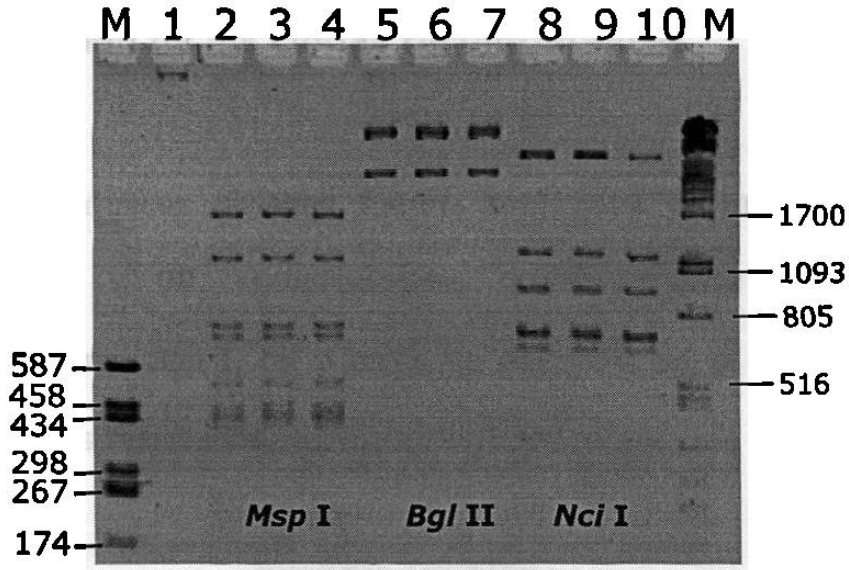


Figura 20.- Caracterización exhaustiva. Gel de agarosa al 1.5% donde se aprecia una digestión analítica de dos clonas positivas a la digestión con *Ban* I. Carriles 2, 5 y 8= pPIC9bGH digeridas con las enzimas señaladas en la parte inferior del gel; carriles 3, 6 y 9, así como los carriles 4, 7 y 10 son dos clonas digeridas con las enzimas señaladas. Ambas resultaron positivas a la mutagénesis así como a la caracterización exhaustiva con las seis enzimas mencionadas. Los marcadores son pBR322 + *Hae* III y λ + *Pst* I.

Finalmente, al menos tres clonas resultaron positivas a la caracterización con las enzimas de restricción y estas fueron denominadas pPIC9chGH. A estas clonas se les realizó una mediana escala para obtener suficiente cantidad del plásmido para almacenar y para transformar a las levaduras.

3.5. Transformación de levaduras.

La transformación de *P. pastoris* con el plásmido pPIC9chGH, se llevó a cabo como se describió en el punto 2.3.7, y dio lugar a 68 colonias que crecieron en medio carente de histidina. De estas colonias se levantaron 14 al azar y se les realizó la extracción de DNA genómico para proceder con la caracterización.

3.6. Caracterización de las clonas recombinantes.

Los DNAs genómicos aislados fueron sometidos a una PCR con los oligonucleótidos 97 y 98, realizándoseles posteriormente una digestión analítica con la enzima *Ban* I, tal y como se describió en el punto 2.3.8. La figura 21 muestra los resultados.

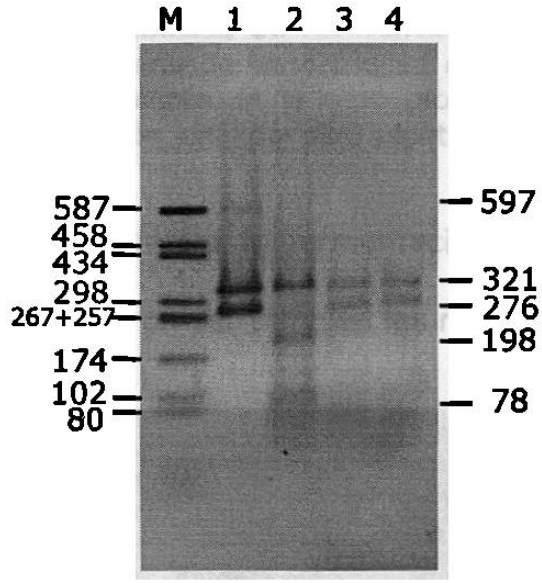


Figura 21.- Caracterización de las clonas de *P. pastoris*. El carril 1 muestra el plásmido mutagenizado después de ser digerido con la enzima *Ban* I. El carril 2 muestra DNA genómico de levadura que contiene en su genoma el DNAc de la BGH. Carriles 3 y 4 muestran DNA genómico de clonas de levaduras transformadas con el plásmido mutagenizado y puede verse que se comportan igual que éste, confirmando así la mutagénesis. Marcador: pUC19 + *Hae* III.

3.7. Fermentación con clonas recombinantes.

Se realizaron fermentaciones con clonas recombinantes productoras de HGHr, de BGHr y de CHGHr para llevar a cabo una comparación. En la figura 22 se muestra una gráfica comparando el crecimiento de las clonas de HGHr, BGHr y CHGHr, el cual fue relativamente similar entre las tres.

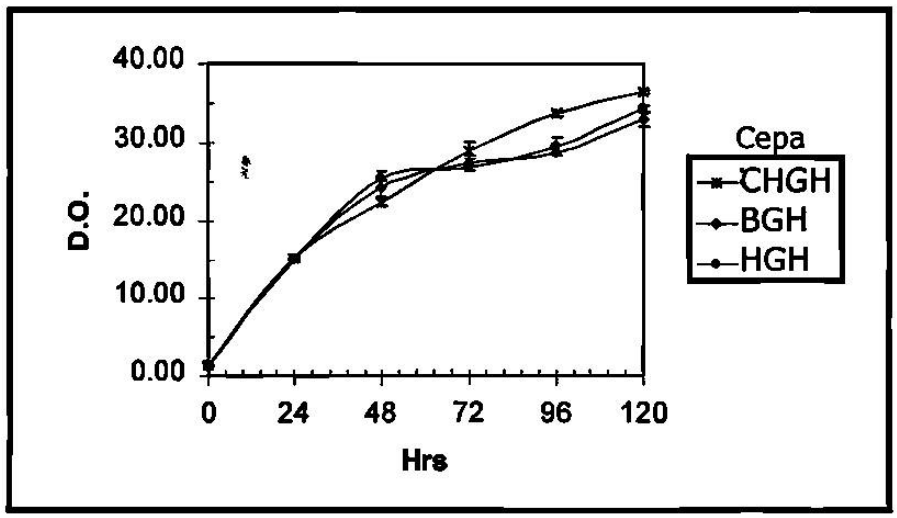


Figura 22.- Comparación de cinética de fermentación. Gráfica donde se puede comparar el comportamiento de las cepas en el medio que mostró ser mas apropiado para el crecimiento de la cepa productora de CHGHr (194). La gráfica incluye la desviación estándar de 3 repeticiones de cada experimento.

En la figura 23 se muestra la fermentación usando las condiciones óptimas para BGH, que resultaron ser también las mejores para CHGH.

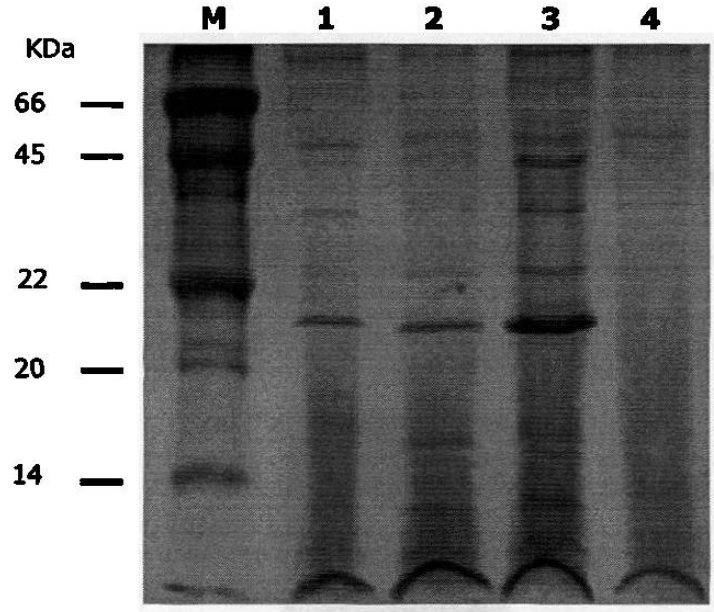


Figura 23.- Fermentación de BGH, HGH y CHGH recombinantes. Gel desnaturalizante de poliacrilamida al 15% donde se observa una comparación entre las clonas fermentadas. Carril 1: BGH, carril 2: HGH, carril 3: clona 194 de CHGH, carril 4: control negativo.

En la figura 24 se muestra un gel en el que se aprecia el resultado de un experimento de fermentación-inducción, donde se obtuvieron los mejores niveles de producción de CHGHr (de hasta 3.6 mg/L).

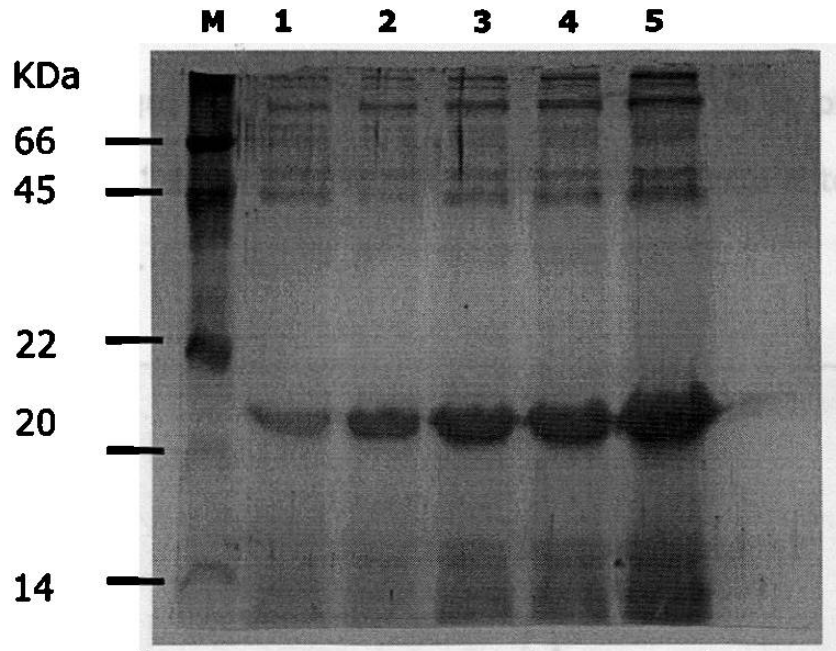


Figura 24.-Producción de CHGHr. Gel desnaturalizante de poliacrilamida al 15% mostrando la producción de la CHGHr. Los carriles del 1 al 5 son alícuotas de los medios de la misma cepa, tomadas a 24, 48, 72, 96 y 120 h, respectivamente.

3.8. Semipurificación de la proteína recombinante.

En la figura 25 se muestra un gel donde se puede comparar el medio antes y después de precipitar con sulfato de amonio al 40%.

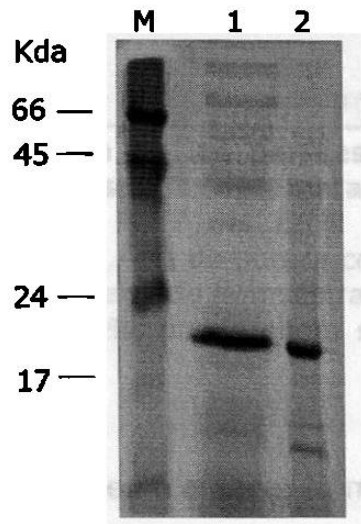


Figura 25.- Precipitación con sulfato de amonio. Gel de poliacrilamida al 15%. En el carril 1 se muestra el medio antes de precipitar con sulfato de amonio y en el carril 2 el mismo medio después de la precipitación.

En la figura 26 se muestran los perfiles de los carriles con y sin precipitación. Se logró mejorar en un 42% la pureza de la proteína en el medio (59.1/41.4 = 1.42. Hay 42% más CHGHr con respecto al total que en el medio sin precipitar).

a)

b)

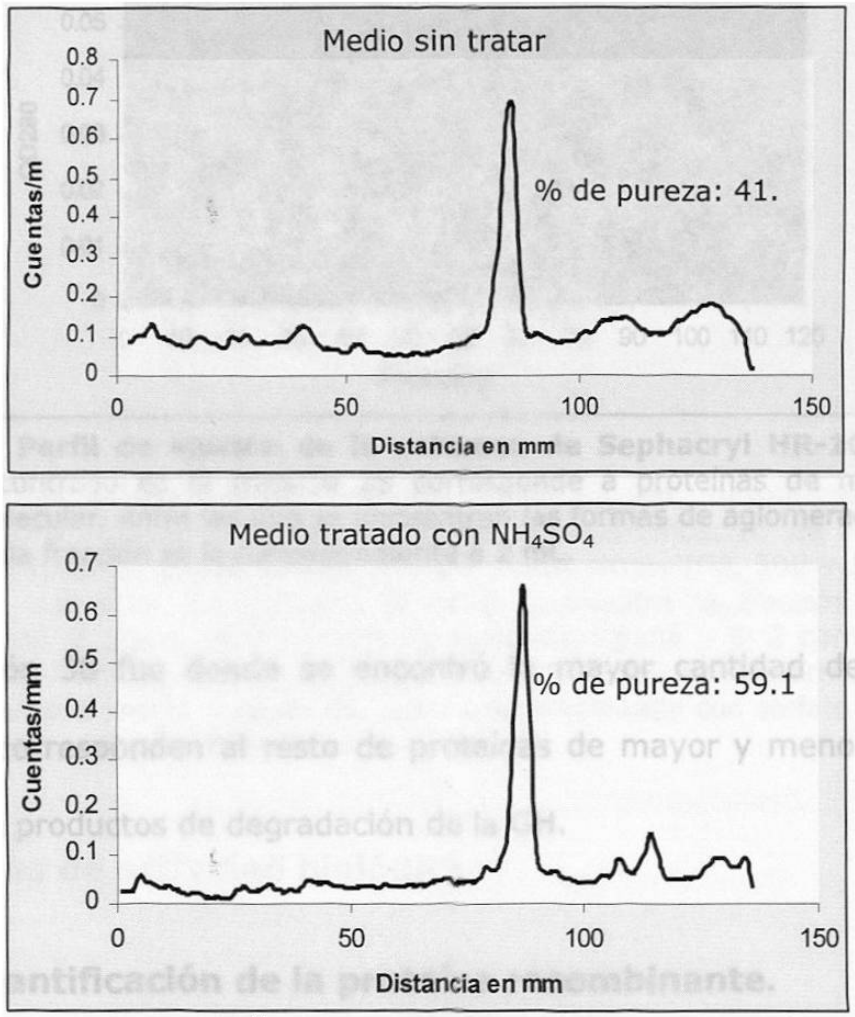


Figura 26.- Comparación de los perfiles del medio fermentado antes y después del tratamiento con sulfato de amonio. a) Perfil del carril del medio sin precipitar mostrando 41.4 % de pureza correspondiente a la CHGHr. b) Perfil del carril de la muestra precipitada con sulfato de amonio al 40%, donde ahora se muestra una pureza de 59.1%.

Después de ésto, se procedió a pasar la muestra por una columna de filtración en gel.

En la figura 26 se muestran los perfiles de los carriles con y sin precipitación. Se logró mejorar en un 42% la pureza de la proteína en el medio (59.1/41.4 = 1.42. Hay 42% más CHGHr con respecto al total que en el medio sin precipitar).

a)

b)

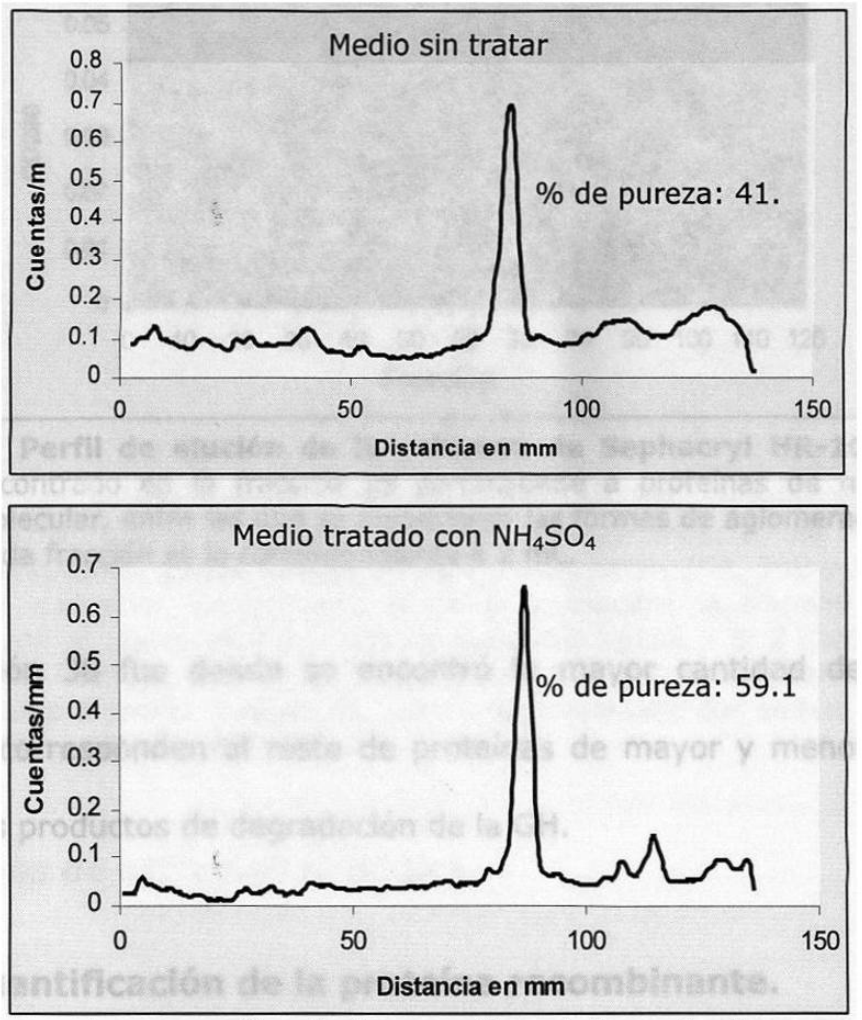


Figura 26.- Comparación de los perfiles del medio fermentado antes y después del tratamiento con sulfato de amonio. a) Perfil del carril del medio sin precipitar mostrando 41.4 % de pureza correspondiente a la CHGHr. b) Perfil del carril de la muestra precipitada con sulfato de amonio al 40%, donde ahora se muestra una pureza de 59.1%.

Después de ésto, se procedió a pasar la muestra por una columna de filtración en gel.

En la siguiente figura se muestra un perfil de la cromatografía por filtración en gel donde se evidencian los picos correspondientes a las proteínas.

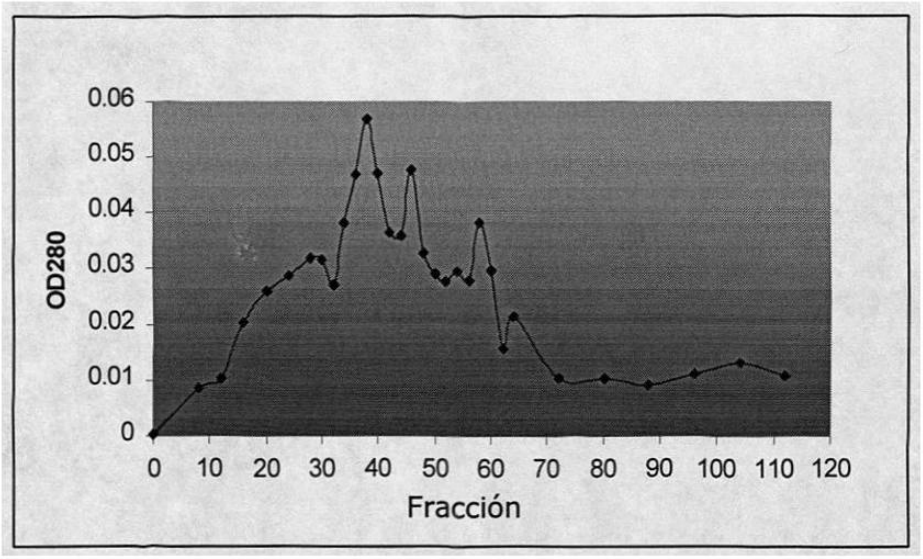


Figura 27.- Perfil de elución de la columna de Sephacryl HR-100. El pico encontrado en la fracción 28 corresponde a proteínas de mayor peso molecular, entre las que se encuentran las formas de aglomerados de GH. Cada fracción es lo correspondiente a 2 mL.

La fracción 38 fue donde se encontró la mayor cantidad de GH. Los demás picos corresponden al resto de proteínas de mayor y menor tamaño, así como a los productos de degradación de la GH.

3.9. Semicuantificación de la proteína recombinante.

Se realizó un gel de poliacrilamida de estas fracciones y se procedió a semicuantificar la proteína como se describió en el punto 2.3.10.1. En la figura 28 se muestra este gel. Con los datos derivados de estos ensayos se logró obtener un estimado de la cantidad de proteína y se pudo entonces diseñar el experimento de diferenciación adipocítica.

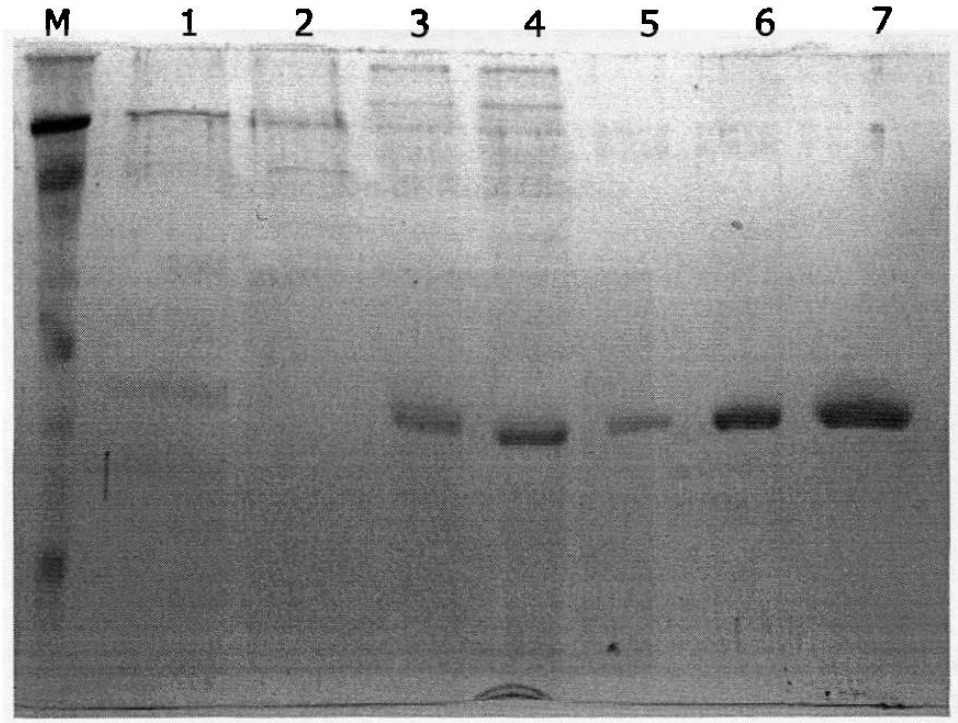


Figura 28.- Semicuantificación de la CHGHr. Gel desnaturalizante de poliacrilamida al 15% mostrando la semicuantificación de la proteína recombinante. En los carriles 5, 6 y 7 se muestran 100, 500 y 1000 ng de HGH comercial cuantificada. El carril 1 muestra la fracción donde se alcanzó el mayor pico después de la cromatografía y el 2 corresponde al control negativo (medio sin inducir), mientras que en los carriles 3 y 4 se muestra el medio después de haber sido precipitado con sulfato de amonio al 40% y antes de pasarlo por la columna.

3.10. Ensayos de actividad biológica.

Como ya se describió, se realizaron los experimentos de diferenciación adipocítica usando la HGH como testigo positivo, CHGHr como muestra problema y el medio de la cepa productora de CHGHr sin inducir pasado por los mismos procesos a los que se sometió CHGHr, como testigo negativo. En cuanto a lo referente a la tinción con rojo oleoso, tanto las células que fueron expuestas a CHGHr como a HGH mostraron mayor diferenciación cuando se comparan con el control del medio sin inducir. En la figura 29 se muestra la

gráfica correspondiente a 3 repeticiones del experimento con la desviación estándar.

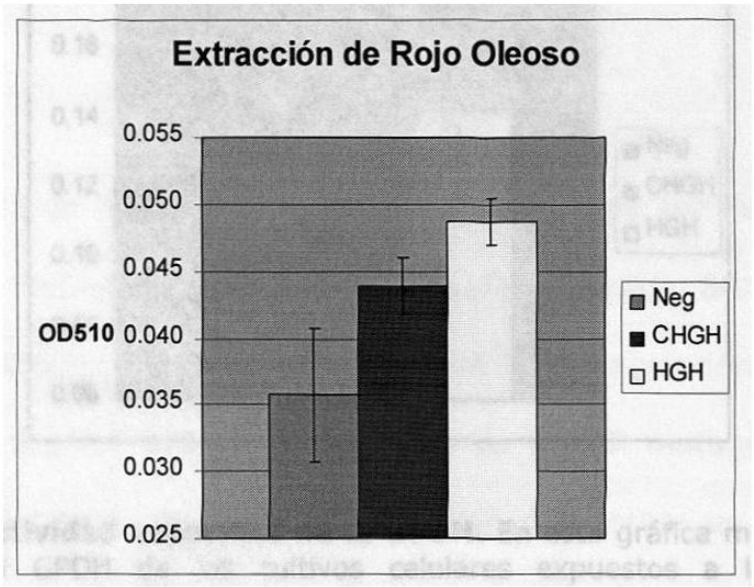


Figura 29.- Ensayo comparativo de actividad biológica. En esta gráfica se muestra la cantidad de rojo oleoso que retuvieron las células expuestas a las hormonas del crecimiento por 7 días comparadas con el control negativo. Se incluyen 3 repeticiones y su desviación estándar

En lo referente a la actividad de la GPDH, también los extractos celulares provenientes de los experimentos en los que se suplementó el medio de cultivo con CHGHr y HGH mostraron mayor actividad que el medio sin inducir y en la gráfica de la figura 30 se muestran estos resultados provenientes de 3 repeticiones y su desviación estándar.

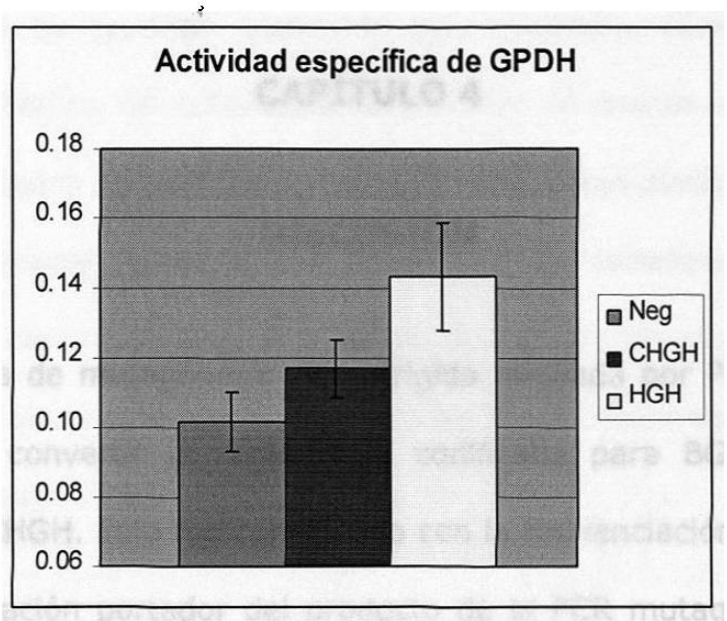


Figura 30.- Actividad específica de la GPDH. En esta gráfica muestra la actividad del GPDH de los cultivos celulares expuestos a las hormonas del crecimiento de la cabra y la humana. Corresponde a 3 repeticiones y se incluye la desviación estándar.

CAPÍTULO 4

DISCUSIÓN

La técnica de mutagénesis sitio-dirigida mediada por PCR resultó muy efectiva para convertir la región que codificaba para BGH en una que codifica para CHGH. Esto fue confirmado con la secuenciación del inserto del vector de clonación portador del producto de la PCR mutagénica. Además, mostró que el empleo de la enzima *Taq* DNA polimerasa es adecuado para estos propósitos siempre y cuando se trate de fragmentos de tamaño pequeño, pues se sabe que la *Taq* es propensa a introducir errores en la secuencia debido a su baja fidelidad durante la síntesis (Gallardo, 1999). Ya que el fragmento que nosotros generamos durante este experimento se reduce a 133 pares de bases, la baja fidelidad de la *Taq* no fue de tanta trascendencia, ya que esta polimerasa tiene un índice de error de 285×10^{-6} (Tindall,1988). La caracterización con endonucleasas de restricción confirmó que la subclonación en el vector de expresión también se llevó a cabo como se esperaba, ya que los sitios *Xma* I y *Apa* I se conservaron después de la ligación, demostrando que no hubo degradación de los extremos 5′, ni en el inserto ni en el vector. La PCR con los iniciadores 97 y 98, y la posterior digestión con la enzima diagnóstica, corroboró que no se insertó mas de un fragmento, ya que las bandas que liberó esta digestión fueron del tamaño esperado.

CAPÍTULO 4

DISCUSIÓN

La técnica de mutagénesis sitio-dirigida mediada por PCR resultó muy efectiva para convertir la región que codificaba para BGH en una que codifica para CHGH. Esto fue confirmado con la secuenciación del inserto del vector de clonación portador del producto de la PCR mutagénica. Además, mostró que el empleo de la enzima *Taq* DNA polimerasa es adecuado para estos propósitos siempre y cuando se trate de fragmentos de tamaño pequeño, pues se sabe que la *Taq* es propensa a introducir errores en la secuencia debido a su baja fidelidad durante la síntesis (Gallardo, 1999). Ya que el fragmento que nosotros generamos durante este experimento se reduce a 133 pares de bases, la baja fidelidad de la *Taq* no fue de tanta trascendencia, ya que esta polimerasa tiene un índice de error de 285×10^{-6} (Tindall,1988). La caracterización con endonucleasas de restricción confirmó que la subclonación en el vector de expresión también se llevó a cabo como se esperaba, ya que los sitios *Xma* I y *Apa* I se conservaron después de la ligación, demostrando que no hubo degradación de los extremos 5', ni en el inserto ni en el vector. La PCR con los iniciadores 97 y 98, y la posterior digestión con la enzima diagnóstica, corroboró que no se insertó mas de un fragmento, ya que las bandas que liberó esta digestión fueron del tamaño esperado.

La transformación de levaduras por el método de esferoplastos o por electroporación se reportan como las más eficientes (Cregg, 1985); sin embargo, la técnica de esferoplastos requiere al menos de 5 días para preparar las células además de un número alto de reactivos, lo que la hace una técnica costosa, además de laboriosa. La electroporación requiere contar con el electroporador. En cambio, la técnica de cloruro de litio se realiza en un día, no requiere la preparación de reactivos costosos y es sencilla de ejecutar.

Las condiciones de fermentación óptimas para esta proteína se acercaron más a las óptimas para BGHr que a las de HGHr, ambas ensayadas en nuestro laboratorio por Gallardo (1999) y Sánchez (1998), respectivamente, lo que era de esperarse por la similitud entre las dos GHs de rumiantes.

La cantidad de proteína heteróloga obtenida en el mejor de los ensayos fue aparentemente mayor a la cantidad de proteína obtenida de la fermentación de la cepa productora de BGHr, aunque no mayor a la de HGHr. No está claro si esto puede ser efecto del cambio aminoacídico, el cual le pudiera conferir mayor estabilidad en el medio de cultivo, o si es debido únicamente a que la cepa de la levadura aquí construida y seleccionada contiene un mayor número de copias del cassette de expresión en comparación con la de BGH.

La semipurificación de la proteína tras precipitación selectiva con sulfato de amonio al 40% y su paso por la columna cromatográfica de filtración en gel fue una opción, aunque aparentemente no la mejor, resultando útil para separar las formas monoméricas de los aglomerados de GH, así como otros productos de degradación. En la literatura se reporta la purificación de GHs con columnas de intercambio aniónico o con columnas de afinidad con anticuerpos monoclonales. Ya que nuestro laboratorio no contaba en esos momentos con dichas columnas, se optó por usar estas opciones, sin embargo, queda mucho por hacer para estandarizar en el laboratorio este tipo de purificación.

Algo similar sucede con los bioensayos. La cuantificación de la diferenciación adipocítica, por medio de la extracción del rojo oleoso fijado en el cultivo y por la medición de la actividad de la GPDH, arrojó resultados preeliminares que deben ser confirmados con más repeticiones. Queda pendiente también ensayar la CHGHr, una vez que se produzca en cantidades suficientes y se logre una purificación que permita elaborar un inyectable, en animales de laboratorio, tales como roedores carentes de pituitaria y cuantificar los efectos que resulten de la aplicación de la hormona; así como realizar pruebas de comportamiento en cabras productoras de leche para probar si la CHGHr tiene la capacidad lactopoyética ampliamente demostrada para el caso de la BGH.

CAPÍTULO 5

CONCLUSIONES

- Se logró construir un iniciador mutagénico capaz de convertir la glicina en el codón 129 de la BGH en valina, para dar así lugar a la CHGH.
- La DNA polimerasa *Taq* pudo ser usada para la construcción del cassette de expresión mutagenizado sin problema alguno, seguramente debido al tamaño pequeño de la región de DNA involucrado, menester corroborar la integridad por secuenciación.
- La técnica de transformación de levaduras por medio del uso de cloruro de litio es una metodología sencilla y económica, que arrojó resultados favorables en un menor tiempo en comparación con otras técnicas descritas.
- Las condiciones de fermentación que resultaron más adecuadas para la producción de CHGHr en *Pichia pastoris* fueron: medio BMMY buffer de citratos pH 5.15, % de metanol de 0.875, iniciando con una biomasa de 1.4 OD_{600} por 5 días de inducción en un matraz de 250 mL con 50 mL de medio con una agitación de 250 rpm, mismas que fueron optimizadas en nuestro laboratorio para BGHr.

- La técnica de bioensayo para corroborar la actividad biológica de la CHGHr arrojó resultados que sugieren que ésta tiene la actividad esperada, sin embargo, hacen falta otros ensayos en animales de laboratorio y posteriormente en cabras para que los resultados sean contundentes.
- Por último, este trabajo aportó el vector de expresión pPIC9chGH, que contiene la secuencia que codifica para la CHGH con su expresión regulada por un promotor inducible por metanol, así como cepas de levadura que contienen insertado en su genoma este vector y que al ser alimentadas con un medio suplementado con metanol, excretan la CHGHr al medio de cultivo en forma abundante, activa y con estructura muy seguramente idéntica a la natural.

CAPÍTULO 6

BIBLIOGRAFÍA

1. Alberts B., Bray D., Johnson A., Lewis J., Walter P., Roberts K. y Raff M. 1998. Essential cell biology. Garland Publishing Inc. pp 63.
2. Amaya F. 1988. Obtención del DNA complementario al RNAm de la hormona del crecimiento bovina. Tesis de Maestría. Facultad de Medicina. UANL.
3. Bauman D.E.; Eppard P.J.; DeGeeter M.J. y Lanza G.M. 1985. Responses of High-producing Dairy Cows to Long-Term Treatment with Pituitary Somatotropin and Recombinant Somatotropin. *J. Dairy Sci*; 68(6):1352-1360.
4. Bauman D.E.; McCutcheon S.N.; Steinhour W.D.; Eppard P.J. y Sechen S.J. February 1985. Sources of Variation and Prospects for Improvement of Productive Efficiency in the Dairy Cow: A Review. *J. Dairy Sci*; 60(2):583-592.
5. Bhat G.J., Lodes M.J., Myler P.J. y Stuart K.D. 1991. A simple method for cloning blunt ended DNA fragments. *Nucleic Acids Res.* 25; 19(2):398.
6. Bielefeldt - Ohmann H. y Fitzpatrick D.R. 1997. High Efficiency T-Vector Cloning Of PCR Products By Forced A Tagging And Post-Ligation Restriction Enzyme Digestion. *Biotechniques* 23:822-826.
7. Castells S., Torrado C., Bastian W. y Wisniewski K.E. 1992. Growth hormone deficiency in Down syndrome children. *J Intellect Disabil Res*, 36(1), 29-43.
8. Chalupa W. y Galligan D.T. 1989. Nutritional implications of somatotropin for lactating cows. *J. Dairy Sci.* 72:2510-2524.
9. Cregg J.M., Barringer K.J., Hessler A.Y. y Madden K.R. 1985. *Pichia pastoris* as a host system for transformations. *Mol Cell Biol.* 5(12):3376-85.

10. Cregg J.M., Vedvick T.S. y Raschke W.C. 1993. Recent advances in the expression of foreign genes in *Pichia pastoris. BioTechnology(NY)* 11, 905-910.

11. Cohen S., Chang A., Boyer H. y Helling R. 1973. Construction of biological functional bacterial plasmids *in vitro. Proc. Natl. Acad. Sci*, USA, 70:3240-3244.

12. Composition of Foods; Dairy and Egg Products. 1976. Agricultural Handbook No. 8-1, Agricultural Research Service, Washington, D.C.; USDA.

13. Eeles R.A. y Stamps A.C. 1993. Polymerase Chain Reaction (PCR): The Technique and Its Application. Landes Bioscience pp13-14.

14. Ellis S.B., Brust P.F., Koutz P.J., Waters A.F., Harpold M.M. y Gingeras T.R. 1985. Isolation of alcohol oxidase and two other methanol regulatable genes from the yeast *Pichia pastoris. Mol Cell Biol.* 5(5):1111-21.

15. Eppard P.J., Bentle L.A., Violand B.N., Ganguli S., Hintz R.L., Kung L. Jr, Krivi G.G. y Lanza G.M. 1992. Comparison of the galactopoietic response to pituitary-derived and recombinant-derived variants of bovine growth hormone. *J Endocrinol* 132(1):47-56

16. Fleet I.R., Fullerton F.M., Heap R.B., Mepham T.B., Gluckman P.D. y Hart I.C. 1988. Cardiovascular and metabolic responses during growth hormone treatment of lactating sheep. *J. Dairy Res* 55, 479-485.

17. Gallardo-Blanco H.L. 1999. Construcción de cepas de *Pichia pastoris* portadoras del DNAc de la hormona del crecimiento bovino. Tesis de Maestría. Facultad de Medicina, UANL.

18. Gamou S., Shimizu Y. y Shimizu N. 1990. Adipocytes en Methods in Molecular Biology, Animal Cell Culture. Polard J.W. y Walker J.M. Editores. Human Press Vol. 5 Cap 18; 197-207.

19. Gietz R.D., Schiestl R.H., Willems A.R. y Woods R.A. 1995. Studies on the transformation of intact yeast cells by the LiAc/SS-DNA/PEG procedure. *Yeast*. Apr 15;11(4):355-60.

20. http://encarta.msn.com

21. http://www.britannica.com

22. Jacobs F. 1985. Breakthrough: The True Story of Penicillin. New York: Dodd, Mead & Company.

23. Johnston M. 1987. A model fungal gene regulatory mechanism: the GAL genes of *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiol Rev* 51(4):458-76.

24. Juárez-Aguilar E. y Castro- Muñozledo F. 1995. 22-kDa isoforms show differential effects when assayed in 3T3-F44a4 and 3T3-F442A/CA adipocytes. *Biochem. Biophys. Res. Commun*. 217, 1;28-33.

25. Knight C.H., Fowler P.A. y Wilde C.J.. 1990. Galactopoietic and mammogenic effects of long-term treatment with bovine growth hormone and thrice daily milking in goats. *J Endocrinol* 127, 129-133.

26. Lee K.B. y Burrill G.S.. 1994. Biotech 95 Reform, Restructure, Renewal: The Industry Annual Report. Palo Alto, CA: Ernst & Young.

27. Lee P.D. y Forsyth I.A. 1988. The effects of raising growth hormone concentration pre-partum on milk yield in goats. *J Endocrinol* 177, (Suppl.), abstract no 37.

28. Lingappa V.R., Devillers-Thiery A. y Blobel G. 1977. Nascent prehormones are intermediates in the biosynthesis of authentic bovine pituitary growth hormone and prolactin. *Proc Natl Acad Sci* U S A Jun;74(6):2432-6.

29. McBride B.W., Burton J.L. y Burton J.H. 1988. The influence of bovine growth hormone (somatotropin) on animals and their products. *Res. Dev. Agric.* 5:1-21.

19. Gietz R.D., Schiestl R.H., Willems A.R. y Woods R.A. 1995. Studies on the transformation of intact yeast cells by the LiAc/SS-DNA/PEG procedure. *Yeast*. Apr 15;11(4):355-60.

20. http://encarta.msn.com

21. http://www.britannica.com

22. Jacobs F. 1985. Breakthrough: The True Story of Penicillin. New York: Dodd, Mead & Company.

23. Johnston M. 1987. A model fungal gene regulatory mechanism: the GAL genes of *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiol Rev* 51(4):458-76.

24. Juárez-Aguilar E. y Castro- Muñozledo F. 1995. 22-kDa isoforms show differential effects when assayed in 3T3-F44a4 and 3T3-F442A/CA adipocytes. *Biochem. Biophys. Res. Commun*. 217, 1;28-33.

25. Knight C.H., Fowler P.A. y Wilde C.J.. 1990. Galactopoietic and mammogenic effects of long-term treatment with bovine growth hormone and thrice daily milking in goats. *J Endocrinol* 127, 129-133.

26. Lee K.B. y Burrill G.S.. 1994. Biotech 95 Reform, Restructure, Renewal: The Industry Annual Report. Palo Alto, CA: Ernst & Young.

27. Lee P.D. y Forsyth I.A. 1988. The effects of raising growth hormone concentration pre-partum on milk yield in goats. *J Endocrinol* 177, (Suppl.), abstract no 37.

28. Lingappa V.R., Devillers-Thiery A. y Blobel G. 1977. Nascent prehormones are intermediates in the biosynthesis of authentic bovine pituitary growth hormone and prolactin. *Proc Natl Acad Sci* U S A Jun;74(6):2432-6.

29. McBride B.W., Burton J.L. y Burton J.H. 1988. The influence of bovine growth hormone (somatotropin) on animals and their products. *Res. Dev. Agric*. 5:1-21.

30. Mephan T.B., Lawrence S.E., Peters A.R. y Hart I.C. 1984. Effects of exogenous growth hormone on mammary function in lactating goats. *Horm Metab Res* 16, 248-253.

31. National Goat Handbook, University of Maryland. http://www.inform.umd.edu/EdRes/Topic/AgrEnv/ndd/goat/

32. Nutritive Value of Foods. 1981. Home And Garden Bulletin Number 72, U. S. Dept. of Agriculture, Washington, D.C., U. S. Government Printing Office.

33. Phipps R.H., Madakadze C., Mutsvangwa T., Hard D.L. y Kerchove G. 1991. Use of bovine somatotropin in the tropics; the effect of sometribove on milk production of *Bos indicus*, dairy cross-bred and *Bos taurus* cows in Zimbabwe. *J Agri Sci*;117:257.

34. Primrose S.B. 1993. Molecular biotechnology. Editorial Blackwell scientific publications. 2ª Edición.

35. Romanos M.A., Scorer C.A. y Clare J.J. 1992. Foreign gene expression in yeast: a review. *Yeast*. 8(6):423-88.

36. Sánchez C.N. 1998. Producción de hormona del crecimiento humano recombinante biológicamente activa en *Pichia pastoris*. Tesis de maestría. Facultad de Medicina. UANL.

37. Sanger F., Nicklen S. y Coulson A.R. 1977. DNA sequencing with chain terminators inhibitors. Proceedings of the National Academy of Sciences, USA 74: 5463-5467.

38. Seavey B.K., Singh R.N., Lewis U.J. y Geschwind I.I. 1971. Bovine growth hormone: evidence for two allelic forms. *Biochem Biophys Res Commun*. Apr 2;43(1):189-95.

39. Sejrsen K., Foldager J., Sorensen M.T., Akers R.M. y Bauman D.E. 1986. Effect of exogenous bovine somatotropin on pubertal mammary development in heifers. *J. Dairy Sci* 69, 1528-1533.

40. Tindall K.R. y Kunkel T.A. 1988. Fidelity of DNA synthesis by the *Thermus aquaticus* DNA polymerase. *Biochemistry* 27, 6008-6013.

41. USDA Handbook #8, 1989

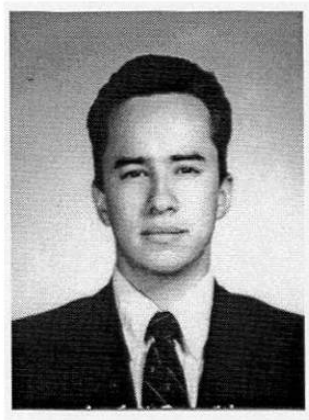
42. Wallace R.B., Schold M., Johnson M.J., Dembek P. y Itakura K. 1981. Oligonucleotide directed mutagenesis of the human beta-globin gene: a general method for producing specific point mutations in cloned DNA. *Nucleic Acids Res.* Aug 11;9(15):3647-56.

43. Watson J.D., Gilman M., Witkowski J., Zoller M. (Contributor), Witkowski G. (Contributor) 1992. Recombinant DNA. Scientific American Books. Second Edition. pp 192, 193.

44. Winder S.J., Turvey A. y Forsyth I.A. 1989. Stimulation of DNA synthesis in cultures of ovine mammary epithelial cells by insulin and insulin-like growth factors. *J Endocrinol* 123, 319-326.

45. Wood D.C., Salsgiver W.J., Kasser T.R., Lange G.W., Rowold E., Violand B.N., Johnson A., Leimgruber R.M., Parr G.R. y Siegel N.R. 1989. Purification and characterization of pituitary bovine somatotropin *J Biol Chem* Sep 5;264(25):14741-7

RESUMEN AUTOBIOGRÁFICO



Jorge Mauricio Reyes Ruiz

Candidato para el grado de

MAESTRÍA EN CIENCIAS con Especialidad en Biología Molecular e Ingeniería Genética.

Tesis: Hormona del Crecimiento Caprino: Construcción de un DNA que la Codifica y su Expresión en *Pichia pastoris*

Campo de Estudio: Biotecnología

Datos Personales:

Nacido en Monterrey, Nuevo León, México, el 18 de Junio de 1974, hijo de Oscar Reyes Robles y Diana Ruiz de Reyes.

Egresado de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, obteniendo el grado el día 22 de Junio de 1998, 3er lugar de su generación.

TIPO DE ADQUISICION
DONATIVO