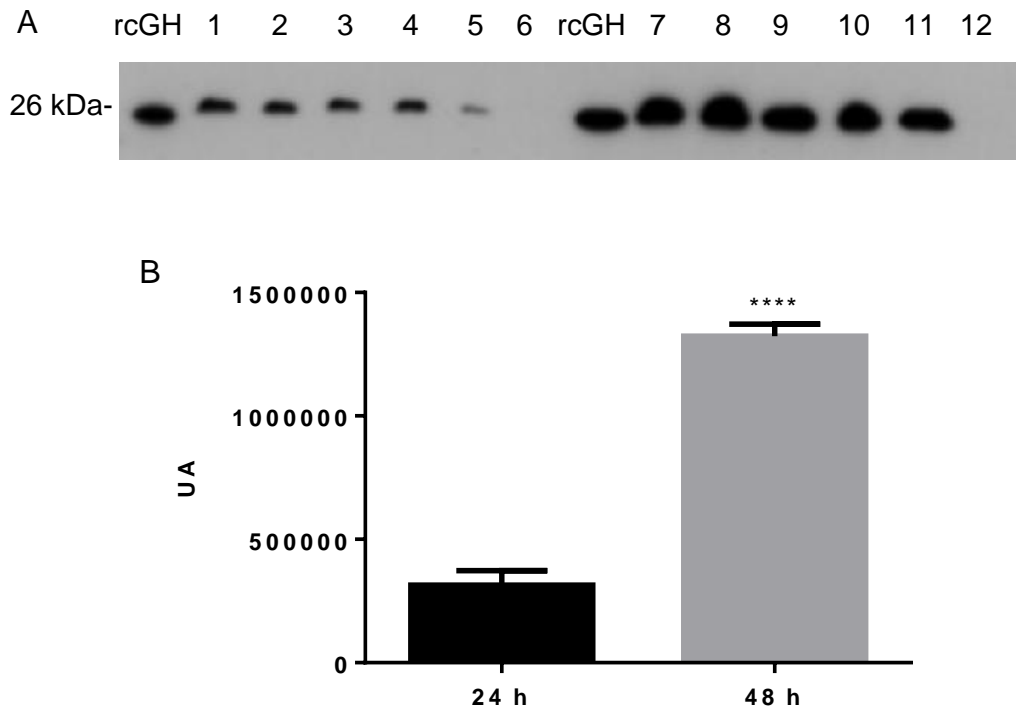


Figura 11. Análisis de la producción de rgiGH (A) Western Blot en condiciones reductoras de los medios de células QNR/D transfectadas. rcGH: como control positivo; 1-5: medio de células transfectadas con pCAG-giGH a las 24 h; 6: medio de células transfectadas con pCAG-GFP a las 24 h; 7-11: medio de células transfectadas con pCAG-giGH a las 48 h; 12: medio de células transfectadas con pCAG-GFP a las 48 h. (B) Densitometría de la banda de 26 kDa observada en la membrana de Western Blot. Las barras muestran la media \pm error estándar ($n=5$), los asteriscos indican diferencia significativa; **** $P < 0.0001$ (t de Student).

5.6 Cuantificación de rgiGH

Se midió la concentración de GH obtenida en los medios de cultivo, proveniente de las células QNR/D transfectadas con el gen de rgiGH, mediante un ELISA indirecto utilizando un anticuerpo dirigido contra GH de pollo. Los resultados mostraron que en el medio recolectado a las 24 h después de la transfección, se obtuvo una concentración de 268.7 ± 5.7 ng de rgiGH por cada mL de medio. Por su parte, el medio correspondiente a las 48 h de transfección mostró una concentración de 419.4 ± 1.1 ng de rgiGH por cada mL de medio, siendo significativamente mayor ($P < 0.0001$) en comparación con el medio recolectado a las 24 h (Figura 12)

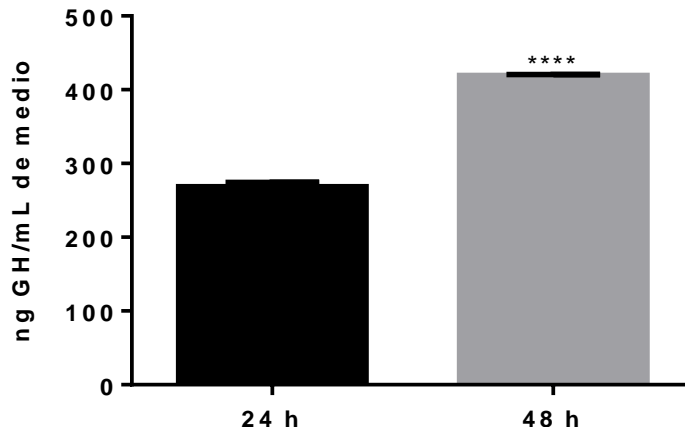


Figura 12. Cuantificación de rgiGH en medios de cultivo de células QNR/D mediante un ELISA indirecto. Las barras muestran la media \pm error estándar ($n=3$), los asteriscos indican diferencia significativa; **** $P < 0.0001$ (t de Student).

5.7 Bioactividad de la hormona de crecimiento recombinante de iguana verde

Se analizó la bioactividad de la rgiGH producida a través de su capacidad para estimular la proliferación de células Nb2, utilizando un ensayo con MTT. Para ello, se sembraron 15,000 células por pozo en una placa de 96 pozos y se añadieron los tratamientos correspondientes; después de incubar por 72 h se añadió el MTT y posteriormente se leyó la placa en un espectrofotómetro a una longitud de onda de 595 nm. En los resultados obtenidos se observó un incremento significativo ($P < 0.0001$) de las células tratadas con rgiGH a 1 y 10 nM con respecto al control de

células Nb2 sin tratar. Por su parte, el control positivo utilizado, la hormona de crecimiento de rata (rGH) a 1 y 10 nM, también mostró un efecto significativo ($P < 0.0001$) con respecto a los controles no tratados, aunque con menor intensidad que el observado con los medios de rgiGH. Además, se analizaron otros controles negativos, como la adición de medio de células QNR/D transfectadas con GFP y medio de células QNR/D sin transfectar, los cuales no mostraron ningún efecto sobre la proliferación de las células Nb2 sin tratar.

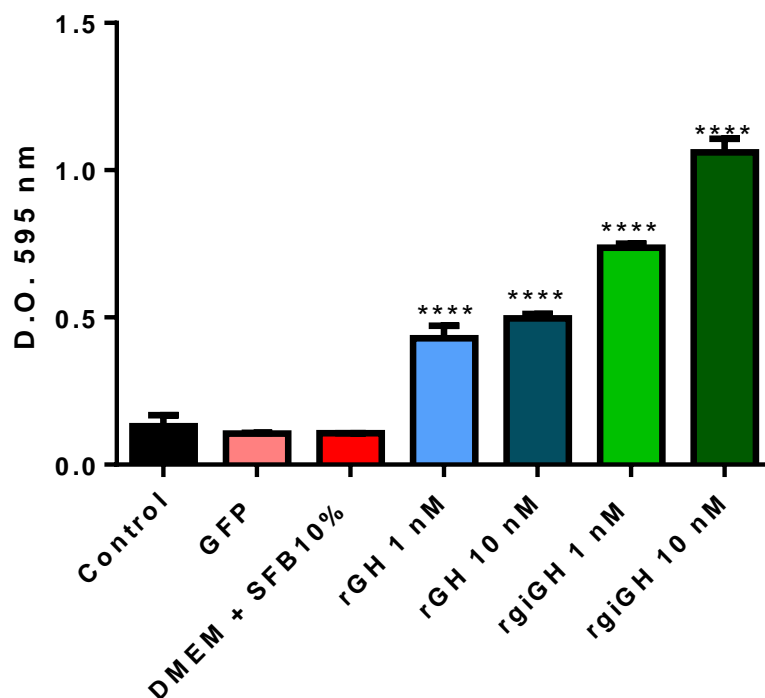


Figura 13. Gráfica de la proliferación celular de Nb2 inducida al aplicar diferentes tratamientos medida mediante MTT. Control: ningún tratamiento; GFP: medio de QNRDs que fueron transfectadas con el plásmido pCAG-GFP; DMEM+SFB 10%: medio de QNRDs que no fueron transfectadas; rGH: hormona de crecimiento de rata; rgiGH: medio de QNRDs transfectadas con el plásmido pCAG-giGH. Las barras muestran la media \pm error estándar ($n=6$), los asteriscos indican diferencia significativa; **** $P < 0.0001$ (ANOVA de una vía, prueba *post hoc* Dunnett).

6. DISCUSIÓN

En nuestro laboratorio se ha logrado la purificación y caracterización bioquímica preliminar de la hormona de crecimiento de la iguana verde, así como la secuenciación de su estructura primaria utilizando metodologías moleculares. Ello nos ha permitido iniciar una serie de estudios que posibilitará avanzar en la investigación sobre la fisiología de la GH y del eje somatotrópico en reptiles, un grupo de vertebrados poco analizado. Para continuar dichos estudios a mayor escala, se requiere contar con cantidades razonables de esta proteína. Obtenerla por métodos convencionales a partir de la fuente biológica original (la hipófisis) implicaría el sacrificio de un número importante de ejemplares, lo que no se considera conveniente. Por ello, se hizo necesario desarrollar una estrategia alternativa que permitiera la producción de esta proteína en cantidades suficientes, de manera confiable y con la posibilidad de emplearla en procesos biotecnológicos para el manejo pecuario de esta especie.

Así pues, en el presente trabajo se desarrolló un proceso de producción de hormona de crecimiento recombinante de iguana verde (rgiGH), utilizando como sistema de expresión la línea celular QNR/D.

Inicialmente se amplificó el gen de la giGH a partir del ARN previamente extraído de hipófisis de iguana, obteniendo como resultado un producto de aproximadamente 684 pb; considerando que los oligonucleótidos diseñados no solo amplificaban al gen de giGH, sino que además añadían dos sitios de restricción para EcoRI y NotI, y a su vez también se añadió la secuencia Kozak (ACC) antes del codón de inicio, para el reconocimiento del sitio de inicio de la traducción por parte del ribosoma en células eucariotas (Kozak, 2002). Se han reportado estudios que demuestran que la ausencia de la secuencia Kozak disminuye los niveles de expresión de proteínas recombinantes (Dvir y col., 2013).

Una vez que se obtuvo el gen amplificado, este se purificó extrayéndolo del gel para ser ligado al vector de clonación pGEM T Easy, con el propósito de poder verificar que el fragmento deseado haya sido digerido correctamente con las enzimas de restricción EcoRI y NotI. Al utilizar dos enzimas se lleva a cabo una clonación

direcciona la cual genera fragmentos de ADN y plásmidos lineales con extremos cohesivos diferentes; debido a ello, el plásmido no puede unirse consigo mismo, además el ADN foráneo solo podrá insertarse en el vector deseado con una sola orientación (Devlin, 2006).

El plásmido se secuenció con los oligonucleótidos SP6 y T7, se obtuvo una similitud de 100% con respecto a la secuencia de la giGH previamente reportada (Ávila-Mendoza y col., 2014). De igual manera, se analizó mediante PCR con los oligonucleótidos previamente utilizados y se observó una banda de aproximadamente 684 pb, por lo cual se verificó de ambas maneras que el plásmido contenía el inserto esperado. Por otro lado, los vectores pGEM-giGH y pCAG-GFP fueron digeridos con las enzimas EcoRI y NotI, los fragmentos de 684 pb y 4784 pb se purificaron por extracción del gel y posteriormente ligados para obtener el plásmido pCAG-giGH, mismo que se utilizó para transfectar células QNR/D y así poder evaluar su capacidad para sintetizar y secretar rgiGH. El plásmido pCAG-giGH se analizó de la misma manera que pGEM-giGH, para conocer si se encontraba el inserto de giGH. Los resultados mostraron un producto de 684 pb en el PCR que presentó el 100% de similitud en el alineamiento de la secuencia con respecto a la giGH reportada (Ávila-Mendoza y col., 2014).

El plásmido generado, pCAG-giGH, contiene el promotor CAG, el cual en estudios previos se conoce que induce a largo plazo altos niveles de expresión de transgenes en diferentes tipos de células, como en la línea de células madre embrionarias de ratón (Alexopoulou y col., 2008; Abe y col., 2011); en células de ovario de hámster chino (CHO) (Niwa y col., 1991); y en la línea celular de carcinoma epitelioide cervical humano (HeLa) (Shoji y col., 1997).

Las células QNR/D fueron transfectadas con el plásmido pCAG-giGH para la expresión de GH recombinante de iguana verde; a su vez también se transfectaron células con el plásmido pCAG-GFP con el propósito de calcular la eficiencia de la transfección, ya que GFP es una proteína muy utilizada como gen reportero debido a su facilidad de poder identificar si fue correctamente expresada (Soboleski y col., 2005). A las 24 horas post transfección se observó que un 26% de las células que

fueron transfectadas con pCAG-GFP acoplaron adecuadamente el gen para su expresión y que a las 48 horas aumentó considerablemente el porcentaje a un 45% de células transfectadas. De acuerdo con los resultados reportados en la producción de rcGH con el plásmido pCAG en células QNR/D, se obtuvo un porcentaje mayor de células transfectadas a las 24 horas en comparación con los resultados obtenidos en este trabajo (Martínez-Moreno y col., 2016).

Las células QNR/D se mantuvieron en las mismas condiciones de incubación previamente reportadas, es decir en DMEM con suero fetal bovino al 10% a una temperatura de 39 °C (Martínez-Moreno y col., 2014; Martínez-Moreno y col., 2016), con el propósito de mantenerlas en un ambiente óptimo para la producción de rgiGH. El suero fetal bovino contiene una gran cantidad de componentes como albúmina, hormonas, factores de crecimiento y nutrientes que ayudan a propiciar el crecimiento de las células (Zheng y col., 2006); sin embargo, para la producción de una proteína recombinante se sugiere utilizar un medio que contenga una menor concentración de proteínas, un medio libre de suero, o un medio químicamente definido, el cual consiste en conocer con exactitud la cantidad de cada uno de los compuestos. Al utilizar un medio que no contenga una cantidad abundante de proteínas, se simplificaría el proceso de purificación y se podría obtener un mayor rendimiento de la proteína de interés. Este tipo de medios son utilizados, por ejemplo, en líneas celulares de hibridoma para la producción de anticuerpos monoclonales (Brunner y col., 2010; Manna y col., 2015) y también se han evaluado para la producción de proteínas recombinantes en la línea celular CHO (Schroder y col., 2003).

Las células QNR/D, al ser una línea celular de células eucariontes, proveerían las condiciones necesarias para obtener el adecuado doblamiento y configuración espacial de la proteína, así como también para llevar a cabo las modificaciones postraduccionales que eventualmente requiera. Se decidió utilizar esta línea celular debido a que la cantidad de GH que generan de manera endógena es muy baja (Martínez-Moreno y col., 2013), por lo cual se podría distinguir fácilmente a la rgiGH sobreproducida de forma inducida. Previamente, esta línea celular se utilizó como sistema de expresión para producir a la hormona de crecimiento recombinante de

pollo (rcGH) (Martínez-Moreno y col., 2016). Los resultados obtenidos en SDS-PAGE/Western Blot mostraron una banda de alrededor de 26 kDa, bajo condiciones reductoras, similar a la hormona de crecimiento de iguana verde purificada y al extracto hipofisiario de iguana verde previamente reportados (Ávila-Mendoza y col., 2014), lo cual indicó que las células QNR/D fueron capaces de producir a la GH recombinante, tanto de iguana como de pollo, y de secretar a la hormona producida al medio extracelular.

En el caso de la cuantificación de rgiGH presente en los medios de cultivo de las células QNR/D, se obtuvo un estimado de la cantidad de proteína inmunorreactiva presente mediante un ELISA indirecto, el cual utiliza un anticuerpo heterólogo dirigido contra GH de pollo, por lo que puede haber cierta variación en la medición. Se ha descrito que el anticuerpo contra GH de pollo es capaz de reconocer a la GH de iguana; sin embargo, para la competencia en el ensayo de ELISA, se requirió de mayor concentración de GH de iguana en comparación a la GH de pollo (Ávila-Mendoza y col., 2014). Por ello, es recomendable desarrollar un anticuerpo homólogo, dirigido específicamente contra la GH de iguana, para contar con un inmunoensayo que permita una cuantificación más precisa. Para lograr este objetivo, ahora se tiene la posibilidad, con la rgiGH producida en cantidades suficientes con el procedimiento desarrollado en este trabajo, de inmunizar conejos y producir antisueros policlonales específicos contra giGH, o bien para producir anticuerpos monoclonales.

Otro aspecto importante de este trabajo fue analizar la bioactividad de la rgiGH producida. Para ello, se realizó un ensayo de proliferación celular utilizando la línea de linfoma de rata Nb2 y midiendo la proliferación con el método de MTT, el cual es un procedimiento confiable, tal como se ha mostrado en diversos estudios que han utilizado esta técnica para medir la bioactividad de GH de humano (Bozzola y col., 1998) y GH canina (Ascacio-Martínez y Barrera-Saldaña, 2004). De acuerdo con los resultados obtenidos, la rgiGH demostró ser bioactiva y capaz de incrementar de manera significativa la proliferación celular de las células Nb2. Sin embargo, es posible que dicho efecto pudiera estar mediado también por el incremento de la

producción de factores de crecimiento que son elaborados por las células QNR/D, en respuesta a la rgiGH que están produciendo. Se sabe que las células QNR/D producen de manera basal diversos factores de crecimiento, tales como IGF-I, BDNF, NTF3, entre otros, y se ha demostrado que cuando las células QNR/D fueron tratadas con rcGH, se provocó un aumento en la expresión de los ARNm de IGF-I y NTF3 (Martínez-Moreno y col., 2013). También se reportó que células QNR/D, que fueron transfectadas con un plásmido para sobreproducir rcGH, mostraron no solo un aumento en la producción de GH sino también un incremento en la expresión de los ARNm de BDNF y NTF3 (Martínez-Moreno y col., 2018), así como en el caso de IGF-I en donde se observó que tanto la expresión de su ARNm como del péptido se incrementaron (Martínez-Moreno y col., 2016). Además, se conoce que IGF-I induce la proliferación celular en cultivos de linfocitos T de humano (Brocardo y col., 2001), NTF3 en oligodendrocitos de rata (McTigue y col., 1998) y BDNF en células del músculo liso de las vías respiratorias de humano (Aravamudan y col., 2012). Estos tres factores son capaces de inducir proliferación en diferentes tipos celulares, por lo cual probablemente también podrían actuar sobre las células Nb2. Los resultados obtenidos en este trabajo mostraron que los medios de células QNR/D transfectadas para producir rgiGH estimularon la proliferación celular aún más que la rGH (Figura 13). Esto podría explicarse porque los medios contenían una dosis mayor de rgiGH que la aplicada en el caso de rGH, o bien porque dichos medios contuvieran una mayor concentración de factores de crecimiento, debido a que la rgiGH podría estar actuando de forma autocrina o paracrina en las células QNR/D y estimulando también la expresión de IGF1, BDNF y NTF3, entre otros factores. Por lo que, el incremento tan notable en la proliferación de las células Nb2 podría ser el resultado combinado del efecto de la propia rgiGH y el de estos factores de crecimiento.

Previamente en nuestro laboratorio, se desarrolló un método de producción de rgiGH en *Pichia pastoris* como sistema de expresión, en el cual se concluyó que al quinto día de inducción con metanol se podía apreciar mediante SDS-PAGE/Western Blot una banda inmunoreactiva de 26 kDa bajo condiciones reductoras que representaba a la rgiGH con base en los controles positivos (Flores, 2014). Sin embargo, en

comparación con el presente trabajo, al utilizar células QNR/D como sistema de expresión, en los resultados obtenidos del SDS-PAGE/Western Blot se observa que desde el primer día después de la transfección se produce rgiGH y que esta aumentó de manera considerable al segundo día (Figura 11). Además, se observó una mayor intensidad en la inmunoreactividad de las bandas a comparación de la rgiGH producida en *Pichia pastoris*; en ambos trabajos se utilizó el mismo anticuerpo contra giGH, por lo cual podríamos deducir que las células QNR/D producen rgiGH con mayor rapidez y rendimiento.

Los resultados de este trabajo muestran que se logró producir la rgiGH en un sistema de expresión constitutiva en células QNR/D y que además se demostró que es bioactiva. La rgiGH producida en las células QNR/D no se encuentra completamente aislada, ya que el medio de las células contiene diversas proteínas que están presentes en el suero fetal bovino o que son producidas por las QNR/D, por lo cual será necesario la purificación de la rgiGH. Con la rgiGH pura se podrían realizar diversos bioensayos para caracterizar la bioactividad de la hormona, así como también se podrán generar anticuerpos específicos y homólogos dirigidos contra GH de iguana, a fin de contar con una herramienta estratégica para profundizar los estudios sobre la fisiología de la GH y del eje somatotrópico en reptiles.

7. CONCLUSIONES

Se desarrolló un sistema recombinante de expresión constitutivo para producir rgiGH utilizando células QNR/D, las cuales fueron capaces de sintetizar y secretar a la hormona de crecimiento recombinante de iguana verde.

El plásmido pCAG-giGH contiene el casete de expresión para giGH que abarca desde el codón de inicio del péptido señal hasta el codón de término, logrando la expresión de su ARNm.

La rgiGH producida por este sistema fue bioactiva, estimulando la proliferación de células Nb2. Se requiere discernir, si el efecto observado fue directo o mediado, indirectamente, por su capacidad para inducir la expresión de otros factores de crecimiento.

Es necesario purificar a la rgiGH producida para analizar su bioactividad en otros bioensayos, así como también para producir anticuerpos específicos y homólogos y para posibles aplicaciones biotecnológicas en el ámbito agropecuario relacionadas con la iguana verde.

8. REFERENCIAS

Abe H, Nakazawa M, Kasuga K, Kojima I, Kobayashi M. The CAG promoter is more active than the CEF promoter for the expression of transgenes in a mouse ES cell line E14-Derived EB3 cells. *Biotechnol Bioeng*. **2011**;25:2301-2304.

Acosta J, Carpio Y, Besada V, Morales R, Sánchez A, Curbelo Y, Ayala J, Estrada MP. Recombinant truncated tilapia growth hormone enhances growth and innate immunity in tilapia fry (*Oreochromis sp.*). *Gen Comp Endocrinol*. **2008**;157:49-57.

Ahumada-Solórzano SM, Carranza ME, Pedernera E, Rodríguez-Méndez AJ, Luna M, Arámburo C. Local expression and distribution of growth hormone and growth hormone receptor in the chicken ovary: Effects of GH on steroidogenesis in cultured follicular granulosa cells. *Gen Comp Endocrinol*. **2012**;175:297-310.

Alba-Betancourt C, Arámburo C, Ávila-Mendoza J, Ahumada-Solórzano SM, Carranza M, Rodríguez-Méndez AJ, Harvey S, Luna M. Expression, cellular distribution and heterogeneity of growth hormone in the chicken cerebellum during development. *Gen Comp Endocrinol*. **2011**;170:528-540.

Alexopoulou AN, Couchman JR, Whiteford JR. The CMV early enhancer/chicken β actin (CAG) promoter can be used to drive transgene expression during the differentiation of murine embryonic stem cells into vascular progenitor. *Cell Biol*. **2008**;9:1-11.

Arámburo C, Carranza M, Sánchez R, Perera G. Partial biochemical and biological characterization of purified chicken growth hormone (cGH). Isolation of cGH charge variants and evidence that cGH is phosphorylated. *Gen Comp Endocrinol*. **1989**;76:330-339.

Arámburo C, Montiel JL, Perera G, Navarrete S, Sánchez R. Molecular isoforms of chicken growth hormone (cGH): different bioactivities of cGH charge variants. *Gen Comp Endocrinol*. **1990**;80:59-67.

Arámburo C, Luna M, Carranza M, Reyes M, Martínez-Coria H, Scanes CG. Growth hormone size variants: changes in the pituitary during development of the chicken. *Proc Soc Exp Biol Med.* **2000**;223:67-74.

Arámburo C, Carranza M, Reyes M, Luna M, Martínez-Coria H, Berumen L, Scanes CG. Characterization of a bioactive 15 kDa fragment produced by proteolytic cleavage of chicken growth hormone. *Endocrine.* **2001**;15:231-240-

Arámburo C, Alba-Betancourt C, Luna M, Harvey S. Expression and function of growth hormone in the nervous system: a brief review. *Gen Comp Endocrinol.* **2014**;203:35-42.

Aravamudan B, Thompson M, Pabelick C, Prakash YS. Brain-derived neurotrophic factor induces proliferation of human airway smooth muscle cells. *J Cell Mol Med.* **2012**;16:812-823.

Arcos-García JL, Cobos-Peralta MA, Reynoso-Rosales VH, Mendoza-Martínez GD, Ortega-Cerilla ME, Clemente-Sánchez F. Growth characterization of black iguana (*Ctenosaura pectinata*) in captivity. *Vet Mex.* **2002**;33:409-419.

Arcos-García JL, Mendoza-Martínez GD, Bárcena Gama R, Espino-Barrost OV, Leyte-Morales GE. Reproductive analysis of *Iguana iguana* females raised in captivity in Oaxaca, Mexico. *Vet Mex.* **2010**;41:251-262.

Ascacio-Martínez JA, Barrera-Saldaña HA. Production and secretion of biologically active recombinant canine growth hormone by *Pichia pastoris*. *Gene.* **2004**;340:261-266.

Ávila-Mendoza J, Carranza M, Pérez-Rueda E, Luna M, Arámburo C. Characterization of pituitary growth hormone and its receptor in the green iguana (*Iguana iguana*). *Gen Comp Endocrinol.* **2014**;203:281-295.

Ávila-Mendoza J, Carranza M, Villalobos P, Olvera A, Orozco A, Luna M, Arámburo C. Differential responses of the somatotrophic and thyroid axes to environmental temperature changes in the green iguana. *Gen Comp Endocrinol.* **2016a**;230:76-86.

Ávila-Mendoza J, Mora J, Carranza M, Luna M, Arámburo C. Growth hormone reverses excitotoxic damage induced by kainic acid in the green iguana neuroretina. *Gen Comp Endocrinol.* **2016b**;234:57-67.

Ávila-Mendoza J, Pérez-Rueda E, Urban-Sosa V, Carranza M, Martínez-Moreno CG, Luna M, Arámburo C. Characterization and distribution of GHRH, PACAP, TRH, SST and IGF1 mRNAs in the green iguana. *Gen Comp Endocrinol.* **2018**;255:90-101.

Ayyar VS. History of growth hormone therapy. *Indian J Endocrinol Metab.* **2011**;15:162-165.

Ber R, Daniel V. Structure and sequence of the growth-encoding gene from *Tilapia nilotica*. *Gene.* **1992**;113:245-250.

Bergan-Roller HE, Sheridan MA. The growth hormone signaling system: insights into coordinating the anabolic and catabolic actions of growth hormone. *Gen Comp Endocrinol.* **2017**;258:119-133.

Berumen LC, Luna M, Carranza M, Martínez-Coria H, Reyes M, Cárabaz A, Arámburo C. Chicken growth hormone: further characterization and ontogenic changes of an N-glycosylated isoform in the anterior pituitary gland. *Gen Comp Endocrinol-* **2004**;139:113-123.

Bozzola M, Zecca M, Locatelli F, Radetti G, Pagani S, Autelli M, Tato L, Chatelain P. Evaluation of growth hormone bioactivity using the Nb2 cell bioassay in children with growth disorders. *J Endocrinol Invest.* **1998**;21:765-770.

Brocardo MG, Schillaci R, Galeano A, Radrizzani M, White V, González-Guerrico A, Santa-Coloma TA, Roldán A. Early effects of insulin-like growth factor-1 in activated human T lymphocytes. *J Leukocyte Biol.* **2001**;70:297-305.

Brunner D, Frank J, Appl H, Schofft H, Pfaller W, Gstraunthaler G. Serum-free cell culture: the serum-free media interactive online database. *Altern Anim Ex.* **2010**;27:1-10.

Canosa LF, Chang JP, Peter RE. Neuroendocrine control of growth hormone in fish. *Gen Comp Endocrinol.* **2007**;151:1-26.

Chung JY, Sunwoo JS, Kim MW, Kim M. The neuroprotective effects of human growth hormone as a potential treatment for amyotrophic lateral sclerosis. *Neural Regen Res.* **2015**;10:1201-1203.

Clark DP, Pazdernik NJ. *Biotechnology*. San Diego: Elsevier, **2016**:359-360.

Cunha NB, Murad AM, Cipriano TM, Araújo AC, Aragao FJ, Leite A, Vianna GR, McPhee TR, Souza GH, Waters MJ, Rech EL. Expression of functional recombinant human growth hormone in transgenic soybean seeds. *Transgenic Res.* **2010**;20:811-826.

Devlin TM. *Bioquímica: libro de texto con aplicaciones clínicas*. 4ta. edición. España: Editorial Reverté, **2006**:289-290.

Dvir S, Velten L, Sharon E, Zeevi D, Carey LB, Weinberger A, Segal E. Deciphering the rules by which 5'-UTR sequences affect protein expression in yeast. *Proc Natl Acad Sci USA.* **2013**;1:2792-2801.

Elinson RP, Stewart JR, Bonneau LJ, Blackburn DG. Amniote yolk sacs: diversity in reptiles and a hypothesis on their origin. *Int J Dev Biol.* **2014**;58:889-894.

Fanjul ML, Fernández F, Fuentes B, González H, Hiriart M, Massieu L, *et al.* *Biología funcional de los animales*. México: Siglo XXI editores, **1998**:256.

Fleming T, Martínez-Moreno, Carranza M, Luna M, Harvey S, Arámburo C. Growth hormone promotes synaptogenesis and protects neuroretinal dendrites against kainic acid (KA) induced damage. *Gen Comp Endocrinol.* **2018**;257:82-92.

Flores B. Producción de hormona del crecimiento recombinante de iguana verde en el sistema *Pichia pastoris*. Tesis de Licenciatura. **2014**. Universidad Autónoma de Querétaro, Querétaro.

Fradkin AH, Boand CS, Eisenberg SP, Rosendahl MS, Randolph TW. Recombinant murine growth hormone from *E. coli* inclusion bodies: expression, high-pressure solubilization and refolding, and characterization of activity and structure. *Biotechnol Prog.* **2010**;26:743-749.

Frohman LA. Growth hormone. En: Squire LR, Ed. Encyclopedia of Neuroscience. Londres: Elsevier, **2009**:993-998.

Frystyk J, Andreassen CM, Fisker S. Determination of free growth hormone. J Clin Endocrinol Metab. **2008**;93:3008-3014.

Funkenstein B, Dyman A, Lapidot Z, Jesus-Ayson EG, Gertler A, Ayson FG. Expression and purification of a biologically active recombinant rabbitfish (*Siganus guttatus*) growth hormone. Aquaculture. **2005**;250:504-515.

Gahete MD, Durán-Prado M, Luque RM, Martínez-Fuentes AJ, Quintero A, Gutiérrez-Pascual E, Córdoba-Chacón J, Malagón MM, Gracia-Navarro F, Castaño JP. Understanding the multifactorial control of growth hormone release by somatotropes. Trends Comp Endocrinol Neurobiol. **2009**;1163:137-153.

Harvey S, Baudet ML, Murphy A, Luna M, Hull KL, Arámburo C. Testicular growth hormone (GH): GH expression in spermatogonia and primary spermatocytes. Gen Comp Endocrinol. **2004**;139:158-167.

Harvey S, Arámburo C, Sanders EJ. Extrapituitary production of anterior pituitary hormones: an overview. Endocrine. **2012**;41:19-30.

Harvey S, Baudet ML, Luna M, Arámburo C. Non-classical signaling of growth hormone in the chick neural retina?. Avian Biol Res. **2014**;7:48-57.

Harvey S, Martínez-Moreno CG, Ávila-Mendoza J, Luna M, Arámburo C. Growth hormone in the eye: a comparative update. Gen Comp Endocrinol. **2016**;234:81-87.

Hattori N. Expression, regulation and biological actions of growth hormone (GH) and ghrelin in the immune system. Growth Horm IGF Res. **2009**;19:187-197.

Hayashida T, Licht P, Nicoll CS. Amphibian pituitary growth hormone and prolactin: immunochemical relatedness to rat growth hormone. Science. **1973**;182:169-171.

Herman-Bonert VS. Growth hormone. En: Melmed S, Ed. The pituitary. Elsevier: Los Angeles, **2011**:83-117.

Hull KL, Harvey S. Growth hormone and reproduction: a review of endocrine and autocrine/paracrine interactions. *Int J Endocrinol.* **2014**;2014:1-24.

Jameson JL, De-Groot LJ, Kretser DM, Giudice LC, Grossman AB, Melmed S, *et al.* *Endocrinology: Adult and Pediatric.* Estados Unidos: Elsevier, **2015**: 386.

Kawaka F, Ngetich A. Plants as expression systems for recombinant proteins. *Asian J Biol.* **2017**;3:1-8.

Khatib N, Gaidhane S, Gaidhane AM, Khatib M, Simkhada P, Gode D, Zahiruddin-Syed Q. Ghrelin: ghrelin as a regulatory peptide in growth hormone secretion. *J Clin Diag Res.* **2014**;8:13-17.

Kozak M. Pushing the limits of the scanning mechanism for initiation of translation. *Gene.* **2002**;299:1-34.

Lara AR. Producción de proteínas recombinantes en *Escherichia coli*. *Rev Mex Ing Quím.* **2011**;10:209-223.

Liang YY, Guo HY, Zhu KC, Zhang N, Yang JW, Sun XX, Jiang SG, Zhang DC. Genomic structure and molecular characterization of growth hormone and its expression response to different feed types in golden pompano *Trachinotus ovatus* (Linnaeus, 1758). *Aquac Res.* **2018**;00:1-14.

Li WS, Lin HR, Wong AO. Effects of gonadotropin-releasing hormone on growth hormone secretion and gene expression in common carp pituitary. *Comp Biochem Physiol.* **2002**;132:335-341.

Lieberman M, Marks AD. *Basic Medical Biochemistry.* 4a edición. Philadelphia: Editorial Lippincott Williams & Wilkins. **2013**;vol.1:802.

Luna M, Huerta L, Berumen L, Martínez-Coria H, Harvey S, Arámburo C. Growth hormone in the male reproductive tract of the chicken: heterogeneity and changes during ontogeny and maturation. *Gen Comp Endocrinol.* **2004**;137:37-49.

Luna M, Barraza N, Berumen L, Carranza M, Pedernera E, Harvey S, Arámburo C. Heterogeneity of growth hormone immunoreactivity in lymphoid tissues and changes during ontogeny in domestic fowl. *Gen Comp Endocrinol.* **2005**;144:28-37.

Luna M, Rodríguez-Méndez AJ, Berumen L, Carranza M, Riesgo-Escovar J, Baudet ML, Harvey S, Arámburo C. Immune growth hormone (GH): localization of GH and GH mRNA in the bursa of Fabricius. *Dev Comp Immunol*. **2008**;32:1313-1325.

Luna M, Rodríguez-Méndez AJ, Luna-Acosta JL, Carranza M, Arámburo C. Expression and function of chicken bursal growth hormone (GH). *Gen Comp Endocrinol*. **2013**;190:182-187.

Luna M, Martínez-Moreno CG, Ahumada-Solórzano MS, Harvey S, Carranza M, Arámburo C. Extrapituitary growth hormone in the chicken reproductive system. *Gen Comp Endocrinol*. **2014**;203:60-68.

Luna-Acosta JL, Aba-Betancourt CL, Martínez-Moreno CG, Ramírez C, Carranza M, Luna M, Arámburo C. Direct antiapoptotic effects of growth hormone are mediated by PI3K/Akt pathway in the chicken bursa of Fabricius. *Gen Comp Endocrinol*. **2015**;224:148-159.

Manna L, Febo T, Armillotta G, Luciani M, Ciarelli A, Salini R, Ventura M. Production of monoclonal antibodies in serum-free media. *Monoclon Antib Immunodiagn Immunother*. **2015**;34: 278-288.

McTigue DM, Horner PJ, Stokes BT, Gage FH. Neurotrophin-3 and brain-derived neurotrophic factor induce oligodendrocyte proliferation and myelination of regenerating axons in the contused adult rat spinal cord. *J Neurosci*. **1998**;18:5354-5365.

Martínez-Coria H, López-Rosales LJ, Carranza M, Berumen L, Luna M, Arámburo C. Differential secretion of chicken growth hormone variants after growth hormone-releasing hormone stimulation *in vitro*. *Endocrine*. **2002**;17:91-102.

Martínez-Moreno CG, Palma L, Carranza M, Harvey S, Arámburo C, Luna M. Cellular distribution of growth hormone in the adult chicken testis. *Gen Comp Endocrinol*. **2011**;172:344-357.

Martínez-Moreno CG, Andres A, Giterman D, Karpinski E, Harvey S. Growth hormone and retinal ganglion cell function: QNR/D cells as an experimental model. *Gen Comp Endocrinol.* **2013**;195:183-189.

Martínez-Moreno CG, Giterman D, Henderson D, Harvey S. Secretagogue induction of GH release in QNR/D cells: Prevention of cell death. *Gen Comp Endocrinol.* **2014**;203:274-280.

Martínez-Moreno CG, Ávila-Mendoza J, Wu Y, Arellanes-Licea EC, Louie M, Luna M, Arámburo C, Harvey S. Neuroprotection by GH against excitotoxic-induced cell death in retinal ganglion cells. *Gen Comp Endocrinol.* **2016**;234:68-80.

Martínez-Moreno CG, Fleming T, Carranza M, Ávila-Mendoza J, Luna M, Harvey S, Arámburo C. Growth hormone protects against kainate excitotoxicity and induces BDNF and NT3 expression in chicken neuroretinal cells. *Exp Eye Res.* **2018**;166:1-12.

Matsuda T, Cepko CL. Electroporation and RNA interference in the rodent retina *in vivo* and *in vitro*. *Proc Natl Acad Sci USA.* **2004**;101:16-22.

Mazurowski A, Frieske A, Kokoszynski D, Mroczkowski S, Bernacki Z, Wilkanowska A. Examination of growth hormone (GH) gene polymorphism and its association with body weight and selected body dimensions in ducks. *Folia Biologica.* **2015**;63:43-50.

Millefanti M. La iguana. Ciudad de México: De Vecchi Ediciones, **2016**:13-15.

Mukhopadhyay UK, Sahni G. Production of recombinant buffalo (*Bubalus buablis*) and goat (*Capra hircurs*) growth hormones from genetically modified *E. coli* strains. *J Biotechnol.* **2002**;97:199-212.

Muñoz EM, Ortega AM, Bock BC, Páez VP. Demografía y ecología de anidación de la iguana verde, *Iguana iguana* (Squamata: Iguanidae), en dos poblaciones explotadas en la Depresión Momposina, Colombia. *Rev Biol Trop.* **2003**;51:229-240.

Niwa H, Yamamura K, Miyazaki J. Efficient selection for high-expression transfectants with a novel eukaryotic vector. *Gene.* **1991**;108:193-200.

Noso T, Valentine A, Kawauchi H. Complete amino acid sequence of crocodile growth hormone. *Gen Comp Endocrinol.* **1995**;98:244-252.

Overton TW. Recombinant protein production in bacterial hosts. *Drug Discov Today.* **2014**;19:590-601.

Pessac B, Girard A, Romey G, Crisanti P, Lorinet AM, Calothy G. A neural clone derived from a Rous sarcoma virus-transformed quail embryo neuroretina established culture. *Nature.* **1983**;302:616-618.

Pormehr LA, Pourkazemi M. Production of recombinant great sturgeon (*Huso huso*, Linnaeus, 1758) growth hormone (GH) by *Pichia pastoris* (Guillierm, 1956). *J Appl Ichtyol.* **2015**;31:609-613.

Rabindran S, Stevenson N, Roy G, Fedorkin O, Skarjinskaia M. Plant-produced human growth hormone shows biological activity in a rat model. *Biotechnol Prog.* **2009**;25:530-534.

Rodríguez-Méndez AJ, Luna-Acosta JL, Carranza M, Harvey S, Arámburo C, Luna M. Growth hormone expression in stromal and non-stromal cells in the bursa of Fabricius during bursal development and involution: causal relationships? *Gen Comp Endocrinol.* **2010**;167:297-307.

Salamone D, Barañao L, Santos C, Bussmann L, Artuso J, Werning C, Prync A, Carbonetto C, Dabsys S, Munar C, Salaberry R, Berra G, Berra I, Fernández N, Papouchado M, Foti M, Judewicz N, Mujica I, Muñoz L, Fernández-Álvarez S, González E, Zimmermann J, Criscuolo M, Melo C. High level expression of bioactive recombinant human growth hormone in the milk of a cloned transgenic cow. *J Biotechnol.* **2006**;124:469-472.

Sánchez A, Gadea J. Animales transgénicos para producción de proteínas humanas. *An Vet.* **2014**;30:7-18.

Sanders EJ, Parker E, Arámburo C, Harvey S. Retinal growth hormone is an anti-apoptotic factor in embryonic retinal ganglion cell differentiation. *Exp Eye Res.* **2005**;81:551-560.

Scherf B. Watch list for domestic animal diversity. Tercera edición. Roma;FAO, **2000**;699-700.

Schroder M, Matischak K, Friedl P. Serum and protein free media formulations for the Chinese hamster ovary cell line DUKXB11. *J Biotechnol.* **2003**;108: 279-292.

Shoji I, Aizaki H, Tani H, Ishii K, Chiba T, Saito I, Miyamura T, Matsuura Y. Efficient gene transfer into various mammalian cells, including non-hepatic cells, by baculoviral vector. *J Gen Virol.* **1997**;78:2657-2664.

Soboleski MR, Oaks J, Halford WP. Green fluorescent protein is a quantitative reporter of gene expression in individual eukaryotic cells. *FASEB J.* **2005**;19:440-442.

Sperling MA. Traditional and novel aspects of the metabolic actions of growth hormone. *Growth Horm & IGF Res.* **2015**;28:69-75.

Stephen C, Pasachnik S, Reuter A, Mosig P, Ruyle L, Fitzgerald L. Survey of status, trade and exploitation of Central American Iguanas. *Convention on international trade in endangered species of wild flora and fauna.* **2012**;25.

Tanner JM. Human growth hormone. *Nature.* **1972**;237:433-439.

Tong J, D'Alessio D, Ramisch J, Davis HW, Stambrook E, Tschop MH, Bidlingmaier M. Ghrelin stimulation of growth hormone isoforms: parallel secretion of total and 20 kDa growth hormone and relation to insulin sensitivity in healthy humans. *J Clin Endocrinol Metab.* **2012**;97:3366-3374.

Wu Y, Liu C, Sun H, Vijayakumar A, Raeisi P, Qiao R, Oppenheimer J, Yakar S, LeRoith D. Growth hormone receptor regulates β cell hyperplasia and glucose-stimulated insulin secretion in obese mice. *J Clin Invest.* **2011**;121:2422-2426.

Yada T, Tetsuya H. Inhibition of growth hormone synthesis by somatostatin in cultured pituitary of rainbow trout. *J Comp Physiol.* **1992**;162:575-580.

Yasuda A, Yamaguchi K, Papkoff H, Yokoo Y, Kawauchi H. Complete amino acid sequence of growth hormone from the sea turtle (*Chelonia mydas*). *Gen Comp Endocrinol.* **1989**;73:242-251.

Yin Y, Li Y, Zhang W. The growth hormone secretagogue receptor: its intracellular signaling and regulation. *Int J Mol Sci.* **2014**;15:4837-4855.

Zheng X, Baker H, Hancock WS, Fawaz F, McCaman M, Pungor E. Proteomic analysis for the assessment of different lots of fetal bovine serum as a raw material for cell culture. *Biotechnol Prog.* **2006**;22:1294-1300.