



CENTRO DE INVESTIGACIONES BIOLÓGICAS
DEL NOROESTE, S.C.

Programa de Estudios de Posgrado

“Caracterización del DNAc de la hormona de crecimiento de *Lutjanus peru* y su producción en *Chlorella sorokiniana* y *Pichia pastoris*.”

TESIS

Que para obtener el grado de

Maestro en Ciencias

Uso, Manejo y Preservación de los Recursos Naturales
(Orientación Biotecnología)

Presenta

Héctor Daniel Garza Avelar

La Paz, Baja California Sur, Abril de 2015.

ACTA DE LIBERACION DE TESIS

En la Ciudad de La Paz, B. C. S., siendo las 14:00 horas del día 6 del Mes de Abr. del 2015, se procedió por los abajo firmantes, miembros de la Comisión Revisora de Tesis avalada por la Dirección de Estudios de Posgrado del Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, S. C., a liberar la Tesis de Grado titulada:

"Caracterización del DNAc de la hormona de crecimiento de *Lutjanus peru* y su producción en *Chlorella sorokiniana* y *Pichia pastoris*."

Presentada por el alumno:

Héctor Daniel Garza Avelar

Aspirante al Grado de MAESTRO EN CIENCIAS EN EL USO, MANEJO Y PRESERVACION DE LOS RECURSOS NATURALES CON ORIENTACION EN Biotecnología

Después de intercambiar opiniones los miembros de la Comisión manifestaron su **APROBACION DE LA TESIS**, en virtud de que satisface los requisitos señalados por las disposiciones reglamentarias vigentes.


Dra. Gracia A. Gómez Anduro

DIRECTORA DE TESIS

LA COMISION REVISORA


Dr. Hugo Barrera Saldaña

CO-TUTOR


Dr. Felipe Ascencio Valle

CO-TUTOR


DRA. ELISA SERVIERE ZARAGOZA,
DIRECTORA DE ESTUDIOS DE POSGRADO
Y FORMACION DE RECURSOS HUMANOS

COMITÉ TUTORIAL

Directora de Tesis:

Dra. Gracia Alicia Gómez Anduro
Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste S.C.

Co-tutor:

Dr. Felipe Ascencio Valle
Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste S.C.

Co-tutor:

Dr. Hugo Barrera Saldaña
Universidad Autónoma de Nuevo León.

COMITÉ REVISOR DE TESIS

Dra. Gracia Alicia Gómez Anduro
Dr. Felipe Ascencio Valle
Dr. Hugo Barrera Saldaña

JURADO DE EXAMEN DE GRADO

Dra. Gracia Alicia Gómez Anduro
Dr. Felipe Ascencio Valle
Dr. Hugo Barrera Saldaña

Suplente

Dr. Ricardo Vázquez Juárez

RESUMEN

El huachinango (*Lutjanus peru*), es un pez con gran potencial comercial que habita desde las costas del sur de California hasta el norte de Perú, su cultivo se ha ido intensificando a medida que se ha cerrado su ciclo de cultivo en cautiverio observando que obtiene su madurez sexual a los 3 años. Para la obtención de cultivos de mayor peso y talla se ha utilizado la aplicación de hormona de crecimiento (GH del inglés de Growth Hormone) recombinante, lo que ha llevado al desarrollo de patentes con un gran potencial comercial. Para la producción de GH se utilizan sistemas de producción entre los que destaca *E. coli* por su facilidad de manipulación, el conocimiento de su genoma y los costos de producción. Sin embargo presenta desventajas a la hora de realizar modificaciones post-traduccionales, esenciales para la actividad biológica de las GH. Por otra parte, organismos como *P. pastoris* y *C. sorokiniana* representan una alternativa viable para la producción de GH recombinantes, entre otros metabolitos de interés industrial, pues ya se ha probado que tienen la capacidad de producir hormonas de crecimiento de mamíferos (humano, perro, gato, caballo, cerdo, entre otros) y de peces con actividad biológica. Es por ello que el objetivo de este trabajo fue el de caracterizar el DNAc de la hormona de crecimiento de *L. peru* (LpGH) y producirlo empleando *Pichia pastoris* y *Chlorella sorokiniana* como sistemas para la obtención de proteínas recombinantes. A partir de RNA total de pituitaria de *L. peru*, se aisló un DNAc de 1025 pb que codifica para una proteína de 203 aa, 23 KDa y punto isoelectrico de 6.89, el gen se obtuvo de gDNA y consta de 2 Kb de regiones intrón. La región codificante de la proteína madura se insertó en el vector de clonación pMDC32 para la transformación por balística de *C. sorokiniana* y pPIC9 para la transformación de *P. pastoris*. Se comprobó mediante pruebas moleculares (PCR) la transformación genética de ambos sistemas y se evaluó la producción de la proteína recombinante en geles de poliacrilamida al 12% teñido con azul de coomassie y la detección de la misma por western blot. Por lo que este trabajo sienta las bases para una aplicación de la LpGH para determinar el efecto de la misma para propósitos prácticos.

Palabras clave: DNAc, hormona de crecimiento, transcriptoma, *P. pastoris*, *C. sorokiniana*, *L. peru*.

ABSTRACT

The red snapper (*Lutjanus peru*), is a high commercial potential fish that inhabits from southern California to northern Peru. Its culture has been intensified as it has closed its growing cycle in captivity, where it has been observed it reaches sexual maturity in 3 years. To produce crops with higher weight and height the recombinant growth hormone (GH) has been applied, leading to the development of commercial patents. To produce GH production systems as *E. coli* have been used because of its easy handling, knowledge of its genome, and production costs. However, it has the disadvantage of making post-translational modifications, essential to GH biological activity. Moreover, organisms such as *Pichia pastoris* and *Chlorella sorokiniana* represent a viable alternative for the production of recombinant GH, among other metabolites of industrial interest, as it has already been proven they have the ability of producing mammalian (human, dog, cat, horse, pig, etc.) and fish growth hormones with biological activity. That is why the aim of this study was to characterize the DNAC of *L. peru* growth hormone (LpGH) and produce it using *P. pastoris* and *C. sorokiniana* as systems for the production of recombinant proteins. From the total RNA of the pituitary gland of *L. peru* a 1025 bp DNAC encoding a protein of 203 aa, 23 kDa and isoelectric point of 6.89 was characterized. The gene was obtained from gDNA and had 2 Kb of intron regions. The coding region of the mature protein was inserted into the pMDC32 and pPIC9 cloning vector for ballistic transformation of both *C. sorokiniana* *P. pastoris*, respectively. The genetic transformation of both systems was checked by molecular tests (PCR) and the production of recombinant protein was evaluated in polyacrylamide gels at 12% coomassie blue stain and the detection thereof by western blot. This work provides the basis for an application of the LpGH to determine its effect for practical purposes.

Key words: DNAC, growth hormone, transcriptome, *Pichia pastoris*, *Chlorella sorokiniana*, *Lutjanus peru*.

DEDICATORIA

A mi madre, por su lucha incansable para hacer de mí un mejor hombre y darme todo lo que puede a base de sacrificio.

A mi padre, por demostrarme su fuerza e inteligencia y saber cómo usar el sentido común.

A mi hermana, por alegrarme los días a la hora de la comida 😊.

Los amo.

AGRADECIMIENTOS

Al Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste por permitirme realizar mis estudios de maestría y el acceso a sus instalaciones para lograr dicho cometido.

A Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología por la beca otorgada.

Al proyecto SEP-CONACYT 156563

A la Universidad Autónoma de Nuevo León por abrirme las puertas para realizar mi estancia de investigación en el Departamento de Bioquímica y Medicina Molecular de la Facultad de Medicina.

A la Dra. Gracia Gómez Anduro, por permitirme formar parte de este trabajo y por confiar en mí desde el 2010 cuando llegué a hacer mi verano; por todos sus consejos y palabras de ánimo en los momentos más difíciles.

Al Dr. Felipe Ascencio Valle, por su confianza y paciencia para sacar adelante este proyecto.

Al Dr. Hugo Alberto Barrera Saldaña, por recibirme en el Departamento de Bioquímica y Medicina Molecular de la UANL y por la motivación extra que imprime en cada charla.

Al M.C. Mario Arce Montoya, por su grandísimo e invaluable apoyo, sugerencias, críticas y regaños y por la constante formación que ha realizado en mí y por considerarme su hijo académico.

A la Dra. Analí Gamez Escobedo, quien me recibió en su laboratorio en la Escuela de Ciencias Biológicas de la Universidad Autónoma de Coahuila unidad Torreón, y que además me asesoró en los momentos más difíciles.

Al Dr. Jorge Ascacio Martínez, por todo el apoyo brindado por mi paso en Bioca, sus consejos, asesorías, paciencia y por darme ánimos para continuar cuando me veía más desesperado.

Al M.C. Julio Hernández Gonzales, por todo el apoyo para lograr obtener parte muy importante de este trabajo y por soportar mi desorden en el laboratorio de Biología Molecular de Plantas.

A la Dra. Martha Reyes Becerril, quien me proporcionó el material biológico inicial, me abrió las puertas del laboratorio de Patogénesis Microbiana y también soportó mi desorden.

A la Dra. Sugey Sinagawa por permitirme realizar un valioso trabajo en el Laboratorio de Biotecnología de la Facultad de Agronomía de la Universidad Autónoma de Nuevo León, así mismo al QBP. Josué Martínez Morales, responsable técnico de este laboratorio quien brindó muchas facilidades para el cumplimiento de este objetivo.

Al M.C. Mario Rojas Arzaluz, quien me aconsejó en las buenas y en las malas y de quien debo aprender muchísimo.

Al laboratorio de Biotecnología Vegetal por las facilidades brindadas para trabajar.

A la M.C. Diana Dorantes por la edición del resumen de ésta tesis y todos los trabajos que lo requirieron durante la maestría.

Al M.C. Milton Spanopoulos, quien consiguió huachinangos que se emplearon en este estudio.

A mis compañeros de maestría, con quienes pasé momentos inolvidables, sin duda alguna excelentes personas Pau, Peter, Betsy, Kike, Sergio, Paloma, Marcelo, Luisito, Bryan, Eli, Tom, Angelica, Cristina y Cristinita, Edisa, Jose Angel, Daniel, Samuel, Denise, Cinthya,

A mis amigos Caro, Kao y Raz que siempre me han acompañado, aconsejado y me pichan las quesadillas de la parcelita, con quienes en estos poco más de dos años compartí grandes momentos y siempre están a disposición para ayudar en las buenas y en las malas.

A los Likelyhoods, debimos ser campeones.

A mis amigos de toda la vida David, Edwin, Beto, Pavel, Mona, Shore, Cristo, con quienes se puede pasar el mejor rato, las mejores risas, los mejores momentos, con quienes se comparten alegrías, tristezas y frustraciones.

A toda mi familia, quienes estuvieron al pendiente de mí mientras estuve fuera, en especial a mis tías Verónica y Griselda.

ACTA DE LIBERACION DE TESIS.....	ii
Comité Tutorial.....	iii
RESUMEN	iv
ABSTRACT	v
DEDICATORIA	vi
AGRADECIMIENTOS.....	vii
LISTA DE FIGURAS.....	xv
1. INTRODUCCIÓN.....	1
2. ANTECEDENTES	3
2.1. Biología de <i>lutjanus peru</i>	3
2.2. Características de las hormonas de crecimiento	3
2.2.1. Familia de las hormona de crecimiento y la prolactina.....	4
2.2.2. Efectos de la GH en el sistema inmune en peces	5
2.3. Sistemas de producción de proteínas recombinantes	5
2.3.1. Bacterias.....	6
2.3.2. Levaduras	7
2.3.3. Ventajas de <i>P. pastoris</i> como sistema de expresión de proteínas recombinantes.....	9
2.3.3.1. Producción de hormona de crecimiento recombinante en <i>P. pastoris</i> 12	
2.3.3.2. El sistema de expresión pPIC9.....	13
2.3.4. Microalgas como biorreactores.....	13
2.3.5. Características de <i>Chlorella</i>.....	15
2.3.5.1. Producción de proteínas recombinantes en <i>Chlorella</i>.....	15

2.3.6. Comparación entre sistemas de expresión de proteínas recombinantes.....	16
3. JUSTIFICACIÓN	18
4. HIPÓTESIS	18
5. OBJETIVOS	18
5.1. Objetivo general	18
5.2. Objetivos específicos	18
6. MATERIALES Y MÉTODOS.....	19
6.1. Material biológico.....	19
6.2. Aislamiento de cerebros de L. peru.....	19
6.3. Diseño de primers degenerados.....	19
6.4. Extracción y evaluación de la calidad de ADN genómico	21
6.5. Extracción y evaluación de la calidad de ARN total.....	21
6.6. Síntesis de DNAc.....	22
6.7. Obtención de un fragmento de la secuencia de la LpGH.	22
6.8. Ligación de la secuencia en el vector pGEM-T Easy	23
6.9. Preparación y transformación de células competentes de E. Coli Top 10 23	
6.10. Selección de transformantes y PCR de colonia.....	25
6.11. Secuenciación y análisis de productos de PCR	25
6.12. Diseño de primers para RACE	26
6.13. Síntesis de DNAc-RACE	26
6.14. Obtención de la secuencia completa del DNAc de la LpGH	28
6.15. Evaluación de posibles regiones de intrón en la secuencia del gDNA de LpHG	29

6.16.	Obtención del ORF de la LpGH.....	29
6.17.	Comparación de la secuencia de aminoácidos de la LpGH con otras GH de peces	30
6.18.	Recombinación del vector pCR8::LpGH-ORF al vector pMDC32	31
6.19.	Caracterización de la construcción pMDC32::LpGH	32
6.20.	Transformación genética de <i>C. sorokiniana</i> por biobalística	33
6.20.1.	Preparación de las micropartículas	33
6.20.2.	Recubrimiento de las partículas de oro con el DNA a introducir ...	33
6.20.3.	Bombardeo.....	34
6.21.	Extracción de DNA genómico de <i>C. sorokiniana</i>	35
6.22.	Confirmación, Selección y aislamiento de clonas transformadas de <i>C. sorokiniana</i>	36
6.23.	Diseño de primers para la clonación de la secuencia de LpGH-ORF en el vector pPIC9	36
6.24.	Clonación de la secuencia de LpGH-ORF en el vector pPIC9.....	37
6.25.	Preparación y transformación de células electrocompetentes de <i>P. pastoris</i> con la construcción pPIC9::LpGH mediante electroporación.....	39
6.26.	Caracterización de las clonas transformadas de <i>P. pastoris</i>	40
6.27.	Preparación de clonas de <i>P. pastoris</i> para la producción de rLpGH	41
6.28.	Inducción de la expresión de rLpGH en <i>P. pastoris</i>	41
6.29.	Extracción de proteínas de <i>P. pastoris</i> y <i>C. sorokiniana</i>	42
6.30.	Cuantificación de proteína total por el método de Bradford.....	42
6.31.	Electroforesis en geles de poliacrilamida-SDS	43
6.32.	Western blot para la detección de His tag en rLpGH.....	43
7.	RESULTADOS.....	45

7.1. Concentración y calidad del ARN total	45
7.2. Diseño de primers degenerados.....	46
7.3. Obtención de un fragmento interno de la GH de L. peru.....	48
7.4. Caracterización de 380 pb del DNAC de GH de L. peru.....	49
7.5. Análisis de secuencias de L. peru	49
7.6. Diseño de primers para RACE	50
7.7. Amplificaciones 5´ y 3´ RACE	50
7.8. Inferencia de la estructura del gen de LpGH	53
7.9. Análisis de secuencias de los productos de PCR-RACE y obtención del ORF de la LpGH.....	54
7.10. Análisis de la secuencia de aminoácidos de la LpGH con otras especies de peces.....	57
7.11. Recombinación de la LpGH-ORF con el vector pMDC32	60
7.12. Caracterización de la construcción pMDC32::LpGH	61
7.13. Transformación genética de C. sorokiniana, selección y confirmación de transformantes.....	62
7.14. Evidencia de la clonación de la secuencia de LpGH-ORF en el vector pPIC9	65
7.15. Confirmación de la transformación de células de P. pastoris por electroporación y caracterización por PCR.....	68
7.16. Inducción de la expresión de la rLpGH, cuantificación de proteínas totales y electroforesis en geles de poliacrilamida-SDS.....	69
7.17. Western blot	75
8. DISCUSIÓN.....	76
9. CONCLUSIONES.....	81

10. LITERATURA CITADA..... 82

LISTA DE TABLAS

Tabla 1.- Ventajas y desventajas de <i>E. coli</i> como sistema de expresión	6
Tabla 2.- Problemas de la producción de proteínas heterólogas en <i>E. coli</i>	7
Tabla 3.- Principales proteínas producidas en <i>P. pastoris</i>	10
Tabla 4.- Hormonas de crecimiento producidas en <i>P. pastoris</i>	12
Tabla 5.- Métodos de transformación de especies de <i>Chlorella</i>	16
Tabla 6.- Características de los sistemas de expresión	17
Tabla 7.- Nombre y características de primers.....	20
Tabla 8.- Reacción de ligación del producto de PCR.....	23
Tabla 9.- Buffer de síntesis de primera cadena de DNAC-RACE.	26
Tabla 10.- Reacción para preparar el DNAC-RACE.	27
Tabla 11.- Reacción de síntesis específica de 5'-DNAC y 3'-DNAC.....	27
Tabla 12.- Reacción de recombinación	31
Tabla 13.- Condiciones de transformación de <i>C. sorokiniana</i>	35
Tabla 14.- Datos de cuantificación de RNA	45
Tabla 15.- Porcentaje de identidad de la secuencia de aminoácidos de la LpGH con otras hormonas de crecimiento	49
Tabla 16.- Datos de la calidad y pureza del DNA plasmídico.	53
Tabla 17.- Datos de la concentración de DNA plasmídico	61
Tabla 18.- Datos de concentración de proteínas en medio de cultivo secretadas por <i>P. pastoris</i>	70
Tabla 19.- Datos de concentración de proteínas en extracto celular de <i>P. pastoris</i>	71

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.- Proceso de clonación del ORF de la LpGH en el vector pCR8 y su recombinación en el vector pMDC32.	31
Figura 2.- T-DNA del vector pMDC32::LpGH y sus sitios de restricción	32
Figura 3.- Construcción del casete de expresión pPIC9::LpGH.....	37
Figura 4.- RNA total de L. peru.	46
Figura 5.- Alineamiento de secuencias de hormonas de crecimiento	48
Figura 6.- Fragmento de 615 pb.....	48
Figura 7.- Fragmento de 380 pb.....	48
Figura 8.- PCR de colonia de E. coli.	49
Figura 9.- Ubicación de los primers para RACE en la secuencia parcial de la LpGH.....	50
Figura 10.- Amplificación de 5' y 3'-RACE.	51
Figura 11.- PCR anidado de la reacción de 3'-RACE.....	51
Figura 12.- PCR de colonia de la reacción 3'-RACE.....	52
Figura 13.- PCR de colonia de la reacción 5'-RACE.....	52
Figura 14.- Extracción de DNA plasmídico de E. coli.....	53
Figura 15.- Comparación de productos de PCR entre DNAc y gDNA para la inferencia de la existencia de intrones dentro de la secuencia de la LpGH.	54
Figura 16.- Secuencia de aminoácidos y primers que flanquean el ORF de la LpGH.....	56
Figura 17.- Amplicones obtenidos del ORF de la LpGH	56
Figura 18.- PCR de colonia del vector pCR8::LpGH-ORF.	56
Figura 19.- Alineamiento de secuencia de aminoácidos de la LpGH con distintas hormonas de crecimiento de peces.	58
Figura 20.- Árbol filogenético.	59
Figura 21.- PCR de colonia del vector pMDC32::LpGH-ORF.	60
Figura 22.- DNA plasmídico pMDC32::LpGH::ORF.	60
Figura 23.- Caracterización de la construcción pMDC32::LpGH.....	62
Figura 24.- Selección día 3 después de la inoculación.	63

Figura 25.- Selección día 6 después de la inoculación	63
Figura 26.- DNAg de <i>C. sorokiniana</i>	64
Figura 27.- PCR de DNAg de <i>C. sorokiniana</i> con primers universales	64
Figura 28.- PCR de DNAg de <i>C. sorokiniana</i> con primers específicos	65
Figura 29.- Amplicón obtenido con los primers de clonación de LpGH en el vector pPIC9.....	66
Figura 30.- Digestión del vector pPIC9 y del amplicón de LpGH con las enzimas XhoI y AvrII.....	66
Figura 31.- Confirmación de la transformación de <i>E. coli</i> con la construcción pPIC9::LpGH.....	67
Figura 32.- Extracción de DNA plasmídico de <i>E. coli</i>	68
Figura 33.- PCR de colonia de las clonas transformadas con la construcción pPIC9::LpGH de <i>P. pastoris</i>	69
Figura 34.- Gráfica de calibración de curva estándar con BSA.....	70
Figura 35.- SDS-PAGE de la clona WT con las diferentes horas de inducción y el origen de la proteína (extracto celular o medio de cultivo).....	72
Figura 36.- SDS-PAGE de la clona C-2 con las diferentes horas de inducción y el origen de la proteína (extracto celular o medio de cultivo).....	72
Figura 37.- SDS-PAGE de la clona C-15 con las diferentes horas de inducción y el origen de la proteína (extracto celular o medio de cultivo).....	73
Figura 38.- SDS-PAGE de la clona C-16 con las diferentes horas de inducción y el origen de la proteína (extracto celular o medio de cultivo).....	74
Figura 39.- SDS-PAGE de la clona C-17 con las diferentes horas de inducción y el origen de la proteína (extracto celular o medio de cultivo).....	74
Figura 40.- Western blot de la clona C-16.	75

1. INTRODUCCIÓN

La producción de proteínas recombinantes se lleva a cabo en diferentes sistemas de expresión entre los que destacan las bacterias: *Escherichia coli* y *Bacillus subtilis*; levaduras como *Pichia pastoris* y *Sacharomyces cerevisiae*; células de insecto como *Spodoptera frugiperda*, células de mamífero como las células del ovario del hámster chino, el empleo de animales transgénicos como vacas, puercos, cabras u ovejas y plantas (Demain and Vaishnav 2009). Los factores más importantes para considerar la elección del sistema de expresión correcto para la producción de proteínas recombinantes son la calidad de la proteína, su funcionalidad, la velocidad de producción y el rendimiento.

Aproximadamente el 30% de la industria de la producción de proteínas recombinantes está dominada por *E. coli* que presenta ciertas ventajas sobre sus competidores, tal como poseer un rápido ciclo de vida, genoma completamente secuenciado y diversos vectores para la expresión de proteínas recombinantes, existiendo un vasto conocimiento de su fisiología y metabolismo. Sin embargo, no todos los sistemas de expresión son adecuados para producir cualquier tipo de proteína. Así como *E. coli* posee sus bondades, también presenta ciertas desventajas en la producción de proteínas complejas de origen animal. Por ejemplo, no posee la capacidad de realizar modificaciones pos-traduccionales, puentes disulfuro, las proteínas obtenidas generalmente vienen acompañadas de endotoxinas por lo que requieren pasos extras de purificación y las proteínas pueden ser sintetizadas como cuerpos de inclusión (Demain and Vaishnav 2009).

Entre las nuevas opciones de organismos modelo para la expresión de proteínas recombinantes también se cuenta con las microalgas, las cuales se emplean en la producción de proteínas de interés farmacéutico, biotecnológico, alimenticio y terapéutico. Las microalgas como *Chlorella* poseen ventajas sobre los modelos de expresión procaríotas, células de insecto y de mamífero, pues además de que su cultivo y mantenimiento son relativamente de bajo costo, pueden actuar como organismos autótrofos y heterótrofos, tienen la capacidad de producir proteínas

complejas de gran tamaño con puentes disulfuro, poseen un bajo riesgo de contaminación con patógenos animales, tienen la capacidad de realizar un plegamiento y ensamblaje adecuado de las proteínas, su escalamiento es fácil y lo más importante: pueden realizar modificaciones pos traduccionales adecuadas (Demain and Vaishnav 2009). En particular la levadura metilotrónica *P. pastoris* ha demostrado ser un excelente sistema para la producción de proteínas recombinantes de mamíferos en un medio extracelular, reportándose rendimientos por encima de los 1.5 g/L de proteínas como insulina, interleucina 2y factor de necrosis tumoral, entre otras proteínas heterólogas, así como hormonas de crecimiento (GHs).

Las GHs de peces, son proteínas producidas por la pituitaria en el cerebro de los teleosteos, que poseen N-glicosilaciones (Sato et al. 1988) (O-glicosilación en el caso de la de humano (Bustamante et al. 2009, Sato et al. 1988) y un peso aproximado entre 21 y 24 kDa. Actualmente ya se han descrito glicosilaciones en hormonas de crecimiento de peces como *Sparus aurata* y *Thunnus thynnus* (Sato et al. 1988), lo que sugiere que esta modificación pos-traduccional sea necesaria para el buen funcionamiento de la hormona. El modelo de estudio de éste trabajo es el huachinango (*Lutjanus peru*), el cual es un pez que habita zonas tropicales y sub tropicales del Océano Pacífico desde la península de Baja California hasta las costas del norte de Perú. Su tasa de crecimiento no está bien documentada, pero se sabe que obtiene su madurez sexual a los 3 años, alcanzando tallas de hasta 1 m en 10 años. A diferencia de peces de interés comercial, el conocimiento del genoma de esta especie es muy limitado, y del transcriptoma solamente se conocen 20 EST's (Por sus siglas en inglés de: Expressed Sequences Tags), por lo que la caracterización del gen de la hormona de crecimiento y la producción de la proteína en microalga (*C. sorokiniana*) y levadura (*P. pastoris*) contribuirá al conocimiento del transcriptoma de la especie y se asentará una base importante para la producción de metabolitos de interés científico y biotecnológico.

2. ANTECEDENTES

2.1. Biología de *Lutjanus peru*

El pargo rojo del pacífico o huachinango es una especie de interés comercial que habita desde las costas del noroeste mexicano (Pacífico y Golfo de California) hasta las del norte de Perú. En la etapa de juvenil habita en estuarios y bocas de ríos, mientras que la localización de especies adultas abarca desde los 30 hasta los 100 m de profundidad en zonas rocosas o arrecifes principalmente. Su abundancia está influenciada por la temperatura de la superficie marina. Se considera un pez carnívoro, como todos los miembros de la familia *Lutjanidae*, alimentándose básicamente de organismos bentónicos, así como de cangrejos, langostinos, calamares, medusas y peces de pequeño tamaño (Rojas M. et al. 2004). Alcanzan su madurez sexual en promedio a los 29.5 cm de longitud (Rojas-Herrera 2001) y sus patrones reproductivos parecen depender del tamaño de las poblaciones y de su distribución a lo largo del margen continental (Grimes 1987). Sin embargo, pese a su importancia, es una especie de la cual se conoce poco, pues las investigaciones en esta especie han sido enfocadas en el manejo reproductivo y primera alimentación. Existen muy escasos trabajos de biología molecular y genómica de este organismo, llegando a encontrarse en bases de datos únicamente tres secuencias parciales de mRNAs de proteínas involucradas en procesos metabólicos y 20 secuencias parciales de rRNAs.

2.2. Características de las hormonas de crecimiento

La hormona de crecimiento (GH, de sus siglas en inglés *growth hormone*) es una hormona pluripotente producida en la glándula pituitaria tanto en el cerebro de los teleósteos, como en el de otros vertebrados (Reinecke et al. 2005, Sanders and Harvey 2004). En los peces, la GH participa en casi todos los procesos fisiológicos en el cuerpo, incluyendo la regulación del balance iónico y osmótico, en el metabolismo de los lípidos, proteínas y carbohidratos, en el crecimiento del tejido blando y esquelético, en la reproducción y en funciones inmunes. Diversos estudios han indicado que la GH afecta diversos aspectos del comportamiento,

incluyendo el apetito, la agresión y la evasión de depredadores, lo que a su vez trae consecuencias ecológicas (Devlirr 1993, Hew et al. 1989, Reinecke et al. 2005).

Se sabe bien que la GH puede ser producida en diversos sitios diferentes a la pituitaria, donde puede participar como un factor de crecimiento local o como citosina en la regulación autócrina/parácrina de la diferenciación celular durante el desarrollo fetal o embrionario (Sanders and Harvey 2004). La GH ejerce su efecto al unirse a receptores simples transmembranales conocidos como receptores GH (GHR por sus siglas en inglés, *Growth Hormone Receptor*) en el tejido blanco.

2.2.1. Familia de las hormona de crecimiento y la prolactina

La GH y PRL son proteínas de cadena simple de alrededor de 190 a 210 (Irene González- Villaseñor et al. 1988, Momota et al. 1988) aminoácidos que fueron reconocidos como miembros de la misma familia de proteínas (Hew et al. 1989, Pérez-Sánchez et al. 2002, Sakamoto and McCormick 2006). Se piensa que estas hormonas y sus receptores descienden como resultado de la duplicación génica y una subsecuente divergencia previo a la evolución de los vertebrados.

Así como en los mamíferos, la organización genómica de los genes de las GH revela la existencia de cinco exones y cuatro intrones. En el caso de la trucha arcoíris, el salmón del Atlántico, la tilapia, el lenguado, la perca gigante y aleta amarilla, el gen de la GH tiene un intron adicional, el cual probablemente evolucionó por eventos de inserción independientes (Agellon L.B. et al. 1988b, Devlirr 1993, Rentier-Delrue et al. 1989a).

La GH está clasificada dentro de dos parálogos divergentes en peces, GH1 y GH2 (Huang and Madan 1999). La GH1 ha sido bien estudiada, más no así la de la GH2. En el tejido blanco, la GH1 se une a sus receptores y además actúa indirectamente a través de la producción de Factor de crecimiento parecido a insulina (IGF-I, por sus siglas en inglés *Insuline-Like Growth Factor*) localmente inducida por la GH1.

2.2.2. Efectos de la GH en el sistema inmune en peces

Los avances en las aproximaciones moleculares en la inmunología han demostrado que los peces poseen una compleja red de sistema inmune similar al de los mamíferos, caracterizados por diferentes tipos y subtipos de leucocitos, inmunoglobulinas (Ig), factores complementarios, un complejo mayor de histocompatibilidad, receptores de células T y citosinas. Por otra parte, una característica del sistema inmune en peces es su profunda sensibilidad a la temperatura medioambiental y la salinidad (Yada 2007).

En peces eurihalinos, un incremento en los niveles de circulación de la GH durante un periodo de adaptación de agua dulce a agua marina, está correlacionado con la activación de funciones inmunes. Además, también se sabe que la administración de GH estimula el sistema de defensa humoral no específico en peces, involucrando las actividades hemolítica y de lisozima. Tanto la GH como la PRL mejoran la actividad fagocítica de leucocitos aislados de riñón cefálico. Otro péptido estructuralmente relacionado a la GH y la PRL producido en la pituitaria de los teleósteos es la somatolactina y no muestra tal efecto. La producción de inmunoglobulina, el mayor componente del sistema inmune específico, es regulada por la GH y la PRL en peces. En trucha arcoíris (*O. mykiss*), la hipofisectomización ocasiona un descenso de células B en riñón cefálico y en la sangre periférica y un declive de los niveles de IgM en plasma (Yada et al. 2004). El decremento en los niveles de IgM en plasma en truchas hipofisectomizadas puede ser restaurado por una terapia de reemplazo con GH y PRL, indicando que estas dos hormonas están involucradas en el mantenimiento de IgM en plasma, probablemente induciendo la producción basal de anticuerpos.

2.3. Sistemas de producción de proteínas recombinantes

La producción de proteínas recombinantes en una forma altamente purificada y bien caracterizada se ha convertido en la tarea principal del biotecnólogo dentro de la industria farmacéutica (Terpe 2006). Existen numerosos sistemas de expresión de proteínas heterólogas, entre los que destacan:

2.3.1. Bacterias

Éstos sistemas son muy atractivos debido a su habilidad para crecer rápidamente en un medio poco costoso, su genética es bien conocida y hay disponibilidad de un gran número de vectores de clonación y cepas mejoradas genéticamente. *E. coli* es uno de los primeros y más ampliamente utilizados hospederos para la producción de proteínas heterólogas. Una de las principales razones es que este microorganismo es bien conocido morfológica y genéticamente en cada laboratorio (Terpe 2006). Por ello es empleada para la producción masiva de un sin número de proteínas comercializadas, siendo ideal para la producción de proteínas simples no glicosiladas. Puede acumular hasta un 80% de proteína recombinante en peso seco y sobrevivir a una gran variedad de condiciones ambientales. Las principales ventajas que hacen de *E. coli* un sistema deseable para la producción de proteínas recombinantes y sus desventajas para producir proteínas con modificaciones postraduccionales se enumeran en la Tabla 1.

Tabla 1.- Ventajas y desventajas de *E. coli* como sistema de expresión

Ventajas	Desventajas
Rápida expresión	Dificultad para expresar proteínas con puentes di- sulfuro
Altos rendimientos	Produce proteínas no glicosiladas
Facilidad para su cultivo y modificar su genoma	Producción de endotoxinas
Económico	Formación de acetato que provoca toxicidad celular
Producción en masa y costo efectiva	Proteínas producidas como cuerpos de inclusión, inactivas y que requieren re plegamiento

Una de las desventajas para la producción de proteínas en *E. coli* para uso terapéutico, es la acumulación de lipopolisacáridos (LPS), generalmente referidos como endotoxinas, las cuales son pirogénicos en humanos y otros mamíferos. En

estos casos las proteínas deben pasar por un segundo proceso de purificación para dejarlas libres de endotoxinas (Terpe 2006, Westers et al. 2004).

La sobreexpresión de un gen foráneo en *E. coli* usualmente resulta en una acumulación de problemas no deseados. La mayoría de estos son resultado de la diferencia entre el uso de codones de *E. coli* con el de la proteína de interés, sobre todo, si ésta pertenece a un organismo eucariota. Se sabe que cada organismo tiene un pool de tRNA que reconocen sus propios codones para la síntesis de proteínas, por lo que la sobreexpresión de proteínas pertenecientes a otro organismo desencadena problemas tales como un estancamiento en la traducción (al no existir suficiente tRNA con el codón adecuado), terminación prematura de la traducción, desplazamiento en el marco de lectura o incorporación errónea de los aminoácidos (Kurland and Gallant 1996). La Tabla 2 muestran los principales problemas de *E. coli* como sistema de sobreexpresión de proteínas recombinantes.

Tabla 2.- Problemas de la producción de proteínas heterólogas en *E. coli*.

Señal	Problema
Muerte celular o crecimiento nulo de colonias	Proteína tóxica, alta expresión basal
Proteína con puentes disulfuro insolubles (cuerpos de inclusión)	Reducción de puentes disulfuro
Proteína insoluble (cuerpos de inclusión)	Demasiada expresión
Sin actividad	Mal plegamiento, etiqueta de afinidad puede disminuir actividad
Sin proteína o proteína truncada	Uso de codones de <i>E. coli</i> (codón bias)

2.3.2. Levaduras

Estos organismos fúngicos eucariotas unicelulares son empleados para fabricar proteínas recombinantes que no son producidas bien en *E. coli* (Demain and

Vaishnav 2009). Las ventajas de las levaduras para la expresión de proteínas complejas son: Fácil manipulación, rápido crecimiento, organización sub celular eucariota capaz de realizar modificaciones post- traduccionales adecuadas. La mayoría de las proteínas recombinantes producidas en levadura se han llevado a cabo en *S. cerevisiae* como sistema hospedero. La elección de este organismo está ampliamente basada en el conocimiento de su genética, fisiología y que es un organismo GRAS.

S. cerevisiae, no obstante, tiene ciertas limitaciones en la expresión de proteínas heterólogas. Por ejemplo, los rendimientos de producción son usualmente bajos alcanzando desde 1% hasta 5 % de la proteína total, incluso con un promotor fuerte (Buckholz and Gleeson 1991). Existe una muy baja estabilidad de los plásmidos de expresión que cuentan con una autonomía en su replicación, ocasionando un estrés adicional en la levadura, lo que genera una lenta tasa de crecimiento, bajos rendimientos y una reducción en la producción total (Buckholz and Gleeson 1991). Además, está demostrada una hiperglicosilación de las proteínas glicosiladas, lo que puede causar diferencias dramáticas en su inmunogenicidad, disminución de la actividad y un decremento en la retención de la proteína en suero. Muchas de estas proteínas secretadas no se liberan eficientemente al medio de cultivo, sino que son retenidas en el espacio periplásmico en una forma asociada a las células, lo que genera dificultades para su purificación y un menor rendimiento de las proteínas purificadas (Luckow and Summers 1988) .

Otra levadura es *P. pastoris*, una levadura metilotrófica de interés académico como industrial (Cregg et al. 1985). Sirve como modelo para estudiar la expresión génica regulada por metanol, ya que esta levadura tiene la capacidad de utilizar metanol como única fuente de carbono y energía (Faber et al. 1995). Durante su crecimiento en metanol, las enzimas alcohol oxidasas (AO) y la dihidroxiacetona sintasa (DHAS) constituyen entre el 60% y el 80% de la proteína total celular. Al clonar y caracterizar los promotores que controlan los altos niveles de producción

de estas proteínas, las levaduras metilotróficas como *P. pastoris* se convirtieron en hospederos potencialmente atractivos para la expresión de genes heterólogos.

2.3.3. Ventajas de *P. pastoris* como sistema de expresión de proteínas recombinantes

Como eucariota, *P. pastoris* tiene muchas de las ventajas de los sistemas de expresión eucariotas superiores tal como el procesamiento y ensamblaje de las proteínas, la realización de modificaciones post-traduccionales, así como la facilidad para manipularla como *E. coli* o *S. cerevisiae*. Este sistema de expresión es más fácil de usar, manipular y es menos caro comparado con otros sistemas de expresión eucariotas como baculovirus o cultivos de células de mamíferos. Esta levadura comparte la conveniencia de la manipulación que posee *S. cerevisiae* con la ventaja de obtener niveles desde 10 hasta 100 veces más la expresión de proteínas heterólogas. Estas características hacen de *P. pastoris* un sistema de expresión de proteínas muy útil. En la Tabla 3 se muestra una lista de las proteínas producidas en *P. pastoris* así como los rendimientos obtenidos en su producción.

Tabla 3.- Principales proteínas producidas en *P. pastoris*

Proteína	Niveles de rendimiento (g/l)	Alcance/Fenotipo
Enzimas		
Invertasa	2.3	Secretada Mut ⁺
Lisozima c2 bovina	0.55	Secretada Mut ⁺
Estreptokinasa (activa)	0.08	Intracelular *
Alfa amilasa	2.5	Secretada Mut ^s
Pectato liasa	0.004	Secretada Mut ^s
Fosforibulokinasa de espinaca	0.1	Intracelular Mut ^s
Antígenos		
Antígeno de la superficie de Hepatitis B	0.4	Intracelular Mut ^s
Antígeno pertussis p66	3.0	Intracelular Mut ^s
Fragmento C de la toxina del tétanos	12.0	Intracelular Mut ⁺ /Mut ^s
HIV-1 gp 120	1.25	Intracelular Mut ⁺
Proteína anticoagulante de garrapata	1.7	Secretada Mut ^s
Glicoproteína del intestino de	1.5	Secretada

garrapata Bm86		*
Proteínas regulatorias		
Factor de necrosis tumoral (TNF)	10.0	Intracelular Mut ^s
Factor de Crecimiento Epidérmico de ratón (EGF)	0.45	Secretada Mut ^s
Interferón humano α2b (IFN)	0.4	Intracelular Mut ^s
Proteínas de membrana		
CD38 de humano (Porción soluble)	0.05	Secretada Mut ^s
Receptor de la serotonina de ratón	0.001	Secretada Mut ⁺
Proteasas e inhibidores de proteasas		
Carboxipeptidasa B	0.8	Secretada Mut ⁺ /Mut ^s
Enterokinasa	0.021	Secretada Mut ⁺
Ghilanten	0.01	Secretada Mut ⁺
Inhibidor de proteasa tipo kunitz	1.0	Secretada *
Inhibidor de proteasa humana 6	0.05	Intracelular Mut ⁺
Anticuerpos		
Anticuerpo de cadena sencilla de conejo	>0.1	Secretada Mut ^s

*: No se describe el fenotipo

2.3.3.1. Producción de hormona de crecimiento recombinante en *P. pastoris*

Actualmente en el Laboratorio de Biotecnología del Departamento de Bioquímica y Medicina Molecular de la Facultad de Medicina de la Universidad Autónoma de Nuevo León, se han aislado, caracterizado y clonado los genes de las hormonas de crecimiento del humano y de numerosas otras especies de primates y animales de interés comercial. Con muchas de ellas se han construido sistemas de expresión en *P. pastoris* (Ascacio-Martínez Jorge A. and Barrera-Saldaña 2004b, Palma-Nicolás et al. 2005) integrándolas como casetes de expresión al genoma de la levadura por recombinación homóloga. Los datos generados de la producción y purificación de estas hormonas, así como su caracterización fisicoquímica y biológica, mostraron que en todos los casos las proteínas heterólogas generadas son idénticas a sus contrapartes naturales y que además son biológicamente activas (Ascacio-Martínez J.A. and Barrera-Saldaña 2012). En la Tabla 4 se muestran las principales hormonas de crecimiento recombinantes producidas en *P. pastoris*, así como sus niveles de expresión.

Tabla 4.- Hormonas de crecimiento producidas en *P. pastoris*

Origen de hormona de crecimiento	Rendimiento	Sistema	Referencia
Puerco (<i>Sus scrofa</i>)	900 µg/ml	Mut ⁺	(Ouyang et al. 2003)
Carpa (<i>Cyprinus carpio</i>)	400 µg/ml	Mut ⁺	(Li et al. 2003)
Perro (<i>Canis familiaris</i>)	24 µg/ml 3 µg/ml	Mut ^s Mut ⁺	(Ascacio-Martínez J. A. and Barrera-Saldaña 2004a)
Panda (<i>Ailuropoda melanoleuca</i>)	100 µg/ml	Mut ⁺	(Xu et al. 2008)

2.3.3.2. El sistema de expresión pPIC9

El genotipo de la cepa GS115 de *P. pastoris* abarca una mutación en el gen de la histidinol deshidrogenasa (*his4*) que previene la síntesis de histidina. El vector de expresión pPIC9 contribuye el gen *HIS4* que complementa al gen *his4* en el hospedero, por lo tanto, las transformantes son seleccionadas por su habilidad para crecer en un medio deficiente de histidina.

Existen dos fenotipos de la levadura, los cuales se pueden encontrar: Mut^s (anteriormente descrita como Mut⁻) y Mut⁺. El fenotipo Mut^s (por sus siglas en inglés, *Methanol Utilization Slow*) es una mutación por la pérdida del gen *AOX1*, y por lo tanto una pérdida de la mayoría de la actividad alcohol oxidasa. Esto resulta en una reducción de las células para metabolizar metanol. Las células, por lo tanto, exhiben un pobre crecimiento en un medio con metanol. Por otra parte, el fenotipo Mut⁺ (*Methanol Utilization plus*), es el fenotipo wild type (silvestre) con la habilidad de la cepa para metabolizar metanol como única fuente de carbono.

El vector de expresión pPIC9 tiene una longitud de 8023 pb con los sitios únicos de restricción para *Xho* I, *Sna*B I, *Eco*R I, *Avr* II y *Not* I, además posee una señal de secreción extracelular de *S. cerevisiae*, lo que facilita la recuperación del medio de cultivo de la proteína recombinante producida, ya que *P. pastoris* tiene la ventaja de secretar pocas proteínas nativas al medio extracelular (Pichia Expression kit, Invitrogen, 2014).

2.3.4. Microalgas como biorreactores

Las microalgas eucariotas pueden representar una alternativa atractiva a los sistemas biorreactores que se emplean actualmente. Desde hace alrededor de 2 décadas, ha habido un progreso significativo en el desarrollo de tecnología de ingeniería genética para numerables grupos de microalgas. Actualmente, los grupos de investigación en algas y las compañías biotecnológicas están enfocadas en la modificación de las rutas metabólicas clave de estos organismos y en la síntesis de proteínas recombinantes de alto valor (Gong et al. 2011, L.Walker et al. 2005). Potencialmente, las microalgas poseen los beneficios de las

plantas superiores acoplados a los de microorganismos inferiores como bacterias, ya que poseen una maquinaria fotosintética básica y, al ser organismos unicelulares y de estructura simple, su energía está dirigida a mantener procesos tales como la fotosíntesis, su crecimiento y reproducción, más que a mantener estructuras celulares diferenciadas. Consecuentemente, los niveles de producción de proteína en una microalga pueden ir desde un 30% a un 50% de su peso seco (Griesbeck et al. 2006, L.Walker et al. 2005). Además, ya que son organismos unicelulares que crecen en medio líquido, se puede mantener un abastecimiento de nutrientes adecuado el cual provee potencialmente los beneficios de mantener altos niveles de expresión controlados y con una productividad, continua como la de las bacterias. La mayoría de las microalgas son fotoautótrofas, lo que significa que requieren solamente de luz, agua y nutrientes básicos para un máximo crecimiento. La falta de un requerimiento de una fuente de carbono exógena para energía hace que los cultivos a gran escala en estanques abiertos sean mucho menos costosos que los mantenidos en un bioreactor. A la fecha, algunas proteínas de mamíferos tales como anticuerpos, hormonas y vacunas han sido expresadas en microalgas de una manera económicamente viable (Gong et al. 2011). Las ventajas de las microalgas como sistemas de expresión son, primero, que duplican su biomasa dentro de 24 h, permitiendo escalar a volúmenes superiores los cultivos iniciales en cuestión de unas pocas semanas. Segundo, las proteínas recombinantes pueden ser expresadas en núcleo, cloroplasto y mitocondria y, que a diferencia de las bacterias, las microalgas poseen la maquinaria precisa para producir proteínas de alto peso molecular con modificaciones postraduccionales como glicosilaciones. Tercero, las microalgas tienen la capacidad de crecer en un ambiente autotrófico o heterotrófico, ya que tienen la capacidad de crecer en bioreactores cerrados, en donde las condiciones de luz, temperatura, nutrientes y aereación pueden ser controladas. Los cultivos en fotobioreactores pueden prevenir la transferencia de genes o el escape de las microalgas al medio ambiente, situación que es más difícil de controlar en una planta superior debido al esparcimiento de polen.

2.3.5. Características de *Chlorella*

Chlorella es un alga verde (*Clorofita*) unicelular, la cual ofrece un sistema alternativo para estudiar la biología molecular de muchos procesos celulares importantes y ha sido un organismo modelo, no solo para los eucariotas inferiores, sino también para las plantas superiores (Chow and Tung 1999, Dawson et al. 1997). Las características que hacen de *Chlorella* un modelo útil son el hecho de que posee vías metabólicas similares a las plantas superiores, produce proteínas glicosiladas, las células pueden ser sincronizadas, es fácil de manipular su ambiente y su cultivo es sencillo, rápido y poco costoso. Consecuentemente, debido a estas características, *Chlorella* tiene el potencial para ser un vehículo útil en el cual se pueden producir compuestos que son de importancia médica, industrial y en investigación.

2.3.5.1. Producción de proteínas recombinantes en *Chlorella*

Entre los principales problemas de la transformación estable que se han descrito para especies de *Chlorella*, está la dificultad de la integración del gen de interés al genoma de la microalga debido al grosor de su pared celular. Se han descrito diversos protocolos de transformación que van desde la electroporación, el tratamiento de las células con enzimas para la formación de protoplastos y su transformación usando polietilen glicol (PEG), hasta el bombardeo de micropartículas. Estos ejemplos se muestran en la Tabla 5.

Tabla 5.- Métodos de transformación de especies de *Chlorella*

Organismo	Gen insertado	Método	Producción	Referencia
<i>C. sorokiniana</i>	Nitrato reductasa de <i>C. vulgaris</i>	Bombardeo de micro partículas	NA	(Dawson et al. 1997)
<i>C. sorokiniana</i> y <i>C. vulgaris</i>	Hormona de crecimiento humana (hGH)	Protoplastos en PEG	600 µg/l	(Hawkins and Nakamura 1999)
<i>C. vulgaris</i>	Gen de resistencia a Higromicina	Electroporación	NA	(Chow and Tung 1999)
<i>C. ellipsoidea</i>	Hormona de crecimiento del pez Flounder (fGH)	Protoplastos en PEG	400 µg/l	(Kim et al. 2002)

Tanto en *C. vulgaris* como en *C. ellipsoidea*, así como en otras especies de microalgas como *Nannochloropsis oculata* (Chen et al. 2008), se han logrado insertar y expresar genes de GHs tanto de peces como de humano, teniendo éxito en los ensayos de transformación y producción, alcanzando niveles aceptables en los rendimientos de las proteínas recombinantes obtenidas en estos sistemas.

2.3.6. Comparación entre sistemas de expresión de proteínas recombinantes

Se toma en cuenta las características más importantes que hacen de un sistema un modelo elegible para la producción de proteínas recombinantes, estas se pueden resumir de tal manera que se pueda hacer la comparación directa entre estos sistemas de producción. En la Tabla 6 se muestran las principales características que poseen los diferentes sistemas de expresión de proteínas recombinantes, como tiempos y costos de producción, rendimientos, costo y temperatura de almacenaje y de transporte, así como la capacidad que tienen algunos de estos sistemas para glicosilar proteínas y el riesgo de contaminación

con diferentes patógenos o los daños a la salud humana que pudieran ocasionar debido a la síntesis de toxinas.

Tabla 6.- Características de los sistemas de expresión

Característica	Bacteria	Levadura	Células de mamífero	Animales	Plantas	Microalgas
Tiempo de producción	Corto	Medio	Largo	Largo	Largo	Corto
Costo de producción	Medio	Medio	Alto	Alto	Bajo	Muy bajo
Costo de escalamiento	Alto	Alto	Alto	Alto	Bajo	Muy bajo
Costo y temp de almacenaje	Bajo/ -20°C	Bajo/ -20°C	Elevado/ NL	Elevado/ NL	Bajo/ TA	Bajo/ TA
Propagación	Fácil	Fácil	Difícil	Feasible	Fácil	Muy fácil
Glicosilación	Ausente	Incorrecta	Correcta	Correcta	Correcta	Correcta
Ensamblaje de proteínas multiméricas	No	No	No	Si	Si	Si
Rendimiento de proteína	Medio	Alto	Medio- Alto	Alto	Alto	Desconocido
Riesgo	Si	Desconocido	si	si	Desconocido	Desconocido
Seguridad	Baja	Desconocido	Media	Alta	Alta	Alta

NL= Nitrógeno líquido

TA= Temperatura ambiente

3. JUSTIFICACIÓN

Debido a que tanto las microalgas como las levaduras son excelentes sistemas de expresión de proteínas recombinantes los cuales han demostrado su efectividad en la producción de GHs, sumado a la posibilidad de caracterizar el DNAC de la GH de *L. peru*, se propone el uso de *P. pastoris* y *C. sorokiniana* como plataformas para ensayar la producción de esta LpGH, lo que contribuiría a un nuevo sistema de expresión eficiente de proteínas recombinantes susceptible de patente.

4. HIPÓTESIS

Si las microalgas y levaduras han demostrado producir GHs recombinantes con actividad biológica, entonces, el empleo de *C. sorokiniana* y *P. pastoris* como sistemas de expresión de la GH caracterizada de *L. peru*, serán adecuados para la obtención de ese valioso regulador metabólico.

5. OBJETIVOS

5.1. Objetivo general

Obtener e integrar en el casete de expresión el DNAC de la hormona de crecimiento obtenida de *L. peru* para producir la proteína recombinante en *C. sorokiniana* y *P. pastoris*.

5.2. Objetivos específicos

- Obtener y caracterizar el DNAC de la GH de *L. peru* e inferir la anatomía de su gen en el genoma de éste pez.
- Construir el casete de expresión con el DNAC de la hormona y transformar con dicho casete a células de *C. sorokiniana* y *P. pastoris* y evidenciar la producción la LpGH recombinante.

6. MATERIALES Y MÉTODOS

6.1. Material biológico

Los peces se capturaron directamente de la bahía de Buena Vista, en las costas del Golfo de California, a 70 km de la ciudad de La Paz, B.C.S. y se trasladaron para su mantenimiento en estanques de 10 000 L en el patio de cultivo de las instalaciones del CIBNOR, hasta que fueron procesados. Todos los organismos se encontraban en etapa juvenil con un peso y talla promedio de 500 g y 27 cm, respectivamente.

6.2. Aislamiento de cerebros de *L. peru*

Se tomaron tres individuos de huachinango y se anestesiaron con aceite de clavo antes de ser sacrificados por decapitación. Se realizaron disecciones en la parte superior de la cabeza para dejar expuesto el cráneo del pez y posteriormente levantarlo para dejar al descubierto el cerebro del individuo, el cual fue tomado con pinzas estériles mantenidas en etanol absoluto. Los cerebros se colocaron en tubos de 2 ml con 1 mL de trizol y perlas de vidrio.

6.3. Diseño de primers degenerados

Para el diseño de primers para amplificar parte de la secuencia de la hormona de crecimiento de *L. peru*, se realizó primeramente un alineamiento de las secuencias de hormonas de crecimiento reportadas para otras especies de peces como *Sparus aurata* (U01301.1), *Oreochromis mossambicus* (AF033805.1), *O. niloticus* (A07830.1), *Tilapia sp.* (A08993.1) y *Lutjanus erythropterus* (JQ346228.1), empleando el programa CLC Main Workbench V5.5. A partir de regiones conservadas de estas hormonas se diseñaron dos juegos primers (oligos) degenerados (Tabla 7). En esta tabla se incluyen todos los juegos de primers empleados en este trabajo.

Tabla 7.- Nombre y características de primers

Nombre	Secuencia	Tm°C
LpGHPCR615F DE	5' ATG <u>GRC</u> <u>ASA</u> GTT GTC <u>STC</u> CTG C 3'	68.9
LpGHPCR615R DE	5' CAT CAG <u>RGT</u> GCA GTT <u>WGC</u> <u>YTC</u> 3'	66.5
LpGHPCR380F DI	5' <u>CAR</u> <u>CTC</u> AAC AAA ATC TTC <u>CTK</u> C 3'	63.5
LpGHPCR380R DI	5' CCT TGT GCA TGT <u>CYT</u> <u>TYT</u> TG 3'	63
LpGHRACE4F	5' CCC GTC CTG ATT GGC CCT GA 3'	69.8
LpGHRACE1R	5' TCA TCA GCC CCA TCG ACA AGC 3'	68.1
LpGHPCRF	5' ATG GAC AGA GTG GTC CTC C 3'	61.7
LpGHPCRR	5' CTA CTA CAA AGT GCA GTT GGC C 3'	62.6
LpGHpPIC F	5'-CTCGAGAAAAGACACCACCACCACCACCACGATGATGACGACAAGCAGCCAATCACAGACGGCCAGC3'	75
LpGHpPIC R	5' CCT AGG TCA CTA CAA AGT GCA GTT GGC CTC TGG 3'	69
LpHc994F	5' CA CAG ACC ACA TCT ACC AGA AC 3'	61.1
LpHc994R	5' AGT ACA GCA CAG GCT TTA TTT C 3'	59.0
M13F	5' GTA AAA CGA CGG CCA G 3'	57.6
M13R	5' GTC ATA GCT GTT TCC TG 3'	50.7
UPM largo	5' CTA ATA CGA CTC ACT ATA GGG CAA GCA GTG GTA TCA ACG CAG AGT 3'	79.1
UPM corto	5' CTA ATA CGA CTC ACT ATA GGG C 3'	56.2
AOX5'	5' GAC TGG TTC CAA TTG ACA AGC 3'	63.4
AOX3'	5' GCA AAT GGC ATT CTG ACA TCC 3'	66.5
TrnL c	5' CGA AAT CGG TAG ACG CTA CG 3'	64.5
TrnL d	5' GGG GAT AGA GGG ACT TGA AC 3'	61.3

6.4. Extracción y evaluación de la calidad de ADN genómico

El ADN genómico de músculo e hígado de *L. peru*, fue extraído por el método de Trizol. Para ello, 500 mg de tejido almacenado en 1 ml de Trizol fueron homogenizados con un pistilo, posteriormente se centrifugó a 12 000 rpm durante 10 min a 4°C descartando la fase acuosa. Posteriormente, la fase orgánica fue mezclada con 600 µl de fenol:cloroformo:alcohol isoamilico (PCI 25:24:1), y centrifugado a 15000 rpm (10 min a temperatura ambiente). Este último paso fue repetido dos veces más, para un total de tres extracciones con fenol:cloroformo:alcohol isoamilico. La fase acuosa fue transferida a un tubo nuevo y se adicionaron 500 µl de isopropanol a -20°C mezclando por inversión, las muestras se almacenaron a -20°C toda la noche. Los tubos fueron centrifugados a 11000 rpm (20 min a 4 °C) y el pellet fue resuspendido en 100 µl de agua MilliQ estéril mediante incubación a 60°C por 1 hr. Se agregaron 5 µl de RNAsa a cada tubo y se incubaron a 37°C por 1 hr. Se agregaron 200 µl de cloroformo:alcohol isoamilico (CIA 24:1), los tubos se agitaron vigorosamente por 60 segundos y se centrifugo a 11000 rpm (10 min a temperatura ambiente). Este último paso se repitió una segunda ocasión, para un total de dos extracciones con cloroformo:alcohol isoamilico. La fase acuosa fue transferida a un tubo nuevo, se adicionaron 50 µl de acetato de amonio 7.5 mM, se mezcló por inversión y se agregaron dos volúmenes de etanol al 100% se mezcló por inversión y se almacenaron a -20°C por 1 hr. Finalmente las muestras se centrifugaron a 11000 rpm (20 min a 4°C), la pastilla de ADN fue lavada dos veces con 1 mL de etanol al 70% el etanol y resuspendida en 50 µl de agua MilliQ estéril. Por último, se cuantificó la concentración de ADN mediante el uso de un espectrofotómetro (NanoDrop ND-100).

6.5. Extracción y evaluación de la calidad de ARN total

Se utilizó tejido cerebral y se maceró por 40 s a máxima velocidad utilizando el equipo Fast Prep (MP Biomedicals). Se homogenizó en vortex y se dejó reposar a temperatura ambiente por 5 min para permitir la disociación completa de los

complejos de nucleoproteínas. Se agregaron 200 µl de Cloroformo, se mezcló ligeramente por 15 s y se incubó a temperatura ambiente por 5 min. Posteriormente se centrifugaron los tubos a 12000 g por 15 min a 4°C. Después de la centrifugación, se separó la fase acuosa conteniendo el RNA total y se transfirió a un tubo limpio y libre de RNAsas. Para precipitar el RNA, se agregó un volumen de 600 µl de isopropanol, se incubó toda la noche a -20°C. Se centrifugó a 12000 g por 10 min a 4°C y se decantó el sobrenadante para lavar 2 veces el pellet de RNA con 1 ml de etanol al 75% en agua DEPC, seguido de centrifugación a 7500 g por 5 min a 4°C. Posteriormente se decantó el exceso de etanol, y se evaporó el alcohol remanente en el pellet a temperatura ambiente. El pellet de RNA se disolvió en agua DEPC. El RNA se cuantificó espectrofotométricamente utilizando un NanoDrop (ND-100). Para evaluar la calidad del RNA, se realizó una electroforesis en gel de agarosa/formaldehído al 24%, se cargó 1 µg de RNA total. Como criterio de integridad se cuidó que se observaran dos bandas correspondientes a las sub unidades ribosomales 28S y 18S en relación 2:1, lo cual indica una buena calidad del ARN.

6.6. Síntesis de DNAc

La síntesis de DNAc se realizó a partir de 1 µg de RNA tratado con DNAsa I (Invitrogen) y siguiendo las recomendaciones del proveedor. Se utilizó oligo (dT)₁₅ y transcriptasa reversa Improm II (Promega), y se almacenó a -20°C hasta su uso.

6.7. Obtención de un fragmento de la secuencia de la LpGH.

Se realizó una amplificación por medio de la técnica de Touchdown PCR (Polymerase Chain Reaction). Primeramente se amplificó un fragmento de 615pb con el juego de primers LpGHPCR615F DE y LpGHPCR615R DE (Tabla 7) diseñados para alinearse en las regiones conservadas más externas de las secuencias de hormonas de crecimiento. La reacción se llevó a cabo a 94°C por 3 min, seguido de 15 ciclos de 94°C por 1 min, un gradiente de 66 a 70°C por 1 min y 72°C por un min, seguido de 20 ciclos donde la temperatura de alineamiento de los primers fue de 58 a 62°C por 1 min, para finalizar con un tiempo de extensión

de 72°C por 10 min. Posteriormente se realizó un PCR anidado con los primers internos LpGHPCR380F DI y LpGHPCR380R DI (Tabla 7) de las secuencias, correspondientes a un tamaño esperado de 380pb siguiendo las mismas condiciones antes descritas.

6.8. Ligación de la secuencia en el vector pGEM-T Easy

El producto de PCR de 380 pb obtenido, se ligó al vector pGEM-T Easy (Promega) siguiendo las indicaciones del proveedor. La reacción de ligación fue llevada a cabo con la enzima T4 DNA ligasa y la relación inserto:vector fue de 3:1, los datos de la reacción se describen en la Tabla 8. La reacción se dejó incubando toda la noche a 4°C.

Tabla 8.- Reacción de ligación del producto de PCR.

Reactivo	Reacción estándar	Control (+)	Control (-)
Buffer de ligación rápida 2X	2.5 µl	2.5 µl	2.5 µl
PGEM-T- Easy (50ng)	0.5 µl	0.5 µl	0.5 µl
Producto de PCR	1.5 µl		
ADN control		1 µl	
T4 DNA ligasa (3U/µl)	0.5 µl	0.5 µl	0.5 µl
H2O libre de DNAsas		0.5	1.5 µl
Volumen Final	5 µl	5 µl	5 µl

6.9. Preparación y transformación de células competentes de E. Coli Top 10

Para la transformación de células competentes de *E. coli* con los productos de ligación obtenidos se empleó el método de shock térmico (Sambrook and Russell 2001). Se inocularon 10 ml de medio LB con 50 µl de células competentes mantenidas a -80°C y se dejó incubando a 37°C en agitación constante a 200 rpm durante toda la noche. De este pre inóculo se tomaron 500 µl para inocular 50 ml

de medio LB en un matraz de 250 ml adicionando 250 μ l de $MgCl_2$ 2M para incubar por 3 h a 37°C a 200 rpm hasta observar una densidad óptica (OD_{600}) igual a 0.3. Posteriormente se recuperan las células transfiriendo el inoculo a tubos de centrifuga fríos y se dejaron reposar en hielo durante 10 min para después ser centrifugados a 2700 g por 10 min a 4°C. Posteriormente se decantó el sobrenadante y las células se re suspendieron con 10 ml de $CaCl_2$ frío el cual se añadió lentamente sobre las paredes del tubo cuidando de no hacer burbujas. Para re suspender las células, los tubos se colocaron en hielo en un ángulo menor a 45° para permitir rotar los tubos con la finalidad de que se re suspendieran las células sin necesidad de agitarlas o emplear vortex. Una vez re suspendidas, se transfirió todo el volumen de los tubos para continuar manejando únicamente dos de ellos. A cada uno se le agregaron 10 ml de $CaCl_2$ frío y estos se centrifugaron nuevamente bajo las mismas condiciones. Posteriormente se agregaron 1400 μ l de $CaCl_2$ frío y 600 μ l de glicerol y se procedió a re suspender nuevamente las células. Cuando las células estuvieron totalmente re suspendidas se transfirieron 100 μ l a tubos eppendorff de 1.5 ml bien etiquetados y se almacenaron a -80°C hasta su uso.

Para la transformación de células competentes se transfirieron 2.5 μ l del producto de ligación obtenido a un vial de células competentes y se dejaron reposar por 20 min en hielo. Transcurrido este tiempo se les dio un shock térmico a 45°C por 30 s usando un termo block, después de este tiempo, los shots se transfirieron a hielo por 2 min y se le agregaron 300 μ l de medio SOC para ser incubados a 37°C por 1 h para la recuperación de las células y la asimilación del vector insertado. Después de este tiempo se sembraron 50 y 100 μ l de las células en placas de medio LB con Ampicilina (50 mg/ml) y 40 μ l de X-Gal (20 mg/ml de 5-bromo-4-cloro-3-indoil- β -D-Galactosido) y se dejaron incubando por 24 h a 37°C.

6.10. Selección de transformantes y PCR de colonia

La selección de colonias transformadas de *E. coli* se realizó tomando en cuenta dos criterios. El primero consiste en la selección por resistencia a un antibiótico, en este caso ampicilina (50 µg/µl). La Ampicilina inhibe la síntesis de la pared celular bacteriana, por lo que aquellas células que estén transformadas con el plásmido de interés, en este caso pGEM-T Easy que confiere resistencia a ampicilina a la bacteria, podrán crecer en la placa de cultivo. El segundo es por el método de α -complementación, el cual se basa en la degradación del sustrato X-Gal por la enzima β -Galactosidasa producida por el operón *LacZ* que se encuentra dentro de la secuencia del vector. Esta degradación da como resultado una coloración azul de la colonia bacteriana. Sin embargo cuando la secuencia del operón es interrumpida y no expresada, en este caso por un inserto, la coloración de la colonia de bacterias es blanca. Esto sucede cuando nuestro producto de ligación realmente fue insertado dentro del vector, así de esta manera nos aseguramos que las colonias blancas que crecen en el medio de cultivo están realmente transformadas con el plásmido e inserto que nosotros queremos.

Para poder hacer el PCR de colonia se picaron las colonias blancas obtenidas usando palillos de madera estériles, uno por colonia, generando placa réplica y lavando el palillo en 2 µl de H₂O MilliQ estéril para usarla como templado de ADN para la PCR.

La reacción de PCR se llevó a cabo empleando los primers M13F y M13R (Tabla 7) que flanquean la región correspondiente al tamaño del inserto que se busca tomando un fragmento del vector

6.11. Secuenciación y análisis de productos de PCR

Para la secuenciación se seleccionaron aquellas clonas que fueron positivas en la reacción de PCR, las clonas se crecieron en 5 mL de LB/ampicilina para la extracción de ADN plasmídico (Bimboim and Doly 1979). Los plásmidos se enviaron a secuenciar a la empresa Genewiz, Inc (New Jersey). La secuencia parcial del DNAc de la LpGH se analizó con el algoritmo BLASTn en la base de

datos de proteínas del NCBI (National Center of Biotechnology Information, por sus siglas en inglés). Las secuencias se analizaron usando el programa Unipro Ugene v1.9.8 con el método de Clustal W para realizar un alineamiento múltiple y obtener una secuencia consenso que fue validada con los cromatogramas correspondientes de cada secuencia.

6.12. Diseño de primers para RACE

Los primers se diseñaron en base a la secuencia parcial del DNAC de LpGH tomando como criterios una Tm mayor a 60°C y menor de 70°C para incrementar la astringencia de la reacción de PCR y promover la unión específica de los primers, 50% de G+C, que no formaran dímeros de primers ni estructuras secundarias y que el extremo 3' terminara en G o C.

6.13. Síntesis de DNAC-RACE

Para generar el DNAC para el RACE se empleó el kit SMARTer RACE DNAC Amplification kit de Clontech y se siguieron las indicaciones del fabricante. Primero se preparó un buffer en suficiente cantidad para cada cadena a sintetizar (5' y 3') como se muestra en la Tabla 9. Posteriormente se prepararon por separado los mRNA para la síntesis de cada extremo como se muestra en la Tabla 10.

Tabla 9.- Buffer de síntesis de primera cadena de DNAC-RACE.

Reactivo	Volumen 1X
5X First-Strand Buffer	2.0 µl
DTT (20mM)	1.0 µl
DNTP Mix (10 mM)	1.0 µl
Volumen final	4.0 µl

Posteriormente se llevaron a un volumen de 3.75 μ l para el 5'-RACE y 4.75 μ l para el 3'-RACE con agua libre de RNAsas, se mezclaron bien los componentes, se les dio un spin en la centrífuga y se incubaron a 72°C por 3 min y 42°C por 2 min.

Tabla 10.- Reacción para preparar el DNAc-RACE.

5'-DNAc-RACE		3'-DNAc-RACE	
2.15 μ l	ARN	3.15 μ l	ARN
1.0 μ l	5'-CDS Primer A	1.0 μ l	3'-CDS Primer A
3.15 μ l	Volumen final	4.15 μ l	Volumen final

Después de la incubación se da nuevamente un spin en centrífuga por 10 s a 14000 rpm. A la reacción correspondiente al 5'-RACE se le agrega 1 μ l de SMARTer IIA, se mezcla bien y se da un spin rápido. Ya que esté listo se prepara una mezcla para cada reacción con los componentes de la Tabla 11 y se distribuyen 5.25 μ l de esta mezcla a cada reacción de síntesis para obtener un volumen total de 10 μ l. Se incubó la reacción a 42°C por 90 min en termociclador y se calienta a 72°C por 10 min. El DNAc se diluyó con 100 μ l de Tricin-EDTA y se almacenó a -20°C hasta su empleo.

Tabla 11.- Reacción de síntesis específica de 5'-DNAc y 3'-DNAc.

Reactivo	Volumen 1X
Buffer Tabla 4	4.0 μ l
Inhibidor de RNAsas (40 U/ μ l)	0.25 μ l
SMARTScribe Transcriptasa Reversa (100U)	1.0 μ l
Volumen Total	5.25 μ l

6.14. Obtención de la secuencia completa del DNAC de la LpGH

Se realizaron PCRs por separado para el extremo 5' y 3' utilizando 2.5 U de la polimerasa Advantage2 (Clontech) para cada reacción. Para la obtención del extremo 5' se usó 0.4 μ M del primer UPM como primer forward y 0.4 μ M del primer LpGHRACE1R como primer reverso, mientras que para la reacción 3'-RACE se usaron 0.4 μ M del primer LpGHRACE4F como primer forward y 0.4 μ M del primer UPM como primer reverso. La reacción se llevó a cabo con 5 ciclos de 94°C por 30 s y 72°C por 3 min, seguido de 5 ciclos de 94°C por 30 s, 63°C por 30 s y 72°C por 3 min, seguido de 27 ciclos adicionales de 94°C por 30 s, 60°C por 30 s y 71°C por 3 min. Posteriormente se realizó un PCR anidado del producto obtenido de la reacción 3'-RACE usando el primer LpGHRACE5F y UPM con las condiciones antes descritas.

Los productos de RACE fueron ligados en el vector pGEM-T Easy (Promega) con los cuales se transformaron células de *E. coli* Top10 y se crecieron en medio LB con Ampicilina (50 ug/ μ l) y X-Gal (40 ug/ μ l) para la selección de las clonas transformadas que contuvieran el plásmido con el inserto deseado. Las clonas positivas se seleccionaron por PCR utilizando los primers M13F y M13R y se realizó la extracción de DNA plasmídico y las muestras se secuenciaron en la empresa Genewiz, Inc (New Jersey). Los cromatogramas se analizaron con el programa Unipro UGENE versión 1.13 y se ensamblaron mediante el programa en línea CAP3 (Huang and Madan 1999) para obtener el contig final. El marco de lectura abierto de la proteína (Open Reading Frame, por sus siglas en inglés) se dedujo informáticamente con la herramienta disponible en: <http://1.usa.gov/1Bn7iNE>.

6.15. Evaluación de posibles regiones de intrón en la secuencia del gDNA de LpHG

Se realizó el diseño de primers que abarcan la secuencia completa del DNAC de LpHG incluyendo regiones UTR (Tabla 7 primers LpHc994F y LpHc994R), con ellos se amplificó por PCR la secuencia de la LpHG utilizando 1 ul de DNAC en una reacción y 74.46 ng de gDNA en otra como templados. Las condiciones de amplificación fueron: 95°C (3 min), seguido de 35 ciclos de: 95°C (1 min), 55°C (1 min), 72°C (3 min). La reacción finalizó con una extensión de 72°C (10 min). Los productos se visualizaron en gel de agarosa al 1% y se compararon el obtenido a partir de DNAC y el obtenido a partir de gDNA para predecir la existencia de intrones de acuerdo a la diferencia de tamaño de los productos obtenidos.

6.16. Obtención del ORF de la LpGH

Para la obtención in vitro del ORF completo de la LpGH se diseñaron primers específicos que flanquean la zona correspondiente al ATG (Metionina inicial, LpGHORF F, Tabla 7) y al codón de paro, incorporando un codón de paro adicional (TAG, LpGHORF R, Tabla 7) a la secuencia, tomando como base la secuencia obtenida con el programa ORF Finder (NCBI).

Con estos primers se procedió a realizar la PCR empleando como DNA templado el DNAC sintetizado para su uso en la reacción de 3'-RACE. Se realizó la amplificación del fragmento de 618 pb empleando la polimerasa JumpStart 2X (Sigma) con 0.4 μ M de ambos primers y 100 ng del DNAC 3'. La amplificación de los productos se llevó a cabo con un programa de 94°C por 3 min, seguido de 32 ciclos de 94°C por 1 min, 62°C por 30 s, 72°C por 1 min y una extensión final de 72°C por 10 min. La visualización de los productos de PCR se realizó por electroforesis en gel de agarosa al 1%.

Una vez que se confirmó el tamaño del amplicón, se procedió a realizar la ligación del producto de PCR en el vector pCR8 (Invitrogen), con el cual se transformó un shot de células competentes de *E. coli* TOP10 para su clonación. Se extrajo el DNA plasmídico por la técnica de lisis alcalina de (Bimboim and Doly 1979), se

cuantificó y se enviaron a secuenciar las muestras seleccionadas para confirmar que la secuencia correspondiera a lo obtenido previamente a partir de la técnica de RACE, comparando la similitud entre las secuencias ensambladas del RACE y la obtenida a partir de la amplificación del ORF de la LpGH ligada al vector pCR8.

6.17. Comparación de la secuencia de aminoácidos de la LpGH con otras GH de peces

Se realizó un alineamiento de secuencia de aminoácidos empleando la herramienta en línea ClustalW con la cual se comparó la secuencia de la LpGH con otras hormonas de crecimiento de distintas especies de peces como: *Morone axatilis*, *Sebastes schlegelii*, *Sciaenops ocellatus*, *Micropterus salmoides*, *Siniperka kneri*, *Epinephelus lanceolatus*, *Epinephelus coioides*, *Pagrus major*, *Sparus aurata*, *Acanthopagrus schlegelii* y *Acanthopagrus latus* con las que la LpGH dio mayor identidad en el algoritmo Blastp. Además, se incluyeron en el análisis secuencias de GHs catalogadas como tipo I y II de *Oncorhynchus nerka*, *Oncorhynchus mykiss*, *Oncorhynchus tshawytscha*, *Oncorhynchus masou*, *Coregonus lavaretus* y *Salmo salar*, considerando también dos hormonas de crecimiento de mamíferos correspondientes a *Bos taurus* y *Mus musculus*. En el análisis se detallan los aminoácidos más importantes de estas proteínas, tamaño, peso molecular, punto isoeléctrico y péptido señal, así como los dominios que posee esta hormona según el análisis realizado por (Watahiki Masanori et al. 1989) y el porcentaje de identidad que comparten estas secuencias con la de la GH de *L. peru*.

También se construyó un árbol filogenético con el programa Mega v6.06, se incluyó el alineamiento de la secuencia de aminoácidos de GHs mencionadas anteriormente. Para esto se realizó una prueba para determinar el mejor modelo para la construcción de dicho árbol resultando el mejor método por máxima verosimilitud usando el modelo Jones-Taylor-Thornton Gamma distribuido (JTT+G) con un bootstrap de 1000.

6.18. Recombinación del vector pCR8::LpGH-ORF al vector pMDC32

Una vez confirmado que el producto obtenido era el deseado, se prosiguió a realizar la recombinación del vector de entrada (pCR8) con el inserto (LpGH-ORF), en el vector destino pMDC32 (para expresión en microalgas), por medio de la tecnología Gateway, esta herramienta aprovecha los sitios de recombinación sitio-específicos de cualquier vector de entrada que cuente con esta tecnología, tal como pCR8, para realizar la transferencia del inserto de interés a los vectores destino por medio de una reacción catalizada por la enzima LR clonasa. En la Figura 1 se muestra el proceso de clonación de la LpGH en el vector pCR8 y cómo se da la recombinación entre este vector con el vector pMDC32 para poder integrar la secuencia del gen de la LpGH en el mismo.

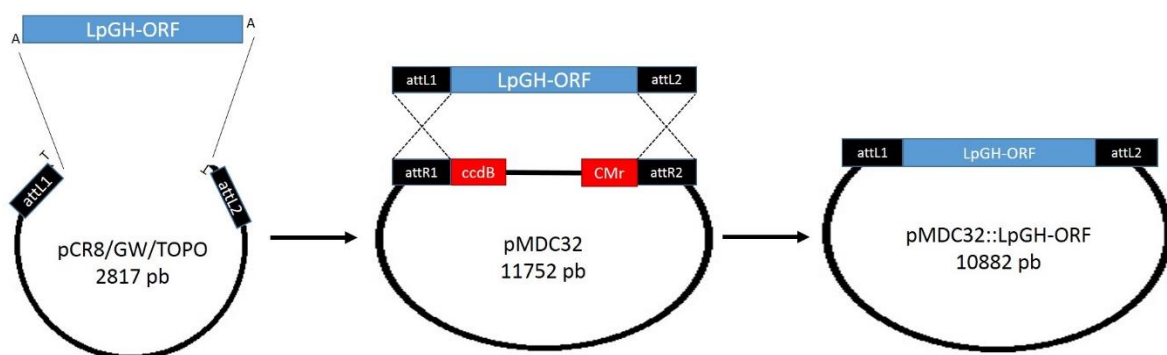


Figura 1.- Proceso de clonación del ORF de la LpGH en el vector pCR8 y su recombinación en el vector pMDC32.

La reacción de recombinación se muestra en la Tabla 12, primeramente se realiza esta mezcla de reacción en un tubo eppendorf de 200 ul.

Tabla 12.- Reacción de recombinación

Reactivo	Volumen
pCR8::LpGHORF	3 ul
pMDC32	1 ul
TE Buffer pH8.0	4 ul

Una vez terminada la mezcla, se agregaron 2 μ l de LR Clonasa, se mezcló bien y se dejó incubar por 1 h a 25°C. Después de la incubación se le agregó 1 μ l de proteinasa K y se incubó la muestra por 10 min a 37°C.

Una vez que se realizó la recombinación, se procedió a transformar un shot de células competentes de *E. coli* TOP10, para la clonación del plásmido y por último se realizó la extracción de DNA plasmídico por la técnica de lisis alcalina. El DNA se cuantificó y se observó su integridad por electroforesis en gel de agarosa al 1% y se almacenaron a -20°C hasta su uso.

6.19. Caracterización de la construcción pMDC32::LpGH

Para caracterizar el vector pMDC32 con la construcción LpGH se analizó la secuencia completa del plásmido en busca de sitios de restricción y se construyó un mapa del T-DNA del vector (Figura 2), incluyendo los bordes izquierdo y derecho (LB y RB, respectivamente) los cuales sirven para la integración del gen de interés en el genoma de la microalga y los sitios de restricción que se encontraron a lo largo de la secuencia.

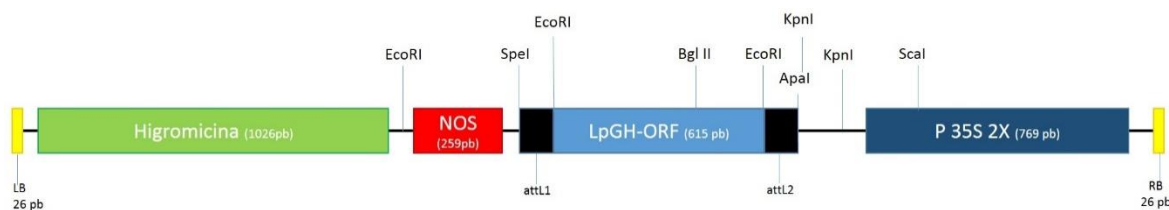


Figura 2.- T-DNA del vector pMDC32::LpGH y sus sitios de restricción

Una vez construido el mapa se realizó la digestión con las enzimas *Apal* – *Scal* en una reacción de 20 μ l utilizando el DNA plasmídico de nuestra construcción.

En la reacción se empleó 1 μ l de cada enzima, 1 μ l de DNA (8530 ng/ μ l), 1 μ l de buffer de reacción (Buffer MC) y se llevó al volumen deseado con MilliQ estéril. Posteriormente, se verificó el patrón de restricción con una electroforesis de agarosa al 1% en TAE 1X. El Patrón de bandeo se observó en un transluminador y se documentó el resultado.

6.20. Transformación genética de *C. sorokiniana* por biobalística

Se realizó una digestión del DNA plasmídico empleado para transformar con la enzima *Hind III* la cual corta en la posición 1975 del DNA plasmídico fuera del T-DNA del plásmido con la finalidad de linealizarlo y hacer más accesible su integración al genoma de la microalga. Se realizó una alícuota de 50 μ l del DNA plasmídico a una concentración de 2 μ g/ μ l, con la cual se trabajó para la transformación.

Se prepararon 4 placas con medio de cultivo NB (Nutrient Broth, Bioxon) inoculadas con *C. sorokiniana*, las cuales se mantuvieron en condiciones de cultivo de 27°C y 16/8 h luz/obscuridad durante 4 días previo al bombardeo.

6.20.1. Preparación de las micropartículas

Primeramente se pesaron 30 mg de las micropartículas de oro de 0.6 μ m de diámetro y se mantuvieron en un tubo eppendorf de 1.5 ml al cual se le adicionó 1 ml de etanol al 70% frío y se agitó vigorosamente con vortex durante 5 minutos. Posteriormente se incubaron por 15 minutos a temperatura ambiente para que las partículas se empaparan, homogenizando cada 5 minutos. Se centrifugaron por 3 minutos a 13000 rpm hasta la formación de un pellet del cual se le removió el sobrenadante y se le adicionó 1 ml de agua estéril. Se dejó reposar por 1 minuto a temperatura ambiente y se centrifugaron por 2 minutos a 13000 rpm. Nuevamente se remueve el sobrenadante y se repite el lavado por 3 ocasiones. Después del último lavado se adicionaron 500 μ l de glicerol al 50%. Cada vial de partículas alcanza para 10 preparaciones de 50 μ l y cada una de estas rinde 7 disparos de 7.1 μ l que acarrea aproximadamente 1 μ g de DNA plasmídico.

6.20.2. Recubrimiento de las partículas de oro con el DNA a introducir

Se tomaron los viales de 500 μ l de las partículas lavadas y estériles, se agitaron vigorosamente para destruir los aglomerados que se pudieran formar con el glicerol. Posteriormente se transfieren alícuotas de 50 μ l de la preparación a tubos de 1.5 ml. Manteniendo agitación constante se agregaron 5 μ l de DNA (2 μ g/ μ l),

50 μl de CaCl_2 2.5 M frío y 20 μl de espermidina 0.1 M (Grado cultivo celular). Las alícuotas se mantienen agitando por 3 minutos, se reposaron 1 minuto en hielo y se centrifugaron por 20 seg a 13000 rpm para remover el sobrenadante. Posteriormente se agregaron 140 μl de etanol al 70%, se centrifugaron a máxima velocidad por 20 seg, se removió el sobrenadante y se agregaron nuevamente 140 μl de etanol 100%, se resuspendieron, centrifugaron y se removió el sobrenadante para agregar por último 50 μl de etanol absoluto. Antes de bombardear se mantienen resuspendidas las partículas con vortex leve.

6.20.3. Bombardeo

Para el bombardeo, todos los materiales del equipo deben de estar limpios y estériles. Primeramente se montó el macro acarreador sobre su soporte y se le agregaron 7.1 μl de los microproyectiles recubiertos con el DNA en el centro y se dejó en reposo hasta que se secó. Posteriormente se montó el soporte sobre la malla de dispersión y posteriormente todo el conjunto se enroscó. Se colocó un disco de ruptura de 1100 psi el cual soporta esa presión antes de romperse y libera el gas Helio que empuja a los microproyectiles para que impacten sobre la muestra. Se colocaron a 6 cm de distancia de disparo las placas de cultivo con *C. sorokiniana* las cuales fueron inoculadas 4 días previos a la transformación y esparcidas con varilla de vidrio para tener una distribución lo más uniforme posible. Una vez montado todo el equipo y las muestras, se cerró la cámara, se prendió el vacío y se dejó que alcanzara una presión de 27 pulgadas de mercurio (In Hg). Una vez conseguido el vacío necesario se presionó el botón de disparo y se sostuvo hasta que alcanzó la presión de 1200 psi cuando se rompió el disco de ruptura y se liberó el DNA que impacto con las microalgas. Después se apagó el vacío, se sacó la placa y se selló inmediatamente con plástico auto adherible. Posteriormente se desmontaron todas las partes del equipo para repetir el proceso por cada placa inoculada. Las placas de cultivo se mantuvieron por 18 h en obscuridad a 27°C previo a la selección con higromicina.

Tabla 13.- Condiciones de transformación de *C. sorokiniana*

Tamaño de partícula	1.6 μm
Tipo de partícula	Oro
Presión de disparo	1100 psi
Distancia de impacto	6 cm
Presión de vacío	27 mm Hg
Cantidad de DNA	1.2 μg

La transformación genética de *C. sorokiniana* se llevó a cabo en un equipo Biolistic PDS-1000/He (Bio Rad) empleando las condiciones de transformación que muestra la Tabla 13.

Con estas condiciones se realizó el bombardeo de 4 placas de medio de cultivo NB con *C. vulgaris* con 4 días de crecimiento, cada placa se bombardeó 7 veces con el DNA plasmídico, en cada disparo se inoculó 1.2 μg de DNA. Por último, la selección de las microalgas transformadas se realizó en medio NB con Higromicina B (50 mg/l), las microalgas se sembraron cada 4 días en medio de selección fresco para mantenerlas aisladas.

6.21. Extracción de DNA genómico de *C. sorokiniana*

Se realizó la extracción de gDNA por el método de CTAB 2X de las diferentes clonas aisladas para emplearse en la confirmación de la transformación de las mismas por PCR, además se incluyó la cepa silvestre para usarla como control. Para la extracción se inocularon 50 ml de medio NB con higromicina a 50mg/l y se cultivaron a 27°C durante 10 días. Posteriormente se concentraron las células centrifugando a 3000 rpm durante 10 min y se repartió 1 ml del cultivo concentrado a un tubo eppendorf de 1.5 ml, el cual se centrifugó nuevamente para descartar sobrenadante. Al pellet se le añadieron 700 μl del buffer de lisis CTAB con 1% de β -mercaptoetanol y se maceró utilizando un pistilo de plástico. El tubo se incubó durante 30 min a 65°C en un termoblock homogenizando cada 5 min y después se

agregaron 600 µl de Cloroformo:alcohol isoamílico y se mezcló con vortex. Posteriormente se centrifugó la muestra a 10000 rpm por 10 min y el sobrenadante se transfirió a un tubo nuevo donde se agregaron 600 µl de isopropanol almacenándolos a -20°C durante 2 horas para precipitar el DNA. Posteriormente se centrifugó por 10 min, se decantó el sobrenadante y el pellet se lavó con 1 ml de etanol al 70%. Se centrifugaron los tubos nuevamente a las mismas condiciones, se eliminó sobrenadante y el etanol restante se secó mediante centrifugación con vacío a 45°C. Finalmente se resuspendieron las muestras con 20 µl MilliQ estéril, se cuantificó el DNA y se observó su calidad en un gel de agarosa al 0.8%.

6.22. Confirmación, Selección y aislamiento de clonas transformadas de *C. sorokiniana*

La confirmación de la transformación se realizó mediante PCR empleando los primers LpGH-ORF (Tabla 7). Se usaron 100 ng de gDNA para una reacción de 10 µl en donde se analizaron las clonas asiladas que se bombardearon con el DNA plasmídico, la clona Mock (bombardeada sin DNA) y el gDNA de la cepa silvestre. El resultado se visualizó en un gel de agarosa al 1%.

6.23. Diseño de primers para la clonación de la secuencia de LpGH-ORF en el vector pPIC9

Se realizó el diseño de un juego de primers para clonar la secuencia de la LpGH correspondiente a la fracción del péptido maduro (aminoácido 18 a 210). El diseño incluyó la adición de los sitios de restricción *Xho I* hacia el extremo 5' del primer Fw y *Avr II* hacia el extremo 3' del primer Rv (LpGHpPICF y LpGHpPICR Tabla 7). También se añadió una etiqueta de histidina y un sitio de reconocimiento para enterocinasa en el primer Fw, con la finalidad de facilitar su purificación y la escisión de dicha etiqueta respectivamente.

6.24. Clonación de la secuencia de LpGH-ORF en el vector pPIC9

En la Figura 3 se muestra el proceso de clonación del fragmento de la LpGH, el cual se encuentra originalmente en el vector pMDC32 y su incorporación al vector pPIC9.

Se realizó una PCR con los primers LpGHpPIC Fw y Rv (Tabla 7) empleando el DNA plasmídico (pMDC32::LpGH) en una reacción de 50 ul utilizando Master Mix 2X. El programa empleado en el termociclador consta de un ciclo de 94°C por 3 minutos seguido de 35 ciclos de 94°C por 30 segundos, 68°C por 45 segundos y 72°C por 45 segundos, seguido de un último proceso de extensión a 72°C por 10 minutos. La confirmación de la amplificación del inserto se verificó en un gel de agarosa en TAE al 1%, donde el producto esperado del amplicón es de 618 pb.

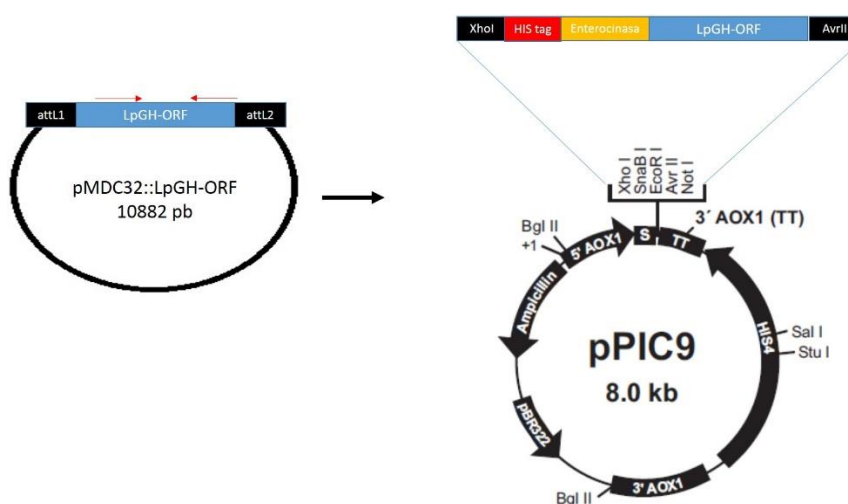


Figura 3.- Construcción del casete de expresión pPIC9::LpGH

Posteriormente se realizó una doble digestión tanto del plásmido pPIC9 como del amplicón obtenido por PCR con las enzimas *Xho I* y *Avr II* en una reacción de 30 ul cada una. Se verificó en gel de agarosa en TAE al 1% la linealización del plásmido comparándolo contra el plásmido sin digerir para verificar que esta haya sido total, cargando los 30 ul de cada reacción en el gel. Posteriormente se cortaron y purificaron las bandas de interés con el kit Wizard SV gel y PCR clean-up system de Promega para evitar tener plásmido no digerido que pudiera

interferir en posteriores reacciones, y se diluyeron en 50 μ l cada uno. Después de la purificación se procedió a observar la calidad del DNA en un gel de Agarosa en TAE al 1%.

Para realizar la construcción del vector se realizó la reacción de ligación entre el vector pPIC9 y el amplicón digeridos en una reacción de 20 μ l siguiendo las indicaciones del proveedor (Bioline) ligasa quick-stick. Se emplearon 5 μ l de buffer de ligación 4X, 1 μ l de ligasa, 10 μ l del inserto y 4 μ l del DNA plasmídico digerido y purificado. Se dejó la digestión a 25°C durante toda la noche y posteriormente se transformaron células calcio competentes de *E. coli* TOP10 F por shock térmico con 2 μ l de cada ligación. Se emplearon dos pools de bacterias para las ligaciones, uno como control positivo (pPIC9 vacío) y uno como control negativo (H_2O). Se siguió el protocolo antes descrito y las células se incubaron por 18 h a 37°C. Se seleccionaron las colonias que crecieron procedentes de la ligación, se transfirieron a una caja réplica y se analizaron por PCR de colonia empleando dos juegos de primers distintos, un juego (AOX) que amplifican la secuencia del promotor de la alcohol oxidasa que contiene el vector pPIC9 que da un producto de 492 pb si el casete está vacío y un producto de 1062 pb si el inserto se integró correctamente al vector y el otro juego de primers corresponde a los específicos de la LpGH con los que se añadieron los elementos génicos necesarios para la construcción y con los cuales se obtiene un producto de 700 pb.

Una vez confirmadas las clonas se procedió a realizar la extracción de DNA plasmídico de las mismas y se buscó un sitio de restricción para linearizar el plásmido y poder así integrarlo al genoma de la levadura por recombinación homóloga.

Se recomienda las enzimas *Sal I*, *Stu I*, *Sac I* y *Bg III* para la linearización del plásmido y su integración en el genoma de *P. pastoris*, en donde las primeras 3 enzimas sirven para recombinar el DNA en la región del promotor AOX1, lo que produce un fenotipo llamado *His⁺ Mut⁺*, mientras que con *Bgl II* se produce un

fenotipo *His⁺ Mut^s*, la diferencia radica principalmente en el sitio de inserción del DNA, ya que este puede alterar el metabolismo de metanol. Si el DNA se introduce en la región del promotor de la alcohol oxidasa (AOX1) se obtiene un fenotipo con un consumo menor de metanol, por eso se le llama así al fenotipo *Mut^s* (De Methanol Utilization Slow), mientras que si la construcción se integra en otra región del genoma de la levadura, ésta quedaría con el promotor AOX intacto y además se incluiría el propio del casete de expresión teniendo un doble de producción de la enzima alcohol oxidasa y por lo tanto el doble de consumo de metanol. La diferencia de estos fenotipos puede ser significativa al momento de expresar una proteína, por eso es deseable probar ambos para determinar cuál tiene una mayor producción de la proteína recombinante.

En este caso particular, del DNAC de la LpGH las enzimas *Sal I*, *Stu I*, *Sac I* y *Bgl II* cortan internamente el inserto, por lo que se optó por digerir el DNA con una enzima alternativa (*Pme I*) la cual hace una incisión dentro de la secuencia del promotor AOX1 de la construcción.

6.25. Preparación y transformación de células electrocompetentes de *P. pastoris* con la construcción pPIC9::LpGH mediante electroporación

Para preparar células electrocompetentes de *P. pastoris* primeramente se inoculó un tubo con 4 ml de medio YPD con un shot (80 ul) de células electrocompetentes y se dejó crecer toda la noche a 30°C a 220 rpm. Al día siguiente se inoculó un matríz con 200 ml de medio YPD empleando 200 ul del cultivo inicial, se dejó incubar por alrededor de 13 h hasta alcanzar una OD₆₀₀ de 0.7-0.9 (en este caso fueron de 0.76). Ya que se alcanzó la OD deseada, se repartió el cultivo en dos tubos de 50 ml para empastillar las células centrifugando a 5000 rpm por 5 min. Posteriormente se decantó el sobrenadante y se resuspendió la pastilla en 30 ml de agua destilada fría y estéril. Una vez resuspendidas las células, se repitió el procedimiento centrifugando, decantando y lavando nuevamente con agua destilada fría estéril para resuspender las células. El tercer proceso de lavado consistió en centrifugar nuevamente a 5000 rpm, decantar el sobrenadante y a

uno de los tubos se le agregaron 15 ml de Sorbitol 1M, se resuspendió la pastilla en vortex y se transfirió el contenido al otro tubo. Después se empastillaron nuevamente las células, se descartó el sobrenadante y se resuspendió la pastilla en 1.5 ml de sorbitol 1 M para transferir shots de células de 80 ul a tubos de 0.6 ml. Cabe destacar que todo el procedimiento debe de realizarse manteniendo siempre las células frías en hielo.

La transformación de células electrocompetentes de *P. pastoris* cepa GS115 se realizó empleando 1 ug de cada uno de los DNAs plasmidicos (pPIC9::LpGH y pPIC9 control positivo), además de agua MQ estéril como control negativo.

El procedimiento consistió en mezclar el DNA plasmídico con un shot de células electrocompetentes de la levadura manteniéndolas frías en hielo. Posteriormente se transfirió la mezcla a una celda de electroporación también fría y se dejó reposar por 5 min en hielo. Una vez transcurrido el tiempo, se retira la celda del hielo y se seca con papel absorbente para retirar los restos de humedad de las placas de contacto de la celda y evitar que se produzca un corto circuito. Se colocó la celda en la cámara del electroporador asegurándose de que las placas hicieran contacto con las terminales de descarga, se presionaron al mismo tiempo los botones de descarga del generador y se soltaron al momento de escuchar el pitido del equipo. Inmediatamente después de la descarga se agregaron 500 ul de Sorbitol 1M a las células electroporadas y se recuperó toda la mezcla para sembrar las células en placas de medio MD (Mínimo Dextrosa) para la selección de las clonas transformadas. La selección se basa en que la levadura no tiene la capacidad de producir Histidina y el medio MD carece de la misma, sin embargo las células que logran integrar el casete de expresión tienen, por complementariedad, la capacidad de producir este aminoácido, por lo que las células que desarrollen colonias en este medio están transformadas.

6.26. Caracterización de las clonas transformadas de *P. pastoris*

Una vez que se obtienen colonias de la levadura transformadas y seleccionadas en medio MD, se deben de caracterizar por PCR con los primers AOX para

verificar el fenotipo (MUT^s o MUT⁺). La característica que presentan se puede observar en un gel de agarosa, donde las clonas con fenotipo MUT^s presentan una amplicón del tamaño correspondiente a la amplificación del fragmento de AOX del vector más el tamaño del inserto, en este caso es de 1086pb, esto debido a que la inserción del casete de expresión se realizó en el gen AOX que se encuentra en el genoma de la levadura, desplazándolo y sustituyéndolo por el de la construcción. En el caso del fenotipo MUT⁺, se deben de apreciar dos amplicones, el correspondiente a los 1086pb de la construcción, más 2.2 kb correspondientes al gen propio de la levadura. En caso de encontrarse únicamente el amplicón de 2.2kb significa que la clona analizada no contiene nuestro inserto.

6.27. Preparación de clonas de *P. pastoris* para la producción de rLpGH

Se seleccionaron 3 clonas de *P. pastoris* confirmadas como transformantes para la producción de la hormona de crecimiento recombinante y se incluyó una clona transformada con el vector pPIC9 sin inserto además de la clona no transformada (WT) para usarlas como control de la producción.

Se inoculó un tubo falcon de 50 ml con 10 ml de medio YPD (Extracto de levadura 1%, Peptona 2% y Dextrosa 2%) con cada una de las clonas descritas anteriormente (WT, C-2, C-15, C-16 y C-17). Las células se incubaron a 27°C y se monitoreó la OD₆₀₀, cuando esta fue de 1 se tomó una muestra del cultivo para almacenar en glicerol a -80°C. Al alcanzar una OD₆₀₀ igual a 2.0 se detuvo el crecimiento del cultivo y se centrifugó a 5000 rpm durante 10 min, se descartó el medio de cultivo y se resuspendió en 10 ml de agua destilada estéril fría. Este procedimiento se repitió en dos ocasiones más para eliminar cualquier resto de medio YPD que pudiera permanecer en el cultivo celular.

6.28. Inducción de la expresión de rLpGH en *P. pastoris*

Una vez que se tiene el cultivo a la densidad óptica deseada y que este fue lavado, se procedió a agregar 50 ml del medio de inducción BMMY (Extracto de levadura 1%, Peptona 2%, 100 mM de fosfato de potasio pH 6.0, YNB 1.34%,

Biotina $4 \times 10^{-5}\%$) y se transfirió todo a matraces de 500 ml, se tomó una muestra de 1 ml de cada uno de los cultivos a inducir siendo esta primera toma a la hora cero de inducción, la cual, para poder llevarse a cabo, se le agregó metanol para 1% volumen final con respecto al cultivo, el cual se adicionó cada 24 h para compensar el metanol consumido por la levadura y el volatilizado. Se tomaron muestras de 1 ml de cada cultivo a las horas 12, 24, 48, 72 y 96 y se transfirieron a tubos eppendorf de 2 ml. Cada una de las muestras se centrifugó por 5 min a 12000 rpm y el medio de cultivo se transfirió a un tubo nuevo para su posterior análisis y cuantificación de proteínas.

6.29. Extracción de proteínas de *P. pastoris* y *C. sorokiniana*

Se realizó la extracción de proteínas de la levadura y la microalga empleando perlas de vidrio y 100 μ l de buffer de extracción (50 mM de fosfato de sodio pH 7.4, 1 mM de EDTA, 5% de glicerol y 1 mM de PMSF como inhibidor de proteasas añadido justo antes de su uso). El procedimiento constó de dar vortex a máxima velocidad a los tubos con el paquete celular durante 30 s y después transferir el tubo a hielo por 30 s, repitiendo el proceso en ocho ocasiones. Posteriormente se centrifugó el cultivo a 12000 rpm durante 5 min y se recuperó el sobrenadante, el cual fue transferido a un tubo nuevo y empleado para su análisis y cuantificación de proteínas.

6.30. Cuantificación de proteína total por el método de Bradford

Se realizó un stock de albúmina sérica bovina (BSA) a 1 mg/ml y a partir de este se realizaron alícuotas a 0 (H_2O), 1.25, 2.5, 5, 10, 20, 40, 60, 80 y 100 μ g/ml para realizar la curva estándar, también se realizaron diluciones de 1:100 de las muestras a analizar. De cada una de las muestras a cuantificar y de las diluciones para elaborar la curva estándar se tomaron 160 μ l y se le agregaron 40 μ l del reactivo de Bradford y se leyó la absorbancia a una longitud de onda de 595 nm. Cada una de las muestras se realizó por triplicado.

Una vez que se obtuvieron los datos de la absorbancia se procedió a graficar los valores obtenidos para la curva estándar para obtener el coeficiente de regresión lineal (r^2), la ordenada al origen, la pendiente de la recta y con estos datos poder obtener la concentración de proteína de la muestra problema para cada uno de los tiempos de la inducción y de cada una de las clonas para observar el incremento de la concentración de la proteína a lo largo del tiempo.

6.31. Electroforesis en geles de poliacrilamida-SDS

Se realizó el análisis de proteínas por electroforesis para determinar la presencia de la rLpGH en medio de cultivo y en las proteínas del extracto celular. Se utilizó un gel de empaquetamiento al 4% y a 12% para el gel de resolución. Se cargaron 10 μ g de proteína del extracto celular y un promedio de 4 μ g de proteína proveniente del medio de cultivo para cada uno de los tiempos y muestras, realizando cada gel por duplicado para su análisis por tinción en azul de coomassie y para western blot respectivamente, en cada uno de los geles se incluyó una muestra control de tamaño conocido (40 kDa) el cual tiene una etiqueta de histidina para su detección con anticuerpos.

Se tiñó cada uno de los geles durante 5 min en azul de coomassie (azul brillante de coomassie R-25 1%, Metanol 30%, H₂O 60% y Ác. Glacial acético 10%). Posteriormente se destiñó el gel en una solución de metanol 30%, ác. Glacial acético 10% y H₂O 60% durante toda la noche hasta que este quedara completamente transparente y se evidenciara la presencia de las bandas de proteínas en el gel, el cual fue documentado utilizando el transluminador del equipo Gel Doc XR+ system de Bio Rad.

6.32. Western blot para la detección de His tag en rLpGH

Primeramente se realizó la transferencia de las proteínas del gel de poliacrilamida a una membrana de PDVF (Polifluoruro de vinilideno) usando una cámara de transferencia a 25 volts durante 35 min. Se empleó un buffer de transferencia (20 mM de Tris base pH 8.0, 150 mM de Glicina y Metanol al 20%), con el cual se

mantuvieron humedecidos los filtros los cuales se utilizan para realizar el contacto para mantener el paso de la corriente a través del gel hacia la membrana y realizar la transferencia de las proteínas. Antes de usarse, la membrana se activa humedeciéndola en metanol durante algunos segundos, posteriormente se pone encima el gel de poliacrilamida y encima de este otro filtro humedecido en buffer de transferencia. Este proceso se repitió para cada uno de los geles.

Una vez que se hayan transferido las proteínas a la membrana, lo cual se podrá detectar debido a la presencia del marcado de peso molecular en las mismas, se procede a bloquear la membrana con leche descremada en polvo al 5% disuelta en TNT (10mM de Tris-HCl pH 8.0, 150 mM de NaCl y Tween 20 al 0.05%) durante dos horas. Posteriormente se lava la membrana en tres ocasiones con buffer TNT durante 5 min. Se agregó el anticuerpo primario (Anti His tag 1:3000) y se dejó incubando durante dos horas con agitación constante. Transcurridas las dos horas, el anticuerpo se recupera para su reutilización. Nuevamente se lavó la membrana con TNT y se agregó el anticuerpo secundario (Anti anti His tag de conejo) con el cual se incubó la membrana durante dos horas a temperatura ambiente y agitación constante. El anticuerpo secundario también se recuperó después de la incubación, se lavó la membrana en tres ocasiones con TNT y se realizó la reacción de revelado con 30 ml de TBS (50 mM de Tris base y 150 mM de NaCl a pH 7.6) con 20 mg de DMB y 24 μ l de peróxido de hidrógeno. La reacción se llevó a cabo en 20 min y se observó una coloración café de las proteínas ricas en histidinas entre ellas la rLpGH. El resultado fue documentado con el equipo Gel Doc XR+ system de Bio Rad

7. RESULTADOS

7.1. Concentración y calidad del ARN total

Se realizó la extracción de RNA total de cerebro de *L. peru* por el método de trizol, se determinó la cantidad de este por espectrofotometría (Tabla 14) y se verificó la calidad del mismo en un gel de agarosa-TBE al 1% (Figura 4). Se sintetizó ADN complementario usando la técnica de RT-PCR. También se empleó el RNA para la síntesis de DNAc-RACE siguiendo las indicaciones de SMARTer RACE DNAc amplification kit (Clonetech). Una vez generado el DNAc se almacenó a -20°C hasta su uso.

Tabla 14.- Datos de cuantificación de RNA

Muestra	ul cargados	Concentración	Carril
1 kb plus	2	--	1
1A	5	71.6 ng/ul	2
1B	5	232.1 ng/ul	3
2A	5	151.5 ng/ul	4
2B	5	1201 ng/ul	5
3A	5	120 ng/ul	6
3B	5	1864.4 ng/ul	7

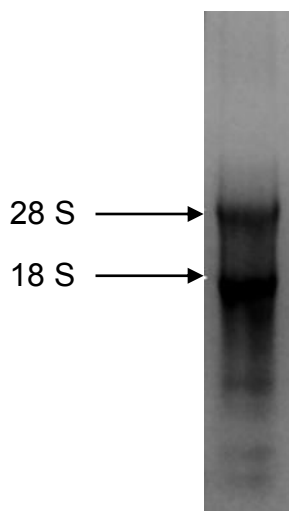


Figura 4.- RNA total de *L. peru*. Se señalan las bandas correspondientes a las sub unidades ribosomales 28 S y 18 S.

7.2. Diseño de primers degenerados

Se empleó el programa CLC Main Workbench V5.5 para realizar un alineamiento de secuencias de diferentes especies de peces (

Figura 5). Los primers se diseñaron a partir de regiones altamente conservadas entre las diferentes secuencias procurando no poseer más de cuatro degeneraciones. Los primers (LpGHPCR615F DE, LpGHPCR615R DE, LpGHPCR380F DI y LpGHPCR380R DI Tabla 7) se sintetizaron en el Instituto de Biotecnología de la Universidad Nacional Autónoma de México. En la

Figura 5 se muestra el alineamiento de secuencias de hormonas de crecimiento y la ubicación de los primers degenerados.

```

O.niloticus      -----CTCGCCCG-CAAACAGAGCCTGAACTGATGCCAGCCATGAACTCAGTC 47
Tilapiasp.      -----CTCGCCCG-CAAACAGAGCCTGAACTGATGCCAGCCATGAACTCAGTC 47
T.mossambica    -----CTCGCCCG-CAAACAGAGCCTGAACTGATGCCAGCCATGAACTCAGTC 42
L.erythropterus -----GCCGCGCGGCAGCCATAT-----AATGGACAGAGTT 31
S.aurata        CAGATCTAGTCACCAGAACTTGAACCAAAACCAGAACCTGAACCAGACATGGACAGAGTG 60
                ***.**:***
                >>>>>>>>>>>>
                LpGHPCR615F DE

O.niloticus      GTCCTCCTGCTGTCGGTTGTGTGTTGGGCGTCTCCTCTCAGCAGATCACAGACAGCCAG 107
Tilapiasp.      GTCCTCCTGCTGTCGGTTGTGTGTTGGGCGTCTCCTCTCAGCAGATCACAGACAGCCAG 107
T.mossambica    GTCCTCCAGCTGTCGGTTGTGTGTTGGGCGTCTCCTCTCAGCAGATCACAGACAGCCAG 72
L.erythropterus GTCGTCTGCTCTCAGTCTGTCTCTGGGCGTCTCCTCTCAGGCAATCACAGAAGCCAG 91
S.aurata        GTGCTCATGCTGTCGGTGATGTCTCTGGGCGTCTTCTCAGCCGATCACAGACGGCCAG 120
                ** *.**:*** **.* ** * * ***** ***** ..*****..*****
                >>>>>>>>>>

O.niloticus      CGTTTGTCTCCATTGCAGTCAACAGAGTCACGCACCTGCACCTGCTCGCCAGAGACTC 167
Tilapiasp.      CGTTTGTCTCCATTGCAGTCAACAGAGTCACGCACCTGCACCTGCTCGCCAGAGACTC 167

```



```

O.niloticus      TGACATCAGAACGTTTTTCTGACATAACTGTGATGCAAGGTGTGAACGGGAATAATGTT 821
Tilapiasp.      TGACATCAGAACGTTTTTCTGACATAACTGTGATGCAAGGTGTGAACGGGAATAATGTT 821
T.mossambica    -----
L.erythropterus ---CCTCTGTCAGGTGCTGAAG-----TG-----CATACTGATGAT 749
S.aurata        TAGCTCCTGTTTCAGTGGTGGAGGATGTAAT-TGAAGGTGGTCTGGTGTGTCATGATGATGAA 839

O.niloticus      ATCTGTGAAATAAATGTGTTGCATTGAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA 881
Tilapiasp.      ATCTGTGAAATAAATGTGTTGCATTGAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA 881
T.mossambica    -----
L.erythropterus G-----TCA--TAGTGATGTCATACG-----ATTGAGCTTGTGAAATAAA----- 787
S.aurata        AGTTTTGAACAGGAAGTGATGTCATACTGTGAAATAAAGTCTGTGCTGTTTGCATTC--- 896

O.niloticus      AAAAAA 887
Tilapiasp.      AAAAAA 887
T.mossambica    -----
L.erythropterus -----
S.aurata        -----

```

Figura 5.- Alineamiento de secuencias de hormonas de crecimiento

7.3. Obtención de un fragmento interno de la GH de *L. peru*

Se realizó una reacción de PCR para lograr amplificar un fragmento de 615 pb usando el juego de primers (LpGHPCR615F DE y LpGHPCR615R DE) y DNAC sintetizados anteriormente. El producto obtenido se muestra en la Figura 6.

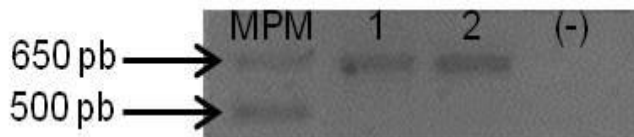


Figura 6.- Fragmento de 615 pb. MPM (1 kb plus); 1 y 2 (amplicón); Agua milli Q como templado en control negativo (-).

A partir del mismo, se realizó una PCR anidada para obtener un producto de 380 pb empleando el juego de primers (LpGHPCR380F DI y LpGHPCR380R DI) (Figura 7).

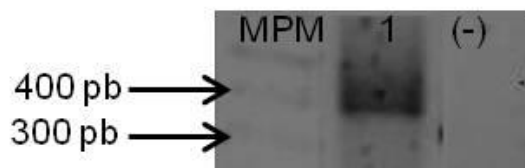


Figura 7.- Fragmento de 380 pb. MPM (1 kb plus); 1 (amplicón); control negativo (-)

7.4. Caracterización de 380 pb del DNAC de GH de *L. peru*

Para la secuenciación, se picaron 10 clonas de *E. coli* y se seleccionaron 9 clonas positivas por medio de PCR de colonia en donde se observa un amplicón de aproximadamente 631 pb (Figura 8).

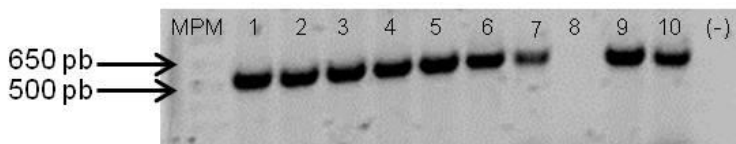


Figura 8.- PCR de colonia de *E. coli*. MPM (marcador de peso molecular, 1 kb plus); 1-10 (clonas analizadas); control negativo (-)

7.5. Análisis de secuencias de *L. peru*

Se realizó el análisis de la secuencia nucleotídica parcial del DNAC de *L. peru*, se obtuvo un producto de 376 pb y se determinó mediante tBlastn el porcentaje de similitud de la secuencia de aminoácidos obtenida con el de otras hormonas de crecimiento de peces (Tabla 15).

Tabla 15.- Porcentaje de identidad de la secuencia de aminoácidos de la LpGH con otras hormonas de crecimiento

Especie	No. Acceso	% Identidad
<i>Siniperca kneri</i>	AY155227.3	91.73
<i>Sciaenops ocellatus</i>	AF065165	91.47
<i>Sciaenops ocellata</i>	AF063834	91.47
<i>Sparus aurata</i>	U01301	90.43
<i>Pseudosciaena crocea</i>	AF231941	90.4
<i>Micropterus salmoides</i>	DQ666528.1	90.13
<i>Lepomis cyanellus</i>	AY530822.1	90.13
<i>Red sea bream</i>	X06962.1	90.16
<i>Sparus aurata</i>	AY038038.1	89.89
<i>Sparus aurata</i>	S54890.1	89.89
<i>Rhabdosargus sarba</i>	AY553207.1	89.89
<i>Acanthopagrus latus</i>	S58867.1	89.36
<i>Lateolabrax japoicus</i>	L43629.1	89.36

la amplificación anidada utilizando éste producto como templado mostró una banda de casi 400 pb (Figura 11).

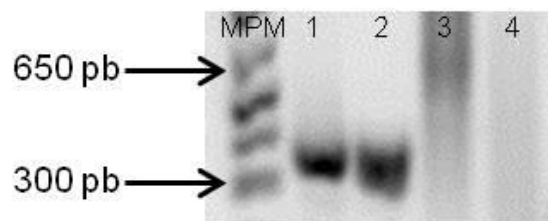


Figura 10.- 5' y 3'-RACE. MPM (1 kb plus); 1 (amplicón 5' RACE); 2 (control negativo reacción 5' RACE); 3 (amplicón 3' RACE); 4 (Control negativo 3' RACE)

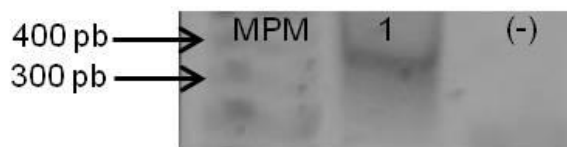


Figura 11.- PCR anidado de la reacción de 3'-RACE. MPM (1 kb plus); 1 (amplicón 3' RACE); control negativo (-)

Los productos de las reacciones de PCR se ligaron en el vector pGEM-T Easy con el cual se transformaron células de *E. coli* Top 10 y se picaron un total de 34 colonias, a las cuales se les realizó PCR de colonia para comprobar aquellas colonias positivas que pudieran presentar el vector con el inserto (Figura 12 y Figura 13). 15 de las colonias seleccionadas corresponden al producto obtenido del PCR anidado que corresponde a la reacción de 3'-RACE (Figura 12).

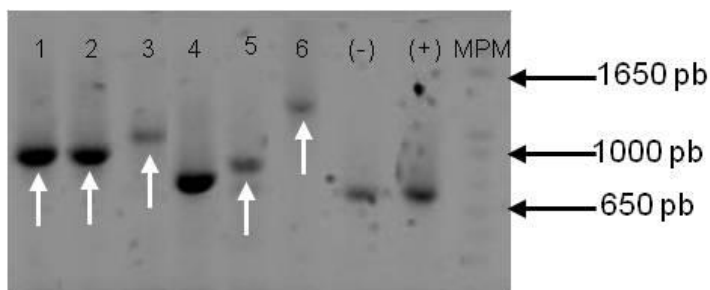


Figura 12.- PCR de colonia de la reacción 3'-RACE. MPM (1 kb plus); 1-6 (clonas analizadas); control negativo (-) y control positivo (+). Las flechas blancas indican los productos que fueron purificados para secuenciarse.

El resto de las colonias seleccionadas corresponden a la reacción de 5'-RACE (Figura 13).

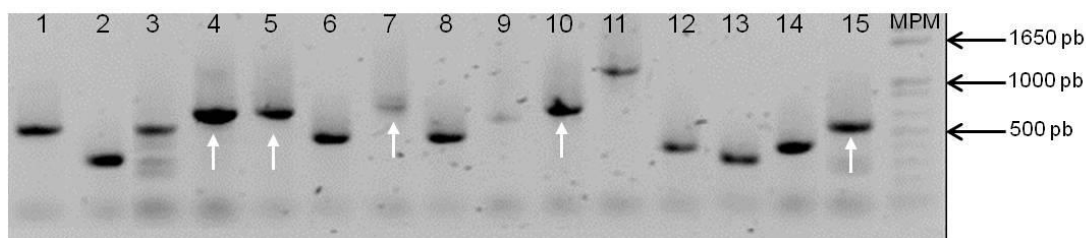


Figura 13.- PCR de colonia de la reacción 5'-RACE. MPM (1 kb plus); 1-15 (clonas analizadas). Las flechas blancas indican los productos que fueron purificados para secuenciarse.

Para poder obtener las secuencias de los insertos dentro del plásmido, se realizó una extracción de ADN plasmídico que se envió a secuenciar. La calidad del ADN extraído se muestra en la Figura 14, mientras que los datos de la concentración y pureza obtenidos son mostrados en la Tabla 16.

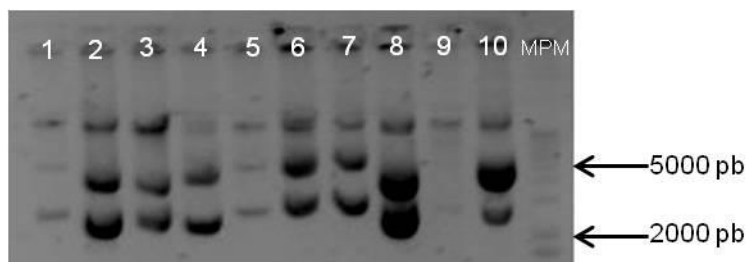


Figura 14.- Extracción de DNA plasmídico de *E. coli*. MPM (1 kb plus); 1-10 (muestras de DNA)

Tabla 16.- Datos de la calidad y pureza del DNA plasmídico.

Muestra	260/280	260/230	ng/ul	Carril
Clona122	1.97	2.35	2359.9	1
Clona115	1.47	1.77	5519.5	2
Clona112	1.43	1.72	5482.6	3
Clona124	1.51	1.84	5399.4	4
Clona1210	1.28	1.48	5499	5
Clona622	1.08	1.22	5675.4	6
Clona323	1.31	1.53	5545.7	7
Clona411	1.31	1.49	5535.5	8
Clona511	1.19	1.33	5663	9
Clona521	1.22	1.42	5573.1	10
1 kb plus	--	--	--	11

7.8. Inferencia de la estructura del gen de LpGH

Se realizó un PCR para comparar la diferencia de tamaño entre el DNAC de la LpGH y el producto de la PCR a partir del DNAG extraído de músculo de *L. peru*,

para determinar posibles regiones intrón dentro de la secuencia de la hormona. La reacción se llevó a cabo con primers que se alinean a los extremos no codificantes del gen (5' y 3' UTR). El resultado se muestra en la Figura 15, donde el carril marcado como DNAC corresponde al amplicón obtenido empleando DNAC como templado, en el cual se aprecia un tamaño de que ligeramente supera los 1000 pb; mientras que el carril marcado como gDNA corresponde al amplicón obtenido de la reacción con DNA genómico de *L. Peru*, y arroja un producto de alrededor de 3000 pb lo que indica la presencia de al menos 2000 pb de región intrón.

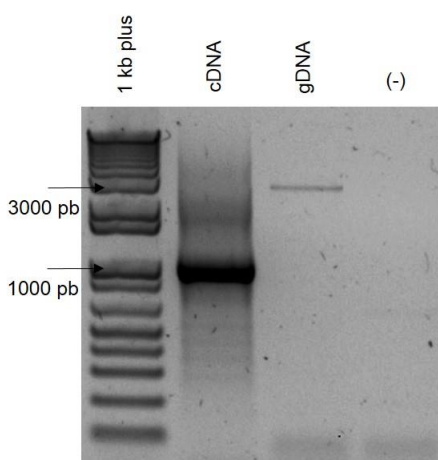


Figura 15.- Comparación de productos de PCR entre DNAC y gDNA para la inferencia de la existencia de intrones dentro de la secuencia de la LpGH.

7.9. Análisis de secuencias de los productos de PCR-RACE y obtención del ORF de la LpGH

Para realizar el análisis de las secuencias se empleó el programa Unipro Ugene v1.9.8 para visualizar la secuencia nucleotídica y los cromatogramas de cada producto. Se empleó la herramienta vecscreen (NCBI) para limpiar las secuencias y eliminar todo lo correspondiente al vector pGEM-T Easy. El resto de las secuencias se analizaron y ensamblaron con la herramienta Cap3, con la cual se obtuvo una secuencia consenso de 1025 nucleótidos (Figura 16) de los cuales 153 nucleótidos corresponden a la región 5' UTR y 257 nucleótidos del extremo 3' UTR,

obteniendo un ORF de 615 nucleótidos que codifica para una proteína de 204 aminoácidos. En la Figura 16 se encuentra localizada la posición de los primers LpGHPCRIF (>>>>>>>) y LpGHPCRIR (<<<<<<) (Tabla 7), desde la metionina inicial hasta el codón de paro e incluyendo un codón de paro adicional, además se puede apreciar en letras negritas la secuencia que corresponde al inicio de la traducción en organismos eucariotas o secuencia Kozak, que son 10 nucleótidos rio arriba del codón de inicio de la traducción (ATG) y se subraya la señal de poliadenilación del RNAm .

```

1                               CACAGACCACATCTACCAGAACCAGAGCCAGAA
34 CCAGAGCCAGAACCAGAGCCTGAACCAGAGCCTGAACCAGAACCAGAGCCAGACCCAGAG
121 CCAGAACCAGAGCCAGAACCAGAACCAGAGCCAGAACCTGAACCAGAGCCAGAACCAGCC

1  M D R V V L L L S V V C L G V T S Q P I
181 ATGGACAGAGTGGTCTCTGCTGCTCGGTGGTGTGTCTGGTGTGACCTCTCAGCCAATC
>>>>>>>>>>>>>>>>>>

21  T D G Q R L F S I A V S R V Q H L H L L
241 ACAGACGGCCAGCCTCTGTCTCCATCGCAGTCAGCAGAGTTCAACACCTCCACCTGCTC

41  A Q R L F S D F E S S L Q T E E Q R Q L
301 GCTCAGAGGCTCTTCTCAGACTTTGAGAGCTCTCTGCAGACGGAGGAGCAACGTCAACTC

61  N K I F L Q D F C N S D Y I I S P I D K
361 AACAAAATCTTCTCGCAGGATTTCTGCAACTCTGATTACATCATCAGCCCCATCGACAAG

81  H E T Q R S S V L K L L S I S Y R L V E
301 CACGAGACACAACGCAGCTCTGTCTGAAGCTCTTATCCATCTCCTATCGATTGGTTCGAG

101 S W E F P S R S L S G G S S P R N Q I T
361 TCTTGGGAGTTCCCAGTCTTCTCTTCTGGAGTTCTTCTCCAGGAACCAGATTACT

121 P K L S E L K T G I L L L I R A N Q D G
421 CCCAAACTGTCTGAGCTGAAGACGGGGATCCTGCTTCTGATCAGGGCCAATCAGGACGGG

141 A E I F P D S S A L Q L A P Y G N Y Y Q
481 GCAGAGATCTTCCCTGATAGCTCCGCCCTCCAGCTGGCTCCTTATGGAAACTATTATCAG

161 S L G G D E S L R R T Y E L L A C F K K
541 AGTCTGGGAGGCGACGAGTCGCTGAGACGAACCTACGAAGTCTGCTGCCTGCTTCAAGAAA

181 D M H K V E T Y L T V A K C R L S P E A
601 GACATGCACAAGGTGGAGACGTACCTGACGGTGGCCAAATGTCGACTCTCTCCAGAGGCC
<<

201 N C T L *
661 AACTGCACCTTGTAGCCCCGCCCTACGCTGTGAAGCCACGCCCTGTCAATGATGCGCTCC
<<<<<<<<<<<<<<<<<<<<

721 CTGCATGTTCTGTAGCTCCGCCCTCCATGCTTTCTGACTGCTAACTAGCATTAGCCCCCAG
781 TGGGTGTCTTTTTTCACAGTGATGATGACGGTGAAGGTTTTCCGATGTCGTGATGATGA
841 AAGCTGTAACAGGAAGTATGTCACACTGTCTCTGTGAGAAATAAGCCTGTGCTGTAAT
901 GCTTAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA

```

Figura 16.- Secuencia de aminoácidos y primers que flanquean el ORF de la LpGH. Los símbolos < y > indican la posición y dirección de amplificación de los primers; Los aminoácidos se indican con el código de una letra; **AGAACCAGCC**, secuencia Kozak; AAATAA, señal de poliadenilación del RNAm.

Para obtener el ORF *in vitro* que se clonó en *P. pastoris* y *C. sorokiniana*, se empleó el DNAc 3' que se utilizó para el RACE. En la Figura 17 se puede apreciar que el amplicón obtenido se encuentra entre los 500 y 650 pb, lo que concuerda con el tamaño esperado de 618 pb.

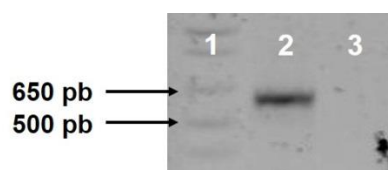


Figura 17.- Amplicones obtenidos del ORF de la LpGH

Se comprobó la dirección de la secuencia insertada en el plásmido mediante PCR de colonia (Figura 18) y secuenciación. El tamaño de los amplicones se encuentra entre 650 y 800 pb, el producto esperado era de 763 pb de los cuales 618 pb corresponden a la secuencia de interés y 145 pb corresponden al fragmento del vector que flanquea el primer M13F.

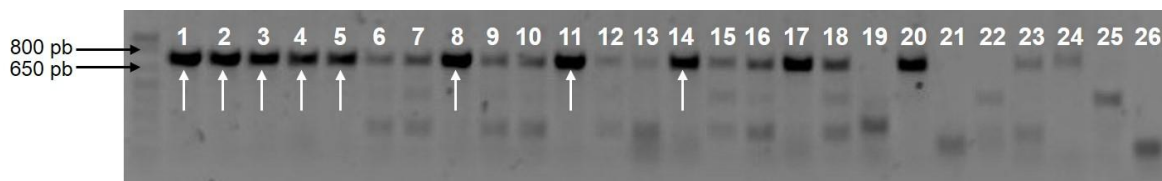


Figura 18.- PCR de colonia del vector pCR8::LpGH-ORF. Los números indican las colonias analizadas y las flechas blancas indican los productos que se enviaron a secuenciar

7.10. Análisis de la secuencia de aminoácidos de la LpGH con otras especies de peces

El análisis se realizó mediante un alineamiento de secuencias con la herramienta ClustalW, donde se comparó la LpGH con otras GHs de distintas especies de peces (Figura 19). Se detallan los aminoácidos importantes para la función y estructura de las hormonas, los dominios que las comprenden, así como los cuatro residuos de cisteína que permiten la formación de puentes disulfuro. Se identificó el péptido señal (marcada en un recuadro rojo), donde la escisión se encuentra entre los aminoácidos 17 y 18 (Watahiki Masanori et al. 1989), estos datos corresponden con los obtenidos con el programa en línea SignalIP 4.0 (Petersen et al. 2011), en recuadros negros se encuentran los 5 dominios que conforman la fracción del péptido maduro denominados GD1 a GD5. Los aminoácidos marcados en rojo (Ala-24, Ser-54, Ser-78, Leu-106, Leu-116 y Asp-122) son considerados importantes para la función y estructura de la hormona, además de que están relacionados con el receptor transmembranal de dicha hormona en el sistema. Por último, los aminoácidos marcados en negro corresponden a los cuatro residuos de cisteína encargados de la formación de puentes disulfuro. Los residuos 176 y 184 de cisteína están relacionados con la formación de un loop pequeño, mientras que los residuos 52 y 160 con la formación de un loop grande. Además de enmarcar los detalles más importantes dentro de la secuencia de aminoácidos de la proteína, se generó la información correspondiente al tamaño (204 aa), peso (23 kDa) y punto isoeléctrico (6.89).

	Peptido señal	GD1_24	GD2	GD5	GD8
37*	Mus musculus	---MADRSRMLIVSLICLLLPQKASIFAMFSLFSSNARVQHLHQLADTYREYRARIYEGQGVRSIQNRQAAP	ETIIPAPTRGEEAKRIMDEMLRFR	ETIIPAPTRGEEAKRIMDEMLRFR	ETIIPAPTRGEEAKRIMDEMLRFR
39*	Bos taurus	---MARGFSTLAFALICLIPMTVYGFAMFSLSEFANNVRAQHRLQIADYFEFRTYRIVGQVRSIQNTQVAF	ETIIPAPTRGEEAKRIMDEMLRFR	ETIIPAPTRGEEAKRIMDEMLRFR	ETIIPAPTRGEEAKRIMDEMLRFR
61*	Oncorhynchus nerka I	---MGQVFLMPLV---	---LASCFTLSGAMENQALFNIAVNRVQHLHLQKMFNDFEFTLLPERRQLNKIFLDF	---DSYSPDKDQETCKSVYLLHLH	FRLLIQQWLGVPQFTS
63*	Oncorhynchus masou I	---MGQVFLMPLV---	---LASCFTLSGAMENQALFNIAVNRVQHLHLQKMFNDFEFTLLPERRQLNKIFLDF	---DSYSPDKDQETCKSVYLLHLH	FRLLIQQWLGVPQFTS
62*	Oncorhynchus mykiss I	---MGQVFLMPLV---	---LASCFTLSGAMENQALFNIAVNRVQHLHLQKMFNDFEFTLLPERRQLNKIFLDF	---DSYSPDKDQETCKSVYLLHLH	FRLLIQQWLGVPQFTS
61*	Oncorhynchus tshawytscha I	---MGQVFLMPLV---	---LASCFTLSGAMENQALFNIAVNRVQHLHLQKMFNDFEFTLLPERRQLNKIFLDF	---DSYSPDKDQETCKSVYLLHLH	FRLLIQQWLGVPQFTS
61*	Oncorhynchus tshawytscha II	---MGQVFLMPLV---	---LASCFTLSGAMENQALFNIAVNRVQHLHLQKMFNDFEFTLLPERRQLNKIFLDF	---DSYSPDKDQETCKSVYLLHLH	FRLLIQQWLGVPQFTS
61*	Oncorhynchus nerka II	---MGQVFLMPLV---	---LASCFTLSGAMENQALFNIAVNRVQHLHLQKMFNDFEFTLLPERRQLNKIFLDF	---DSYSPDKDQETCKSVYLLHLH	FRLLIQQWLGVPQFTS
60*	Oncorhynchus keta II	---MGQVFLMPLV---	---LASCFTLSGAMENQALFNIAVNRVQHLHLQKMFNDFEFTLLPERRQLNKIFLDF	---DSYSPDKDQETCKSVYLLHLH	FRLLIQQWLGVPQFTS
61*	Salmo salar I	---MGQVFLMPLV---	---LASCFTLSGAMENQALFNIAVNRVQHLHLQKMFNDFEFTLLPERRQLNKIFLDF	---DSYSPDKDQETCKSVYLLHLH	FRLLIQQWLGVPQFTS
61*	Oncorhynchus masou II	---MGQVFLMPLV---	---LASCFTLSGAMENQALFNIAVNRVQHLHLQKMFNDFEFTLLPERRQLNKIFLDF	---DSYSPDKDQETCKSVYLLHLH	FRLLIQQWLGVPQFTS
60*	Oncorhynchus mykiss II	---MGQVFLMPLV---	---LASCFTLSGAMENQALFNIAVNRVQHLHLQKMFNDFEFTLLPERRQLNKIFLDF	---DSYSPDKDQETCKSVYLLHLH	FRLLIQQWLGVPQFTS
61*	Oncorhynchus mykiss gairdneri II	---MGQVFLMPLV---	---LASCFTLSGAMENQALFNIAVNRVQHLHLQKMFNDFEFTLLPERRQLNKIFLDF	---DSYSPDKDQETCKSVYLLHLH	FRLLIQQWLGVPQFTS
87*	Lutjanus peru	---MDRIVLLSVL---	---SLGVSSQALTEGQALFESIANVRVQHLHLQKMFNDFEFTLLPERRQLNKIFLDF	---DVIISPDKDQETCKSVYLLHLH	FRLLIQQWLGVPQFTS
87*	Morone axatilis	---MDRIVLLSVV---	---SLGVSSQALTEGQALFESIANVRVQHLHLQKMFNDFEFTLLPERRQLNKIFLDF	---DVIISPDKDQETCKSVYLLHLH	FRLLIQQWLGVPQFTS
87*	Sebastes schlegelii	---MDRIVLLSVV---	---SLGVSSQALTEGQALFESIANVRVQHLHLQKMFNDFEFTLLPERRQLNKIFLDF	---DVIISPDKDQETCKSVYLLHLH	FRLLIQQWLGVPQFTS
87*	Scaenops ocellatus	---MDRIVLLSVV---	---SLGVSSQALTEGQALFESIANVRVQHLHLQKMFNDFEFTLLPERRQLNKIFLDF	---DVIISPDKDQETCKSVYLLHLH	FRLLIQQWLGVPQFTS
87*	Micropetrus salmoides	---MDRIVLLSVV---	---SLGVSSQALTEGQALFESIANVRVQHLHLQKMFNDFEFTLLPERRQLNKIFLDF	---DVIISPDKDQETCKSVYLLHLH	FRLLIQQWLGVPQFTS
89*	Siniperca kneri	---MDRIVLLSVV---	---SLGVSSQALTEGQALFESIANVRVQHLHLQKMFNDFEFTLLPERRQLNKIFLDF	---DVIISPDKDQETCKSVYLLHLH	FRLLIQQWLGVPQFTS
89*	Epinephelus coioides	---MDRIVLLSVV---	---SLGVSSQALTEGQALFESIANVRVQHLHLQKMFNDFEFTLLPERRQLNKIFLDF	---DVIISPDKDQETCKSVYLLHLH	FRLLIQQWLGVPQFTS
86*	Pagrus major	---MDRIVLLSVV---	---SLGVSSQALTEGQALFESIANVRVQHLHLQKMFNDFEFTLLPERRQLNKIFLDF	---DVIISPDKDQETCKSVYLLHLH	FRLLIQQWLGVPQFTS
87*	Sparus aurata	---MDRIVLLSVV---	---SLGVSSQALTEGQALFESIANVRVQHLHLQKMFNDFEFTLLPERRQLNKIFLDF	---DVIISPDKDQETCKSVYLLHLH	FRLLIQQWLGVPQFTS
87*	Acanthopagrus latus	---MDRIVLLSVV---	---SLGVSSQALTEGQALFESIANVRVQHLHLQKMFNDFEFTLLPERRQLNKIFLDF	---DVIISPDKDQETCKSVYLLHLH	FRLLIQQWLGVPQFTS
106	Mus musculus	---RIFNSIMFGTSRVIEX	---KDLREGIQA	---VGLLQVYKDFPNAMGSDALLKRVYLLSG	---RKKDHRHRTVTLVAVK
116	Bos taurus	---RVFNSLVFGTSRVIEX	---KDLREGIQA	---VGLLQVYKDFPNAMGSDALLKRVYLLSG	---RKKDHRHRTVTLVAVK
116	Oncorhynchus nerka I	---INSIMAVRNANQISEK	---SOLKAVGINL	---ITGSG	---SVLSDSDNSQHLFFPYGNYQYQLGEGNVRVYLLA
116	Oncorhynchus masou I	---INSIMAVRNANQISEK	---SOLKAVGINL	---ITGSG	---SVLSDSDNSQHLFFPYGNYQYQLGEGNVRVYLLA
116	Oncorhynchus mykiss I	---INSIMAVRNANQISEK	---SOLKAVGINL	---ITGSG	---SVLSDSDNSQHLFFPYGNYQYQLGEGNVRVYLLA
116	Oncorhynchus tshawytscha I	---INSIMAVRNANQISEK	---SOLKAVGINL	---ITGSG	---SVLSDSDNSQHLFFPYGNYQYQLGEGNVRVYLLA
116	Coregonus lavaretus I	---INSIMAVRNANQISEK	---SOLKAVGINL	---ITGSG	---SVLSDSDNSQHLFFPYGNYQYQLGEGNVRVYLLA
116	Oncorhynchus tshawytscha II	---INSIMAVRNANQISEK	---SOLKAVGINL	---ITGSG	---SVLSDSDNSQHLFFPYGNYQYQLGEGNVRVYLLA
116	Oncorhynchus nerka II	---INSIMAVRNANQISEK	---SOLKAVGINL	---ITGSG	---SVLSDSDNSQHLFFPYGNYQYQLGEGNVRVYLLA
116	Oncorhynchus keta II	---INSIMAVRNANQISEK	---SOLKAVGINL	---ITGSG	---SVLSDSDNSQHLFFPYGNYQYQLGEGNVRVYLLA
116	Salmo salar I	---INSIMAVRNANQISEK	---SOLKAVGINL	---ITGSG	---SVLSDSDNSQHLFFPYGNYQYQLGEGNVRVYLLA
116	Oncorhynchus masou II	---INSIMAVRNANQISEK	---SOLKAVGINL	---ITGSG	---SVLSDSDNSQHLFFPYGNYQYQLGEGNVRVYLLA
116	Oncorhynchus mykiss II	---INSIMAVRNANQISEK	---SOLKAVGINL	---ITGSG	---SVLSDSDNSQHLFFPYGNYQYQLGEGNVRVYLLA
116	Oncorhynchus mykiss gairdneri II	---INSIMAVRNANQISEK	---SOLKAVGINL	---ITGSG	---SVLSDSDNSQHLFFPYGNYQYQLGEGNVRVYLLA
116	Lutjanus peru	---VGF---	---AARNQISFR	---SELATGIQ	---IRANQ
116	Morone axatilis	---VGF---	---AARNQISFR	---SELATGIQ	---IRANQ
116	Sebastes schlegelii	---VGF---	---AARNQISFR	---SELATGIQ	---IRANQ
116	Scaenops ocellatus	---VGF---	---AARNQISFR	---SELATGIQ	---IRANQ
116	Micropetrus salmoides	---VGF---	---AARNQISFR	---SELATGIQ	---IRANQ
116	Siniperca kneri	---VGF---	---AARNQISFR	---SELATGIQ	---IRANQ
116	Epinephelus coioides	---VGF---	---AARNQISFR	---SELATGIQ	---IRANQ
116	Pagrus major	---VGF---	---AARNQISFR	---SELATGIH	---IRANE
116	Sparus aurata	---VGF---	---AARNQISFR	---SELATGIH	---IRANE
116	Acanthopagrus latus	---VGF---	---AARNQISFR	---SELATGIH	---IRANE

Figura 19.- Alineamiento de secuencia de aminoácidos de la LpGH con distintas hormonas de crecimiento de peces. Recuadro rojo (peptido señal); recuadro negro (dominios GD1 a GD5); aa rojos (importantes para la función); aminoácidos negros (residuos de cisteína).

El resultado del análisis filogenético (Figura 20) demostró la agrupación de las hormonas de crecimiento tipo I y II en un clado, donde se aprecia claramente que la LpGH, así como aquellas GHs no catalogadas como tipo I o II, se encuentran agrupadas en otro clado totalmente aparte. Se puede apreciar también las diferencias que existen con las hormonas de crecimiento de mamíferos (*Bos taurus* y *mus musculus*) de los cuales el porcentaje de identidad que comparte la LpGH con estas secuencias no es mayor al 39%, por lo que se utilizaron para enraizar el árbol.

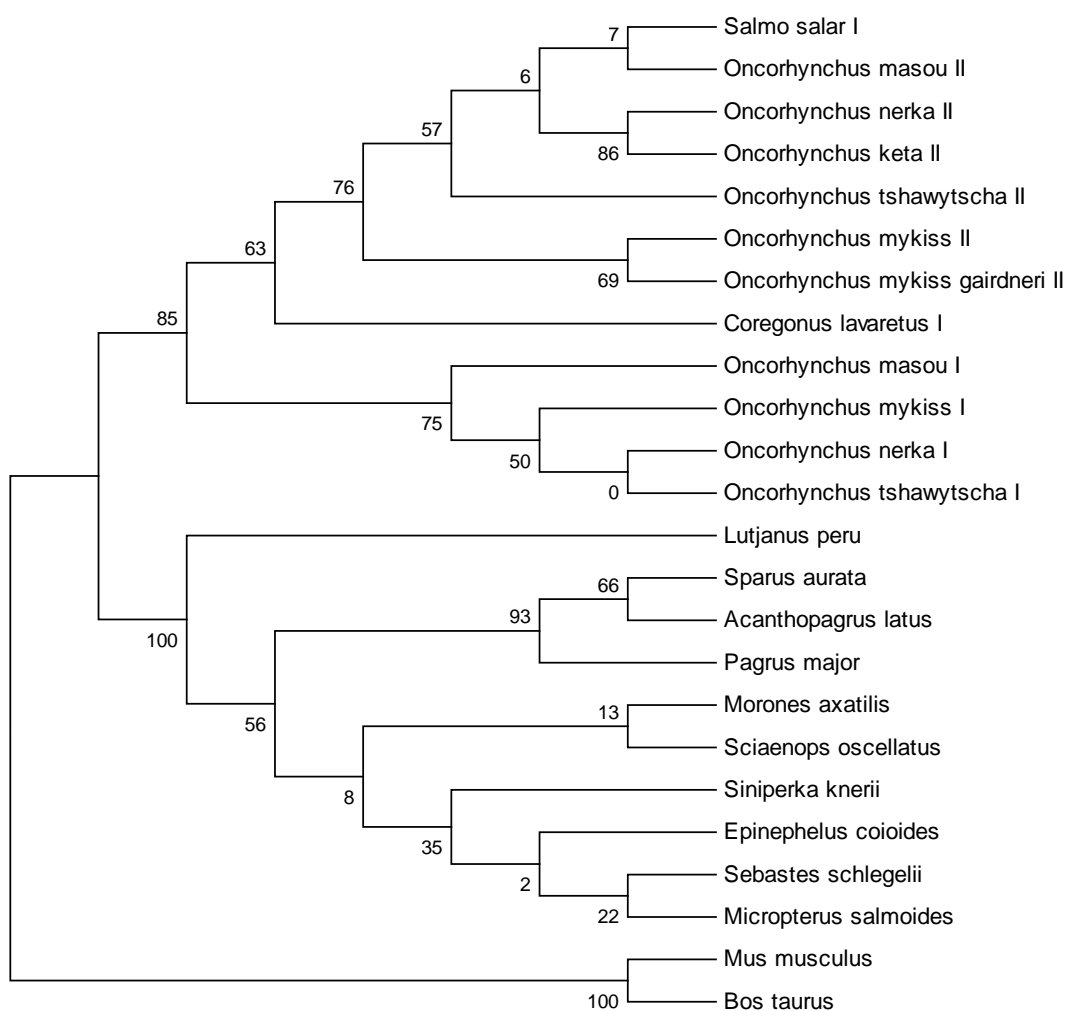


Figura 20.- Árbol filogenético. Se muestra la división de las secuencias de GHs en dos grupos: 1) correspondiente a las GHs tipo I y II; 2) otras GHs. El árbol se enraizó con un grupo externo (mamíferos).

7.11. Recombinación de la LpGH-ORF con el vector pMDC32

El ORF de la LpGH que se encontraba en el vector pCR8 se recombinó en el vector pMDC32. Se realizó la confirmación de la inserción del ORF en el vector pMDC32 empleando tanto los primers específicos para la LpGH-ORF (LpGHPCRF y LpGHPCRR) como los primers M13 (Figura 21).



Figura 21.- PCR de colonia del vector pMDC32::LpGH-ORF. Carril 1 (Marcador de peso molecular 1 kb plus); Carriles 2, 4, 6 y 8 (reacción con primers M13F-LpGHPCRR); Carriles 3, 5, 7 y 9 (reacción con primers LpGHPCRF-M13R); Carriles 10 y 12 (controles positivos de ambas reacciones); Carriles 11 y 13 (controles negativos de ambas reacciones).

Se realizó la extracción de DNA plasmídico de las colonias 2, 3, 5 y 6 por duplicado con el método de lisis alcalina y se corroboró su integridad por medio de electroforesis en gel de agarosa al 1% (Figura 22).



Figura 22.- DNA plasmídico pMDC32::LpGH::ORF. Carril 1 (marcador de peso molecular 1 kb plus); carril 2 a 9 (DNA plasmídico de las distintas clonas obtenidas).

Se cuantificó el DNA plasmídico usando un nanodrop N1000, los datos de la cuantificación se muestran en la Tabla 17.

Tabla 17.- Datos de la concentración de DNA plasmídico

Carril	Muestra	ng/ul	260/280	260/230
2	M2A	4818	1.79	2.35
3	M2B	4473.71	1.85	2.43
4	M3A	5158.33	1.68	2.17
5	M3B	5194.73	1.67	2.16
6	M4A	4779.87	1.78	2.31
7	M4B	5461.24	1.56	1.98
8	M5A	5237.49	1.67	2.14
9	M5B	5064.43	1.71	2.21

7.12. Caracterización de la construcción pMDC32::LpGH

Se realizó una reacción de doble digestión del DNA plasmídico con el casete de expresión de la LpGH empleando las enzimas *Apa* I y *Sca* I. El patrón de restricción se analizó mediante electroforesis en agarosa (Figura 23). Con la digestión realizada con estas enzimas (Carril D) se esperaba ver cuatro bandas con los tamaños de 253, 1158, 3213 y 6253 pb. En la Figura 23 se aprecian bandas de esos tamaños, además de otra por debajo de los 3000pb y una más con un tamaño ligeramente mayor a los 5000pb.

Con los resultados obtenidos de esta digestión y el análisis previo realizado *in silico*, se pudo determinar que la construcción del vector pMDC32 con el inserto LpGH se encuentra armada correctamente, lo que dio paso a poder realizar posteriormente los ensayos de transformación de las microalgas.

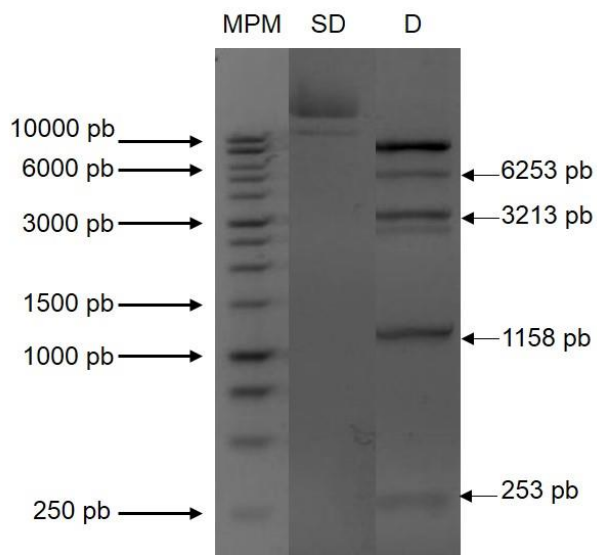


Figura 23.- Caracterización de la construcción pMDC32::LpGH. MPM (1 kb DNA ladder); SD (plásmido sin digerir); D (plásmido digerido).

7.13. Transformación genética de *C. sorokiniana*, selección y confirmación de transformantes

Durante el proceso de selección se pudo observar la diferencia en la velocidad de crecimiento de las microalgas en medio con higromicina con respecto a las que crecieron en medio sin higromicina al día 3 después del bombardeo (Figura 24). No existe diferencia apreciable en el crecimiento entre el control (Mock) y las réplicas en medio de selección, ya que la concentración con la que se inocularon las placas fue relativamente alta, lo que ocasiona un desgaste del antibiótico o poca actividad del mismo, permitiendo el crecimiento de aquellas células que no se vieron afectadas por la higromicina.

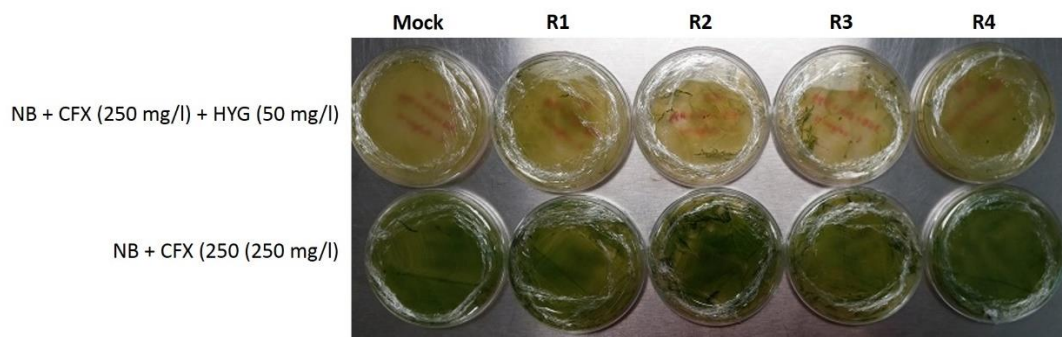


Figura 24.- Selección con higromicina de *C. sorokiniana* al día 3 después de la inoculación.

Al día 4 después de la inoculación, se realizó el recambio de las microalgas a medio de selección fresco y se incubaron en la cámara de crecimiento a 27°C con 16/8 h luz/obscuridad. Se observan claras diferencias entre el control y las réplicas de la transformación (Figura 25), donde el primero aparenta ser más afectado por el antibiótico, ya que la densidad de células que fueron inoculadas fue relativamente baja. Sin embargo en las réplicas se aprecia un crecimiento mayor con respecto al control, lo que indica cierta resistencia de las microalgas a la higromicina. La caja R4 con higromicina mostró un mayor crecimiento que el resto de las réplicas.

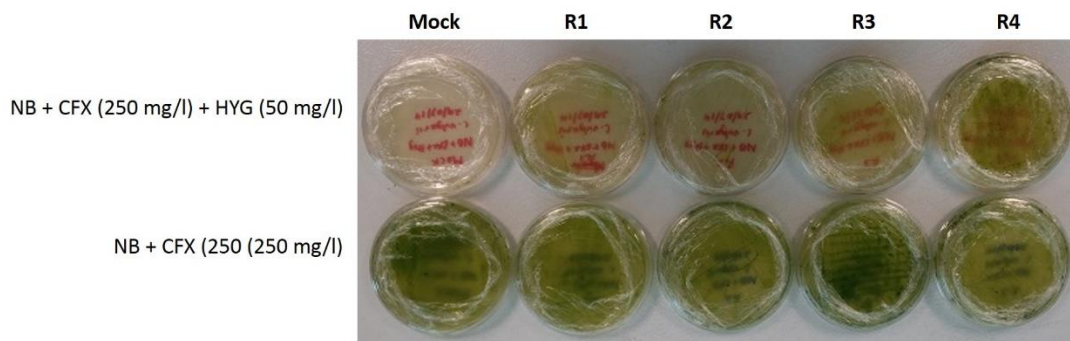


Figura 25.- Selección con higromicina de *C. sorokiniana* día 6 después de la inoculación

La extracción de DNA genómico de las microalgas (Figura 26) se realizó por el método de CTAB 2X. Se analizaron las clonas aisladas de cada una de las cajas réplica de la transformación que presentaron crecimiento en medio de selección, las cuales fueron WT, MA2 (Mock), R1A4, R1A5, R2A1, R2A3, R2A4, R2A31, R3A2, R3A7, R4A19 y R4A20.

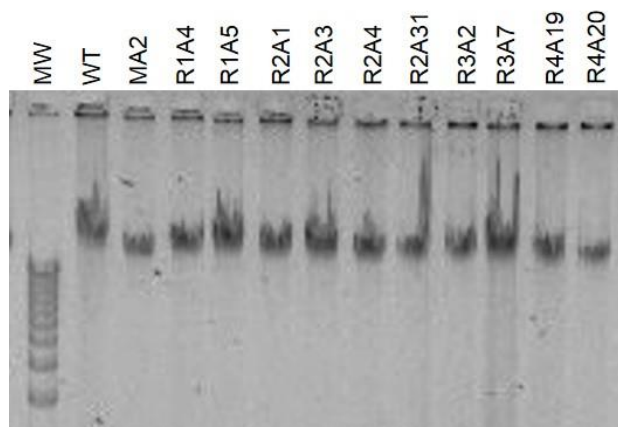


Figura 26.- DNAg de *C. sorokiniana*. MW (marcador de peso molecular 1 kb plus); Cada carril está marcado con el nombre de la clona de donde procede el DNA genómico.

Se realizó un PCR con los primers universales de cloroplasto TrnLc y TrnLd descritos en (Haider 2011) (Tabla 7), para verificar que el DNA extraído correspondiera a DNA vegetal, en este caso del cloroplasto de *C. sorokiniana* (Figura 27) donde el amplicón obtenido supera los 300 pb. Una vez confirmado, se procedió a realizar el PCR con primers específicos para la LpGH (Figura 28).

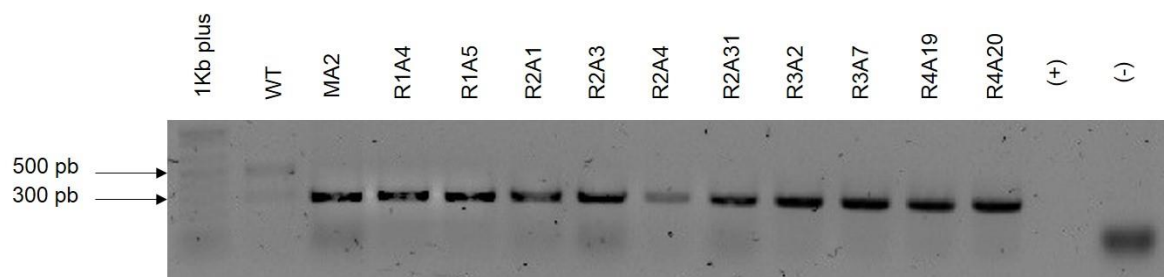


Figura 27.- PCR de DNAg de *C. sorokiniana* con primers universales

En la Figura 28 se puede apreciar el amplicón del producto obtenido con los primers específicos de 618 pb para las clonas R1A5, R2A31, R3A2, R4A19 y R4A20, presentando únicamente la clona R1A5 una señal fuerte.

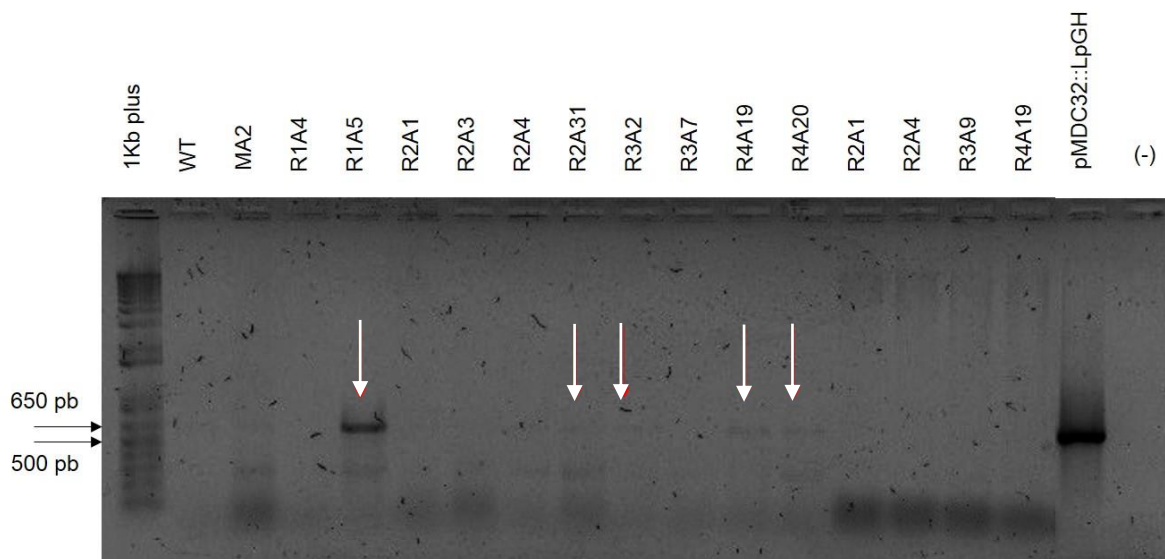


Figura 28.- PCR de DNAG de *C. sorokiniana* con primers específicos

7.14. Evidencia de la clonación de la secuencia de LpGH-ORF en el vector pPIC9

Primeramente se muestra en la Figura 29 el amplicón del producto obtenido de la PCR con los primers LpGHpPIC Fw y Rv, el cual corresponde a 625 pb. En la imagen se puede apreciar que la banda aparece entre los 600 y 700 pb del marcador de peso molecular.

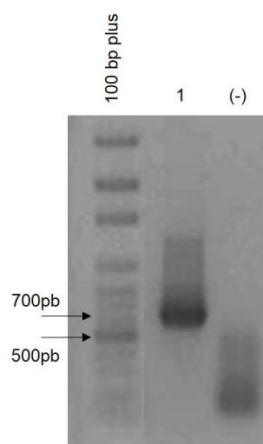


Figura 29.- Amplicón obtenido con los primers de clonación de LpGH en el vector pPIC9. 1 (amplicón); control negativo (-)

Una vez confirmado el tamaño del amplicón, se procedió a la digestión del fragmento y el vector pPIC9 con las enzimas *Xho* I y *Avr* II. El resultado de la digestión se observó en un gel de agarosa en TAE al 1% (Figura 30).

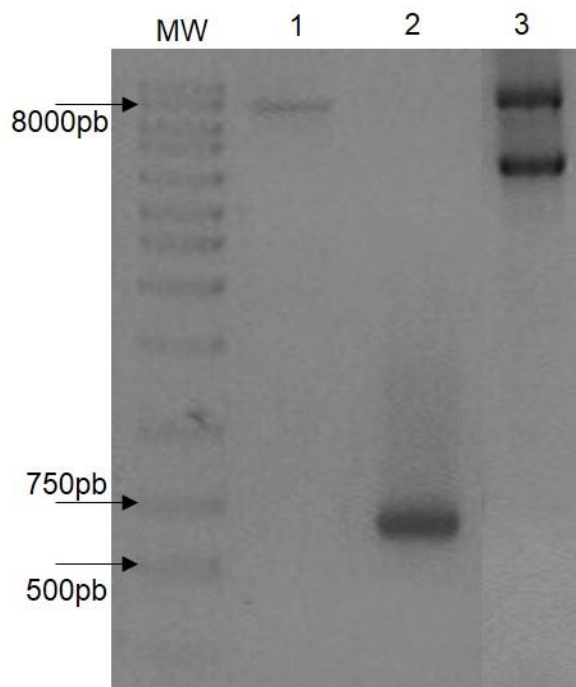


Figura 30.- Digestión del vector pPIC9 y del amplicón de LpGH con las enzimas *Xho*I y *Avr*II. MW (1 kb plus); 1 (vector digerido); 2 (amplicón digerido) y 3 (vector sin digerir).

La ligación del inserto con el vector se utilizó para transformar células competentes de *E. coli* como se describió en la metodología. Las clonas de *E. coli* se analizaron con los primers AOX5' y AOX3' para detectar la presencia del vector y con los primers LpGHpPIC9F y LpGHpPIC9 R para detectar la presencia del inserto, empleando el vector pPIC9 vacío así como la construcción pMDC32::LpGH como controles positivos para ambas reacciones, respectivamente (Figura 31). Podemos apreciar que los amplicones obtenidos de las clonas analizadas con los primers específicos corresponden al tamaño esperado de 625 pb (carriles 1 a 6), mientras que los productos obtenidos con los primers AOX corresponden a los 1124 pb (carriles 7 a 12).

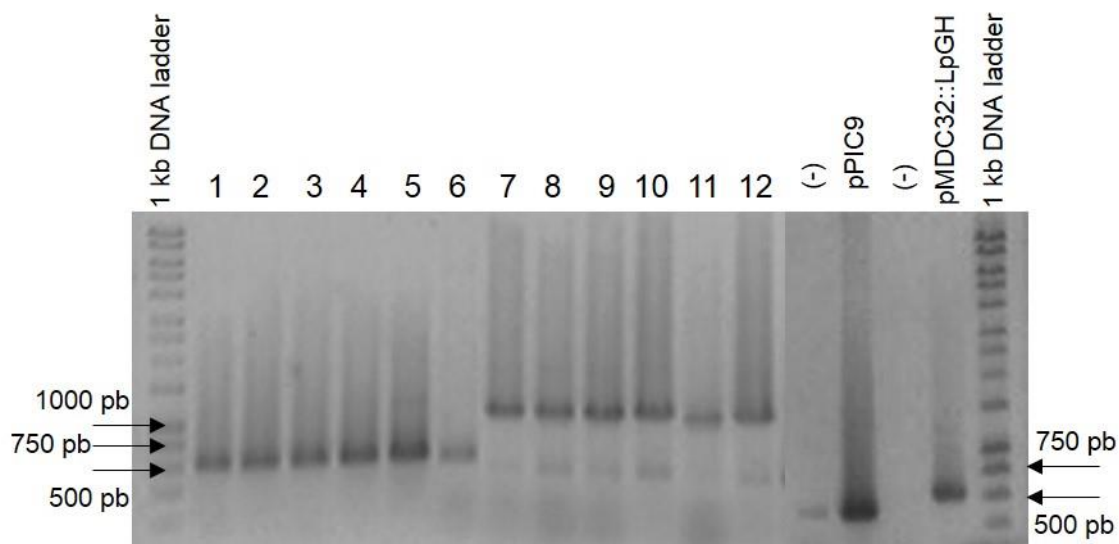


Figura 31.- Confirmación de la transformación de *E. coli* con la construcción pPIC9::LpGH. 1-6 (amplicones con primers específicos); 7-12 (amplicones con primers AOX).

Se seleccionaron las clonas que corresponden a los carriles 6 y 12 de la Figura 31 para realizar la extracción del DNA plasmídico que se emplearía posteriormente para la transformación de la levadura (Figura 32). Se puede apreciar claramente la diferencia de tamaño entre las bandas obtenidas del vector pPIC9 vacío y la de la construcción con el inserto (pPIC9::LpGH), lo que indica la presencia del mismo en el DNA plasmídico extraído.

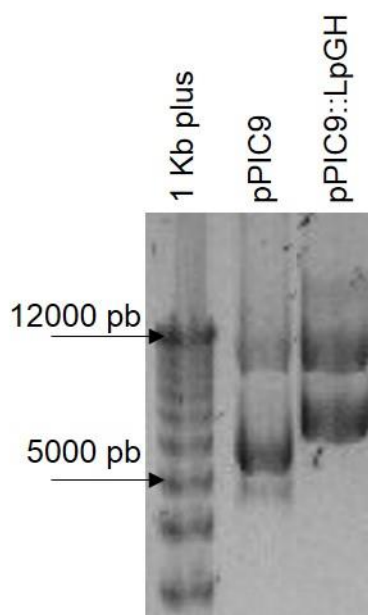


Figura 32.- Extracción de DNA plasmídico de *E. coli*. pPIC9 (vector vacío); pPIC9::LpGH (Vector con inserto).

7.15. Confirmación de la transformación de células de *P. pastoris* por electroporación y caracterización por PCR

Una vez que se obtuvo el DNA plasmídico con la construcción y el vector vacío, se procedió a realizar una digestión con la enzima *Pme* I con la finalidad de linearizar el DNA y facilitar su inserción en el genoma de la levadura.

Para confirmar la presencia/ausencia del inserto según la clona analizada se realizó un PCR de colonia con primers AOX (Figura 33 se puede observar las clonas verificadas por PCR (11 a 18), donde se incluye el vector pPIC9 vacío como control negativo y la construcción con el inserto como controles positivos de la reacción. El tamaño obtenido de los amplicones fue de 1068 pb, con la ausencia del amplicón correspondiente al gen endógeno AOX, indicando un fenotipo Mut^s de la levadura. Las flechas blancas indican las clonas seleccionadas para la inducción de la producción de la rLpGH.

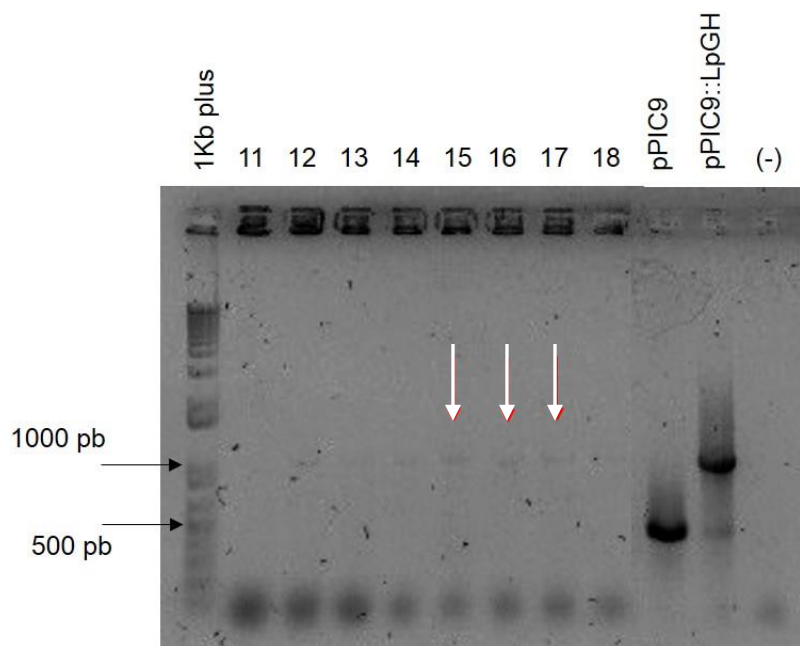


Figura 33.- PCR de colonia de las clonas transformadas con la construcción pPIC9::LpGH de *P. pastoris*. 11-18 (número de clona analizada).

7.16. Inducción de la expresión de la rLpGH, cuantificación de proteínas totales y electroforesis en geles de poliacrilamida-SDS

Se cultivaron las clonas 15, 16 y 17 transformadas con la construcción pPIC9::LpGH, la clona 2 transformada con el vector vacío (pPIC9) y la clona WT en medio YPD hasta alcanzar una OD_{600} de 2.0. Se lavaron las células con agua destilada estéril para eliminar restos de dextrosa de las células y éstas fueron transferidas a medio de inducción BMMY para la producción de la GH. Se tomaron muestras a las 0, 12, 24, 48, 72 y 96 horas de inducción y se cuantificó proteína total por el método de Bradford, tanto en el medio de cultivo, como de extracto celular. En la Figura 34, se muestra la gráfica de la curva estándar empleada para la cuantificación de las proteínas, en donde destaca la ecuación de la recta y el coeficiente de correlación R^2 .

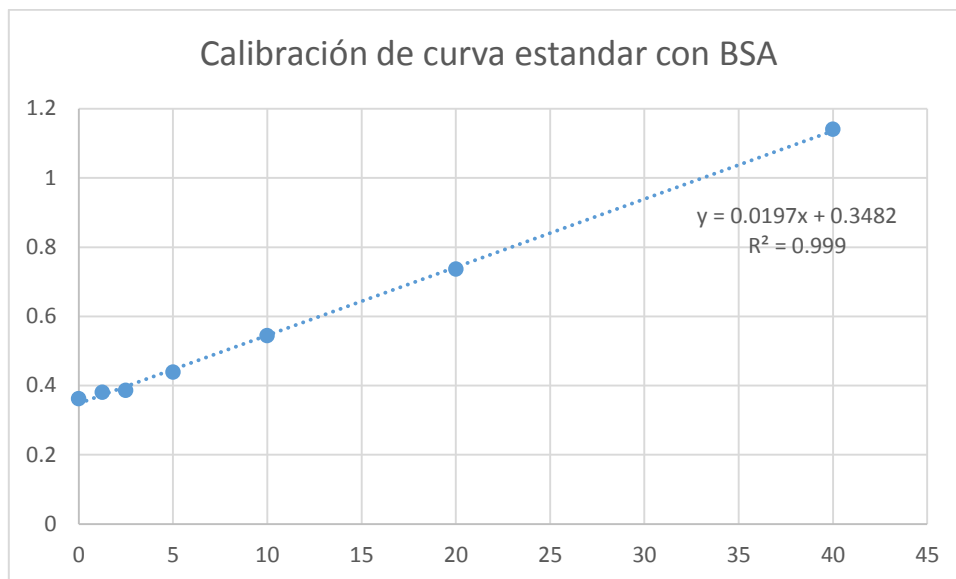


Figura 34.- Gráfica de calibración de curva estándar con BSA

En la Tabla 18, se muestra el resultado de la cuantificación de proteínas de *P. pastoris* que se encuentran secretadas en el medio de cultivo, se puede apreciar que la clona C-17 alcanzó un máximo de 0.56 $\mu\text{g/ml}$ a las 96 horas de inducción.

Tabla 18.- Datos de concentración de proteínas en medio de cultivo secretadas por *P. pastoris*. En cada columna se muestra la hora a la que se obtuvo la muestra. Las unidades se expresan en $\mu\text{g/ml}$

muestra	0h	12h	24h	48h	72h	96h
WT sn	0.42	0.22	0.54	0.60	0.52	0.47
C-2 sn	0.26	0.39	0.35	0.38	0.38	0.44
C-15 sn	0.38	0.36	0.29	0.33	0.37	0.45
C-16 sn	0.32	0.31	0.46	0.43	0.40	0.34
C-17 sn	0.21	0.25	0.27	0.34	0.33	0.56

Mientras que en la Tabla 19 se muestran las concentraciones obtenidas de la cuantificación de proteínas de extracto celular. Los valores de concentración se encuentran en $\mu\text{g/ml}$.

Tabla 19.- Datos de concentración de proteínas en extracto celular de *P. pastoris*. . En cada columna se muestra la hora a la que se obtuvo la muestra. Las unidades se expresan en $\mu\text{g/ml}$

muestra	0h	12h	24h	48h	72h	96h
WT cel	1.91	6.06	6.21	6.89	7.05	6.90
C-2 cel	3.62	5.63	5.52	4.73	6.12	3.45
C-15 cel	3.42	5.69	5.00	4.70	6.12	5.08
C-16 cel	5.11	6.10	5.94	7.97	7.39	5.42
C-17 cel	3.37	6.59	7.46	7.20	7.57	6.03

Una vez obtenidos los datos de la concentración de proteínas, se procedió a analizarlas por SDS-PAGE, en donde se cargaron 10 μg de proteína de extracto celular para cada una de las clonas y muestras según la hora. En cambio para el análisis de las proteínas de medio de cultivo se emplearon 12 μl de cada una de las muestras para su análisis lo que representa un promedio de 4.5 μg de proteína por muestra. A continuación se muestra el resultado de la tinción de los geles de poliacrilamida con azul de coomassie para las clonas WT (Figura 35), C-2 (Figura 36), C-15 (Figura 37), C-16 (Figura 38) y C-17 (Figura 39).

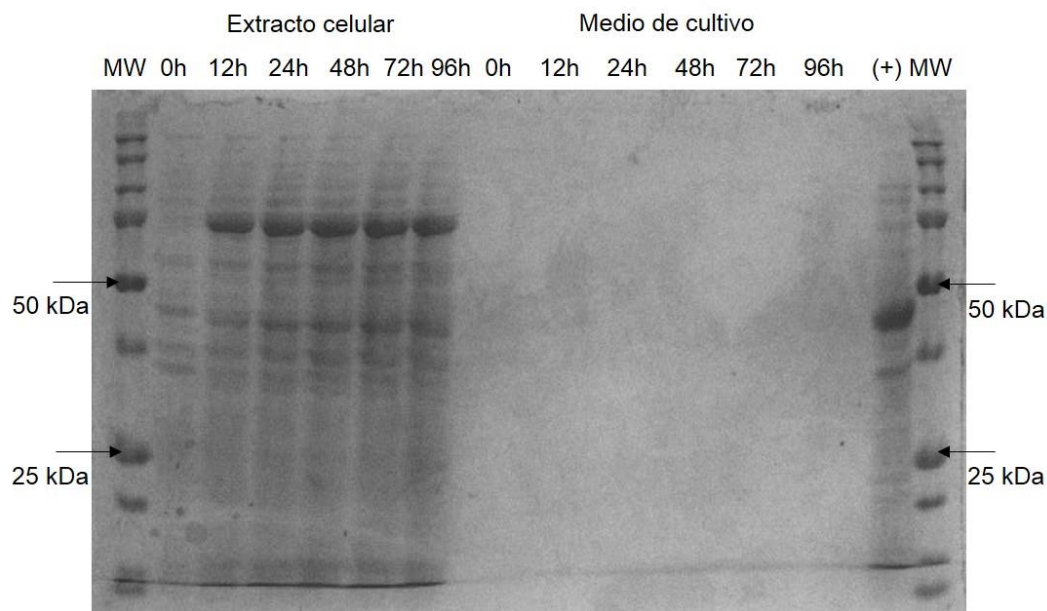


Figura 35.- SDS-PAGE de la clona WT con las diferentes horas de inducción y el origen de la proteína (extracto celular o medio de cultivo). MW (precision plus protein); control positivo (+).

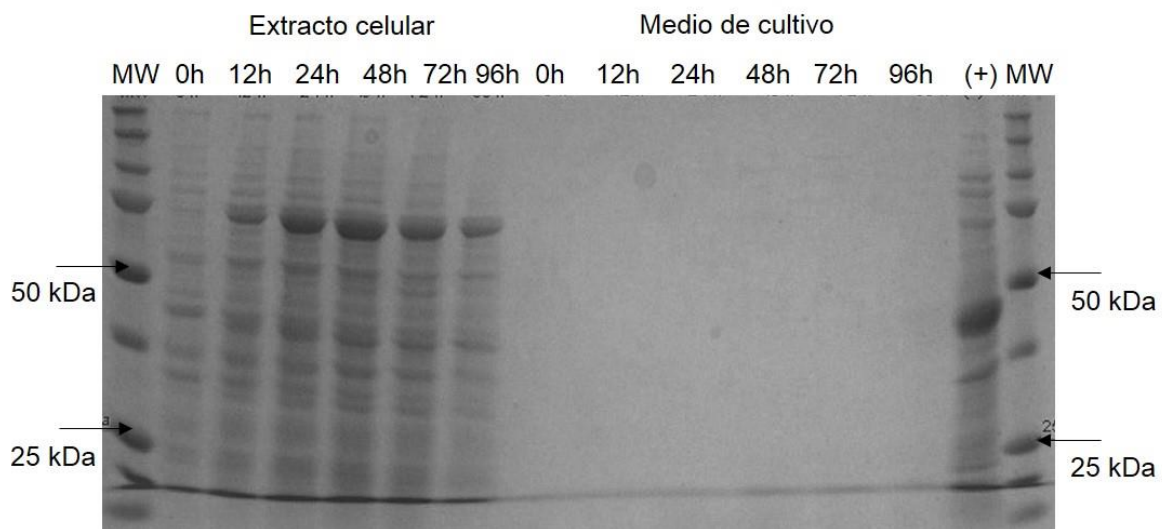


Figura 36.- SDS-PAGE de la clona C-2 con las diferentes horas de inducción y el origen de la proteína (extracto celular o medio de cultivo). MW (precision plus protein); control positivo (+).

Como se puede observar, en la Figura 36, no hay presencia de proteínas en el medio de cultivo, lo que indica que efectivamente la clona transformada con el vector vacío no produce la rLpGH, aunque probablemente si induce la expresión de proteínas nativas al medio de cultivo pero estas no son suficientes para ser detectadas por electroforesis.

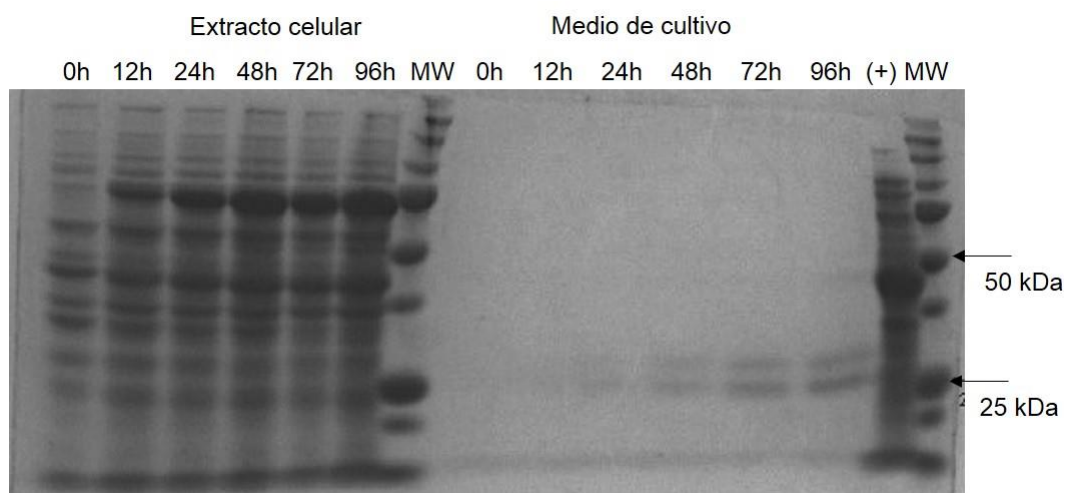


Figura 37.- SDS-PAGE de la clona C-15 con las diferentes horas de inducción y el origen de la proteína (extracto celular o medio de cultivo). MW (precision plus protein); control positivo (+).

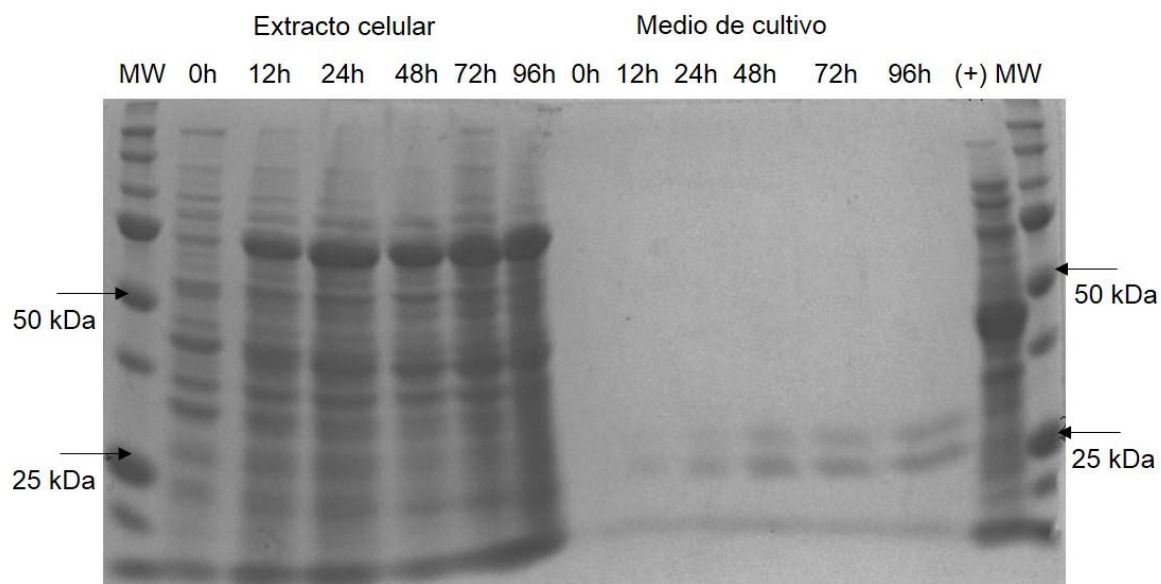


Figura 38.- SDS-PAGE de la clona C-16 con las diferentes horas de inducción y el origen de la proteína (extracto celular o medio de cultivo). MW (precision plus protein); control positivo (+).

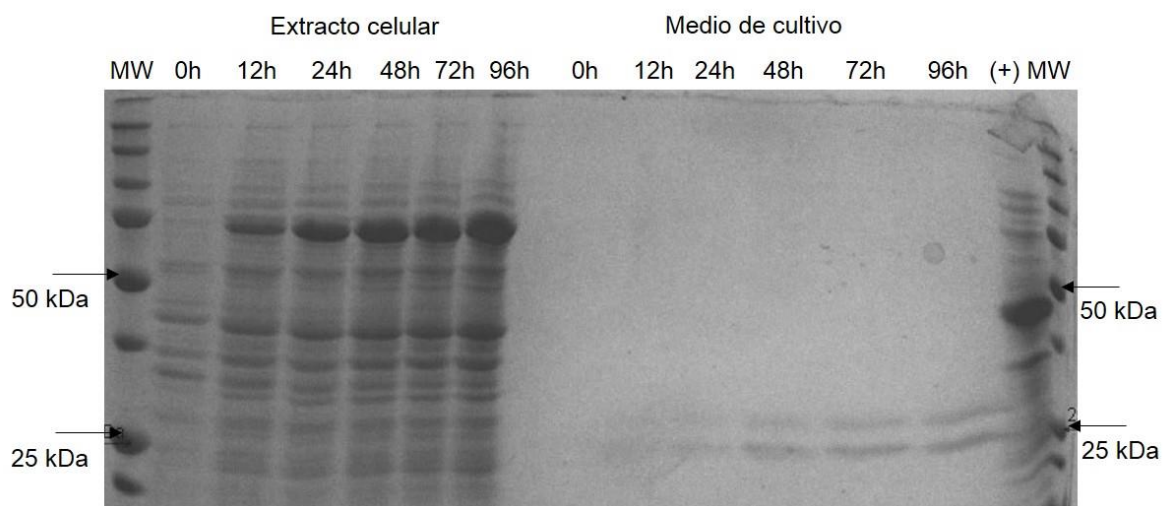


Figura 39.- SDS-PAGE de la clona C-17 con las diferentes horas de inducción y el origen de la proteína (extracto celular o medio de cultivo). MW (precision plus protein); control positivo (+).

Como podrá observarse en las figuras correspondientes a las clonas 15, 16 y 17, se nota la presencia de dos bandas de proteínas en el medio de cultivo para las diferentes horas de inducción con un tamaño de 25 kDa, lo que corresponde al tamaño esperado de la rLpGH, la cual tiene un tamaño de 23 kDa más el peso añadido por la His tag y la secuencia de unión a enterocinasa, lo que podría sumar el total de 25 kDa observados en los geles de poliacrilamida.

7.17. Western blot

Se realizó el western blot utilizando como anticuerpo primario un anti His tag y como anticuerpo secundario un anti anti His tag de conejo. El resultado de la inmunodetección quedó documentado en la Figura 40, la cual corresponde a la clona C-16. En los tres casos de detección de la rLpGH para las clonas productoras el resultado fue el mismo, en cambio no hubo detección de proteínas para el caso de la clona C-2 y WT.

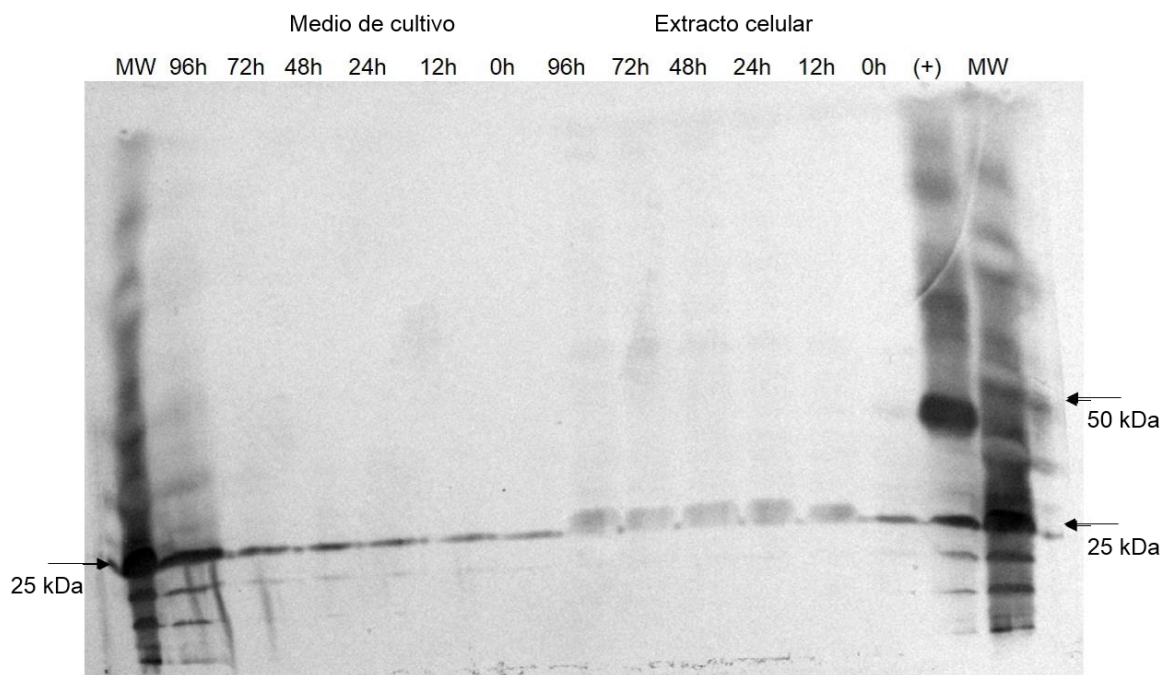


Figura 40.- Western blot de la clona C-16. Se puede apreciar la unión del anticuerpo con la LpGH a la altura de 25 kDa y la detección de la misma tanto en medio de cultivo como en extracto celular. MW (precision plus protein); control positivo (+).

8. DISCUSIÓN

Se obtuvo la secuencia de DNAC de la GH de *L. peru* de 1025 pb, la cual posee un ORF de 615 pb, tal como el DNAC de otras GH caracterizada de *Seriola quinqueradiata* o Hamachi (Watahiki M. et al. 1988), *Thunnus thynnus* o tuna (Sato et al. 1988), 630 pb en *Ctenopharyngodon idellus* o carpa china (Ho et al. 1989), 630 pb tanto para la GH I como para la GH II de *Oncorhynchus mykiss* o trucha arcoíris (Rentier-Delrue et al. 1989a) y 621 pb en el ORF de la GH de *Oreochromis niloticus* o Tilapia (Rentier-Delrue et al. 1989b). Por medio de la técnica de RACE se lograron obtener los extremos no codificantes del gen de la GH de *L. peru*, donde existen ciertas similitudes en cuanto a los tamaños reportados para otras GHs de peces, como por ejemplo poseer un extremo 5' UTR de menor longitud que el extremo 3' UTR en todos los casos, así, para el huachinango, se encontró una región no codificante de 153 nucleótidos corresponden a la región 5' UTR y 257 nucleótidos del extremo 3' UTR. Lo anterior coincide con los datos de genes reportados de otras GHs de peces indican la presencia de UTRs 5' y 3' de 64 y 426 nucleótidos respectivamente en *Oncorhynchus keta* o chum salmon (Sekine et al. 1985), 43 y 518 en el caso de la carpa china (Ho et al. 1989); 66 y 484 nucleótidos en la GH I de trucha arcoíris (Rentier-Delrue et al. 1989a); 65 y 231 nucleótidos en Tuna (Sato et al. 1988). También se identificaron elementos regulatorios importantes como la secuencia Kozak, la cual es la secuencia que indica el inicio de la traducción en organismos eucariotas superiores o lo que es similar a la secuencia Shine-Dalgarno en procariotas. Se tiene reportada una secuencia Kozak consenso la cual es (GCC)GCC A/G CCATGG previo al codón de inicio (Kozak 1987). La secuencia que estamos reportando es AGAACCAGCCCATGG, de la cual, los primeros tres nucleótidos río arriba del codón de inicio corresponden con la secuencia consenso reportada. Sin embargo según Kozak, en el 97% de las secuencias analizadas de un total de 699 RNAm de vertebrados, el tercer nucleótido es una adenina, e indica que tanto la adenina en la posición -3 como la guanina en la posición +4 son indicadores importantes, ya que poseen una influencia muy fuerte en la eficiencia de traducción y que se

espera una traducción muy ineficiente cuando en la posición -3 no está presente una adenina (Kozak 1987, 1999), tal como se reporta en la LpGH, y que en los casos analizados que carecen de una A en la posición -3, corresponden a hormonas o linfoquinas, lo cual concuerda con los datos obtenidos de la GH de huachinango. Otro de los elementos génicos importantes en la secuencia de la LpGH, es la señal de poliadenilación AAATAA que se encuentra 18 nucleótidos antes del sitio de poliadenilación, así como está reportado en la secuencia de Tuna (Sato et al. 1988).

La secuencia primaria de la LpGH tiene una longitud de 204 residuos de aminoácidos de los cuales 18 de estos corresponden a la fracción de la proteína inmadura, dejando un péptido maduro de 186 aminoácidos. Se reporta una doble N-glicosilación en las GH tipo I y II de la trucha arcoíris (Rentier-Delrue et al. 1989a) en la posición del aminoácido Asn-131 y Asn-185 (Asn-Xaa-Ser o Thr, donde Xaa puede ser cualquier aminoácido). Si comparamos la secuencia de aminoácidos de la LpGH podemos encontrar un sitio de glicosilación dado por la secuencia Asn-Cys-Thr en la posición 184 de la proteína madura, este dato concuerda con el sitio de glicosilación reportado para la secuencia de aminoácidos de la GH de Tuna, la cual está dada por Ans-Cys-Thr en la posición 184 de la proteína madura (Sato et al. 1988), por lo que puede considerarse esta secuencia como un potencial sitio de glicosilación en la LpGH.

De acuerdo a lo descrito por (Watahiki Masanori et al. 1989), las GHs poseen cinco dominios altamente conservados (GD1, GD2, GD3, GD4 y GD5). El autor realiza un análisis para comparar la secuencia de aminoácidos de la hormona del pez flounder con la de distintas especies de peces y mamíferos (pez aleta amarilla, salmón, tuna, pollo, rata, puerco, ovino, bovino y humano), encontrando una relación muy peculiar entre las mismas, en dónde se señalan los aminoácidos importantes para la función de la hormona (Ala-24, Ser-54, Ser-78, Leu-106, Leu-116 y Asp-122), además de los cuatro residuos de cisteína que conforman dos puentes disulfuro y que se encuentran en las posiciones 52, 160, 176 y 184. Estos

datos concuerdan con el alineamiento realizado en este trabajo, donde se comparan las secuencias de aminoácidos de la GH de *L. peru* con la de *M. axatilis*, *S. schlegelii*, *S. ocellatus*, *M. salmoides*, *S. knerii*, *E. lanceolatus*, *E. coioides*, *P. major*, *S. aurata*, *A. schlegeli* y *A. latus*. Además, el autor señala que los dominios GD1 a GD4 están implicados en la formación de uniones determinantes de la GH, las cuales pudieran ser con sus receptores.

Las hormonas de crecimiento son cadenas polipeptídicas simples de alrededor de 190 a 210 aminoácidos (Agellon L.B. et al. 1988b, Pérez-Sánchez et al. 2002) y un peso entre 21 y 23 kDa (Acosta et al. 2008a, Acosta et al. 2008b), como la LpGH resultó con un tamaño de 204 aminoácidos y un peso de 23 kDa, así como en los mamíferos, la organización genómica de los genes de las GH en el pez gato como en cipriniformes revela la ocurrencia de cinco exones y cuatro intrones, mientras que en la trucha arcoíris, el salmón del Atlántico, Tilapia, pez flounder y el pez aleta amarilla, el gen de la GH tiene un intrón adicional, el cual probablemente evolucionó por eventos de inserción independientes. Pudiendo comparar el tamaño del DNAC de la LpGH obtenido (1025 pb) con el tamaño del producto de PCR de DNA genómico (alrededor de 3000 pb), podemos predecir la presencia de intrones en el gen de la LpGH. Así como para el DNAC de la GH1 y GH2 de la trucha arcoíris los cuales poseen un tamaño de 1180 y 1212 nucleótidos respectivamente

Se ha estudiado bien la presencia de dos genes (GH1 y GH2) y dos polipéptidos correspondientes a hormonas de crecimiento en diferentes especies de salmónidos. Se caracterizaron los genes de ambas GH's en trucha arcoíris (Agellon L.B. et al. 1988b). En un trabajo realizado por (Acosta et al. 2008b) en donde producen la hormona de crecimiento truncada de tilapia (tiGH) en un bioreactor de 5 L empleando la cepa MP36 de *P. pastoris*, obtienen una concentración de tiGH secretada al sobrenadante de 40 mg/l comparados con los 0.56 mg/l obtenidos en este trabajo. Sin embargo, cabe destacar que Acosta y colaboradores analizan diferentes clonas transformadas de la levadura para

seleccionar la de mayor tasa de producción. Otro factor que puede ser determinante en los niveles de expresión es el uso de codones de *P. pastoris*, ya que los niveles de expresión de proteínas heterólogas no solo dependen de la secuencia nativa del DNAc, además de que se deben de establecer las mejores condiciones para lograr una optimización máxima del cultivo (Li et al. 2003), donde se pueden variar parámetros como pH, volumen de cultivo, concentración celular inicial, duración de la inducción, temperatura, oxígeno disuelto y concentración de metanol.

Cuando se realizó el análisis filogenético para interpretar la relación que tiene la GH de *L. peru* con GHs de tipo I y II reportadas para otras especies como *chum salmon*, salmón del Atlántico, trucha arcoíris y Tilapia, podemos percatarnos que la LpGH no se encuentra agrupada entre estos dos tipos de GHs, esto puede deberse a las diferencias evolutivas que existen entre estos organismos, ya que se sabe bien que estas especies de salmónidos de las cuales se tienen reportadas dos secuencias distintas de GHs (de las cuales solo se conoce la función de las tipo I), poseen un intrón adicional en la secuencia del gen de la GH (Agellon L. B. et al. 1988a, Devlirr 1993, Johansen et al. 1989, Male et al. 1992, Pérez-Sánchez et al. 2002). Lo anterior es un dato muy particular para estas especies y que no está presente en otros peces de los cuales también está caracterizada su GH y que sin embargo no están catalogadas dentro de ninguno de estos dos tipos. Otro dato interesante, es que se tiene la hipótesis de que las especies de salmónidos que presentan dos genes de GHs se debe a un evento de duplicación génica por tetraploidización que ocurrió en sus ancestros acuáticos vertebrados (Pérez-Sánchez et al. 2002, Rentier-Delrue et al. 1989a, Rentier-Delrue et al. 1989b), ya que se ha descubierto que en esta familia de peces, las hormonas han sido aisladas en pares. Por otra parte, hace falta analizar la secuencia del gen completo de la LpGH para determinar el número de intrones que ésta contiene para poder realizar una comparación más exhaustiva de las relaciones filogenéticas entre GHs.

Los análisis de SDS-PAGE demuestran que la rLpGH es secretada al medio de cultivo, esto se puede observar claramente al comparar la clona silvestre (WT), la clona C-2 (transformada con el vector vacío) y las clonas productoras (C-15, C-16 y C-17). Sin embargo, al analizar la imagen obtenida por western blot podemos percatarnos de que existe una inmuno detección de la rLpGH en las proteínas del extracto celular, lo cual puede deberse al desfase de las células, ya que las células “nuevas” pudieron no haber liberado la hormona al medio de cultivo en el momento en el que fueron cosechadas. Por otra parte, el sistema que se empleó para producir la GH recombinante en *C. sorokiniana* no es el adecuado para poder comparar rendimiento de producción, ya que el plásmido empleado para transformar *Chlorella* carece de un sistema que nos permita purificar o detectar fácilmente la GH así como la Histag que posee el vector pPIC9, en todo caso sería necesario poder contar con un anticuerpo monoclonal específico para esta proteína que nos pueda servir para detectarla en ambos sistemas, ya que en el caso de *Chlorella*, a diferencia de *P. pastoris*, tampoco se cuenta con una señal de excreción extra celular que nos pueda facilitar su purificación. Es importante poder diseñar vectores propios con este tipo de características que sean de utilidad en la transformación y producción de metabolitos en sistemas como *C. sorokiniana* u otras microalgas que tengan un potencial uso en acuicultura, con los que se pueda generar un método integral que nos permita, desde transformar genéticamente un microorganismo para que produzca una proteína de interés hasta escalar dicha producción a un nivel piloto con la mayor eficiencia en el menor consumo de recursos. El vector pMDC32 posee un gen de selección para las microalgas que es higromicina el cual eleva los costos de mantenimiento de dicha microalga, a comparación del vector pPIC9 con el cual, la selección de las levaduras transformadas se da por complementariedad en la producción de histidina, la cual carece el medio de cultivo de selección (Daly and Hearn 2005).

9. CONCLUSIONES

Se caracterizó el DNAC de una hormona de crecimiento de *L. peru* con un tamaño de 1025 pb, encontrándose un ORF de 615 pb y la presencia de 2000 pb de intrones en el gen de esta hormona. La proteína de LpGH es de 203 aa (23 kDa) y se encontró que mantiene la estructura base y aminoácidos importantes de otras hormonas de crecimiento de peces, sin embargo no pertenece a los grupos clásicos de HC I o II. Se logró la integración de la secuencia del ORF del DNAC de LpGH en *C. sorokiniana* y *P. pastoris* (fenotipo Mut^s) por medio de biobalística y electroporación respectivamente, lo cual se confirmó por análisis de PCR punto final en DNA genómico de la microalga y por análisis de SDS-PAGE y western blot en el caso de *P. pastoris*. Con lo anterior, se obtuvo un sistema adecuado para la producción de proteína recombinante de hormona de crecimiento de *L. peru*, en los sistemas de microalga (*C. sorokiniana*) y levadura (*P. pastoris*, fenotipo Mut^s).

10. LITERATURA CITADA

- Acosta J, Carpio Y, Besada V, Morales R, Sánchez A, Curbelo Y, Ayala J, Estrada MP. 2008a. Recombinant truncated tilapia growth hormone enhances growth and innate immunity in tilapia fry (*Oreochromis* sp.). *General and Comparative Endocrinology* 157: 49-57.
- Acosta J, Carpio Y, Besada V, Morales R, Sánchez A, Curbelo Y, Ayala J, Estrada MP. 2008b. Recombinant truncated tilapia growth hormone enhances growth and innate immunity in tilapia fry (*Oreochromis* sp.). *General and Comparative Endocrinology* 157: 49-57.
- Agellon LB, Davies SL, Chen TT, Powers DA. 1988a. Structure of a fish (rainbow trout) growth hormone gene and its evolutionary implications. *Proc Natl Acad Sci U S A* 85: 5136-5140.
- Agellon LB, Davies SL, Lin C-M, Chen TT, D.A. P. 1988b. Rainbow Trout Has Two Genes for Growth Hormone. *Molecular Reproduction and Development* 1: 11-17.
- Ascacio-Martínez JA, Barrera-Saldaña HA. 2004a. Production and secretion of biologically active recombinant canine growth hormone by *Pichia pastoris*. *Gene* 340: 261-266.
- Ascacio-Martínez JA, Barrera-Saldaña HA. 2004b. Production and secretion of biologically active recombinant canine growth hormone by *Pichia pastoris*. *Gene* 340: 6.
- Ascacio-Martínez JA, Barrera-Saldaña HA. 2012. Genetic Engineering and Biotechnology of Growth Hormones. Pages 173-196 in Barrera-Saldaña PHA, ed. *Genetic Engineering - Basics, New Applications and Responsibilities*, Intech.
- Bimboim HC, Doly J. 1979. A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Research* 7: 1513-1523.
- Buckholz RG, Gleeson MAG. 1991. Yeast systems for the commercial production of heterologous proteins. *Nature* 9: 6.
- Bustamante JJ, Gonzalez L, Carroll CA, Weintraub ST, Aguilar RM, Muñoz J, Martinez AO, Haro LS. 2009. O-Glycosylated 24 kDa human growth hormone has a mucin-like biantennary disialylated tetrasaccharide attached at Thr-60. *Proteomics* 9: 3474-3488.
- Chen HL, Si SL, Rang H, Huai-Jen T. 2008. Conditional Production of a Functional Fish Growth Hormone in the Transgenic Line of *Nannochloropsis oculata* (Eustigmatophyceae). *Phycological Society of America* 44: 768-776.
- Chow K-C, Tung WL. 1999. Electrotransformation of *Chlorella vulgaris*. *Plant Cell Reports* 18: 778-780.
- Cregg JM, Barringer KJ, Hessler AY, Madden KR. 1985. *Pichia pastoris* as a Host System for Transformations. *Molecular and cellular biology* 5: 3376-3385.
- Daly R, Hearn MTW. 2005. Expression of heterologous proteins in *Pichia pastoris*: a useful experimental tool in protein engineering and production. *Journal of Molecular Recognition* 18: 119-138.

- Dawson HN, Burlingame R, Cannons AC. 1997. Stable Transformation of *Chlorella*: Rescue of Nitrate Reductase-Deficient Mutants with the Nitrate Reductase Gene. *Current Microbiology* 35: 356-362.
- Demain AL, Vaishnav P. 2009. Production of recombinant proteins by microbes and higher organisms. *Biotechnology Advances* 27: 297-306.
- Devlirr RH. 1993. Sequence of sockeye salmon type 1 and 2 growth hormone genes and the relationship of rainbow trout with Atlantis and Pacific salmon. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences* 50: 1738-1748.
- Faber KN, Harder W, Geert AB, Marten V. 1995. Review: Methylotrophic Yeasts as Factories for the Production of Foreign Proteins. *Yeast* 11: 1331-1344.
- Gong Y, Hu H, Gao Y, Xu X, Gao H. 2011. Microalgae as platforms for production of recombinant proteins and valuable compounds: progress and prospects. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology* 38: 1879-1890.
- Griesbeck C, Kobl I, Heitzer M. 2006. *Chlamydomonas reinhardtii*: A Protein Expression System for Pharmaceutical and Biotechnological Proteins. *Molecular Biotechnology* 34: 213-223.
- Grimes C. 1987. Reproductive biology of the Lutjanidae. *Biology and fisheries management*: 239-294.
- Haider N. 2011. Chloroplast-specific universal primers and their uses in plant studies. *Biologia Plantarum* 55: 225-236.
- Hawkins RL, Nakamura M. 1999. Expression of Human Growth Hormone by the Eukaryotic Alga, *Chlorella*. *Current Microbiology* 38: 335-341.
- Hew CL, Trinh KY, Du SJ, Song S. 1989. Molecular cloning and expression of salmon pituitary hormones. *Fish Physiology and Biochemistry* 7: 375-380.
- Ho WKK, Tsang WH, Dias NP. 1989. Cloning of the grass carp growth hormone cDNA. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 161: 1239-1243.
- Huang X, Madan A. 1999. CAP3: A DNA sequence assembly program. *Genome Res.* 9: 868-876.
- Irene González- Villaseñor L, Peijun Z, Chen TT, Powers DA. 1988. Molecular cloning and sequencing of coho salmon growth hormone cDNA. *Gene* 65: 239-246.
- Johansen B, Johnsen OC, Valla S. 1989. The complete nucleotide sequence of the growth-hormone gene from Atlantic salmon (*Salmo salar*). *Gene* 77: 317-324.
- Kim D-H, Kim YT, Cho JJ, Bae J-H, Hur S-B, Hwang I, Choi T-J. 2002. Stable Integration and Functional Expression of Flounder Growth Hormone Gene in Transformed Microalga, *Chlorella ellipsoidea*. *Marine Biotechnology* 4: 63-73.
- Kozak M. 1987. An analysis of 5'-noncoding sequences from 699 vertebrate messenger RNAs. *Nucleic Acids Research* 15: 8125-8148.
- . 1999. Initiation of translation in prokaryotes and eukaryotes. *Gene* 234: 187-208.
- Kurland C, Gallant J. 1996. Errors of heterologous protein expression. *Current Opinion Biotechnology* 7: 489-493.
- L.Walker T, Purton S, Becker DK, Collet C. 2005. Microalgae as bioreactors. *Plant Cell Rep* 24: 629-641.

- Li Y, Junjie B, Qing J, Xing Y, Haihua L, Xinhui L, Jianren L, Xufang L. 2003. Expression of common carp growth hormone in the yeast *Pichia pastoris* and growth stimulation of juvenile tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Aquaculture* 216: 329-341.
- Luckow VA, Summers MD. 1988. Signals Important for High-Level Expression of Foreign Genes in *Autographa californica* Nuclear Polyhedrosis Virus Expression Vectors. *Virology* 167: 56-71.
- Male R, Nerland AH, Lorens JB, Telle W, Lossius I, Totland GK. 1992. The complete nucleotide sequence of the Atlantic salmon growth hormone I gene. *Biochim Biophys Acta* 1130: 345-348.
- Momota H, Kosugi R, Ohgai H, Hara A, Ishioka H. 1988. Amino acid sequence of flounder growth hormone deduced from a cDNA sequence. *Nucleic Acids Res* 16: 10362.
- Ouyang J, Jinwen W, Riqiang D, Qingxin L, Xunzhang W. 2003. High-level expression, purification, and characterization of porcine somatotropin in *Pichia pastoris*. *Protein Expression and Purification* 3: 28-34.
- Palma-Nicolás J, Ascacio-Martínez J, Revol A, Barrera-Saldaña H. 2005. Production of Recombinant Human Placental Variant Growth Hormone in *Pichia Pastoris*. *Biotechnology Letters* 27: 1695-1700.
- Pérez-Sánchez J, Caldusch-Giner JA, Mingarro M, Vega-Rubín de Celis S, Gómez-Requeni P, Saera-Vila A, Astola A, Valdivia MM. 2002. Overview of fish growth hormone family. New insights in genomic organization and heterogeneity of growth hormone receptors. *Fish Physiology and Biochemistry* 27: 243-258.
- Petersen TN, Brunak S, von Heijne G, Nielsen H. 2011. SignalP 4.0: discriminating signal peptides from transmembrane regions. *Nature Methods* 8: 785-786.
- Reinecke M, Björnsson BT, Dickhoff WW, McCormick SD, Navarro I, Power DM, Gutiérrez J. 2005. Growth hormone and insulin-like growth factors in fish: Where we are and where to go. *General and Comparative Endocrinology* 142: 20-24.
- Rentier-Delrue F, Swennen D, Mercier L, Lion M, Benrubi O, Martial JA. 1989a. Molecular Cloning and Characterization of Two Forms of Trout Growth Hormone cDNA: Expression and Secretion of tGH-II by *Escherichia coli*. *DNA* 8: 109-117.
- Rentier-Delrue F, Swennen D, Philippart JC, L'Hoir C, Lion M, Benrubi O, Martial JA. 1989b. Tilapia Growth Hormone: Molecular Cloning of cDNA and Expression in *Escherichia coli*. *DNA* 8: 271-278.
- Rojas-Herrera AA. 2001. Aspectos de dinámica de poblaciones del huachinango *Lutjanus peru* (Nichols y Mmurphy, 1922) y del flamenco *Lutjanus guttatus* (Steindachner, 1869) (Pisces: Lutjanidae) del litoral de Guerrero, México. Universidad de Colima, México.
- Rojas M. JR, Maravilla E, Chicas B. F. 2004. Hábitos alimentarios del pargo mancha *Lutjanus guttatus* (Pisces: Lutjanidae) en Los Cóbano y Puerto La Libertad, El Salvador. *Revista de Biología Tropical* 52: 163-170.

- Sakamoto T, McCormick SD. 2006. Prolactin and growth hormone in fish osmoregulation. *General and Comparative Endocrinology* 146: 24-30.
- Sambrook J, Russell DW. 2001. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Sanders EJ, Harvey S. 2004. Growth hormone as an early embryonic growth and differentiation factor. *Anatomy and Embryology* 209: 1-9.
- Sato N, Watanabe K, Murata K, Sakaguchi M, Kariya Y, Kimura S, Nonaka M, Kimura A. 1988. Molecular cloning and nucleotide sequence of tuna growth hormone cDNA. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Gene Structure and Expression* 949: 35-42.
- Sekine S, Mizukami T, Nishi T, Kuwana Y, Saito A, Sato M, Itoh S, Kawauchi H. 1985. Cloning and expression of cDNA of Salmon growth hormone in *Escherichia coli*. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 82: 4306-4310.
- Terpe K. 2006. Overview of bacterial expression systems for heterologous protein production: from molecular and biochemical fundamentals to commercial systems. *Appl Microbiol Biotechnol* 72: 211-222.
- Watahiki M, Masanori Y, Minoru Y, Minoru T, Kunio N. 1989. Conserved and Unique Amino Acid Residues in the Domains of the Growth Hormones. *The Journal of Biological Chemistry* 264: 312-316.
- Watahiki M, Tanaka M, Masuda N, Yamakawa M, Yoneda Y, Nakashima K. 1988. cDNA cloning and primary structure of yellow tail (*Seriola quinqueradiata*) pregrowth hormone. *General and comparative endocrinology* 70: 401-406.
- Westers L, Westers H, Quax WJ. 2004. *Bacillus subtilis* as cell factory for pharmaceutical proteins: a biotechnological approach to optimize the host organism. *Biochimica et Biophysica Acta* 1694: 299-310.
- Xu Q, et al. 2008. High-level secretory expression, purification and characterization of *Ailuropoda melanoleuca* growth hormone in *Pichia pastoris*. *Protein Expression and Purification* 60: 182-187.
- Yada T. 2007. Growth hormone and fish immune system. *General and Comparative Endocrinology* 152: 353-358.
- Yada T, Ichiro M, Kohji M, Teruo A, Schreck CB. 2004. Effects of prolactin and growth hormone on proliferation and survival of cultured trout leucocytes. *General and Comparative Endocrinology* 136: 298-306.