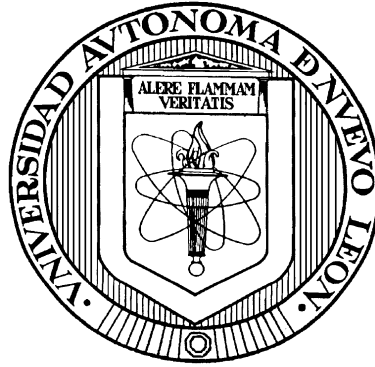


UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

FACULTAD DE MEDICINA



EXPRESIÓN DEL *LOCUS* GH EN EL OJO DE PRIMATES SUPERIORES

Por

DIANA CRISTINA PÉREZ IBAVE

**Como requisito parcial para obtener el Grado de
DOCTOR EN CIENCIAS con Especialidad en
Biología Molecular e Ingeniería Genética**

JULIO 2014

EXPRESIÓN DEL *LOCUS* GH EN EL OJO DE PRIMATES SUPERIORES

Aprobación de tesis:



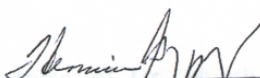
DR. C. HUGO ALBERTO BARRERA SALDAÑA
Director De Tesis



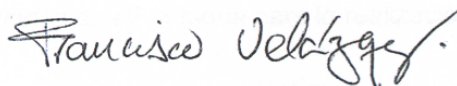
DR. med. HUMBERTO CAVAZOS ADAME
Co-Director de Tesis



DRA. C. MARÍA DE LOURDES GARZA RODRÍGUEZ
Comisión de Tesis



DRA. C. HERMINIA GUADALUPE MARTÍNEZ RODRÍGUEZ
Comisión de Tesis



DR. C. JUAN FRANCISCO VELÁZQUEZ VADILLO
Comisión de Tesis



DR. med. GERARDO ENRIQUE MUÑOZ MALDONADO
Subdirector de Estudios de Posgrado

AGRADECIMIENTOS

En primer lugar quiero agradecer a Dios por darme la vida, la oportunidad de continuar con mis estudios y por permitirme formar una linda familia; en fin por todas sus bendiciones.

A mi familia: Mi esposo Gerardo, a Gerardito y a Emily; gracias por estar conmigo, por amarme y apoyarme en todo. Los amo.

A mi mamá Trinidad y mis hermanos Ana Laura y Rafael por apoyarme siempre, por estar a mi lado y amarme incondicionalmente.

A mi director de tesis el Dr. Hugo Alberto Barrera Saldaña: gracias por permitirme trabajar en su laboratorio, por sus enseñanzas, su paciencia, dedicación, por confiar en mí y por permitirme ser parte de este proyecto de investigación.

A mi co-director de tesis el Dr. Humberto Cavazos Adame: gracias por apoyarme para la realización de este proyecto, por su asesoría en la parte clínica y confianza en mi persona para la realización de este trabajo.

A mi sinodal la Dra. María de Lourdes Garza: Gracias por ser mi amiga, por estar conmigo en las buenas en las malas, por quererme a pesar de mis errores y por su apoyo para la realización de este proyecto.

A mis sinodales: Dra. Lourdes Garza, Dra. Herminia Martínez, Dr. Francisco Velázquez; por su tiempo, dedicación y consejos.

A mis compañeros de laboratorio: Daniela, David, Alí, Oscar, Rafa, Mariel, Erick, Rolando y Mauricio. A todos y cada uno de ustedes mil gracias por ayudarme cuando lo necesité.

Del Departamento de Oftalmología, agradezco los apoyos de los Drs: Jesús Mohamed, Karim Mohamed, Jibrán Mohamed, Karla Butrón, Manuel Valdés. Así como también a la Lic. Elena Tovar y a las secretarias Juanita, Rosy , Laura y Karla.

A mis amigos: Mariana, Yael, Idalia, Martuchis, Raquel, Juany, Lupita y Normita, así como a todo el personal del Departamento de Bioquímica y Medicina Molecular.

Un agradecimiento muy especial a Irám Rodríguez por su amistad, sus consejos, y apoyo incondicional para la realización de este trabajo.

DEDICATORIA

A mi papá Rafael Pérez Ávila (1958-2012) que aunque ya no está físicamente conmigo, me apoyó durante mi formación profesional y se que estaría muy orgulloso de mí. Un beso donde quiera que estés, te quiero.

A mi familia: Gerardo, Gerardito y Emily. Los amo y son mi motor de impulso.

ÍNDICE

LISTA DE FIGURAS.....	VI
LISTA DE CUADROS.....	VIII
ABREVIATURAS.....	IX
RESUMEN.....	XV
1. INTRODUCCIÓN.....	1
1.1 Estructura del locus <i>GH</i> humano.....	1
1.2 Estructura del gen <i>GH-N</i> humano.....	2
1.3 Isoformas de los genes <i>GH-N</i> y <i>GH-V</i> en el humano.....	2
1.4 Regulación de la expresión de los genes del locus <i>GH</i> en el humano.	4
1.4.1 Descondensación de la cromatina.....	4
1.4.2 Regulación tejido específica.....	5
1.4.3 Regulación transcripcional.....	6
1.4.4 Regulación neuroendocrina de la secreción de GH.....	6
1.4.5 Mecanismos de acción molecular de la GH.....	7
1.4.6 Función de las hormonas del locus <i>GH</i>	9
1.4.7 Evolución de la <i>GH</i> en los primates.....	10
2. ANTECEDENTES.....	11
2.1 <i>GH</i> en otros tejidos.....	11
2.2 Anatomía del ojo humano.....	12
2.3 Anatomía de la retina humana.....	16
2.4 Expresión de la <i>GH</i>	17
2.4.1 <i>GH</i> ocular en peces.....	17
2.4.2 <i>GH</i> ocular en anfibios.....	17

2.4.3 GH ocular en aves.....	18
2.4.4 GH ocular en ratas.....	20
2.4.5 GH ocular en ratones.....	21
2.4.6 GH ocular en bovinos.....	21
2.4.7 GH ocular en humanos.....	21
3. JUSTIFICACIÓN.....	24
4. OBJETIVOS.....	25
4.1 Objetivo general.....	25
4.2 Objetivos específicos.....	25
5. ESTRATEGIA GENERAL.....	26
6. MATERIALES Y MÉTODOS.....	28
6.1 Reactivos.....	28
6.1.1 Ensayos de qPCR.....	28
6.1.1.1 Recolección de los tejidos oculares para ensayos de qPCR.....	28
6.1.1.2 Extracción de RNA total en tejidos oculares de humanos.....	28
6.1.1.3 Extracción de RNA total en tejidos oculares de babuinos.....	28
6.1.1.4 Retrotranscripción (RT-PCR).....	29
6.1.1.5 PCR Cuantitativa en tiempo real (qPCR).....	29
6.1.2 Ensayos de Inmunofluorescencia.....	29
6.1.2.1 Recolección de los tejidos oculares para ensayos de inmunofluorescencia.....	29
6.1.2.2 Desparafinar tejidos embebidos en parafina.....	29
6.1.2.3 Tinción hematoxilina-eosina (método de Harris).....	29
6.1.2.4 Exposición de epítopes.....	30
6.1.2.5 Lavados de las laminillas con TBS.....	30
6.1.2.6 Lavados de las laminillas con TTBS.....	30

6.1.2.7 Bloqueo de peroxidasa endógena.....	30
6.1.2.8 Bloqueo de inespecificidades con borohidrato de sodio al 1% y leche al 5%.....	30
6.1.2.9 Incubación con anticuerpo primario.....	30
6.1.2.10 Incubación con anticuerpo secundario.....	31
6.1.2.11 Incubación con DAPI.....	32
6.1.2.12 Montaje de las laminillas.....	32
6.1.3 Ensayos de proteómica.....	32
6.1.3.1 Extracción de proteínas en tejidos de babuinos utilizando el buffer de lisis RIPA.....	32
6.1.3.2 Cuantificación de proteínas con el reactivo EZQ.....	32
6.1.3.3 Inmunoprecipitación.....	32
6.1.3.4 Preparación de la muestra con perlas magnéticas de fase reversa (M ² C8 beads)	33
6.1.3.5 LC/FT-MS/MS.....	33
6.2 Equipo.....	33
6.2.1 Ensayos de qPCR.....	34
6.2.1.1 Extracción de RNA total en tejidos oculares de humanos y babuinos.....	34
6.2.1.2 Retrotranscripción (RT-PCR).....	34
6.2.1.3 PCR Cuantitativa en tiempo real (qPCR).....	34
6.2.2 Ensayos de Inmunofluorescencia.....	34
6.2.2.1 Confección de bloques de parafina de los tejidos oculares.....	34
6.2.2.2 Tinción hematoxilina-eosina (método de Harris).....	34
6.2.2.3 Exposición de epítopes.....	34
6.2.2.4 Observar al microscopio la luz de marcaje.....	35
6.2.3 Ensayos de proteómica.....	35
6.2.3.1 Cuantificación de proteínas con el reactivo EZQ.....	35
6.2.3.2 Extracción de proteínas en tejidos de babuinos utilizando el buffer de	

lisis RIPA.....	35
6.2.3.3 Inmunoprecipitación.....	35
6.2.3.4 Preparación de la muestra con perlas magnéticas de fase reversa (M ² C8 beads).....	35
6.2.3.5 LC/FT-MS/MS.....	36
6.3 Metodología.....	36
6.3.1 Recolección de muestras de tejidos oculares de pacientes...	36
6.3.2 Extracción de RNA total en tejidos oculares humanos.....	37
6.3.3 Extracción de RNA total en tejidos oculares de babuinos.....	39
6.3.4 Retrotranscripción RT-PCR.....	40
6.3.5 PCR cuantitativa en tiempo real (qPCR).....	40
6.3.6 Ensayos de inmunofluorescencia.....	41
6.3.6.1 Confección de bloques de parafina de los tejidos oculares.....	41
6.3.6.2 Desparafinar tejidos embebidos en parafina.....	42
6.3.6.3 Tinción hematoxilina-eosina (método de Harris).....	42
6.3.6.4 Reacción de inmunofluorescencia.....	43
6.3.7 Ensayos de proteómica.....	44
6.3.7.1 Extracción de proteínas en tejidos de babuinos utilizando el buffer de lisis RIPA.....	44
6.3.7.2 Cuantificación de proteínas con el reactivo EZQ.....	45
6.3.7.3 Inmunoprecipitación.....	45
6.3.7.4 Preparación de la muestra con perlas magnéticas de fase reversa (M ² C8 beads).....	47
6.3.7.5 LC/FT-MS/MS.....	49
7. RESULTADOS.....	50

7.1 Objetivo 1 biobanco.- Generar una colección de tejidos oculares de pacientes y de babuinos, incluidos los datos relevantes de los bioespecímenes.....	50
7.1.1 Datos demográficos de los pacientes.....	51
7.1.2 Datos clínicos de los pacientes.....	52
7.2 Objetivo 2 expresión génica.- Determinar si en los tejidos oculares la expresión del gen GH-1 y la del resto de los genes del locus (GH-2, CSH-1 y CSH-2), así como la del gen del receptor de la GH (GHR).....	53
7.2.1 PCR cuantitativa en tiempo real (qPCR).....	53
7.2.2 Ensayos de inmunofluorescencia.....	56
7.3 Objetivo 3 regulación génica.- Investigar si los factores y mecanismos que participan en la regulación <i>del locus GH</i> en la hipófisis y placenta, también lo hacen en la regulación ocular del <i>locus GH</i>	61
7.3.1 PCR cuantitativa en tiempo real (qPCR).....	61
7.3.2 Ensayos de inmunofluorescencia.....	63
7.4 Objetivo 4 modelo animal.- Corroborar los hallazgos y probar las hipótesis que surjan para explicar estos, en el modelo experimental del babuino.....	66
7.4.1 PCR cuantitativa en tiempo real (qPCR).....	67
7.4.2 Ensayos de inmunofluorescencia.....	70
7.4.3 Ensayos de proteómica.....	73
8. DISCUSIÓN.....	76
9. CONCLUSIONES.....	80
10. BIBLIOGRAFÍA.....	81
11. ANEXOS.....	88

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: El locus <i>GH</i> humano.....	1
Figura 2: El gen de la <i>GH</i> humano.....	2
Figura 3: Isoformas por splicing alternativo del transcrito primario del gen <i>GH-N (GH-1)</i>	3
Figura 4: Isoformas por splicing alternativo del transcrito primario del gen <i>GH-V (GH-2)</i>	4
Figura 5: Regulación de expresión de los genes del locus <i>GH</i>	6
Figura 6: Vías de señalización de la GH.....	9
Figura 7: Vista lateral del globo ocular humano.....	13
Figura 8: Anatomía de la retina humana.....	16
Figura 9: Microscopía confocal que muestra la inmunoreactividad de la GH de pollo en el DE 7 en retina.....	19
Figura 10: Microscopía confocal que muestra la inmunoreactividad de GHR (rojo) y GH (verde) de pollo en el DE 7 en retina.....	20
Figura 11: Microscopía confocal que muestra la inmunoreactividad de GHR (rojo) y GH (verde) en tres retinas humanas adultas.....	22
Figura 12: Estrategia general.....	27
Figura 13: Estrategia general de la recolección de tejidos oculares humanos... ..	37
Figura 14: Análisis de los datos demográficos de los pacientes del Hospital Universitario “Dr. José Eleuterio González (HU) de la UANL y del Instituto de Oftalmología Fundación Conde Valenciana IAP (IOCV).....	52
Figura 15: Análisis de los datos clínicos de los pacientes del Hospital Universitario “Dr. José Eleuterio González (HU) de la UANL y del Instituto de Oftalmología Fundación Conde Valenciana IAP (IOCV).....	53
Figura 16: Curvas de amplificación de los controles positivos para el locus <i>GH</i> utilizados en este estudio: placenta y adenomas hipofisarios. Así como la curva de amplificación del gen endógeno utilizado <i>ACTB</i>	54
Figura 17: Curvas de amplificación de las muestras para los genes del locus <i>GH</i> y su receptor <i>GHR</i>	55

Figura 18: Microscopía confocal que muestra la inmunoreactividad de GH y GHR en los controles positivos: placenta e hipófisis.....	57
Figura 19: Microscopía confocal que muestra la inmunoreactividad de GH y GHR en distintos tejidos oculares humanos.....	58
Figura 20: Microscopía confocal que muestra la inmunoreactividad de los controles negativos.....	59
Figura 21: Microscopía confocal que muestra la inmunoreactividad de los controles positivos.....	60
Figura 22: Curvas de amplificación de tejidos oculares humanos para el gen <i>Pit-1</i>	61
Figura 23: Curvas de amplificación de tejidos oculares humanos para los genes <i>SST</i> y sus receptores (<i>SSTR1- SSTR5</i>)	62
Figura 24: Microscopía confocal que muestra la inmunoreactividad de <i>SST</i> y <i>SSTR1</i> en tejidos oculares humanos.....	63
Figura 25: Microscopía confocal que muestra la inmunoreactividad de <i>SSTR2</i> , <i>SSTR3</i> y <i>SSTR4</i> en retina humana.....	64
Figura 26: Microscopía confocal que muestra la inmunoreactividad de <i>SSTR5</i> , <i>GHRH</i> y <i>GHRHR</i> en retina humana.....	65
Figura 27: Curvas de amplificación de tejidos oculares de babuinos para los genes: <i>GH-1</i> , <i>GH-2</i> , <i>CSH-1/CSH-2</i> y <i>GHR</i>	68
Figura 28: Curvas de amplificación de tejidos oculares de babuinos para los genes: <i>Pit-1</i> , <i>GHRH</i> , <i>GHRH</i> , <i>SST</i> y sus receptores (<i>SSTR1-SSTR5</i>).....	69
Figura 29: Microscopía confocal que muestra la inmunoreactividad de GH y GHR en tejidos oculares de babuinos.....	71
Figura 30: Microscopía confocal que muestra la inmunoreactividad de <i>SST</i> , sus receptores (<i>SSTR1-SSTR5</i>), <i>GHRH</i> y <i>GHRHR</i> en tejidos oculares de babuinos.....	72
Figura 31: Cuantificación de las muestras de vítreo de babuinos por el método EZQ.....	76
Figura 32: Resultados de los ensayos de proteómica en vítreo de babuinos.....	77

LISTA DE CUADROS

Cuadro 1: Síntesis extrapituitaria de la GH.....	12
Cuadro 2: Anticuerpos primarios utilizados.....	31
Cuadro 3: Anticuerpos secundarios utilizados.....	32
Cuadro 4: Mezcla de reacción de la RT-PCR.....	40
Cuadro 5: Programa de termociclado para la reacción de RT-PCR.....	40
Cuadro 6: Condiciones de reacción para el ensayo de qPCR.....	41
Cuadro 7: Condiciones de termociclado para el ensayo de qPCR.....	41
Cuadro 8: Biobanco de tejidos oculares humanos provenientes del Hospital Universitario “Dr. José Eleuterio González” (HU) de la UANL.....	50
Cuadro 9: Biobanco de tejidos oculares humanos provenientes del Instituto de Oftalmología Fundación Conde de Valenciana IAP (IOCV)	51
Cuadro 10: Resumen de las cuantificaciones del ARNm por qPCR de los genes del locus <i>GH</i> y <i>GHR</i>	56
Cuadro 11: Resumen de los resultados de las inmunofluorescencias.....	60
Cuadro 12: Resumen de los ensayos de qPCR para <i>Pit-1</i> y otros posibles reguladores.....	62
Cuadro 13: Resumen de los ensayos de inmunofluorescencia para posibles reguladores.....	66
Cuadro 14: Biobanco de tejidos oculares de babuinos.....	67
Cuadro 15: Biobanco de tejidos hipofisarios de babuinos.....	67
Cuadro 16: Resumen de los ensayos de qPCR en babuinos.....	69
Cuadro 17: Resumen de los ensayos de qPCR en babuinos para <i>Pit-1</i> y otros posibles reguladores.....	70
Cuadro 18: Resumen de los ensayos de inmunofluorescencia para tejidos oculares de babuinos.....	75

ABREVIATURAS

aa.- Aminoácidos.

ACN.- acetonitrilo anhidro

ACTB.- beta actina.

ADN.- Ácido desoxirribonucleico.

Akt.-grupo de proteínas con actividad serina/treonina quinasa.

ARN.- Ácido ribonucleico.

ARNdc.- ARN de doble cadena.

ARNm.- ARN mensajero.

ARNss.- ARN de cadena sencilla.

AP-2.- del inglés activated protein 2.

CaCl.- Cloruro de Calcio.

CD79b.- del inglés cluster differentiation 79b.

CSH-1.- del inglés human chorionic somatomammotropin 1 ó CSH-A.

CSH-A.- del inglés human chorionic somatomammotropin A.

CSH-2.- del inglés human chorionic somatomammotropin 2 ó CSH-B.

CSH-B.- del inglés human chorionic somatomammotropin B.

CSH-L.- del inglés human chorionic somatomammotropin L.

°C.- Grados centígrados.

Da.- Daltones.

DAPI.- 4',6-diamidino-2-fenilindol.

DE.- Día embrionario.

DEPC.- Dietilpirocarbonato.

dNTP's.- Desoxinucleótidos trifosfato.

EDTA.- Ácido etilen-diamino-tetracético.

ELISA.- Ensayo Inmunoenzimático.

g.- Gramos.

GDP.-glicoproteína.

GH-1.- del inglés growth hormone 1 (Hormona de crecimiento 1 ó GH-N)

GH-N.- Hormona de crecimiento normal ó pituitaria.

GH-2.- del inglés growth hormone 2 (Hormona de crecimiento 2 ó GH-V)

GH-V.- Hormona de crecimiento variante ó placentaria.

GHR.- del inglés growth hormone receptor.

GHRH.- del inglés growth hormone releasing hormone.

GHRHR.-del inglés growth hormone releasing hormone receptor.

Glut-1.-del inglés glucose transporter 1.

Glut-4.-del inglés glucose transporter 4.

H₂O.- Agua.

HCl.- Ácido Clorhídrico.

HPLC.- del inglés high pressure liquid chromatography.

HS.- Hipersensitive site.

IGF-1.- del inglés insulin growth factor 1.

INL.- del inglés inner nuclear layer.

IPL.- del inglés inner plexiform layer.

IP₃.- Inositol tri-fosfato.

IR.- inmunoreactividad.

IRS-1.-del inglés insulin receptor substrate 1.

JAK-2.- del inglés janus activated kinase.

kDa.- KiloDaltons.

KCl.- Cloruro de Potasio.

K₂HPO₄.- Bifosfato de Potasio.

MAbs.- Anticuerpos monoclonales.

Mg⁺².- Magnesio.

MPM.- Marcador de Peso Molecular.

μL.- Microlitro.

μM.- Micromolar.

μg.- Microgramo.

min.- Minutos.

mL.- Mililitro.

mM.- Milimolar.

mm.- Milímetros.

MgCl₂.- Cloruro de Magnesio.

MNM.- Monos del nuevo mundo.

MVM.- Monos del viejo mundo.

ng.- Nanogramos.

Nt.- Nucleótidos.

NaCl.- Cloruro de Sodio.

NaOH.-Hidróxido de Sodio.

NF-1.- Factor nuclear 1.

NTP.- Nucleotidil trifosfato.

LC/FT-MS/MS.- del inglés liquid chromatography/fourier transform- mass spectrometry/mass spectrometry.

LPL.- Lipoproteín lipasa.

OPL.-del inglés outer plexiform layer.

Pb.- Pares de bases.

PBS.- Solución de Buffer Fosfatos.

PCR.- Reacción en Cadena de la Polimerasa.

Pit-1.- Factor de transcripción pituitario 1.

PSE-A.- Sitio de unión A del elemento P.

PSE-B.- Sitio de unión B del elemento P.

pH.- Potencial de Hidrógeno.

qPCR.-del inglés quantitative polymerase chain reaction.

QNR/D.-línea celular inmortalizada de neuroretina de codorniz.

RFX.- Factor regulador X.

RIPA.-del inglés radioimmunoprecipitation assay buffer.

RGC.- del inglés retinal ganglion cell.

RPE.- del inglés retinal pigmented epithelium cells.

rpm.- Revoluciones por minuto.

RT.- del inglés reverse transcriptase.

s.- Segundos.

SCN4A.- del inglés sodium channel, voltage-gated, type IV, alpha subunit.

SDS.- Duodecyl sulfato de sodio.

Sp-1.-del inglés specific protein 1.

SS.- somatostatina.

SST.- del inglés somatostatin.

SSTR1.- del inglés somatostatin receptor 1.

SSTR2.- del inglés somatostatin receptor 2.

SSTR3.- del inglés somatostatin receptor 3.

SSTR4.- del inglés somatostatin receptor 4.

SSTR5.- del inglés somatostatin receptor 5.

STAT.- del inglés signal transducer and activator of transcription.

Taq.- *Thermophilus aquaticus*.

TCAM.-del inglés testicular cell adhesion molecule 1.

TBE.- Tris-Borato-EDTA.

TBS.- del inglés Tris-Buffer-Saline

TE.- Tris-EDTA.

TEAB.- bicarbonato de trietilamonio.

TTBS.-Tritón-Tris-Buffer-Saline.

USF-1.-del inglés upstream transcription factor.

UV.- Ultravioleta.

V.- Volts.

%.- Por ciento.

RESUMEN

**Universidad Autónoma de Nuevo León
Facultad de Medicina
Departamento de Bioquímica y Medicina Molecular**

M.C. Diana Cristina Pérez Ibane

Candidato al grado de Doctor en Ciencias con orientación en Biología Molecular e Ingeniería Genética

EXPRESIÓN DEL LOCUS GH EN EL OJO DE PRIMATES SUPERIORES

Introducción: La GH es una hormona que regula el crecimiento y el metabolismo en vertebrados. En humanos el locus de la hormona de crecimiento (*GH*) se encuentra en el cromosoma 17, y está conformado por cinco genes: dos de tipo GH (*GH-1* y *GH-2*) y tres de tipo hormona somatomamotropina corónica (*CSH-L*, *CSH-1* y *CSH-2*).

El gen *GH-1* se expresa principalmente en las células somatotrofas de la pituitaria anterior, mientras que el resto de los genes del locus se expresan en el sincitiotrofoblasto de la placenta. Recientemente se ha reportado la expresión de GH en numerosos tejidos extrapituitarios, siendo uno de ellos el ojo, lo que apunta a un rol más complejo de la hormona y a posibles nuevas funciones. Por lo que comprender la biología molecular de esta hormona en el ojo ayudará a dilucidar su función.

Objetivo: Investigar la biología molecular del locus de la GH en el ojo humano y del babuino (*Papio hamadryas*).

Materiales: Se recolectaron muestras de tejidos oculares humanos (152 tejidos frescos y 209 tejidos embebidos en parafina) de pacientes que por indicación médica y/o traumatismos se les retiró el tejido, con su respectiva firma de carta de consentimiento informado. También se recolectaron muestras de tejidos oculares de babuinos (6 ojos completos para extracción de ARN y de proteínas; y 3 ojos completos embebidos en parafina).

Metodología: Los tejidos oculares, tanto de babuinos como de humanos que se almacenaron en RNA later®, se utilizaron para ensayos de tiempo real. Los tejidos almacenados en parafina se usaron para los ensayos de inmunofluorescencia, en donde se analizaron los siguientes genes y proteínas respectivamente: *GH-1*, *GH-2*, *CSH-1*, *CSH-2*, *GHR*, *Pit-1*, *SST*, *SSTR-1*, *SSTR-2*, *SSTR-3*, *SSTR-4*, *SSTR-5*, *GHRH* y *GHRHR*. También se realizaron ensayos de proteómica para analizar en muestras de vítreo de babuino las distintas isoformas o cambios postraduccionales de la GH.

Resultados y Discusión: Del locus *GH* sólo se detectó la expresión del gen *GH-1*, tanto en muestras oculares de humanos como de babuinos. La falta de expresión ocular del resto de los genes del locus en primates es un hallazgo inédito. Este resultado no es una sorpresa, ya que se ha reportado que la mayoría de los tejidos extrapituitarios sólo expresan el gen *GH-1*. El ARNm del gen *GH-1* en el humano no sólo se encontró en retina, como previamente ya se había reportado, sino también se encontró en coroides y trabéculo. En el babuino se encontró en retina-coroides. Por medio de ensayos de inmunofluorescencia la *GH-1*, se encontró en células ganglionares de retina y en las demás estirpes celulares de este tejido tanto en humanos como en babuinos. Estos hallazgos apuntan a que la GH pudiera tener otras funciones además de la función neuroprotectora propuesta para las células RGC. Tanto el ARNm como la proteína de *GHR* se encontraron en córnea, coroides y retina de humanos y babuinos. Un descubrimiento importante es la identificación de *GHR* en las células basales del epitelio

corneal. Por lo que nosotros proponemos que probablemente la GH participe como un factor de proliferación celular en córnea. Al encontrarse co-expresión de GHR y de GH-1 se postula acción autocrina, y al encontrarse en ciertos tejidos oculares sólo la expresión de GHR también se postula acción paracrina.

Ninguno de los tejidos oculares expresó Pit-1, por lo que la regulación de la expresión de la GH ocular es independiente de Pit-1.

Tanto el ARNm y las proteínas de SST, sus receptores (SSTR1-SSTR5), GHRH y su receptor GHRHR, se localizaron principalmente en retina y coroides de humanos y babuinos. En base a lo anterior se propone que estos dos neurotransmisores podrían estar involucrados en la regulación de la GH ocular en primates.

Por medio de ensayos de proteómica LC/FT-MS/MS en muestras de vítreos de babuinos se encontró solo la presencia de la GH-1 de 22 kD. Por lo que se descarta en este primate la presencia de isoformas y/o otros miembros del locus *GH*.

Conclusión: De los cinco genes que componen el locus de la *GH* humana, sólo se detectó la expresión de *GH-1* en los distintos tejidos oculares. La GH no sólo se encontró en retina en células ganglionares sino también en las demás estirpes celulares de este tejido, tanto en humanos como en babuinos. Lo anterior apunta a que la GH puede tener otras funciones además de la función neuroprotectora en células ganglionares. En primates, la *GH* probablemente actúa de manera autocrina y paracrina, al estar presente su receptor en varios de los tejidos de este órgano. La expresión del gen de la *GH-1* en el ojo parece ser independiente del factor transcripcional hipofisiario Pit-1. De entre los posibles candidatos a regularle están los neurotransmisores GHRH y SST. Aunque aún falta mucho por entender sobre el papel de la GH en el ojo, dados los hallazgos, se postula para ésta una función neuroprotectora en retina, mientras que en el caso de córnea posiblemente se trate de regeneración celular.

1. INTRODUCCIÓN

1.1 Estructura del locus GH humano.

El locus de la hormona de crecimiento en humanos (*GH*, del inglés *growth hormone*) se encuentra en el cromosoma 17 en la banda q22.4¹. Abarca aproximadamente 50 mil pares de bases (kpb) y está constituido por cinco unidades transcripcionales: dos de tipo *GH* (*GH-N* de normal y *GH-V* de variante) y tres de tipo hormona somatomatotropina coriónica (*CSH-L*, *CSH-1* y *CSH-2*)². Por su extremo 5', el locus inicia con el gen *GH-N*, cuya expresión es específica de los somatotrofos de la glándula pituitaria anterior. Los restantes cuatro genes se expresan en el sincitiotrofoblasto de la placenta. *CSH-1* y *CSH-2* codifican para una hormona madura idéntica^{3, 4} y *CSH-L* es considerado un pseudogén (debido a la mutación puntual G→A que posee al inicio de su segundo intrón y que interfiere con la remoción del mismo) y *GH-V* codifica para una hormona similar a la GH hipofisaria, que se cree reemplaza durante el embarazo⁵. El locus se encuentra flanqueado en su extremo 5' por el gen *CD79b*, específico de linfocitos B⁶, mientras que en su extremo 3' lo hace por el gen *TCAM*, expresado en testículo⁷. Las unidades transcripcionales de los genes del locus no ocupan más de 2 kpb cada una y están separadas por cuatro regiones intergénicas: dos de 13 kpb, una de 6.5 kpb y una de 6 kpb⁸ (Figura 1).

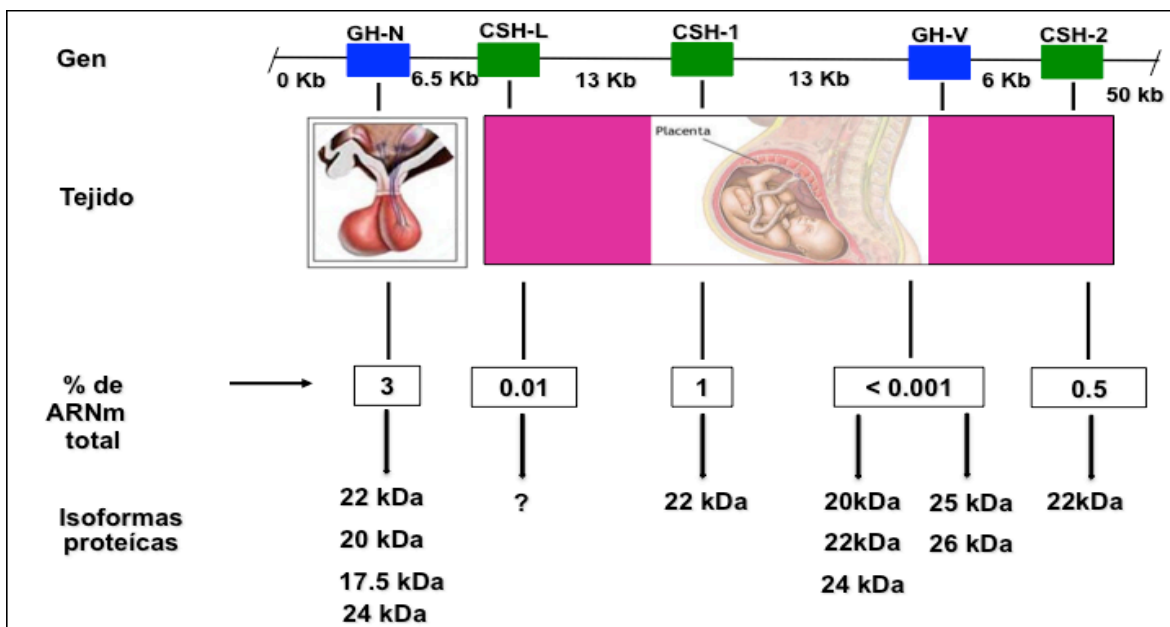


Figura 1: El locus *GH* humano. Se muestra la estructura del locus, los tejidos donde se expresa, los niveles de ARNm y las isoformas proteicas emanadas de los genes miembros de la familia multigénica *GH* (Pérez-Ibave *et al*, 2014⁹). Entre paréntesis se precisa la longitud de las regiones intergénicas.

1.2 Estructura del gen *GH-N* humano.

El gen *GH-N* ó *GH-1* en el humano tiene 1.65 Kpb de longitud, como el resto de los genes del locus. En vertebrados superiores, este gen está conformado por cinco exones (1-5) y cuatro intrones (A-D), siendo la longitud de los exones de 65 pb para el primero, 160 pb para el segundo, 120 pb para el tercero, 160 pb para el cuarto y 300 pb para el quinto. Por su parte, los intrones cuentan con longitudes aproximadas de 260 pb para el intrón A, 240 pb para el intrón B, 90 pb para el intrón C y 250 pb para el intrón D (Figura 2). Los bordes 5' y 3' de los intrones están conservados de acuerdo a la regla de Chambón (AG...GT). Además, el primer exón incluye 55 pb de región 5' no traducible¹⁰.

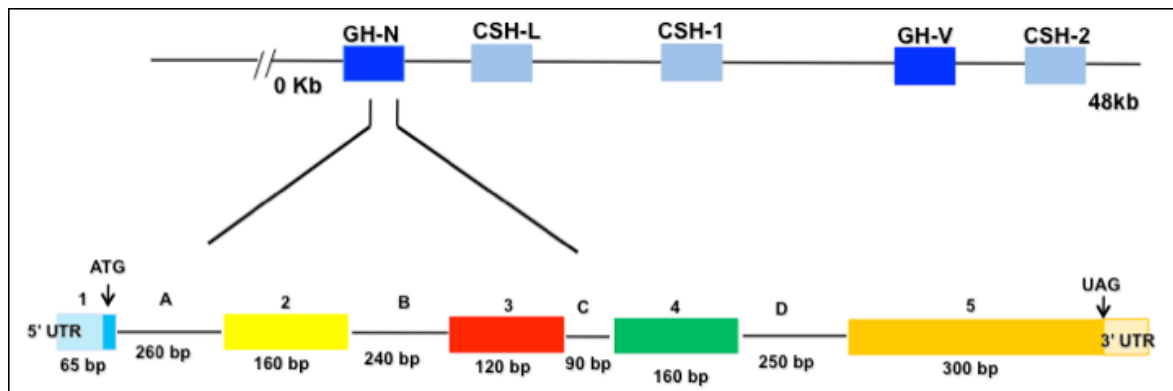


Figura 2: El gen de la *GH* en humanos. Se muestra la estructura del gen *GH-1* ó *GH-N*. El cual está compuesto por: dos regiones UTR 5' y 3' no traducibles, cinco exones, los cuales se muestran con números y cuatro intrones, los cuales se muestran con letras.

1.3 Isoformas de los genes *GH-N* y *GH-V* en el humano.

El ARNm del gen *GH-N* de tamaño completo, conformado por el *splicing* de los cinco exones, se traduce en una proteína de 22 kDa (191 residuos aminoácidos o aa). Un *splicing* alternativo da como resultado varias isoformas de la GH. Una delección de 45 pb del extremo 5' del exón 3 presente en el ARNm en pituitaria, da como resultado una proteína de 20 kDa (176 aa), la cual carece de los residuos aminoácidos (aa) 32 al 46¹⁰ y representa el 10% de la GH total de la pituitaria⁴. Otra isoforma que ha sido descrita para la *GH-1* en la glándula pituitaria es la de 17.5 kDa, la cual carece de 40 aa (32-71) codificados por el exón 3, pero ésta sólo se presenta bajo condiciones patológicas, cuando el gen *GH-1* está mutado (deficiencia genética de GH tipo II)¹¹ (Figura 3).

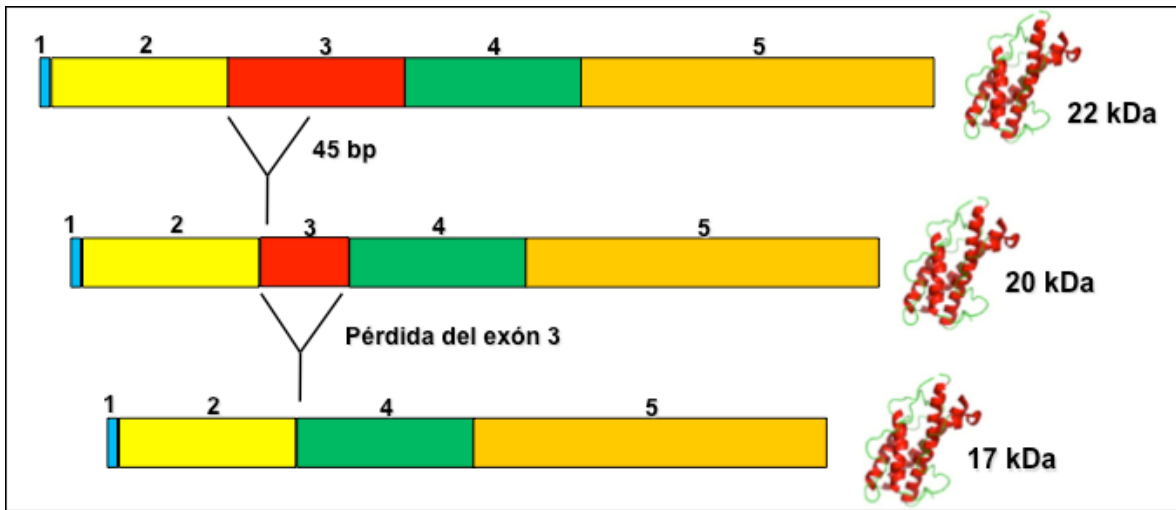


Figura 3: Isoformas por splicing alternativo del transcrito primario del gen *GH-N* (*GH-1*). Se muestran las estructuras de los ARNm (exones en colores) que codifican para las proteínas GH-1 de 22 kDa, 20 kDa y 17 kDa.

Las modificaciones pos-traduccionales de la GH de 22 kDa constan de una acetilación y dos desaminaciones en las posiciones Asp137 y Glu152¹².

En la placenta humana se han descrito dos isoformas de la GH-V: una de 191 aa y otra de 230 aa. Esta última es producto de la traducción de una variante del ARNm del gen *GH-V* que retiene el intrón D. Su traducción origina un polipéptido con un peso molecular de 26 kDa, cuya principal diferencia, con respecto a la GH-V de 22 kDa, reside en la región carboxilo terminal. Se presume que la GH-V2 es una proteína de membrana¹³. Otra isoforma que se ha detectado en placenta posee la misma secuencia aminoacídica o estructura primaria de la isoforma de 22 kDa y una glicosilación en la asparagina 140, que resulta en una isoforma de 25 kDa¹⁴.

En testículo y placenta se ha encontrado otra isoforma: la GH-V Δ 4 o GH-V3. Esta resulta de un transcrito que carece de 4 pb (GTGG) en el extremo 5' del intrón D, lo que da como resultado un segundo sitio donador del *splicing*, localizado hacía el interior de este intrón. El ARNm resultante origina una proteína de 24 kDa (210 aa)^{13,15}. Otro de los transcritos encontrados en placenta posee la delección de 45 pb en el extremo del exón 3, que experimenta el transcrito primario del gen *GH-N*, lo cual rinde para una isoforma de 20 kDa¹⁵ (Figura 4).

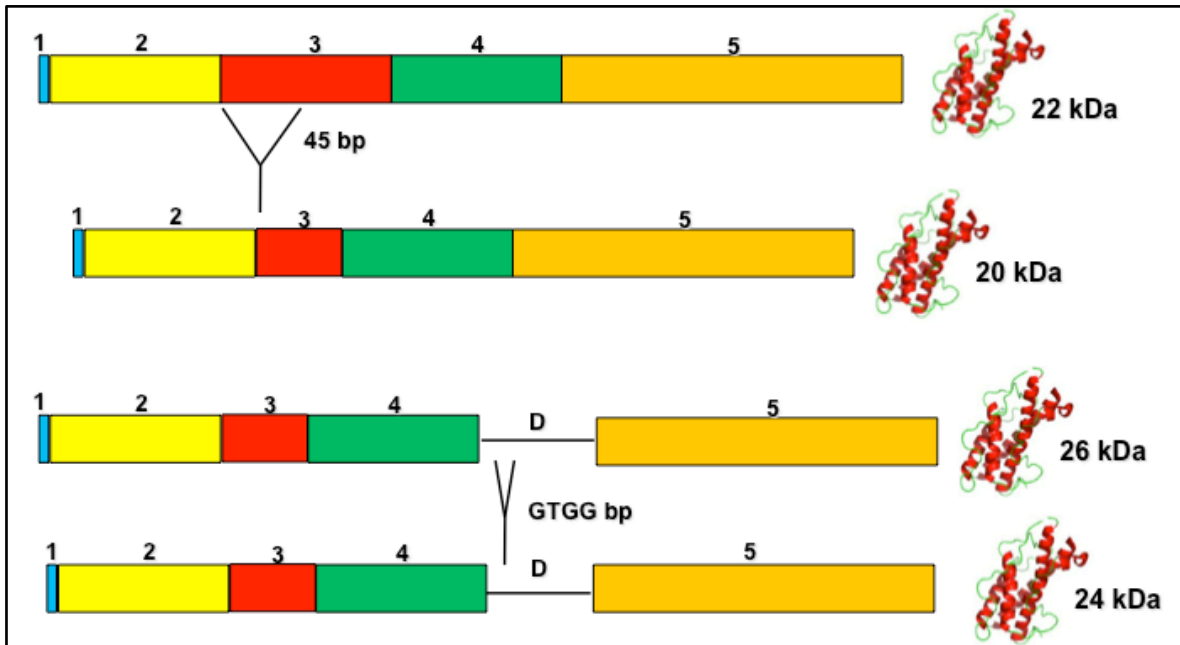


Figura 4: Isoformas por splicing alternativo del transcrito primario del gen *GH-V* (*GH-2*). Se muestran las estructuras de los ARNs que codifican para las proteínas *GH-2* de 22 kDa, 20 kDa, 26 kDa y 24 kDa.

1.4 Regulación de la expresión de los genes del locus *GH* en el humano.

La regulación de la expresión del locus *GH* está dada por múltiples mecanismos complejos que participan en conjunto. A saber: descondensación de la cromatina, acción de factores de transcripción, influencia neuroendocrina hipotalámica y represión específica de tejido, entre otros¹⁴.

1.4.1 Descondensación de la cromatina

La región control de locus [del inglés: *locus control region* (LCR)] es una región de DNA remota que controla la expresión del locus *GH* y que se caracteriza por tener múltiples sitios sensibles a la DNasa I (HS, hypersensitive sites). Estos son indicativos de cambios en el grado de compactación de la cromatina que propician la expresión génica. Se han detectado cinco regiones con sitios hipersensibles localizadas de 14 a 32 kb río arriba del gen *GH-N*. Las regiones HS I y HS II son específicas de pituitaria y están a 14.6 kb río arriba del gen *GH-N* (flanqueando al gen *CD79b*). Las regiones HS III, IV y V se localizan de 28 a 32 kb río arriba del gen *GH-N* (traslapándose en el gen *SCN4A*, un canal de sodio específico del músculo esquelético), de los cuales la región HS IV es exclusiva de regulación de placenta; mientras que las regiones HS III y V se observan tanto en

pituitaria, como en placenta. La región HS I-II contiene tres sitios de unión para el factor transcripcional Pit-1, el cual actúa como un activador del gen *GH-N*¹⁴.

Otra de las regiones a las que se une Pit-1 es la región del promotor adyacente al gen *GH-N*, en la cual existen dos sitios de unión: uno referido como proximal (-92 a -65 nt) y el otro como distal (-130 a -105 nt)¹⁵ (Figura 5).

Se ha demostrado que hiperacetilaciones en las histonas H3 y H4 de las regiones HSI-II y del promotor, modifican la cromatina permitiendo el acceso a Pit-1. Ensayos de transfección han demostrado que la región promotora no es suficiente para la expresión eficiente del gen *GH-N*, sino que también se requieren las regiones HSI-II. Estudios adicionales han demostrado que la distribución de la ARN polimerasa II, coincide con la trimetilación de la histona H3 en su cuarta lisina, así como también con otras modificaciones covalentes asociadas con una cromatina activa, sugiriendo que el acceso y actividad del promotor del gen *GH-N* dependen de diversos mecanismos independientes, tales como la hiperacetilación en HSI/II, la unión de Pit-1, la atracción de secuencias TATA en el reclutamiento de la ARN polimerasa II y la trimetilación de histonas, lo que permite un eficiente uso del promotor¹⁴.

1.4.2 Regulación tejido específica

A 2 kpb río arriba de los genes de expresión placentaria del locus se encuentra una copia de un elemento referido como P, el cual corresponde a una región altamente conservada de 263 pb¹, a la cual se unen en la hipófisis ciertos factores de transcripción o proteínas, mismas que luego interfieren con la unión de Pit-1 a los promotores de dichos genes (*CHS-A*, *CSH-B* y *GH-V*), impidiendo su expresión en esta glándula^{14, 16}. El elemento P contiene dos dominios: PSE-A y PSE-B. El primero interacciona con factores de transcripción miembros de la familia del factor regulador X (RFX), mientras que el segundo lo hace con el factor Nuclear-1 (NF-1)^{16, 17, 18, 19}.

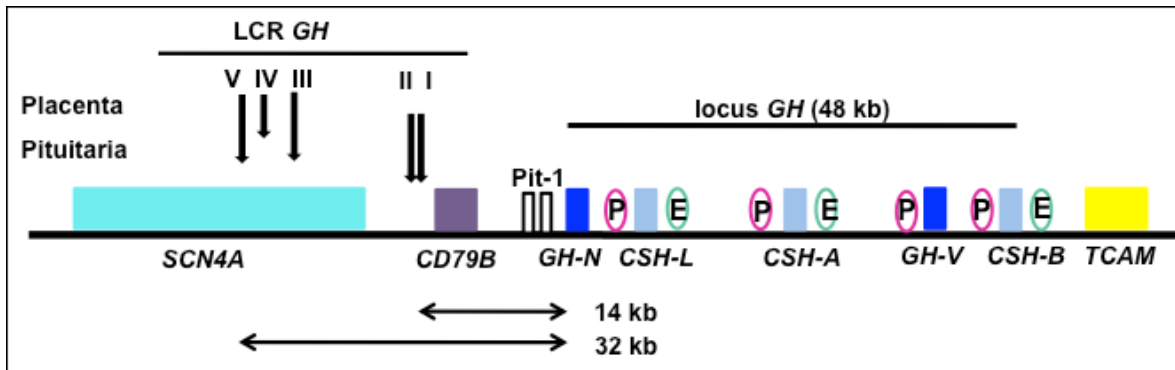


Figura 5: Regulación de expresión de los genes del locus *GH* humano. Esquema del locus *GH* y de los genes flanqueantes. En un círculo rosado se muestran los elementos P localizados antes de los genes placentarios y en un círculo verde el enhancer (E o potenciador) después de los genes *CSH*. En números romanos se representan los sitios hipersensibles a DNAsas¹⁷.

1.4.3 Regulación transcripcional

La región promotora del gen *GH-N* contiene una caja TATA y sitios de unión río arriba que sirven de unión para factores de transcripción²⁰. Pit-1 se une a la región del promotor adyacente al gen *GH-N* de expresión hipofisiaria, en la cual existen dos sitios: uno referido como proximal (-92 a -65 nt) y el otro como distal (-130 a -105 nt)¹⁵. Hay otros factores de transcripción que se cree regulan la expresión basal del gen *GH-N*, como: Sp-1 (que se une en la región -140 a -116 nt)²¹, USF-1 (unidos a la región -266 a -253 nt), NF-1 (que se une en la región -290 a -268 nt)²² y AP-2 (unidos en la región -290 a -263), los cuales pueden tener poco impacto en el control de la transcripción del gen *GH-N*²³.

1.4.4 Regulación neuroendocrina de la secreción de GH

La secreción de la hormona está regulada bajo el control dual hipotalámico ejercido por GHRH (del inglés *growth hormone releasing hormone*) y SS (somatostatina). Cada episodio de secreción de GH está dado por una liberación del neuropéptido GHRH al sistema portal hipotalámico-hipofisiario. Se trata de un sistema de doble capilarización, donde a nivel de las células neurosecretoras hipotalámicas se encuentra la primera capilarización. A esta última se vierten las hormonas del hipotálamo, que viajan hacia la adenohipófisis, o lóbulo anterior, donde se produce la segunda capilarización permitiendo a dichas hormonas alcanzar las células glandulares, ya sea estimulando o inhibiendo su secreción y precedido por una disminución de SS. Este mecanismo trabaja en conjunto

con una serie de factores como: neurotransmisores, otras hormonas y metabolitos intermediarios (aminoácidos, glucosa y ácidos grasos libres).

GHRH es un péptido que pertenece a la familia glucagón-secretina de aproximadamente 44 aa (aminoácidos). Las neuronas que la producen se encuentran localizadas en el núcleo arqueado del hipotálamo, sus proyecciones axonales alcanzan la eminencia media y liberan el péptido al sistema portal hipotalámico-hipofisiario. En la pituitaria, la GHRH se une a su receptor el GHRHR (del inglés *growth hormone releasing hormone receptor*) de los somatotrofos, donde promueven la liberación y la síntesis de GH; así como el crecimiento, proliferación y diferenciación de estas células.

La SS es un péptido de 28 aa, el cual se produce en las neuronas localizadas en el núcleo anterior periventricular. Las proyecciones de estas neuronas alcanzan la eminencia media y liberan el péptido al sistema portal hipotalámico-hipofisiario. La principal función de la SS es antagonizar la función de GHRH.

La liberación de GHRH y SS está regulada principalmente por neurotransmisores, destacando los α_2 -adrenérgicos (dopamina, adrenalina, noradrenalina, etc.) que inhiben la liberación de SS y por lo tanto promueven la expresión y liberación de GH. Por su parte, los glucocorticoides estimulan la transcripción de GH y aumentan el número de receptores GHRH. La falta de hormonas tiroideas afecta la síntesis hipotalámica de GHRH. Mientras que debido a todo esto, se puede observar que la regulación en la expresión y liberación de GH no es un sólo mecanismo, sino un conjunto de vías que regulan y coordinan este proceso^{24, 25}.

1.4.5 Mecanismos de acción molecular de la GH

Una vez liberada al torrente sanguíneo, la GH llega a su receptor: GHR (del inglés *growth hormone receptor*). Éste es miembro de la superfamilia de los receptores tipo citoquinas/hematopoyetina y está compuesto por dos subunidades. Cada subunidad es de aproximadamente 70 kDa, que tras la unión GH-GHR, resultan en una dimerización, causando la activación de la tirosin-quinasa JAK2 (del inglés Janus activated kinase 2). Esta enzima está asociada al receptor de manera citoplasmática y promueve la fosforilación del receptor y de JAK2. A continuación, un sin número de otras proteínas son fosforiladas en sus residuos de tirosina. Las primeras proteínas fosforiladas de la cascada de señalización son las MAP cinasas (MAPK), que poseen un rol crítico en la regulación del crecimiento y diferenciación. También se induce la vía Akt, la cual promueve la supervivencia celular, entre otros procesos.

La GH aumenta el transporte de glucosa a consecuencia del reclutamiento de Glut1 y Glut4, los cuales transportan la glucosa del plasma a la célula. La GH estimula la fosforilación en residuos de tirosina del receptor de insulina IRS-1, lo que crea múltiples sitios de unión para proteínas con dominios SH2, incluyendo la subunidad de 85 kDa de la proteína-quinasa PI3K (fosfatidilinositol 3-quinasa). Esta última ha sido implicada en el transporte de glucosa, la síntesis de DNA y la actividad de la enzima $p70^{\text{rsk}}$, que interviene en la regulación del ciclo celular.

La GH induce pequeñas cantidades de diacilglicerol (DAG) que es conocido por ser un activador de la proteína-quinasa C (PKC, del inglés *protein kinase C*). La producción de este segundo mensajero tiene su origen en la ruptura del fosfatidilinositol, por medio de la fosfolipasa C. Su acción abarca la inducción de la lipogénesis, de la expresión de *c-fos*, de la unión de una proteína nuclear al oligonucleótido C/EBP y del incremento en el calcio intracelular.

Otra de las cascadas de señalización activadas por GH, es la activación de los factores de transcripción STAT. Estos son factores citoplasmáticos que se traslocan al núcleo, donde se unen al DNA y activan la expresión de varios genes. Dentro de los genes activados de expresión temprana, están *c-fos* y *c-jun*, que codifican factores de transcripción implicados en diferenciación y crecimiento celular. La GH también induce la expresión del gen *c-myc*, que codifica para un factor de transcripción involucrado en proliferación celular.

Dentro de las proteínas cuyos genes son inducidos por GH y que se sabe participan en la diferenciación adipogénica están: glicerol fosfato deshidrogenasa (GDP), la enzima lipogénica aP2, la proteína de unión a lípidos y la lipoproteína lipasa (LPL). De Fos se sabe que participa en la regulación de aP2 y LPL.

En el hígado, la GH regula la expresión del gen IGF-1 (del inglés *insulin-like growth factor*), que es un mediador sérico de las acciones de aquella. Sin embargo, estudios recientes indican que otros tejidos también expresan IGF-1, en respuesta a GH, como los condrocitos y los adipocitos. IGF-1 se ha visto que regula varias funciones como: neurogénesis, crecimiento, supervivencia celular, formación de mielina, sinaptogénesis, neuroprotección y síntesis de proteínas, entre otras.

Como se puede inferir por todo lo anteriormente descrito, la GH participa y regula un gran número de procesos celulares y metabólicos en el humano (Figura 6)^{26, 27}.

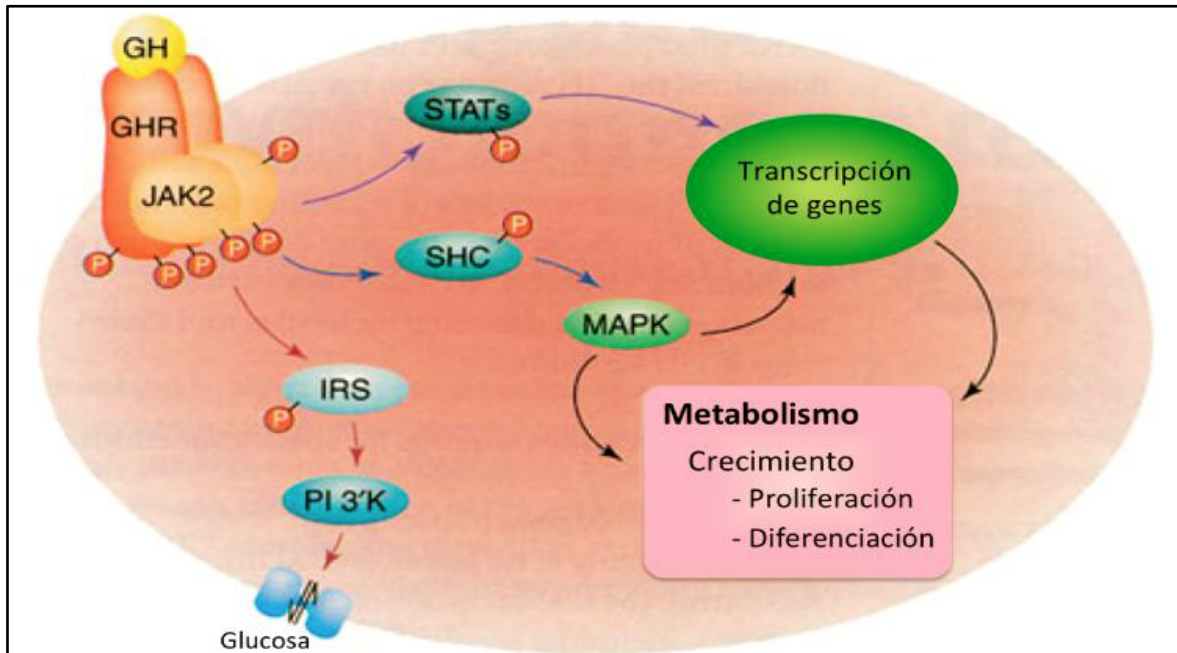


Figura 6: Vías de señalización de la GH: JAK2 fosforila: 1) a varios miembros de la familia de factores de transcripción STAT (flechas púrpuras) y 2) a las proteínas SHC, activando así la vía MAPK (flechas azules). JAK2 también fosforila a proteínas IRS, activando de este modo a la PI3 quinasa (flechas rojas), que posee un papel fundamental en el transporte de glucosa. Abreviaturas: GH, hormona de crecimiento; GHR, receptor de la hormona de crecimiento; IRS, sustratos del receptor de la insulina; JAK2, Janus quinasa 2; MAPK, proteína quinasa activada por mitógenos; P, fosfato; PI3K, fosfoinositol 3-cinasa; STAT, transductores de señal y activadores de la transcripción²⁷

1.4.6 Función de las hormonas del locus GH

La principal función de la GH hipofisiaria, la GH-N, es promover el crecimiento lineal posnatal y regular diversas actividades metabólicas, como la homeostasis de la glucosa, la síntesis proteica en el tejido muscular, la lipólisis en el tejido adiposo, la reparación tisular y la regeneración ósea⁸⁸. Recientemente se le han atribuido nuevas funciones como la neuroprotección, neurogénesis y espermatogénesis, entre otras⁹.

La GH-V se asocia con crecimiento intrauterino, un incremento del peso al nacer y con un aumento en los niveles séricos del IGF-1 en la madre^{89,90}.

La CSH por su parte, participa en la regulación del metabolismo materno durante el embarazo a favor del desarrollo del feto, lo que comprende, la inhibición de la síntesis de glucógeno, de la lipogénesis, de la glucólisis y del ingreso de glucosa a las células; además de la activación de la glucogenólisis, de la proteólisis en el músculo y de

la gluconeogénesis. Estas acciones tienen como propósito precisamente aumentar la concentración plasmática de nutrientes y energía para el feto^{90,91}.

1.4.7 Evolución de la GH en los primates

La evolución de la GH en los primates es única por su dramática evolución en los primates. En la mayoría de los mamíferos, incluyendo los prosimios, el locus de la GH es unigénico. Sin embargo en primates superiores una serie de duplicaciones génicas seguidas de eventos de divergencia evolutiva condujeron a un aumento en el número de genes GH lo que dió origen a locus multigénicos complejos^{73, 74}. Estos eventos de duplicación génica ocurrieron antes de la separación entre MNM (monos del nuevo mundo) y MVM (monos del viejo mundo)^{74, 75}; lo que conllevó no solo a la formación de un locus GH multigénico, sino a la generación de nuevos genes con función y expresión tejido específica, dando origen a las CSHs, las cuales tienen como tejido de expresión el sincitiotrofoblasto de la placenta⁷⁵. Estas hormonas asumen un segundo rol como reguladores metabólicos al interactuar con los receptores lactogénicos, dejando la función de promover el crecimiento a su contraparte (GH-N) de la pituitaria⁷⁵.

2. ANTECEDENTES

2.1 GH en otros tejidos

Tradicionalmente, la GH se ha visto como un factor endócrino, producido por las células somatotrofas de la pituitaria y liberado a la circulación sistémica, donde actúa en los diferentes órganos blancos²⁸. Sin embargo este concepto está cambiando, ya que existen múltiples reportes de la síntesis de la GH en numerosos tejidos extrapituitarios^{9, 29}.

En años recientes se ha demostrado que la GH se produce en los sistemas: inmune, nervioso, respiratorio, digestivo, tegumentario y reproductivo. En este último se ha visto que el resto de los genes del locus GH también se coexpresan (Cuadro 1)⁹. Estos hallazgos apuntan a un rol más complejo de la hormona y a posibles nuevas funciones²⁹. Esta posibilidad está respaldada por el reciente descubrimiento de la hormona en el ojo de vertebrados, donde se ha propuesto que se desempeña como un factor neuroprotector²⁸.

Cuadro 1: Síntesis extrapituitaria de la GH⁹

Molécula (s)	Órgano o Sistema	Referencia
ARNm de GH	Piel	[35], [36].
	Sistema Inmune	[37].
	Testículo	[38].
	Ovario	[39].
	Útero	[40].
	Glándula mamaria	[41].
Proteína GH	Hueso	[42].
	Músculo	[43].
	Sistema Inmune	[44], [45], [46].
	Cerebro	[43].
	Ojo	[47], [48].
	Testículo	[38].
	Ovario	[39].
	Glándula salival	[49].
	Páncreas	[46], [49]
	Hígado	[43].
	Riñón	[43].
	Colón	[43], [49].
	Estómago	[43].
	Pulmón	[43].
	Corazón	[49].
ARNm de GH y proteína de GH	Sistema inmune	[45], [46], [47], [37].
	Testículo	[38].
	Ovario	[39].

2.2 Anatomía del ojo humano.

El ojo es un órgano de forma esférica (mide 2.5 cm de diámetro) que detecta la luz y es la base del sentido de la vista. Su función consiste básicamente en transformar la energía lumínica en señales eléctricas que son enviadas al cerebro a través del nervio óptico hasta la región posterior del cerebro, el cual interpreta las señales mediante un complejo mecanismo en el que intervienen millones de neuronas. Su funcionamiento es prácticamente igual en todos los vertebrados y este órgano a su vez está dividido en varios tejidos⁹³ (Figura 7).

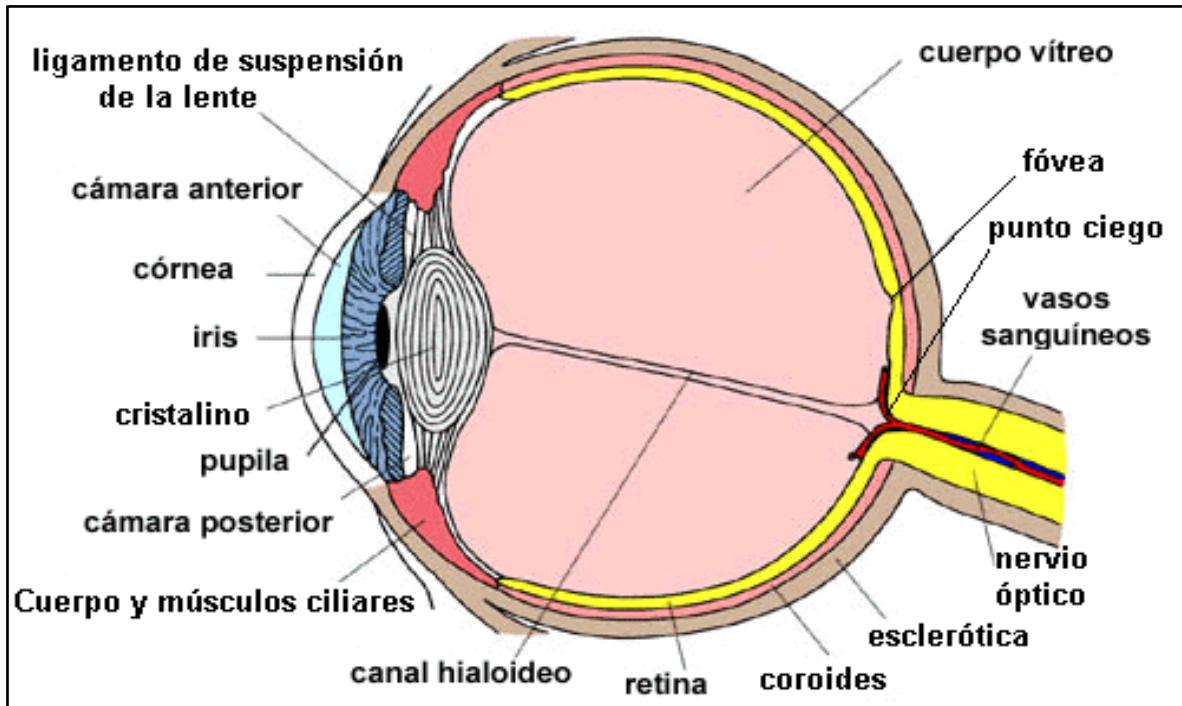


Figura 7: Vista lateral del globo ocular humano, donde se muestran los distintos tejidos que componen el ojo.

- **Conjuntiva:** Membrana mucosa y transparente que tapiza el globo ocular desde el limbo hasta los fondos de saco conjuntivales. Ayuda a lubricar el globo ocular, produciendo mucosidad y lágrimas, aunque éstas en una cantidad menor que las glándulas lagrimales. Debido a su exposición a agentes externos es especialmente susceptible a traumas, infecciones y reacciones alérgicas, pudiendo inflamarse y dar lugar a la conjuntivitis.
- **Córnea:** Es una estructura hemisférica (cónica) transparente localizada al frente

del órgano ocular, y que permite el paso de la luz a las porciones interiores y que protege al iris y cristalino. Es uno de los pocos tejidos del cuerpo que no posee irrigación sanguínea alguna, pero sí está inervado, ya que es la porción anatómica del cuerpo humano que posee más terminaciones nerviosas sensoriales. Se nutre de la lágrima y del humor acuoso. Otra característica de la córnea es la reparación corneal, que le permite a la córnea regenerarse en caso de una leve lesión.

- **Humor acuoso:** Líquido claro que fluye por la cámara anterior (entre la córnea y el iris) y la cámara posterior (entre el iris y el cristalino). El humor acuoso es secretado activamente en los procesos ciliares hacia la cámara posterior, pasa por la pupila hasta la cámara anterior y abandona el ojo por el canal de Schlemm, ubicado en el ángulo camerular (iridocorneal). Su producción es constante siendo un aporte importante de nutrientes y oxígeno para la córnea. También tiene la función de mantener su presión constante, lo que ayuda a conservar la convexidad original de la córnea.
- **Iris:** Es la membrana coloreada y circular del ojo que separa la cámara anterior de la cámara posterior. Posee una apertura central de tamaño variable que comunica las dos cámaras: conocida como pupila. Su función principal es permitir a la pupila dilatarse o contraerse con el objetivo de regular la cantidad de luz que llega a la retina.
- **Cristalino:** Lente biconvexa que está situada tras el iris y delante del humor vítreo. Su propósito principal consiste en permitir enfocar objetos situados a diferentes distancias. Este objetivo se consigue mediante un aumento de su curvatura y de su espesor, proceso que se denomina acomodación. El cristalino se caracteriza por su alta concentración en proteínas, que le confieren un índice de refracción más elevado que los fluidos que lo rodean. Este hecho es el que le otorga su capacidad para refractar la luz, ayudando a la córnea a formar las imágenes sobre la retina.
- **Cuerpo ciliar:** Es una parte del ojo situada entre el iris y la región de la ora serrata en la retina. Es el responsable de la producción del humor acuoso y del cambio de forma del cristalino necesario para lograr la correcta acomodación (enfoque). Está formado por dos estructuras, el músculo ciliar y los procesos ciliares.
- **Tendón y músculo ocular:** Los músculos oculares extrínsecos son músculos que se insertan en el exterior del globo ocular y en los huesos de la órbita. Tienen la

función principal de mover el globo ocular en la dirección deseada y de manera voluntaria. Son los músculos rectos superior, interno u externo y los músculos oblicuos mayor y menor.

- **Esclerótica:** Es la "parte blanca del ojo". Es una membrana de color blanco, gruesa, resistente y rica en fibras de colágeno. Constituye la capa más externa del globo ocular. Su función es la de darle forma y proteger a los elementos más internos. Cubre aproximadamente las cuatro quintas partes del ojo. Por detrás es perforada por el nervio óptico y por delante se adapta a la córnea a través de un punto que se conoce como membrana esclerocorneal. Cubre a la coroides y a su vez está cubierta por la conjuntiva ocular en su parte anterior.
- **Coroides:** Se le llama coroides o úvea posterior a una membrana profusamente irrigada con vasos sanguíneos y tejido conectivo, de coloración oscura que se encuentra entre la retina y la esclerótica del ojo. La parte más posterior está perforada por el nervio óptico y continuándose por delante con la zona ciliar. La función de la coroides es mantener la temperatura constante y nutrir a algunas estructuras del globo ocular.
- **Retina:** Es la capa más interna de las tres capas del globo ocular y es el tejido fotorreceptor sensible a la luz que se encuentra en la parte posterior interna del ojo y actúa como la película en una cámara: las imágenes pasan a través del cristalino del ojo y son enfocadas en la retina. La retina convierte luego estas imágenes en señales eléctricas y las envía a través del nervio óptico al cerebro. La retina normalmente es de color rojo debido a su abundante suministro de sangre.
- **Nervio óptico:** Compuesto por axones de las células fotorreceptoras situadas en la retina, capaces de convertir la luz en impulsos nerviosos. Transmite la información visual desde la retina hasta el cerebro para realizar funciones de reconocimiento de imágenes o patrones.
- **Humor vítreo:** Líquido gelatinoso y transparente que rellena el espacio comprendido entre la retina y el cristalino, más denso que el humor acuoso, el cual se encuentra en el espacio existente entre el cristalino y la córnea. Está compuesto en un 99.98% por agua (el resto consiste en cantidades menores de cloro, sodio, glucosa y potasio). La cantidad de proteínas del humor vítreo es aproximadamente una centésima parte de la cantidad de la sangre. El humor vítreo provee los elementos necesarios para el metabolismo de los tejidos vasculares como la córnea y el cristalino^{93, 94}.

2.3 Anatomía de la retina humana.

La retina tiene una estructura compleja, estando formada básicamente por varias capas de neuronas interconectadas mediante sinapsis. Las capas de la retina son diez y están ubicadas en forma paralela desde la parte más externa de la copa óptica hacia el interior y unidas a la coroides⁹³ (Figura 8). Estas son:

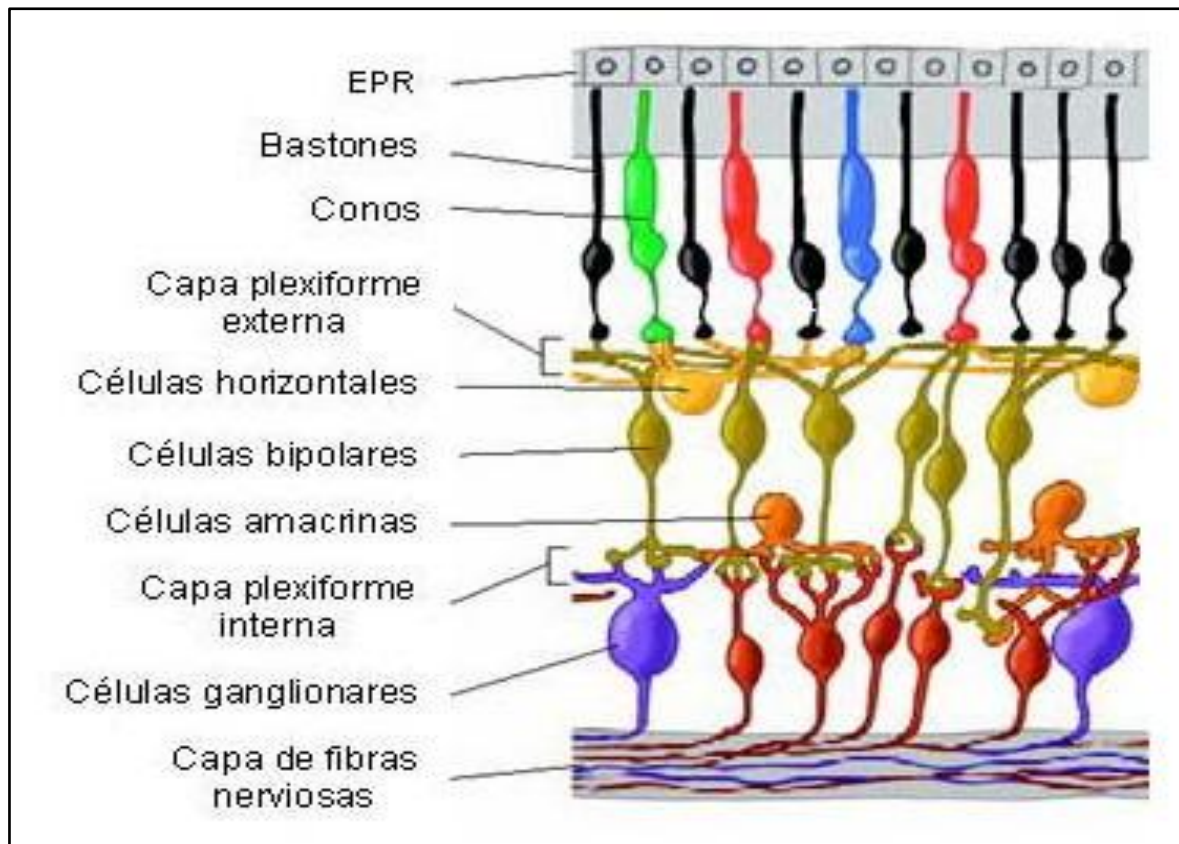


Figura 8: Anatomía de la retina humana. Se muestran cada una de las estirpes celulares que la conforman.

- **Epitelio pigmentario:** Es la capa más externa de la retina. Está formada por células cúbicas que no son neuronas y poseen gránulos de melanina que le dan una pigmentación característica.
- **Capa de las células fotorreceptoras:** Está formada por los segmentos más externos de los conos y los bastones.

- **Membrana limitante externa:** En realidad no es una membrana sino uniones intercelulares del tipo zónula adherente entre las células fotorreceptoras y las células de Müller.
- **Capa nuclear o granular externa:** Está formada por los núcleos celulares de las células fotorreceptoras.
- **Capa plexiforme externa:** Es la región de conexión sináptica entre células fotorreceptoras, bipolares y horizontales.
- **Capa nuclear o granular interna:** Está formada por los núcleos celulares de las células bipolares y por los núcleos de las células horizontales y amacrinas.
- **Capa plexiforme interna:** Es la región de la conexión sináptica entre células bipolares, amacrinas y ganglionares.
- **Capa de las células ganglionares:** Formada por los núcleos de células ganglionares.
- **Capa de fibras del nervio óptico:** Está formada por los axones de células ganglionares que forman el nervio óptico.
- **Membrana limitante interna:** Tampoco es una membrana, sino la lámina basal que separa las células de Müller.

2.4 Expresión ocular de la GH.

2.4.1 GH ocular en peces

La retina de teleosteos es un sitio blanco para la acción de GH. Se ha reportado que la GH recombinante estimula la actividad mitótica de las células progenitoras de la zona germinal de la retina y de las células fotorreceptoras^{51, 52}. Estos autores también observaron que la GH induce la expresión de IGF-1, la que a su vez estimula la neurogénesis en la retina de estos peces⁵¹.

2.4.2 GH ocular en anfibios

Wainwright *et al.*,⁵³ observaron que al realizar hipofisectomía en ranas se producía un arresto en la proliferación celular en el epitelio del cristalino, el cual se revertía al administrar de manera exógena GH recombinante. Éste efecto no se observa en ratas⁵⁴. Se ha postulado que esto puede reflejar diferencias no solo entre especies, sino también en la permeabilidad de la barrera retino-hemática⁵².

2.4.3 GH ocular en aves

En pollos se ha observado una inmunoreactividad a GH a partir del día embrionario (DE) 7 en los siguientes tejidos oculares: retina, epitelio pigmentario, coroides, esclera, córnea, epitelio del cristalino y vitreo^{54, 55, 56, 57}, mostrando una mayor inmunoreactividad en células ganglionares (RGC del inglés *retinal ganglion cells*)⁵⁸; en ésta la señal se observa tanto a nivel citoplasmática como a nivel nuclear^{58, 54} (Figura 9). La presencia de GH en el citoplasma es de esperarse debido a la traducción del ARNm de GH a proteínas, mientras que la GH nuclear se ha asociado a la acción de la GH a través de su receptor GHR, el cual también se ha encontrado en núcleo⁵². La presencia de inmunoreactividad para GH en tejidos oculares en pollos sugería su síntesis in situ y por tanto la posible presencia de su ARNm; Baudet et al.⁵⁴, a partir de extractos de retina, amplificaron y secuenciaron el DNA complementario (DNAC) del ARNm de la GH y encontraron que éste presentaba un 100% de similitud con el de la GH hipofisiaria.

Otro hallazgo interesante es que en pollos la inmnoreactividad en tejidos oculares se debe principalmente a la isoforma de 15 kDa y no a la proteína completa (25 kDa), la cual es la más abundante en hipófisis. Con base en esto se propone que esta isoforma podría tener una función tejido específica y distinta a la función de la GH pituitaria⁵⁴.

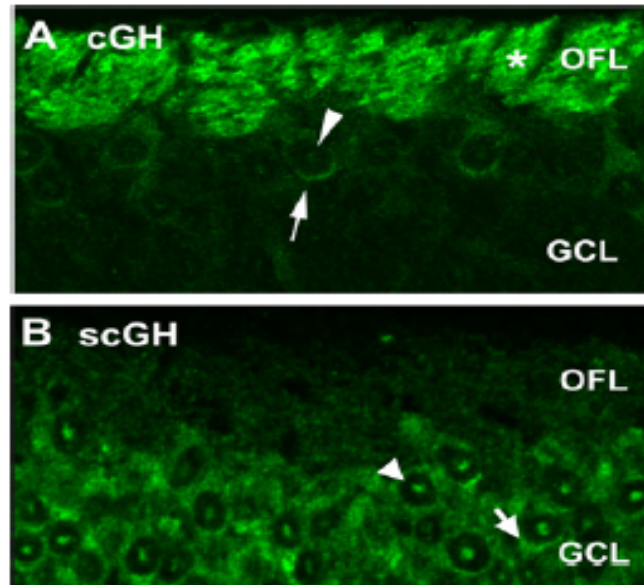


Figura 9: Microscopía confocal que muestra la inmunoreactividad de la GH de pollo en el DE 7 en retina. A) Muestra la inmunoreactividad de la GH completa (cGH, 25 kDa) en la capa de células ganglionares de retina (GCL del inglés *ganglion cell layer*) y en la capa de la fibra óptica (OFL del inglés *optic fiber layer*). Las flechas indican la presencia de GH tanto de manera citoplasmática como nuclear. B) Muestra la inmunoreactividad de la isoforma de 15 kDa (scGH del inglés *small chick growth hormone*). Las flechas indican la presencia de GH tanto de manera citoplasmática como nuclear⁵⁴.

La cantidad total de GH en la retina no parece variar durante la embriogénesis y permanece en los mismos niveles al menos hasta el día 12 después del nacimiento, esto a juzgar por los resultados de ensayos de *Western-blot*. Sin embargo, en pollos a partir del día 42, la GH en la retina es indetectable; no obstante, la GH de 15 kDa permanece en grandes concentraciones en el vítreo⁵⁴. Estos resultados indican que el vítreo puede actuar como un almacén de la GH retiniana, además de que la concentración y la acción de la GH ocular en pollos varían con respecto a la edad⁵².

La posibilidad de que la GH actúe en tejidos oculares de pollo, está basada en la presencia del ARNm y de la proteína GHR en retina y nervio óptico (Figura 10)⁵⁶. Se ha observado que la GH actúa a través de IGF-1, debido a que cuando se incubaron células retinianas con GH recombinante, IGF-1 aumentó cinco veces más que en células sin tratamiento⁵².

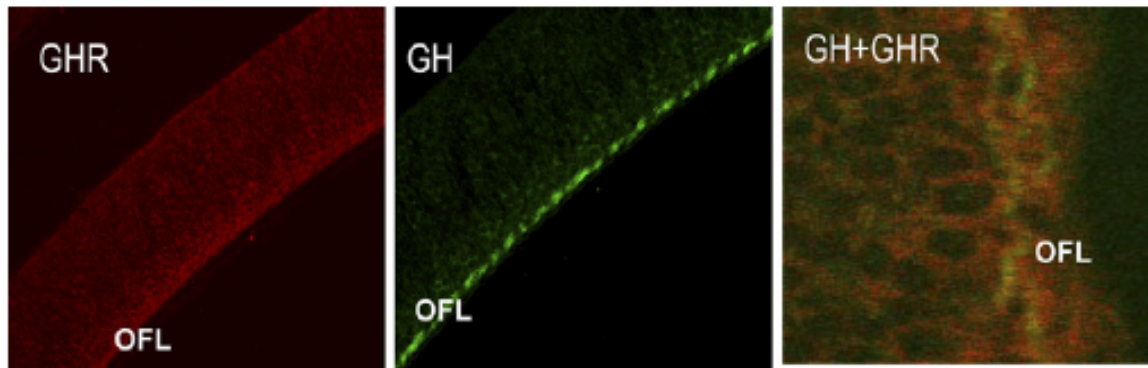


Figura 10: Microscopía confocal que muestra la inmunoreactividad de GHR (rojo) y GH (verde) de pollo en el DE 7 en retina. En amarillo se muestra la co-localización de ambas proteínas. OFL (del inglés *outer fiber layer*)⁵⁶.

Se ha propuesto que en esta especie, la GH actúa como un posible factor neuroprotector⁵⁹. El *knock-down* de la GH en células QNR/D retina de codorniz promueve la apoptosis, donde se propone que la GH regula ya sea de manera autocrina y/o paracrina la supervivencia celular en retina⁶⁰. Esta acción está mediada a través de la supresión de la expresión de caspasa 3^{61, 62} debido a la supresión de la expresión del factor inductor de apoptosis (AIF, del inglés *apoptosis-inducing factor*)⁶¹, y a través de la fosforilación de Akt⁶².

2.4.4 GH ocular en ratas

La posibilidad de que la GH estuviera activa en el ojo de ratas fue sugerida por Lobie et al⁷³., cuando se descubrió que las células RGC (del inglés, *retinal ganglion cells*) presentaban inmunoreactividad a GHR.

Posteriormente Harvey et al⁷²., demostraron la presencia de ARNm de GH en extractos de ojo de retinas de ratas. Utilizando hibridación *in situ*, el transcrito de GH fue abundante en la retina, principalmente en las células RGC; la proteína resultante posee un peso molecular idéntico al de la GH de la pituitaria. Esta inmunoreactividad también se presentó tanto en núcleo como en citoplasma.

2.4.5 GH ocular en ratones

Tanto la proteína como el ARNm de GH se han detectado en ojos de ratones recién nacidos y adultos. El ARNm mostró ser más abundante en las células RGC; aunque también se presentó en las células de las capas: IPL (del inglés *inner plexiform layer*), INL (del inglés *inner nuclear layer*) y OPL (del inglés *outer plexiform layer*)⁷².

En ratones knockout para GHR *-/-* se observó una longitud axial del nervio óptico más corta comparada con el genotipo wild type, este mismo fenómeno también se observa en niños con el síndrome de Laron (que es un tipo de enanismo). Por lo que se concluye que una ausencia de la señalización de GH puede inducir una emetropización anormal. En estos ratones la IPL (del inglés *inner plexiform layer*) y la OPL (del inglés *outer plexiform layer*) se vieron disminuidas en tamaño, pero no las GCL. Lo que sugiere que la GH promueve la diferenciación en axones pero no la migración de las GCL⁹⁵.

2.4.6 GH ocular en bovinos

En bovinos se inyectó GH recombinante marcada con yodo en la arteria cilioretiniana del ojo; la cual fue incapaz de pasar a través de las células endoteliales de retina o entrar a la retina⁶³. Esto se debe a la barrera retino-hemática que se encuentra presente en mamíferos; por lo tanto, esto excluye la posibilidad de que la GH sérica entre al ojo en bovinos⁵².

2.4.7 GH ocular en humanos

Recientemente la GH ha sido identificada en el ojo humano, específicamente en la retina y humor vítreo de cadáveres y de pacientes con disfunción ocular (retinopatía diabética, desprendimiento de retina, hemorragia vítrea o membrana epirretiniana)^{9, 64}. La evidencia sugiere que la GH se sintetiza en las RGC, donde se co-localiza con la presencia de GHR y ambas se observan principalmente en el núcleo de estas células (Figura 11).

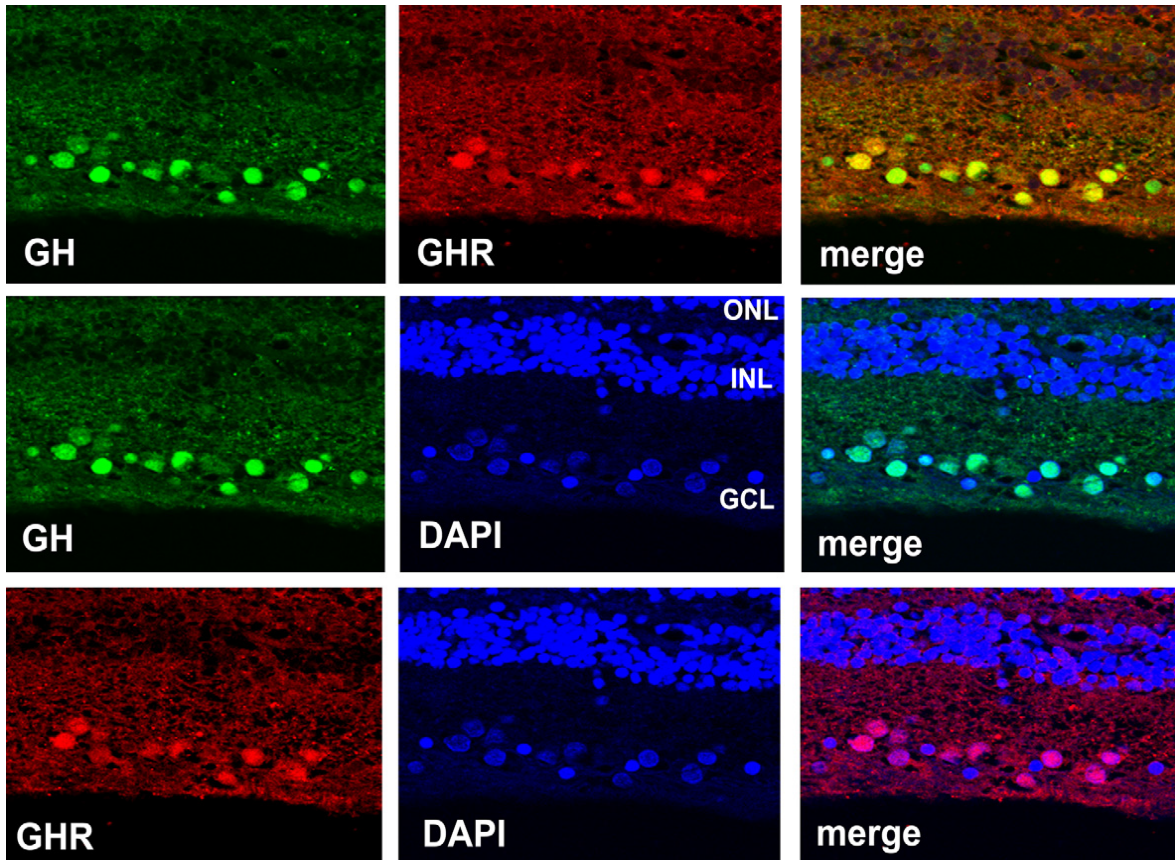


Figura 11: Microscopía confocal que muestra la inmunoreactividad de GHR (rojo) y GH (verde) en tres retinas humanas adultas. En amarillo se muestra la co-localización de ambas proteínas⁴⁷.

Se ha propuesto que la GH ocular en humanos participa en la promoción de la supervivencia celular, debido a que se observó, por ensayos de inmunohistoquímica, que secciones de retina de cadáveres, eran GH positivas, resultan negativas para apoptosis por la técnica de TUNEL⁶⁴. También se ha propuesto que la GH y el IGF -1 pueden tener una influencia en la vascularización de la retina y en el crecimiento celular aberrante de las células endoteliales de la microvascularización de la retina humana⁶⁵⁻⁶⁷.

La octreotida (análogo de la somatostatina) ha mostrado ser un tratamiento seguro y eficaz para la retinopatía diabética proliferativa severa, al bloquear la producción local y sistémica de GH e IGF-1, lo que impide la neovascularización en la retina las células epiteliales pigmentadas (células RPE)^{9, 68, 69}. Los pacientes no diabéticos con terapia de reemplazo de GH desarrollan problemas similares a la retinopatía diabética^{9, 70}. Esta correlación también se observa en los niños con deficiencia congénita de GH, que

presentan una vascularización retiniana reducida independientemente del tratamiento con HGH recombinante. La GH probablemente influye indirectamente en la angiogénesis a través de la acción de IGF-1, ya que los pacientes con defectos genéticos del axis GH/IGF-1 (como por ejemplo síndrome de Laron y delección parcial o de un alelo del gen del receptor de IGF-1) tienen una menor vascularización en la retina^{9, 71}.

3. JUSTIFICACIÓN

Ahora se sabe que la GH se encuentra en la retina de distintas especies, incluyendo el humano. Sin embargo, se desconoce si el resto de las hormonas codificadas en este locus (*GH-V*, *CHS-1*, *CSH-2* y *CSH-L*) lo hacen. También se desconoce si hay expresión de este locus en otros tejidos oculares. De la misma manera, falta por entender el papel de la GH en el ojo. Por lo que comprender su biología molecular, ayudará a dilucidar éste, así como su posible participación en patologías oculares.

Dadas las ventajas del babuino como modelo experimental, se justifica utilizar los tejidos oculares de este primate para reforzar nuestra investigación sobre los mecanismos que regulan la expresión del locus GH en el ojo humano.

4. OBJETIVOS

4.1 OBJETIVO GENERAL

Investigar la biología molecular del locus de la GH en el ojo del humano y del babuino (*Papio hamadryas*).

4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

4.2.1 BIOBANCO: Generar una colección de tejidos oculares de pacientes y de ejemplares babuinos, incluidos los datos relevantes de los bioespecímenes.

4.2.2 EXPRESIÓN GÉNICA: Determinar en los tejidos oculares el nivel de expresión de los genes *GH-1*, *GH-2*, *CSH-1*, *CSH-2* y *GHR*.

4.2.3 REGULACIÓN GÉNICA: Investigar si los factores y mecanismos que participan en la regulación del locus GH en la hipófisis y placenta, se encuentran presentes en el ojo.

4.2.4 MODELO ANIMAL: Corroborar estos hallazgos en el modelo experimental del babuino.

5. ESTRATEGIA GENERAL

La estrategia general (Figura 12) seguida para desarrollar el presente trabajo se abordó a través de dos enfoques: 1) La generación de un biobanco de tejidos oculares humanos y su posterior análisis por medio de ensayos de PCR en tiempo real e inmunofluorescencia 2) La generación de un biobanco de tejidos oculares de babuino (*Papio hamadryas*) y su posterior análisis a través de ensayos de PCR en tiempo real, inmunofluorescencia y proteómica.

El proyecto de investigación se sometió a evaluación al Comité de Ética e Investigación y fue aprobado bajo el siguiente número de registro OF10-005 . Se recolectaron muestras de tejidos oculares humanos de pacientes que por indicación médica y/o traumatismo se les retiró el tejido, con su respectiva firma de carta de consentimiento informado. Los pacientes provinieron de: el Departamento de Oftalmología del Hospital Universitario “Dr. José Eleuterio González” de la Universidad Autónoma de Nuevo León, del Servicio de Trasplante del Hospital Universitario “Dr. José Eleuterio González” de la Universidad Autónoma de Nuevo León y del Instituto de Oftalmología Fundación Conde de Valenciana IAP, México D.F. También se recolectaron muestras de tejidos oculares de babuinos provenientes del *Texas Biomedical Research Institute at San Antonio Texas* (TBRI), acorde a los procedimientos éticos del Institutional Animal Care and Use Committee of the TBRI.

Los tejidos oculares, tanto de babuinos como de humanos que se almacenaron en RNA later®, se utilizaron para ensayos de tiempo real. Los tejidos almacenados en parafina se usaron para los ensayos de inmunofluorescencia, en donde se analizaron los siguientes genes y proteínas respectivamente: GH-1, GH-2, CSH-1, CSH-2, GHR, Pit-1, SST, SSTR-1, SSTR-2, SSTR-3, SSTR-4, SSTR-5, GHRH y GHRHR.

También se realizaron ensayos de proteómica para analizar en muestras de vítreo de babuino las distintas isoformas o cambios postraduccionales de la GH.

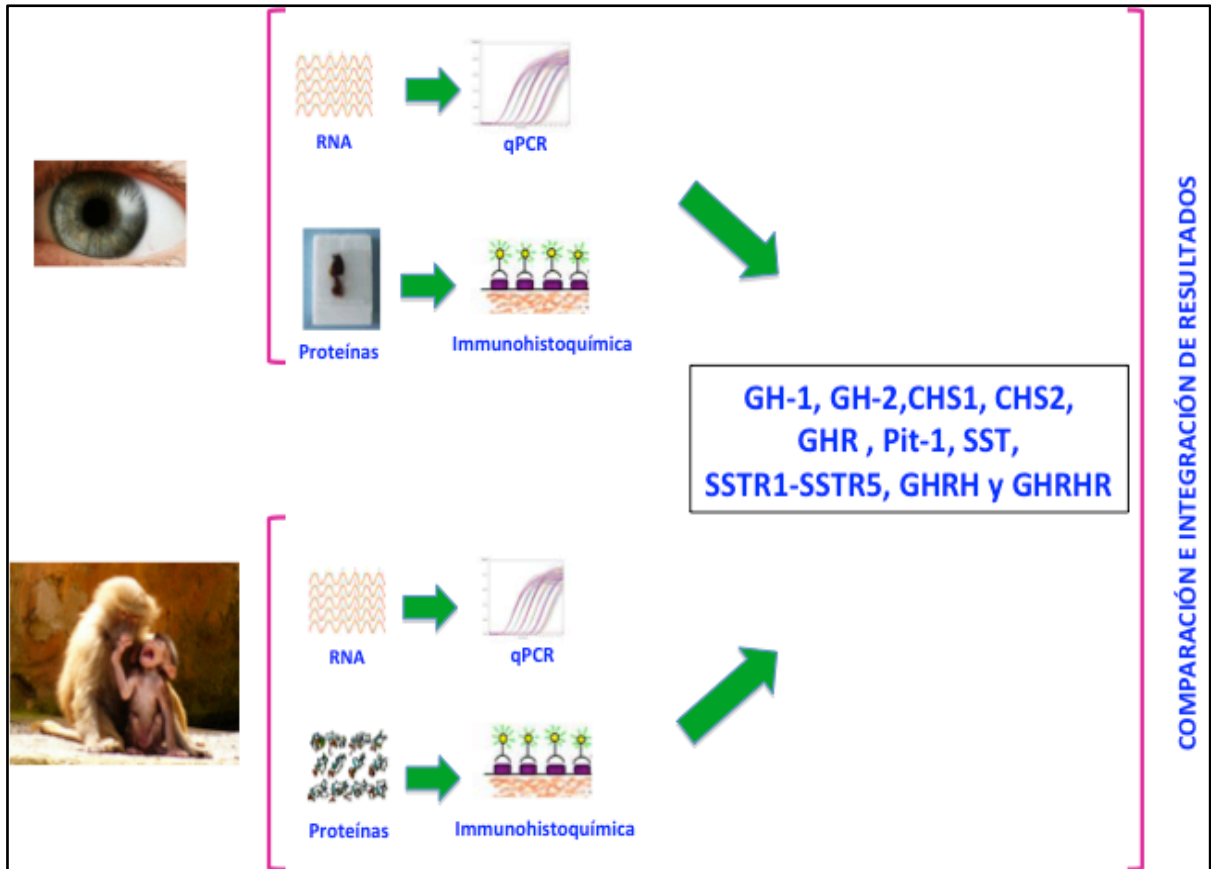


Figura 12: Estrategia general. Comprendió la realización de un biobanco de tejidos oculares tanto de humanos como de babuinos. Se les realizaron extracción de ARN para los ensayos de expresión por PCR en tiempo real y el análisis de las proteínas se realizó por medio de ensayos de inmunofluorescencia.

6. MATERIALES Y MÉTODOS

El estudio fue aprobado por el Comité de Investigación y Ética del Hospital Universitario “Dr. José Eleuterio González” de la Universidad Autónoma de Nuevo León, bajo el siguiente número de registro OF10-005.

Este trabajo se realizó en el laboratorio de Unidad de Biotecnología Médica del Departamento de Bioquímica y Medicina Molecular en colaboración con las siguientes instituciones:

- Departamento de Oftalmología del Hospital Universitario “Dr. José Eleuterio González” de la Universidad Autónoma de Nuevo León.
- Servicio de Transplante del Hospital Universitario “Dr. José Eleuterio González” de la Universidad Autónoma de Nuevo León.
- Department of Biology. University of Texas at San Antonio.
- Instituto de Neurobiología, UNAM. Campus Juriquilla, Querétaro.
- Instituto de Oftalmología Fundación Conde de Valenciana IAP, México D.F.
- Texas Institute of Biomedical Research of San Antonio (TIBR).

6.1 REACTIVOS

6.1.1 Ensayos de qPCR

6.1.1.1 Recolección de los tejidos oculares para ensayos de qPCR.

Para la recolección de las muestras se utilizó RNA later® de la marca Life Technologies (Foster City, CA, USA).

6.1.1.2 Extracción de RNA total en tejidos oculares de humanos.

Para ello se empleó el kit RNAqueous®-4PCR de la marca Life Technologies (Foster City, CA, USA), etanol de la marca Merck (Darmstadt, Germany), y RNA OUT de la marca Invitrogen (Carlsbad, CA, USA).

6.1.1.3 Extracción de RNA total en tejidos oculares de babuinos.

Para ello se empleó el reactivo Trizol de la marca Invitrogen (Carlsbad, CA, USA), Cloroformo de la marca Fisher Scientific (Bridgewater, New Jersey, USA), Etanol de la

marca Merck , Isopropanol de la marca Fisher Scientific y RNA OUT de la marca Invitrogen.

6.1.1.4 Retrotranscripción (RT-PCR)

Para la retrotranscripción se utilizó el kit High-Capacity cDNA Reverse Transcription de la marca Life Technologies.

6.1.1.5 PCR Cuantitativa en tiempo real (qPCR)

Para la cuantificación relativa del ARNm se utilizó como gen endógeno beta actina (ACTB) para las muestras oculares humanas y el gen ribosomal 18s para las muestras oculares de babuinos ambos de la marca Life Technologies. La cuantificación se realizó en dos etapas: primero se sintetizó el cDNA a partir del RNA total mediante una RT-PCR. Posteriormente, se realizó la PCR en tiempo real empleando los siguientes ensayos de la marca Life Technologies.

:GH1 Hs04189257_m1, GHR Hs00174872_m1, GH2 Hs00737951_g1, CHS 1-2 Hs04190925_gH, Pit-1 Hs01030492_m1, SST Hs00356144_m1, SSTR1 Hs00265617_s1, SSTR2 Hs00265624_s1, SSTR3 Hs00265633_s1, SSTR4 Hs01566620_s1, SSTR5 Hs00265647_s1, GHRH Hs00184139_m1 y GHRHR Hs00173457_m1.

Además se empleó el reactivo TaqMan Universal PCR Master Mix de la marca Life Technologies.

6.1.2 Ensayos de Inmunofluorescencia

6.1.2.1 Recolección de los tejidos oculares para ensayos de inmunofluorescencia.

Para la recolección de las muestras de babuinos se utilizó paraformaldehído de la marca Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA). Para la recolección de los tejidos oculares de humanos, las muestras se almacenaron en solución carnoy (ver Anexo 11.1.1.1)

6.1.2.2 Desparafinar tejidos embebidos en parafina.

Para este proceso fue utilizado el detergente citrisolv de la marca Fisherbrand (Haptom, NH, USA) y etanol de la marca Merck.

6.1.2.3 Tinción hematoxilina-eosina (método de Harris).

Se emplearon de la casa comercial Sigma-Aldrich para la tinción de hematoxilina, alumbre de potasio y amonio, óxido rojo de mercurio, eosina, ácido acético glacial e

hidróxido de amonio. El etanol fue adquirido de la casa comercial Merck, mientras que el ácido clorhídrico fue adquirido de la casa comercial J.T Baker (Center Valley, PA, USA),

6.1.2.4 Exposición de epítopes.

Para permeabilizar la membrana y exponer los epítopes se utilizó citrato de sodio de la marca Sigma-Aldrich.

6.1.2.5 Lavados de las laminillas con TBS.

Los lavados se realizaron con TBS 1X para ello se utilizó: Tris de la marca Bio-Rad (Hercules, CA, USA), cloruro de sodio de la marca Sigma-Aldrich, y timerosal también de la marca Sigma-Aldrich.

6.1.2.6 Lavados de las laminillas con TTBS.

Los lavados se llevaron a cabo usando TTBS 1X para cuya preparación se utilizaron: Tris de la marca Bio-Rad, mientras que de Sigma-Aldrich se consiguió el cloruro de sodio, el tritón y el timerosal.

6.1.2.7 Bloqueo de peroxidasa endógena.

Para bloquear la enzima peroxidasa endógena se utilizó peróxido de hidrógeno al 30% de la marca Merck y metanol de la marca Sigma-Aldrich.

6.1.2.8 Bloqueo de inespecificidades con borohidruro de sodio al 1% y leche al 5%.

Como agente reductor se empleó el borohidruro de sodio de la marca Sigma-Aldrich. Para el bloqueo de inespecificidades se utilizó leche en polvo (nonfat milk) de la marca Bio-Rad.

6.1.2.9 Incubación con anticuerpo primario.

En este proceso se emplearon los siguientes anticuerpos (Cuadro 2):

Cuadro 2: Anticuerpos primarios utilizados

ANTICUERPOS	FUENTE	REACCIONA CON	DILUCIÓN DE TRABAJO
Anti-GHRH	Policlonal- Conejo abcam ab80009	Humano.	1:10-1:50
Anti-GHRHR	Policlonal- Conejo abcam ab28692	Humano.	1:200
Anti-SST	Policlonal- Conejo Pierce PA516253	Humano.	1:50-1:100
Anti-SSTR1	Policlonal- Conejo Pierce PA3108	Humano.	1:2500
Anti-SSTR2	Policlonal- Conejo Pierce PA5-34220	Humano.	1:2500
Anti-SSTR3	Policlonal- Conejo Pierce PA3110	Humano.	1:2500
Anti-SSTR4	Policlonal- Conejo Pierce PA3111	Humano.	1:2500
Anti-SSTR5	Policlonal- Conejo Pierce PA1-41496	Humano	10 ug/ml
Anti-GH	Policlonal- Conejo AFP-C11981A NIDDK	Humano	1:250
Anti-GHR	Monoclonal – Ratón Pierce MAB263	Human, rata y conejo.	1: 200
Anti-PRL	Monoclonal – Ratón Pierce MA1-10597	Humano, ratón, rata, primates, bovino y ovino.	1: 250
Anti-PRLR	Monoclonal – Ratón Pierce MA1-610	Humano, rata, conejo, porcino y equino.	1: 100
Anti-GFAP	Monoclonal- Ratón Proteína fibrilar acida glial MAB360 chemicon	Humano, ratón, pollo, porcino, bovino, rata y conejo.	1:400-1:800
Anti- γ -synuclein	Policlonal-conejo abcam ab6169	Humano y rata.	1:100
Anti-B-tubulina	Monoclonal-Mouse Neuronal Tubulin 3 beta chain CONVANCE MMS-453P	Mamíferos.	1:500-1:5000
Anti-NeuN	Monoclonal-Mouse Neuron specific nuclear protein Millipore MAB377	Aves, humano y ratón	1:10-1:100

6.1.2.10 Incubación con anticuerpo secundario.

Para llevar a cabo este proceso se emplearon los siguientes anticuerpos secundarios (Cuadro 3):

Cuadro 3: Anticuerpos secundarios utilizados

ANTICUERPOS	FUENTE	CARACTERÍSTICAS	DILUCIÓN DE TRABAJO
Cy5 anti-mouse IgG	Cabra Invitrogen A10524	Excitación/Emission (nm): 649/665	1:5000
FITC anti-mouse CD3 Fluorescein labeled	Cabra Sigma F0257	Excitación/Emission (nm): 495/528	1:250
Cy3 anti-rabbit IgG	Cabra Invitrogen A10520	Excitación/Emission (nm): 553/565	1:5000

6.1.2.11 Incubación con DAPI.

Para la tinción de los núcleos se empleó DAPI de la marca Sigma-Aldrich.

6.1.2.12 Montaje de las laminillas.

El montaje de las laminillas fluorescente se realizó utilizando Vectashield de Vector Labs (Burlingame, CA, USA).

6.1.3 Ensayos de Proteómica.**6.1.3.1 Extracción de proteínas en tejidos de babuinos utilizando el buffer de lisis RIPA .**

Para la preparación del buffer (ver anexo 11.1.4.2) se utilizaron los siguientes reactivos de la casa comercial Sigma-Aldrich: cloruro de sodio, Tris, SDS, EDTA y desoxicolato.

6.1.3.2 Cuantificación de proteínas con el reactivo EZQ.

Para la realización de la curva estándar se utilizó BSA de la marca Sigma-Aldrich y el kit EZQ Protein Quantification de la marca Invitrogen.

6.1.3.3 Inmunoprecipitación.

Este procedimiento se llevó a cabo utilizando anticuerpo anti-GH policlonal PA1-85518 de la marca Pierce de Thermo scientific, perlas magnéticas protein G magnetic beads MAG-104 de la marca Bioclone (San Diego, CA, USA), fosfato de sodio dibásico, fosfato de sodio monobásico, ácido clorhídrico y Tris-HCl de la marca Sigma- Aldrich, glicina de la marca Bio-Rad y agua ultra pura HPLC de la marca Thermo scientific.

6.1.3.4 Preparación de la muestra con perlas magnéticas de fase reversa (M² C8 beads).

Las perlas magnéticas C8 que fueron utilizadas en este estudio provenían de Bioclone, los siguientes reactivos se adquirieron de la casa comercial Sigma-Aldrich: cloruro de sodio, iodoacetamida, hidroxilamina, acetonitrilo anhidro (ACN), ácido acético y bicarbonato de trietilamonio (TEAB); mientras que el metanol y el ácido trifluoroacético de la marca J.T Baker, la tripsina (1 µg/1 µl) y los reactivos isobáricos para marcar (TMT)-6plex de la marca Thermo Fisher.

6.1.3.5 LC/FT-MS/MS

Para realizar la espectrometría de masas se emplearon partículas magnéticas C18 de la marca Bioclone. Para el gradiente de fase reversa se utilizó ácido fórmico y acetonitrilo anhidro (ACN) de Sigma-Aldrich.

6.2 Equipo

6.2.1 Ensayos de qPCR

6.2.1.1 Extracción de RNA total en tejidos oculares de humanos y babuinos.

Para disgregar los tejidos se utilizó el disruptor de tejido TissueRuptor de la marca QIAGEN (Hilden, Germany), se usó la centrifuga refrigerada 22000 rpm, Heraeus™ Biofuge™ Stratos™ de la marca Thermo Scientific.

6.2.1.2 Retrotranscripción (RT-PCR)

La reacción de RT-PCR se llevó a cabo en un termociclador Veriti® 96-well thermal cycler de la marca Life technologies. Para la cuantificación de DNAC se utilizó el NanoDrop ND 2000 de la marca Thermo Scientific.

6.2.1.3 PCR cuantitativa en tiempo real (qPCR)

Para los ensayos de qPCR fue empleado un termociclador en PCR en tiempo real 7500 Fast real time PCR de la marca Life technologies.

6.2.2 Ensayos de Inmunofluorescencia

6.2.2.1 Confección de bloques de parafina de los tejidos oculares.

La confección de los bloques de parafina se llevó a cabo con los equipos: Leica TP1020 y el Leica EG1150 modular tissue embedding center de la marca Leica Biosystems (Solms, Alemania). Para realizar los cortes de parafina se utilizó el micrótopo Leica RM2235 y el baño maría dLeica H11210 de la casa comercial Leica Biosystems y la estufa de secado HERAterm de 400 L de la marca Thermo Scientific.

6.2.2.2 Tinción hematoxilina-eosina (método de Harris).

La observación de las tinciones se realizó mediante la utilización del microscopio óptico CX31 de la marca OLYMPUS (Shinjuku, Tokio, Japón).

6.2.2.3 Exposición de epítopes.

Para calentar las muestras se utilizó la placa de calentamiento y agitación sp131635q de la marca Thermo Scientific.

6.2.2.4 Observar al microscopio la luz de marcaje.

Para observar los ensayos de inmunofluorescencia se utilizó el microscopio confocal LSM780 de la marca ZEISS (Jena, Alemania).

6.2.3 Ensayos de proteómica

6.2.3.1 Cuantificación de proteínas con el reactivo EZQ.

La cuantificación de proteínas en las muestras de vítreo e hipófisis de babuino se utilizó el multi-mode microplate reader synergy HT de la marca BioTek (Winooski, VT, USA).

6.2.3.2 Extracción de proteínas en tejidos de babuinos utilizando el buffer de lisis RIPA .

Para pesar los reactivos fue utilizada la balanza analítica AX224 de la marca Sartorius (Göttingen, Alemania). También se utilizaron los siguientes equipos: agitador vortex genie-2 de la marca DAIGGER (Vernon Hills, Illinois, USA) y la centrifuga refrigerada Z36HK de la marca Labnet (New Jersey, USA).

6.2.3.3 Inmunoprecipitación

Para este procedimiento se emplearon los siguientes equipos: agitador vortex genie-2 de la marca DAIGGER, la centrifuga refrigerada Z36HK de la marca Labnet y la placa de calentamiento PC-320 de la marca Corning (New York, USA).

6.2.3.4 Preparación de la muestra con perlas magnéticas de fase reversa (M² C8 beads).

Los equipos utilizados fueron: agitador vortex genie-2 de la marca DAIGGER y el microondas NNH965W de la marca Panasonic (Osaka, Japón).

6.2.3.5 LC/FT-MS/MS

Para los ensayos de proteómica se utilizó el hybrid linear ion trap-Fourier-transform tandem mass spectrometer LTQ-ELITE de la marca Thermo Fisher.

6.3 Metodología

6.3.1 Recolección de muestras de tejidos oculares de pacientes

Los tejidos oculares se recolectaron de pacientes que por indicación médica y/o por traumatismo se les retirara algún tejido o de pacientes donantes de órganos. De todos los pacientes se obtuvo la carta de consentimiento informado y se recabaron sus datos tanto clínicos como demográficos para la realización de una base de datos (Figura 11). Los pacientes provinieron del: Departamento de Oftalmología del Hospital Universitario “José Eleuterio González” de la Universidad Autónoma de Nuevo León y del Instituto de Oftalmología Fundación Conde de Valenciana IAP, México D.F. Los pacientes donantes provinieron del Servicio de Trasplante del Hospital Universitario “José Eleuterio González” de la Universidad Autónoma de Nuevo León.

Los criterios de inclusión y de exclusión de los pacientes incluidos en el estudio fueron los siguientes:

Criterios de inclusión

Pacientes que por indicación médica fuera necesario que se les retirara tejido ocular.
Que desearan participar en el estudio y firmaran carta de consentimiento informado.

Criterios de exclusión

Pacientes que no desearon participar en el estudio.

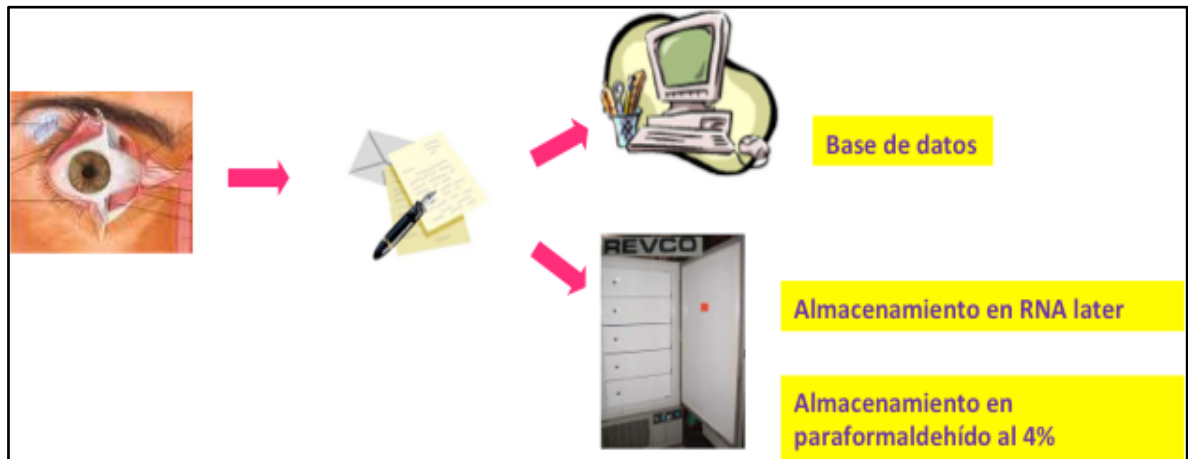


Figura 13: Estrategia general de la recolección de tejidos oculares humanos.

Los tejidos recolectados para los ensayos de qPCR se almacenaron en 500 μ l de RNA later®. Se dejó incubar el tejido toda la noche a 4°C, para permitir que la solución penetrara en el tejido. Una vez terminada la incubación se almacenaron a -80°C hasta su uso. Los tejidos recolectados para los ensayos de inmunofluorescencia se almacenaron en 5 ml de solución de Carnoy hasta su uso.

Para los tejidos oculares de babuinos se recolectaron, en autopsias programadas de babuinos adultos de entre 15-35 años de edad provenientes del TBRI de San Antonio Texas. Los tejidos recolectados para los ensayos de qPCR se almacenaron en 500 μ l de RNA later®, igual que en tejidos oculares humanos. Los tejidos recolectados para los ensayos de inmunofluorescencia se almacenaron en paraformaldehído al 4% hasta su uso.

6.3.2 Extracción de RNA total en tejidos oculares humanos

Este procedimiento se llevó a cabo utilizando el kit RNAqueous 4-PCR, bajo el siguiente protocolo:

1. Se limpiaron las pipetas, la mesa de trabajo y los guantes con el inhibidor de RNAsas con las toallitas RNAzap®.
2. Se preparó la solución de etanol al 64% adicionando 22.4 ml de etanol absoluto a la botella del kit etiquetada como Water for 64% ethanol.
3. La solución de lavado #2/3 se preparó adicionando 28 ml de etanol absoluto a la

botella Was soluiton #2/3.

4. El tejido se descongeló en hielo, una vez realizado esto, la muestra se centrifugó 1 minuto a 3000 rpm y se le retiró con la ayuda de una pipeta la solución RNA later®.
5. El tejido se colocó en un tubo de microcentrifuga nuevo estéril de 1.5 ml. Se adicionaron 500 µl de la solución Lysis/Binding solution.
6. La disrupción del tejido se llevó a cabo utilizando el homogenizador de tejidos.
7. Una vez homogenizado el tejido con la solución de lisis se adicionaron 500 µl de la solución Water for 64% etanol, después se mezcló por inversión hasta ver una completa homogenización de ambas soluciones.
8. Se tomaron 700 µl de la mezcla anterior y se colocaron en una columna con su respectivo tubo de colección.
9. La muestra se centrifugó a 14,000 rpm durante 1 min, hasta observar que toda la solución pasara por completo a través del filtro de la columna.
10. Se descartó la solución del tubo de colección, una vez realizado esto, se colocó de nuevo con su respectiva columna.
11. Se colocó en la columna 700 µl de la solución de lavado Wash solution #1.
12. Se repitieron los pasos 9 y 10.
13. En la columna se adicionaron 500 µl de la solución de lavado Wash solution #2/3.
14. Se repitieron los pasos 9 y 10.
15. Nuevamente se adicionaron 500 µl de la solución de lavado Wash solution #2/3, repitiendo los pasos 9 y 10.
16. Se le dio un spin a las columnas sin la tapa de la centrifuga para ayudar a que se evaporara el etanol de las muestras.
17. Una vez terminada la fase de lavado, las columnas se colocaron en tubo de microcentrifuga de 1.5 ml estéril, se adicionaron 50 µl de la solución de elución la cual previamente se calentó a 70°C.
18. Las columnas se centrifugaron a 14,000 rpm durante 1 min.
19. La columna se deshecha, etiquetando y almacenando la muestra a -80°C hasta su uso.

6.3.3 Extracción de RNA total en tejidos oculares de babuinos

Este procedimiento se llevó a cabo utilizando reactivo de Trizol®, bajo el siguiente protocolo:

1. Se limpiaron las pipetas, la mesa de trabajo y los guantes con el inhibidor de RNAsas con las toallitas RNAzap®.
2. El tejido se descongeló en hielo, una vez realizado esto, la muestra se centrifugó 1 minuto a 3000 rpm y se le retiró con la ayuda de una pipeta la solución RNA later®.
3. Se colocó en un tubo de microcentrifuga de 2 ml estéril de 50-100 mg de tejido y se adicionó 1 ml de Trizol.
4. La disrupción del tejido se llevó a cabo utilizando el homogenizador de tejido.
5. Se incubó la muestra a temperatura ambiente durante 5 min.
6. Se adicionaron 200 µl de cloroformo, se homogenizó por vórtex y se incubó la muestra por 3 min a temperatura ambiente.
7. Posteriormente las muestras se centrifugaron a 10,000 rpm a 4°C durante 15 min.
8. Con la ayuda de una pipeta se recuperó la fase acuosa y se colocó en un tubo de microcentrifuga de 2 ml estéril nuevo, se adicionaron 500 µl de isopropanol.
9. Las muestras se mezclaron por inversión.
10. Posteriormente se incubaron las muestras durante 10 min a temperatura ambiente.
11. Después las muestras se centrifugaron a 10,000 rpm a 4°C durante 10 min.
12. Una vez formada la pastilla de RNA se retiró el isopropanol por decantación, se le dio nuevamente un spin a la muestra y con la ayuda de una micropipeta se quitó el exceso.
13. La pastilla de ARN se lavó adicionando 1 ml de etanol al 75%, se mezcló por vortex.
14. Posteriormente se centrifugó la muestra a 7500 rpm a 4°C durante 5 min.
15. Se dejó secar la pastilla en una campana de flujo laminar durante 15 min.
16. La pastilla se resuspendió en 50 µl de agua libre de nucleasas.
17. Las muestras se almacenaron a -80°C hasta su uso.

6.3.4 Retrotranscripción RT-PCR

Una vez realizada la extracción de RNA total a partir de tejidos, este fue sujeto a retrotranscripción con el kit High Capacity cDNA reverse transcription. Se preparó la siguiente mezcla de reacción (Cuadro 4)

Cuadro 4: Mezcla de reacción de la RT-PCR

Reactivos	Concentración Inicial	Volumen por reacción	Concentración Final
Buffer RT	10X	2 µl	1X
dNTPs mix	25X	0.8 µl	1X
Random Primer	10X	2 µl	1X
Enzima MultiScribe RT	50 U/µl	1 µl	2.5 U
RNase inhibitor	20 U/ µl	1 µl	1 U
Agua DEPC	-----	4.2 µl	-----
RNA	0.2 – 2 µg	10 µl	-----
Volumen final		20 µl	

El programa para la retrotranscripción fue el siguiente (Cuadro 5)

Cuadro 5: Programa de termociclado para la reacción de RT-PCR

Tiempo	Temperatura °C
10 minutos	25
120 minutos	37
5 minutos	85
∞	4

6.3.5 PCR cuantitativa en tiempo real (qPCR).

Una vez obtenido el DNAC, se cuantificó la muestra y a partir de la concentración obtenida se realizó una dilución para obtener una concentración de 500 ng/µl. Para la PCR se usaron las sondas mencionadas en el apartado de reactivos 6.1.1.5. Se empleó el termociclador en PCR en tiempo real 7500 Fast real time PCR bajo las siguientes condiciones de reacción (Cuadro 6).

Cuadro 6: Condiciones de reacción para el ensayo de qPCR

Reactivos	Concentración inicial	Volumen por reacción	Concentración final
TaqMan Universal PCR master mix	2x	10 µl	1x
Ensayo Taqman	20x	1 µl	1x
cDNA diluido en agua DEPC	500 ng	2 µl	-----
Volumen total		20 µl	

Las condiciones de amplificación fueron las siguientes (Cuadro 7).

Cuadro 7: Condiciones de termociclado para el ensayo de qPCR

Tiempo	Temperatura °C
2 minutos	50
10 minutos	95
15 segundos	95
1 minuto	60

Para normalizar de los niveles del RNA se utilizó el gen ACTB para los tejidos oculares humanos y 18s para los tejidos oculares de babuinos. Para el cálculo de los niveles de expresión fue elegido el método $2^{(-\Delta\Delta CT)}$.

6.3.6 Ensayos de inmunofluorescencia

6.3.6.1 Confección de bloques de parafina de los tejidos oculares

Los tejidos fijados con paraformaldehído al 4% (para su preparación ver anexo 11.1.1.2) o solución de carnoy (para su preparación ver anexo 11.1.1.1) se deshidrataron bajo el siguiente protocolo:

1. Los tejidos se sumergieron 30 minutos en cada serie de diluciones de etanol: 50%, 70%, 95% y etanol absoluto 100%.
2. Posteriormente se clarificaron los tejidos en xileno durante 30 minutos.
3. Después los tejidos se infiltraron con parafina a 56°C durante 3 horas.

4. Los bloques se dejaron enfriar a 4°C durante una hora.
5. Posteriormente se realizaron secciones transversales de 5 micras de los bloques de parafina y se colocaron en los portaobjetos impregnados con 5% de gelatina.

6.3.6.2 Desparafinar tejidos embebidos en parafina

Los cortes de los tejidos se desparafinaron bajo el siguiente protocolo:

1. Las secciones fueron sumergidas en citrosolv durante 15 minutos.
2. Posteriormente las muestras se rehidrataron sumergiendo los cortes con una concentración creciente de etanol (100%, 100%, 96%, 96%, 70%, 70% y 50%) por cinco minutos en cada dilución.
3. Finalmente los cortes se equilibraron en agua destilada durante 2 minutos.

6.3.6.3 Tinción hematoxilina-eosina (método de Harris)

Una sección de cada uno de los tejidos se tiñó con hematoxilina-eosina para analizar la histo-patología de los tejidos, el método se realizó de la siguiente manera:

1. Los portaobjetos se sumergieron con hematoxilina (para su preparación ver anexo 11.1.2.1) en una caja coplin durante 3 min.
2. Las muestras se lavaron al sumergirlas con agua destilada en una caja coplin durante 1 min con agitación.
3. Posteriormente las muestras se diferenciaron rápidamente en alcohol acidulado (para su preparación ver anexo 11.1.2.2) al sumergirlas por un segundo.
4. Se repitió el paso 2.
5. Después las muestras se viraron en agua amoniacal (para su preparación ver anexo 11.1.2.3) sumergiéndolas 5 veces.
6. Una vez realizado esto, se introdujeron en eosina (para su preparación ver anexo 11.1.2.4) por 5 segundos.
7. Se repitió el paso 2.
8. Las muestras se deshidrataron en una serie de diluciones de etanol (96%, 96%, 100%) durante 1 min por dilución.
9. Posteriormente se colocaron en xilol durante 2 min.
10. Se colocó enzima del corte una gota de resina entellan y se acomodó el portaobjetos permitiendo que la resina se distribuyera por capilaridad.
11. La muestra se dejó secar durante 5 horas.
12. Una vez seca la muestra se observó al microscopio.

6.3.6.4 Reacción de inmunofluorescencia

Una vez desparafinados los cortes, se identificaron las proteínas de interés y su localización en las distintas estirpes celulares por medio de ensayos de inmunofluorescencia bajo el siguiente protocolo:

1. La exposición de los epítopes se realizó incubando la muestra por 40 minutos en buffer de citrato de sodio al 10 mM y 0.05% de tritón a pH 6 (para su preparación ver anexo 11.1.3.1), bajo una temperatura de mínimo 80°C.
2. Inmediatamente después las preparaciones se sumergieron en 100 ml de TBS 1x (para su preparación ver anexo 11.1.3.2) durante 5 min por 3 ocasiones.
3. Para el bloqueo de peroxidasa endógena los cortes se incubaron en una solución de peróxido de hidrógeno al 3% en TBS-Metanol 50:50 (para su preparación ver anexo 11.1.3.3) durante 1 hora en oscuridad.
4. Se repitió el paso 2.
5. Para eliminación de inespecificidades los cortes se colocaron en una solución de borohidrato de sodio al 1% diluido (para su preparación ver anexo 11.1.3.4) en TBS 1X durante 10 min.
6. Se repitió el paso 2.
7. Para el bloque de sitios inespecíficos se incubaron los cortes en una solución de leche descremada al 5% (para su preparación ver anexo 11.1.3.5) diluida en TBS 1x durante toda la noche a temperatura ambiente, colocando un parafilm en las preparaciones para evitar que se secan y en una cámara húmeda.
8. Posteriormente se realizaron lavados con TTBS 1x (para su preparación ver anexo 11.1.3.6) durante 5 minutos por 3 ocasiones.
9. Las preparaciones se transfirieron a una cámara húmeda y se incubaron a temperatura ambiente con el anticuerpo primario (1er Ab) diluido en TTBS 1x y leche al 1% (para su preparación ver anexo 11.1.3.7), se colocó un parafilm en las preparaciones para evitar que se secan.
10. En caso de la preparación que se utilizó como control negativo esta solo se incubó en leche al 1% sin anticuerpo primario.
11. Para el preabsorbido se colocó en un tubo de microcentrífuga de 1.5 ml, 250 µg de hGH recombinante con 200 µl del anticuerpo anti-GH, esta preparación se dejó

incubando toda la noche. Una vez terminada la incubación ésta se colocó en la su respectiva laminilla y se incubó toda la noche a temperatura ambiente.

12. Posteriormente las laminillas se lavaron durante 5 min en TTBS 1x durante 3 ocasiones.
13. Después la muestra se incubó en oscuridad durante 2 horas con el anticuerpo secundario (2do. Ab) el cual estaba previamente diluido en TTBS 1X y leche al 1%. Tanto el control negativo como el preabsorbido se incubaron con el anticuerpo secundario.
14. Se repitió el paso 12.
15. Las muestras posteriormente se incubaron durante 40 min con 200 µl de DAPI solución de trabajo (para su preparación ver anexo 11.1.3.8).
16. Se repitió el paso 12.
17. Por último, las muestras se montaron con una gota de vectashield y un cubreobjetos para posteriormente ser observados al microscopio confocal LSM 780 ZEISS.

6.3.7 Ensayos de proteómica

6.3.7.1 Extracción de proteínas en tejidos de babuinos utilizando el buffer de lisis RIPA.

La extracción de proteínas a partir de tejidos hipofisarios de babuino siguió el proceso siguiente:

1. La hipófisis de babuino se le realizó una disección para cortar el tejido en pequeños pedazos y se lavó el tejido con PBS 1x (para su preparación ver anexo 11.2.1) estéril para remover rastros de sangre.
2. Las muestras se colocaron inmediatamente en hielo.
3. Posteriormente se adicionaron a 10 ml del buffer de lisis RIPA (para ver la preparación del buffer ver anexo 11.2.2) una tableta de inhibidores de proteasas de la marca roche.
4. El buffer se homogenizó en vortex a temperatura ambiente durante 1 hora.
5. Se adicionaron 1 ml del buffer de lisis RIPA a cada uno de los tejidos.
6. El tejido se disgregó utilizando el disruptor de tejido tissueruptor de QIAGEN.
7. Las muestras se incubaron durante 30 min a 4°C.
8. Posteriormente se sonicó la muestra durante 5 min a 180 watts.
9. La muestra se centrifugó a 9000 rpm durante 20 minutos a 4°C.

10. El sobrenadante se transfirió a un tubo de microcentrífuga de 1.5 ml estéril nuevo.
11. La muestra se almacenó a -80°C hasta su uso.

6.3.7.2 Cuantificación de proteínas con el reactivo EZQ

1. Se realizó la preparación de los estándares utilizando albúmina liofilizada de pollo a una concentración de 2 mg. La cual fue reconstituida adicionando 1 ml de agua estéril para obtener una concentración final 2 mg/ml.
2. Posteriormente se realizaron una serie de diluciones hasta obtener las siguientes concentraciones: 1 mg/ml, 0.5 mg/ml, 0.25 mg/ml, 0.125 mg/ml y 0.0625 mg/ml. Estas diluciones se almacenaron a -20°C hasta su uso.
3. Se realizaron las siguientes diluciones de las muestras: 1:2, 1:4, 1:6, 1:8 y 1:16.
4. En un filtro whatman colocado en un microplato se coloraron por triplicado 1 μ l de cada uno de los estándares y de las diluciones de las muestras.
5. Se dejaron secar las muestras en el filtro.
6. Posteriormente el filtro se incubó en metanol al 70% durante 5 min. Cuidando de que el papel filtro se sumergiera por completo en la solución.
7. Se descartó el metanol y se dejó secar por completo al aire libre el papel filtro.
8. Posteriormente la muestra se incubó en oscuridad con el reactivo EZQ durante 30 minutos.
9. Se descartó la solución e inmediatamente se colocó la solución HAC (para su preparación ver anexo 11.3.1) y se incubó durante 5 minutos en agitación.
10. Se repitió el paso 9 dos veces más.
11. Después se colocó el filtro en el microplato y posteriormente se leyó en el lector de placas de BioTek.
12. Los resultados se analizaron utilizando el software BioTek Gen 1.10.

6.3.7.3 Inmunoprecipitación

1. Como control se utilizó hGH recombinante (la cual fue donada por el Dr. Luis Haro) la cual se resuspendió en 1052 μ l en agua HPLC ultra pura para obtener una concentración final de 0.5 μ g/ μ l.
2. Para los ensayos de inmunoprecipitación se decidió colocar 2500 μ g de proteína total de vítreo de babuinos. Se realizó previamente un pool de muestras para evitar variación.

3. En tres muestras (con una concentración total de proteínas de 2500 μg) se colocaron 25 μg de anticuerpo anti-GH.
4. En dos de los tubos se colocaron: 0.1, 0.5 y 1 μg de proteína hGH recombinante como un estándar interno.
5. Las muestras se incubaron durante toda la noche a 4°C en agitación por inversión.
6. Posteriormente se colocaron 250 μl de las perlas *protein G magnetic beads* de Bioclone.
7. Las muestras se incubaron toda la noche a 4°C en agitación por inversión.
8. Después las muestras se colocaron en un separador magnético durante 1 min.
9. Se removió el sobrenadante mientras el tubo se mantenía en el separador magnético.
10. Después se lavaron las perlas con 5 volúmenes (aproximadamente 500 μl) del 1X Binding/Washing Buffer (para su preparación ver anexo 11.4.1). La muestra se mezcló por vortex.
11. Las muestras se lavaron dos veces más siguiendo los pasos 8, 9 y 10 respectivamente.
12. Posteriormente se adicionó a las perlas la cantidad apropiada de anticuerpo y *Binding solution buffer*: 1 μl del anticuerpo anti-GH en 300 μl del *binding solution buffer* (para ver su preparación ver anexo 11.4.1).
13. Se mezclaron las muestras pipeteando suavemente y se incubaron durante 30 min a 4°C con agitación rotacional.
14. Las muestras se lavaron nuevamente como en el paso 10 hasta que la absorbancia del sobrenadante a 280 nm fuera menor o igual a 0.05 (aproximadamente de 4 a 5 veces).
15. Se adicionaron 100 μl del *buffer* de elución (para ver su preparación ver anexo 11.4.2).
16. Se mezclaron las muestras pipeteando suavemente y se incubaron durante 10 min a 4°C con agitación rotacional.
17. Se colocaron las muestras en el separador magnético durante 1 min y se recolectaron los sobrenadantes en un tubo de microcentrífuga de 1.5 ml estéril nuevo.
18. Inmediatamente se neutralizaron las muestras adicionando 0.1 ml del buffer de neutralización (para ver su preparación ver anexo 11.4.3) por cada 1 ml de sobrenadante.

19. Las muestras se almacenaron a -80°C hasta su uso.

6.3.7.4 Preparación de la muestra con perlas magnéticas de fase reversa (M² C8 beads)

1. Se tomó 1 ml de las perlas magnéticas C8 (50 mg/ml) y se resuspendió en un 1 ml de metanol al 50%, se homogenizó con vortex.
2. Se transfirieron 400 μl de las perlas magnéticas resuspendidas a un tubo de microcentrífuga de 1.5 ml estéril.
3. Se colocó el tubo en el separador magnético durante 1 min.
4. Se aspiró y se descartó el sobrenadante mientras el tubo estaba en el separador magnético.
5. Una vez realizado esto, se lavaron en tres ocasiones las perlas con 400 μl en buffer de equilibrio (para ver su preparación ver anexo 11.5.1).
6. Posteriormente las perlas se resuspendieron en 400 μl de buffer de equilibrio.
7. Las muestras una vez realizada la inmunoprecipitación, se cuantificaron por el método EZQ previamente descrito.
8. Se realizaron diluciones de las muestras para que quedaran a una concentración final de 1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$. Las diluciones de las muestras se realizaron de la siguiente manera:
 - a) Dilución 0:100 (1.824 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$) : Se colocaron 54.82 μl del inmunoprecipitado más 45.175 μl de agua HPLC ultra pura.
 - b) Dilución 0.1:100 (2.16 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$) : Se colocaron 46.29 μl del inmunoprecipitado más 53.704 μl de agua HPLC ultra pura.
 - c) Dilución 1:100 (2.58 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$) : Se colocaron 38.76 μl del inmunoprecipitado más 61.24 μl de agua HPLC ultra pura.
9. Las muestras se mezclaron utilizando una pipeta y se adicionaron 100 μl de las perlas magnéticas.
10. La mezcla se incubó durante 5 min a temperatura ambiente.
11. Posteriormente se colocaron en el separador magnético durante 1 min y con la ayuda de una micropipeta se retiró el sobrenadante sin retirar el tubo del separador magnético.
12. Las perlas se lavaron con 150 μl de buffer TEAB (para ver la preparación del buffer ver anexo 11.5.2).

13. Se colocaron los tubos en el separador magnético durante 1 min.
14. Se aspiró y se descartó el sobrenadante mientras los tubos estaban en el separador magnético.
15. Se repitieron los pasos del 12 al 14 por dos ocasiones más.
16. Se adicionaron 150 μ l de DTT 10 mM (para ver su preparación ver anexo 11.5.3)
17. Las muestras se calentaron en el microondas durante 10 segundos a 700 watts.
18. Se repitieron los pasos 13 y 14.
19. Se adicionaron 150 μ l de iodoacetamida.
20. Las muestras se calentaron en el microondas durante 10 segundos.
21. Se repitieron los pasos 12, 13 y 14 por dos ocasiones más.
22. Las muestras se resuspendieron en 150 μ l en buffer TEAB.
23. Para resuspender la tripsina se colocaron 20 μ l de ácido acético 50 mM (para ver su preparación ver anexo 11.5.4)
24. Para realizar la proteólisis se colocaron a cada una de las muestras 4 μ l de tripsina (en una proporción 1:25 tripsina-proteína).
25. Las muestras se calentaron en el microondas durante 60 segundos a 700 watts.
26. Se colocaron las muestras en el separador magnético durante 1 min.
27. El sobrenadante se transfirió a un tubo de microcentrífuga de 1.5 ml estéril nuevo e inmediatamente las muestras se colocaron en hielo.
28. Posteriormente las muestras se almacenaron a -80°C hasta la realización del marcado de las muestras con los tag TMT-label.
29. Los reactivos se dejaron a temperatura ambiente. Para los viales de 0.8 mg se adicionaron 41 μ l de acetonitrilo anhidro.
30. Se mezcló por vortex durante 5 minutos.
31. Posteriormente se le dio un *spin* a los viales (los cuales son estables solo por una semana una vez resuspendidos).
32. Después se adicionaron al vial 41 μ l de la muestra (1100 μ g) al tubo TMT. Las muestras se marcaron de la siguiente manera:
 - a) Dilución 0: 100 TMT⁶-126
 - b) Dilución 0.1:100 TMT⁶-127
 - c) Dilución 1: 100 TMT⁶-128

33. Se calentaron las muestras en el microondas durante 10 segundos a 700 watts.
34. Posteriormente se adicionaron 8 μ l de hidroxilamida al 5% (para ver su preparación ver anexo 11.5.5).
35. Las muestras se almacenaron a -80°C hasta su uso.

6.3.7.5 LC/FT-MS/MS

El análisis de las isoformas de la GH en muestras de vítreo de babuinos se realizó con una bomba splitless de nano - LC -2D (Eksigent , Livermore, CA) , una columna de 50- MID repleta de partículas C18 de 3 a 7 cm, se utilizó una trampa de hibridación lineal con un espectrómetro de masas Fourier transform (FT-MS). El gradiente de fase inversa fue de 2 a 62% de ácido fórmico al 0.1% en acetonitrilo durante 60 minutos a 350 nl/min. Para análisis imparciales, los seis principales iones que eluyeron de manera más abundante fueron fragmentados utilizando una mayor colisión de energía dependiente de los datos de disociación (HCD) en modo centroide (con una resolución de masa 60 000 para los precursores iónicos y 15 000 para los productos de los iones) con una exclusión dinámica y una anchura de aislamiento de cuatro m/z . El análisis de los datos de las proteínas se realizó con un cluster de 10 nodos MASCOTA (Matrix Science, Londres, Reino Unido) para identificar y cuantificar proteínas.

7. RESULTADOS

Los resultados divididos por objetivos se describen a continuación:

7.1 Objetivo 1 biobanco.- Generar una colección de tejidos oculares de pacientes y de babuinos, incluidos los datos relevantes de los bioespecímenes.

Se generó un biobanco de muestras de 152 tejidos oculares frescos provenientes de pacientes del Departamento de Oftalmología del Hospital Universitario “Dr. José Eleuterio González” de la UANL (Cuadro 8). A la par se generó un biobanco de tejidos oculares embebidos en parafina provenientes del Instituto de Oftalmología Fundación Conde de Valenciana IAP (Cuadro 9). Se obtuvieron al menos tres bioespecímenes para cada tejido ocular.

Cuadro 8: Biobanco de tejidos oculares humanos provenientes del Hospital Universitario “Dr. José Eleuterio González” (HU) de la UANL

TEJIDO FRESCO (HU)	CANTIDAD
CONJUNTIVA	8
TENON	8
CÓRNEA	4
ESCLERA	7
HUMOR ACUOSO	30
RED TRABECULAR	3
IRIS	7
COROIDES	3
ÚVEA	4
CRISTALINO	48
VÍTREO	11
RETINA	7
NERVIO ÓPTICO	4
MÚSCULO RECTO	4
MÚSCULO OBLICUO INFERIOR	3
TOTAL	152

Cuadro 9: Biobanco de tejidos oculares humanos provenientes del Instituto de Oftalmología Fundación Conde de Valenciana IAP (IOCV).

TEJIDO EN PARAFINA (IOCV)	CANTIDAD
CONJUNTIVA	125
TENON	2
CÓRNEA	58
ESCLERA	3
HUMOR ACUOSO	NA
RED TRABECULAR	0
IRIS	2
COROIDES	2
ÚVEA	2
CRISTALINO	5
VÍTREO	NA
RETINA	6
NERVIO ÓPTICO	0
MÚSCULO RECTO	0
MÚSCULO OBLICUO INFERIOR	3
TOTAL	209

7.1.1 Datos demográficos de los pacientes.

Se obtuvieron los datos demográficos de los pacientes en base al expediente clínico y al cuestionario. Para los pacientes del HU: el rango de edad fue de 1 a 112 años, la media de edad fue de 33 años. Para los pacientes del IOCV: el rango de edad fue de 1 a 92 años, la media de edad fue de 49.5 años (Figura 14).

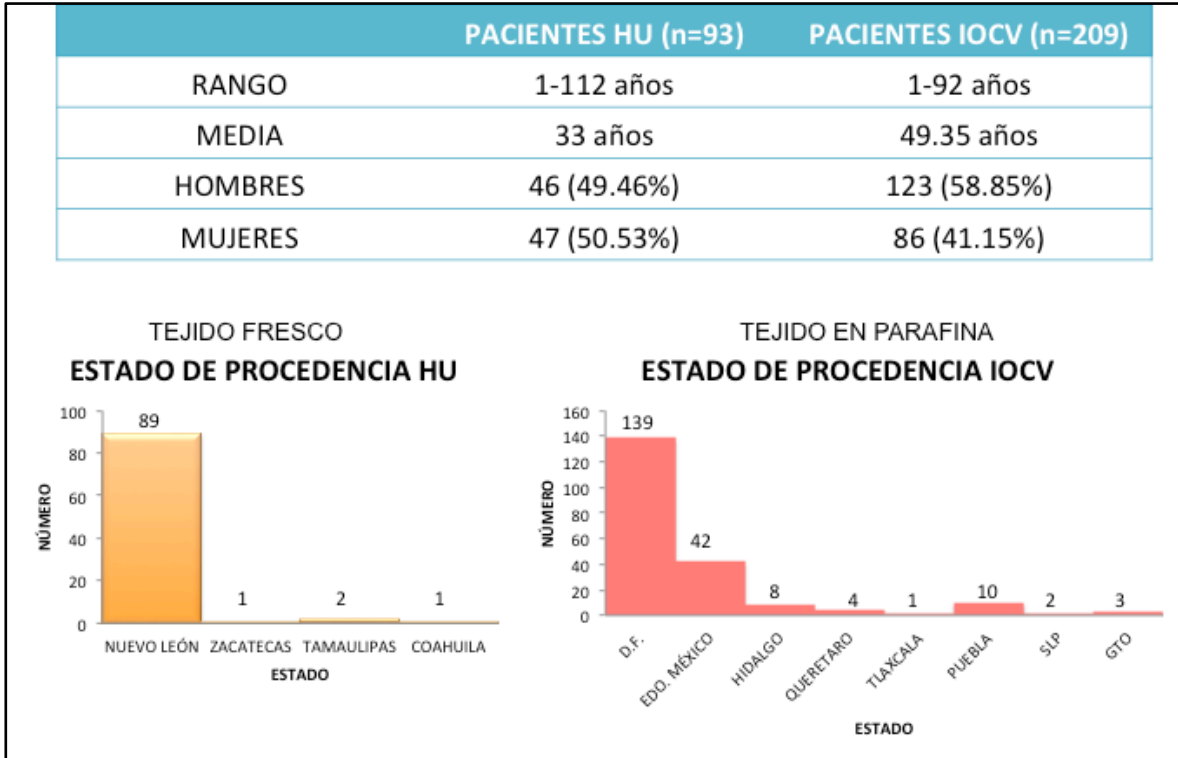


Figura 14: Análisis de los datos demográficos de los pacientes del Hospital Universitario “Dr. José Eleuterio González” (HU) de la UANL y del Instituto de Oftalmología Fundación Conde de Valeniana IAP (IOCV).

7.1.2 Datos clínicos de los pacientes

Para los pacientes del HU la patología más común fue catarata (opacificación total o parcial del cristalino), la cual es motivo de la cirugía oftalmológica más común en México⁸³. Para los pacientes del IOCV la patología más común fue el pterigión. El pterigión es una enfermedad que involucra un cuadro de inflamación crónica, proliferación del tejido conectivo subconjuntival y la presencia de angiogénesis; con una incidencia en regiones ecuatoriales del 22% en la población⁸⁴ (Figura 15).

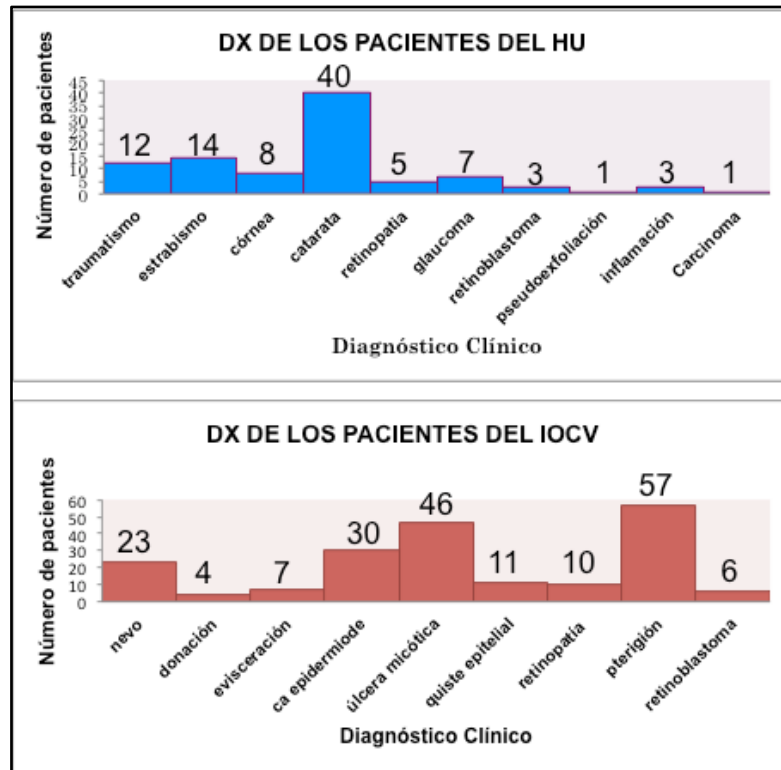


Figura 15: Análisis de los datos clínicos de los pacientes del Hospital Universitario “Dr. José Eleuterio González” (HU) de la UANL y del Instituto de Oftalmología Fundación Conde de Valeniana IAP (IOCV).

7.2 Objetivo 2 expresión génica.- Determinar en los tejidos oculares el nivel de expresión de los genes *GH-1*, *GH-2*, *CSH-1*, *CSH-2* y *GHR*.

7.2.1 PCR cuantitativa en tiempo real (qPCR)

Para investigar si el resto de los genes del locus *GH* también se expresaban en retina, así como en el resto de los tejidos oculares, se realizaron ensayos de qPCR para cada uno de sus genes (*GH-1*, *GH-2*, *CSH-1/CSH-2*) y para el gen *GHR*, utilizando sondas Taqman. Para corroborar que nuestro sistema de expresión funcionaba perfectamente se utilizaron tejidos como controles positivos. Para el caso de *GH-2*, *CHS-1* y *CHS-2* se utilizó como control positivo placenta humana y como control positivo para *GH-1* (Figura 16) se utilizaron adenomas hipofisarios de pacientes; ambos tejidos provinieron de pacientes del HU de la UANL.

Para normalizar los niveles de ARNm por el método ΔCT , se utilizó el gen endógeno beta actina (*ACTB*), el cual se expresó en todos los tejidos oculares como se muestra en la figura 16.

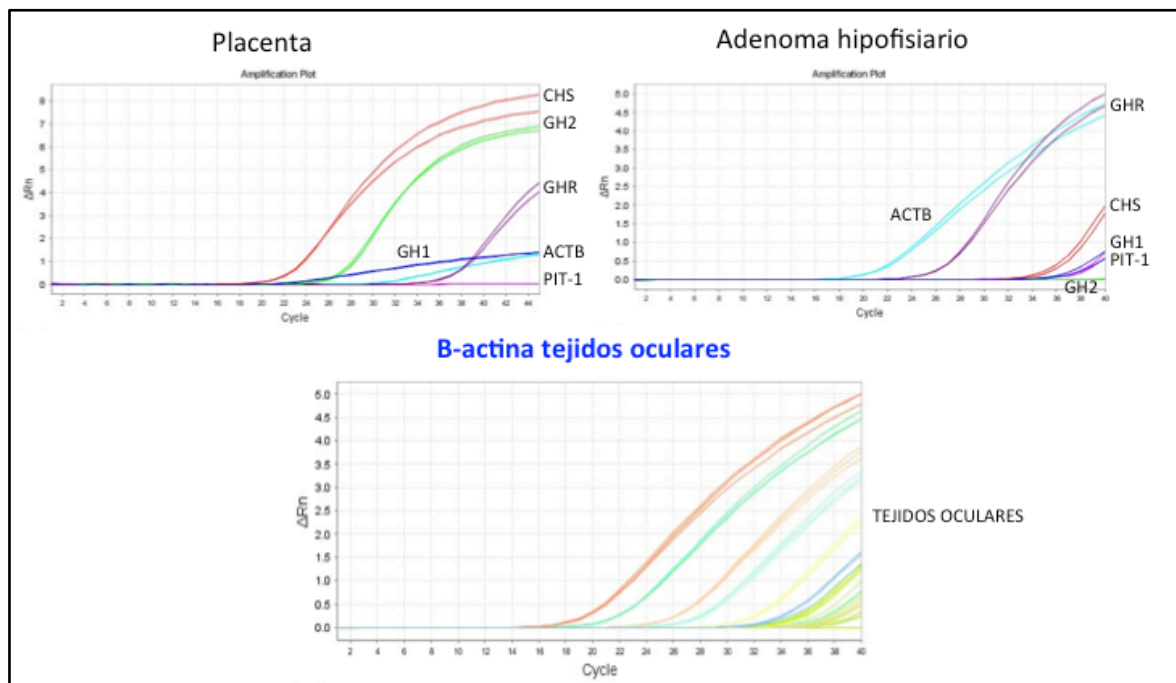


Figura 16: Curvas de amplificación de los controles positivos para el locus *GH* utilizados en este estudio: placenta y adenomas hipofisiarios. Así como la curva de amplificación del gen endógeno utilizado *ACTB*.

Una vez validado nuestro sistema, se prosiguió con los ensayos de expresión para los genes: *GH-1*, *GH-2*, *CSH-1/CHS-2* y *GHR*. En la figura 15 se muestran las curvas de amplificación para cada uno de los genes analizados con sus respectivos controles.

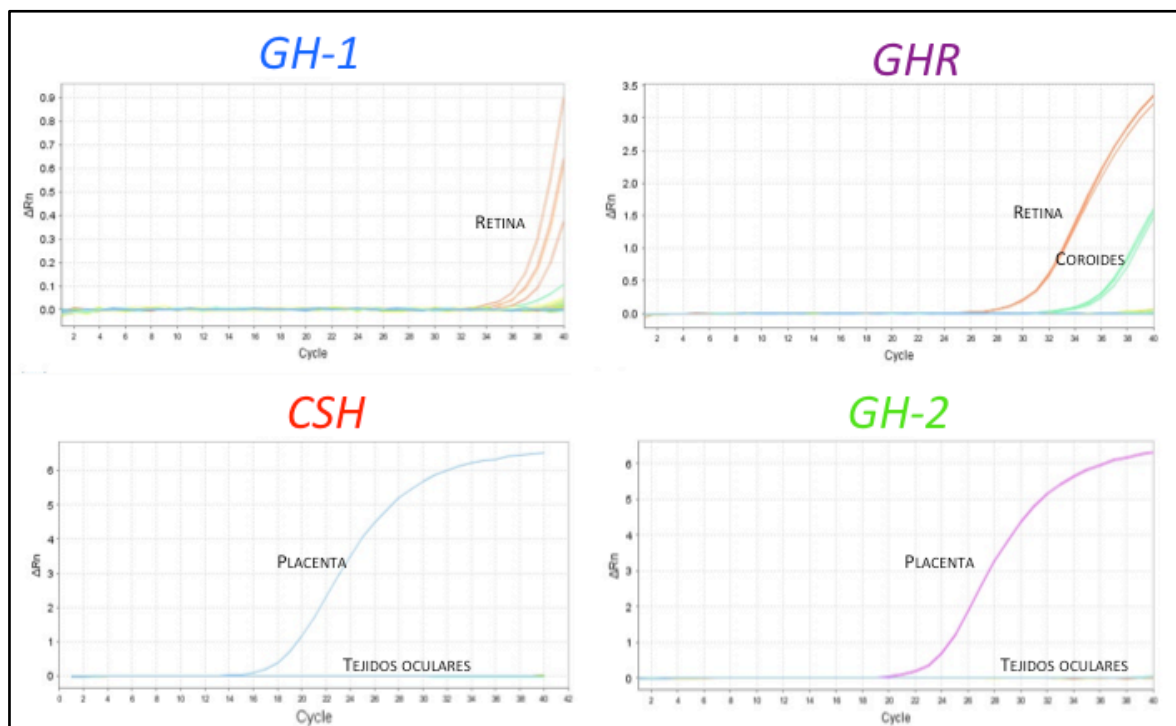


Figura 17: Curvas de amplificación de las muestras para los genes del locus *GH* y para el del receptor *GHR*

El ARNm del gen *GH-1* en el humano se encontró en: coroides, retina y trábeculo (Cuadro 10). Un hallazgo interesante es que las retinas provenientes de pacientes con retinoblastoma (en un total de 3 muestras) no presentaron expresión de *GH-1*, lo que apunta a diferencias de expresión de la hormona en esta patología. Para confirmar este hallazgo se requieren más estudios y aumentar el número de muestras.

El ARNm del receptor *GHR* se encontró en: córnea, coroides y retina de tejidos humanos (Cuadro 10). En iris y conjuntiva se identificaron dos tejidos positivos para el ARNm, los cuales provenían de pacientes con traumatismos. En estas muestras pudieran presentarse falsos positivos debido a la contaminación con sangre, ya que los linfocitos T y B expresan *GH*. Estos resultados deberán repetirse en más bioespecímenes del mismo tejido para corroborar estos resultados.

Cuadro 10: Resumen de las cuantificaciones del ARNm por qPCR de los genes del locus GH y GHR.

TEJIDOS	GH1	GH2	CSH	GHR
retina	POS (4/7)	NEG	NEG	POS (4/7)
coroides	POS (3/3)	NEG	NEG	POS (3/3)
red trabecular	POS (3/3)	NEG	NEG	POS (3/3)
córnea	NEG	NEG	NEG	POS (3/4)
iris	NEG	NEG	NEG	POS (2/7)
tenon	NEG	NEG	NEG	POS (1/8)
conjuntiva	NEG	NEG	NEG	POS (1/8)
esclera	NEG	NEG	NEG	NEG
músculo recto	NEG	NEG	NEG	NEG
úvea	NEG	NEG	NEG	NEG
músculo oblicuo inf	NEG	NEG	NEG	NEG
cristalino	NEG	NEG	NEG	NEG



7.2.2 Ensayos de inmunofluorescencia

Para corroborar los hallazgos observados por qPCR y determinar las estirpes celulares en donde se encontraban las proteínas GH y su receptor GHR, se realizaron ensayos de inmunofluorescencia utilizando anticuerpos específicos para cada una de las proteínas. Como controles positivos de inmunotinción se usaron los tejidos de placenta y adenoma hipofisiario de humanos (Figura 18). La presencia de GH se esperaba manifestar en forma de gránulos citoplasmáticos en toda la célula, preferentemente de distribución periférica. Las células positivas para GH en hipófisis, los somatótrofos, son células heterogéneas en cuanto a forma, tamaño y distribución en la hipófisis. El receptor a su vez se encontró en somatótrofos, lactótrofos y gonadotropos, lo cual ya estaba previamente reportado⁸⁵. En el caso de placenta el GHR se encuentra en la membrana del sincitiotrofoblasto, la cual se caracteriza por ser multinucleada, esto corresponde a lo que ya se había reportado anteriormente⁸⁶; sin embargo lo que sí fue sorprendente fue encontrar la presencia de GH-1, lo cual no estaba reportado, por lo que estos resultados deberán repetirse con un mayor número de bioespecímenes, así como con otras técnicas.

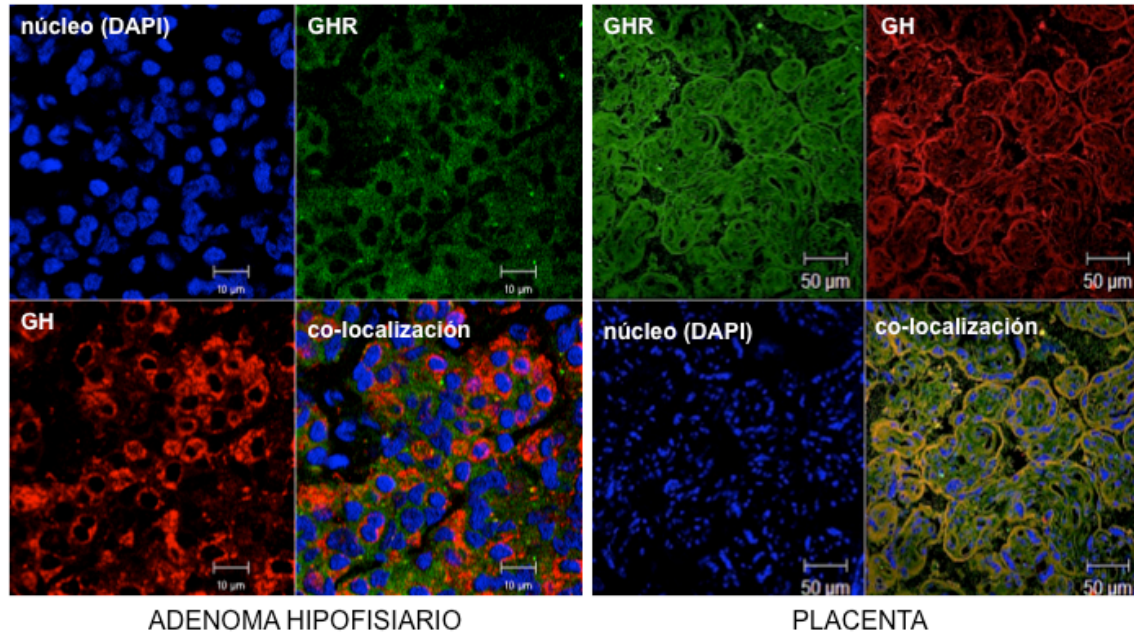


Figura 18: Microscopía confocal que muestra la inmunoreactividad de la GH y GHR en los controles positivos placenta e hipófisis. Se muestra la doble inmunotinción para GH (rojo) y el GHR (verde) en adenoma hipofisario y placenta utilizados como controles positivos

En los ensayos de inmunofluorescencia la GH se encontró en coroides y retina de tejidos humanos (Figura 19), concordando con los resultados por qPCR (Cuadro 11). La presencia de GHR se localizó en: coroides, retina y córnea.

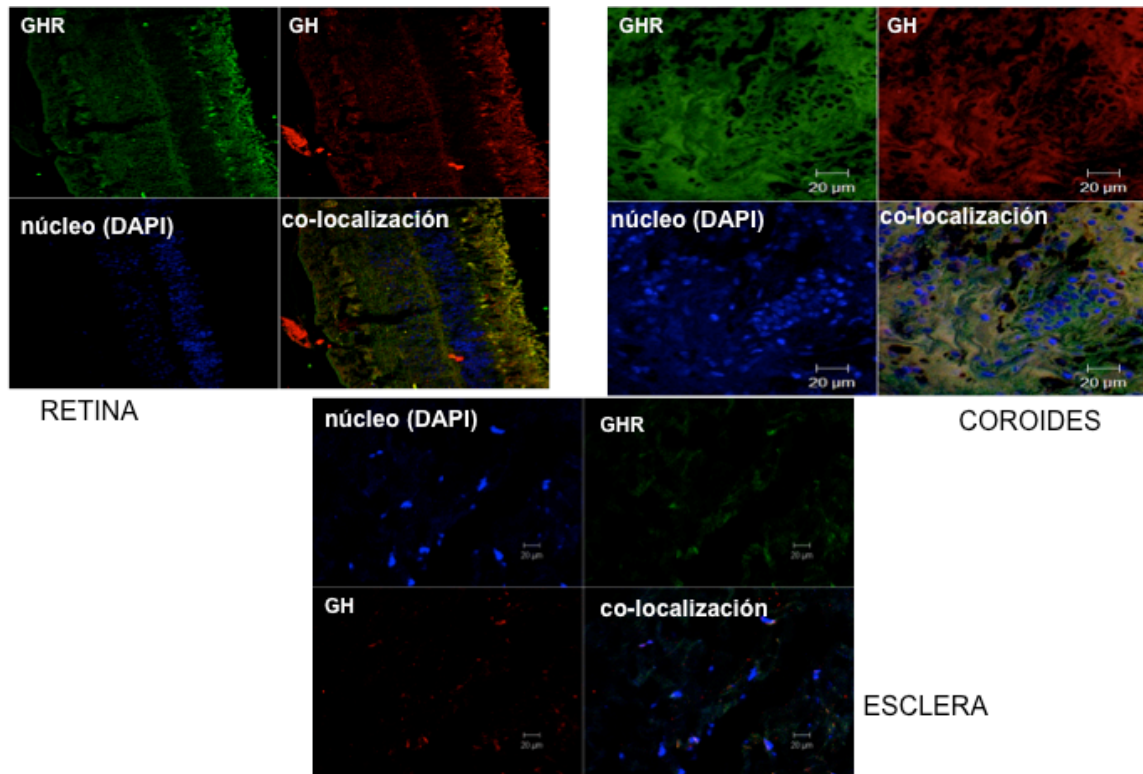


Figura 19: Microscopía confocal que muestra la inmunoreactividad de la GH y GHR en los controles positivos placenta e hipófisis. Se muestra la doble inmunotinción para GH (rojo) y el GHR (verde) en: retina, coroides y esclera.

Para descartar que la fluorescencia observada en conos y bastones, no se debía a inespecificidades, se incluyeron dos controles negativos: el preabsorbido (el anticuerpo primario se incubó con 250 mg de HGH recombinante, posteriormente esta mezcla se colocó en la muestra), el cual no mostró ninguna señal, indicando que no hay inespecificidades por parte del anticuerpo primario; como control negativo del anticuerpo secundario se incubó un corte en leche 1X sin anticuerpo primario, en donde tampoco se observó señal (Figura 20).

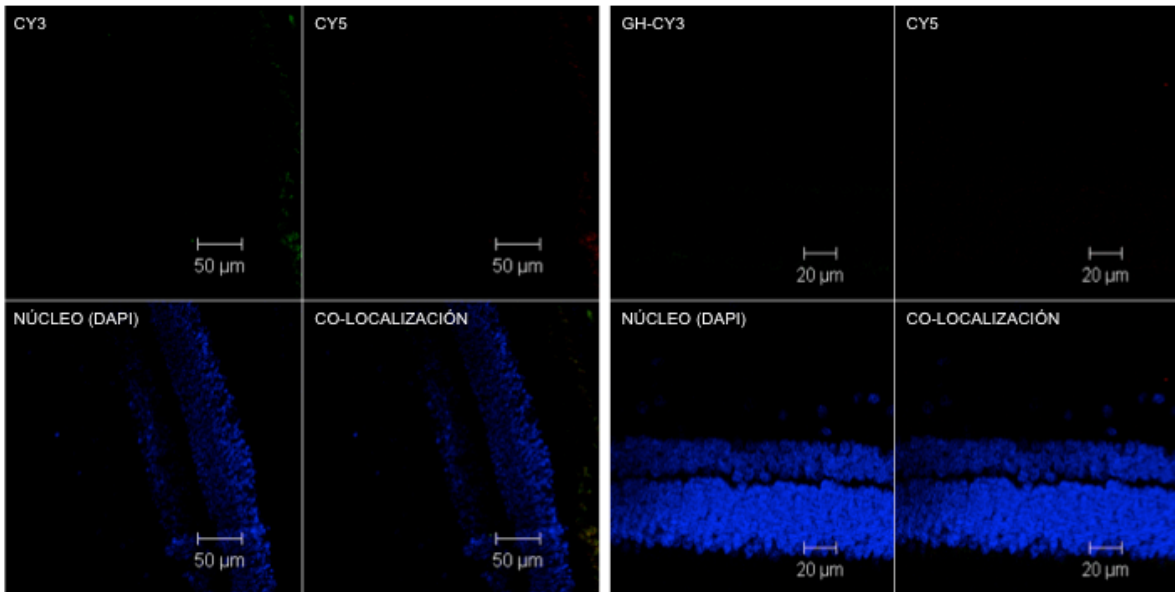


Figura 20: Microscopía confocal que muestra la inmunoreactividad de los controles negativos. Se muestra el negativo para los anticuerpos secundarios Cy3 y Cy5 en la figura de lado izquierdo y el preabsorbido de lado derecho.

Se llevaron a cabo dobles inmuntinciones de GH con anticuerpos específicos para cada uno de los tipos celulares: GFAP (del inglés *glial fibrillary acidic protein*) que es específico de astrocitos, III B tubulina, el cual es específico de células de tipo neuronal⁸⁷ y gama sinucleina, que es específico de células ganglionares⁴⁷ (Figura 21).

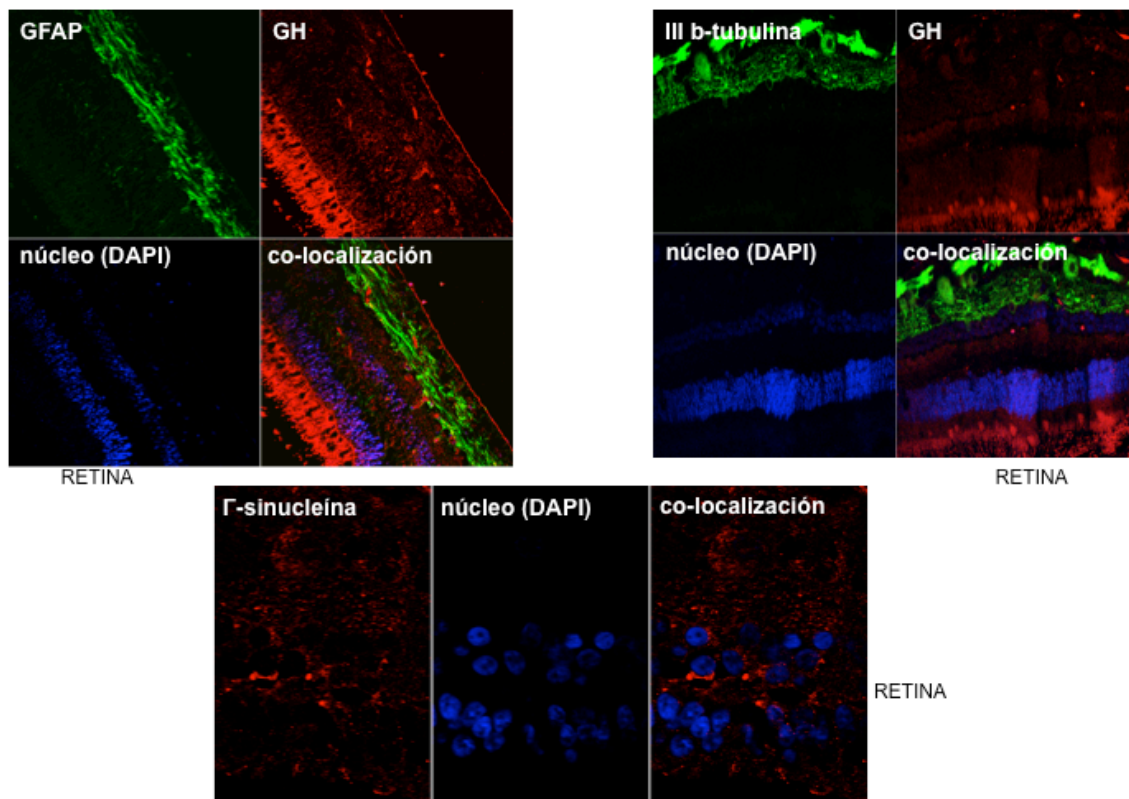


Figura 21: Microscopía confocal que muestra la inmunoreactividad de los controles positivos. Se muestra la doble inmunotinción para GH (rojo) y GFAP (verde), III B-tubulina (verde) y gamma-sinucleína (rojo) en retina de humano.

A continuación en el cuadro 11 se muestra un resumen de los resultados de las inmunofluorescencias en los tejidos oculares humanos.

Cuadro 11: Resumen de los resultados de las inmunofluorescencias

TEJIDOS	GH1	GHR
retina	POS	POS
coroides	POS	POS
córnea	NEG	POS
iris	NEG	NEG
conjuntiva	NEG	NEG
esclera	NEG	NEG
músculo recto	NEG	NEG
úvea	NEG	NEG
músculo oblicuo inf	NEG	NEG
cristalino	NEG	NEG



7.3 Objetivo 3 regulación génica.- Investigar si factores y mecanismos que participan en la regulación del locus GH en la hipófisis y placenta, se encuentran presentes en el ojo.

7.3.1 PCR cuantitativa en tiempo real (qPCR)

Para indagar si el factor de expresión pituitaria Pit-1 estaba involucrado en la regulación de la GH ocular, se realizaron ensayos de qPCR en los distintos tejidos oculares humanos y como control positivo se utilizaron muestras de adenomas hipofisarios (Figura 22). Ninguno de los tejidos oculares expresó *Pit-1*.

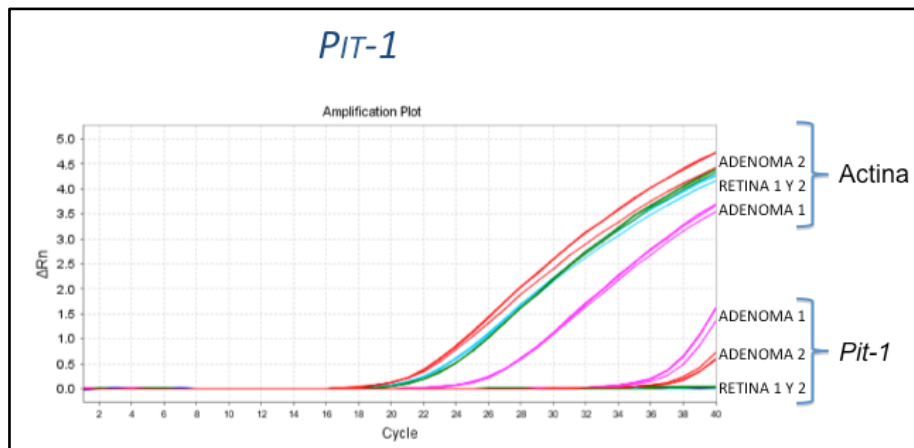


Figura 22: Curvas de amplificación de tejidos oculares humanos para el gen *Pit-1*. Donde como control positivo se utilizaron muestras de adenomas hipofisarios

Debido a que no se encontró la expresión de *Pit-1* en las condiciones experimentales utilizadas, y que el ojo posee tejidos de tipo neuronal, se indagó si el ojo humano expresaba algunos de los neurotransmisores hipotalámicos que regulan la liberación e inhibición de la GH en hipófisis. Se realizaron ensayos de qPCR para determinar si los distintos tejidos oculares humanos expresaban ARNm de *GHRH* (del inglés *growth hormone releasing hormone*), con su respectivo receptor *GHRHR* (del inglés *growth hormone releasing hormone receptor*), y de *SST* (del inglés *somatostatin*), con sus respectivos receptores (*SSTR1-SSTR5*) (Figura 23).

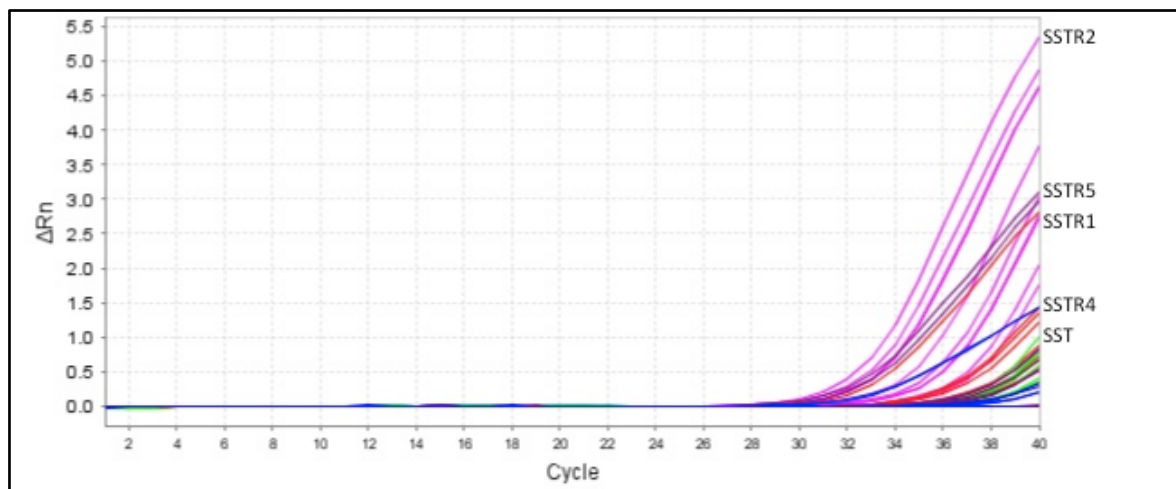


Figura 23: Curva de amplificación de tejidos oculares humanos para los genes SST y sus receptores (*SSTR1-SSTR5*).

Para *SST* el ARNm se encontró en: retina, coroides úvea y córnea. El ARNm del receptor *SSTR1* se identificó en coroides, retina y úvea. Para *SSTR3* tanto el ARNm como la proteína se identificaron en coroides, úvea, retina y córnea. Los ARNMs de *SSTR2*, *SSTR4*, *SSTR5*, *GHRH* y *GHRHR* se identificaron en coroides y retina (Cuadro 12).

Cuadro 12: Resumen de los ensayos de qPCR para *Pit-1* y otros posibles reguladores

TEJIDOS	<i>PIT-1</i>	<i>SST</i>	<i>SSTR1</i>	<i>SSTR2</i>	<i>SSTR3</i>	<i>SSTR4</i>	<i>SSTR5</i>	<i>GHRH</i>	<i>GHRHR</i>
retina	NEG	POS	POS	POS	POS	POS	POS	POS	POS
coroides	NEG	POS	POS	POS	POS	POS	POS	POS	POS
úvea	NEG	POS	POS	POS	POS	NEG	NEG	NEG	NEG
córnea	NEG	POS	POS	NEG	POS	NEG	NEG	NEG	NEG
esclera	NEG	NEG	POS	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG
tenon	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG
conjuntiva	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG
red trabecular	NEG	NEG	POS	POS	POS	POS	NEG	NEG	NEG
músculo Recto	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG
iris	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG
músculo oblicuo inf	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG
crystalino	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG

7.3.2 Ensayos de inmunofluorescencia

Para corroborar los hallazgos observados por qPCR y determinar las estirpes celulares en donde se encontraban las proteínas GHRH, GHRHR, SST y sus receptores SSTR1- SSTR5, se realizaron ensayos de inmunofluorescencia utilizando anticuerpos específicos para cada una de las proteínas antes mencionadas (Figuras de la 24 a la 26).

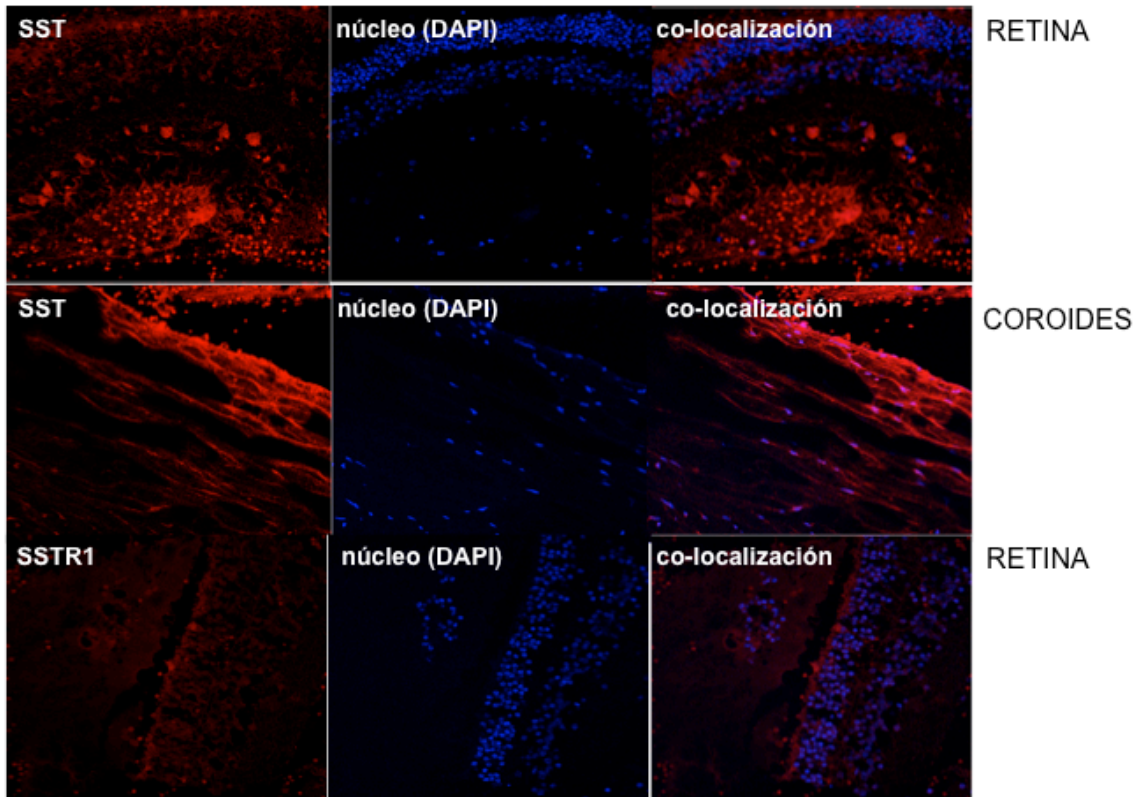


Figura 24: Microscopía confocal que muestra la inmunoreactividad de SST y SSTR1 en tejidos oculares humanos. Se muestra la inmunotinción para SST (rojo) en retina y coroides; y el receptor SSTR1 para retina.

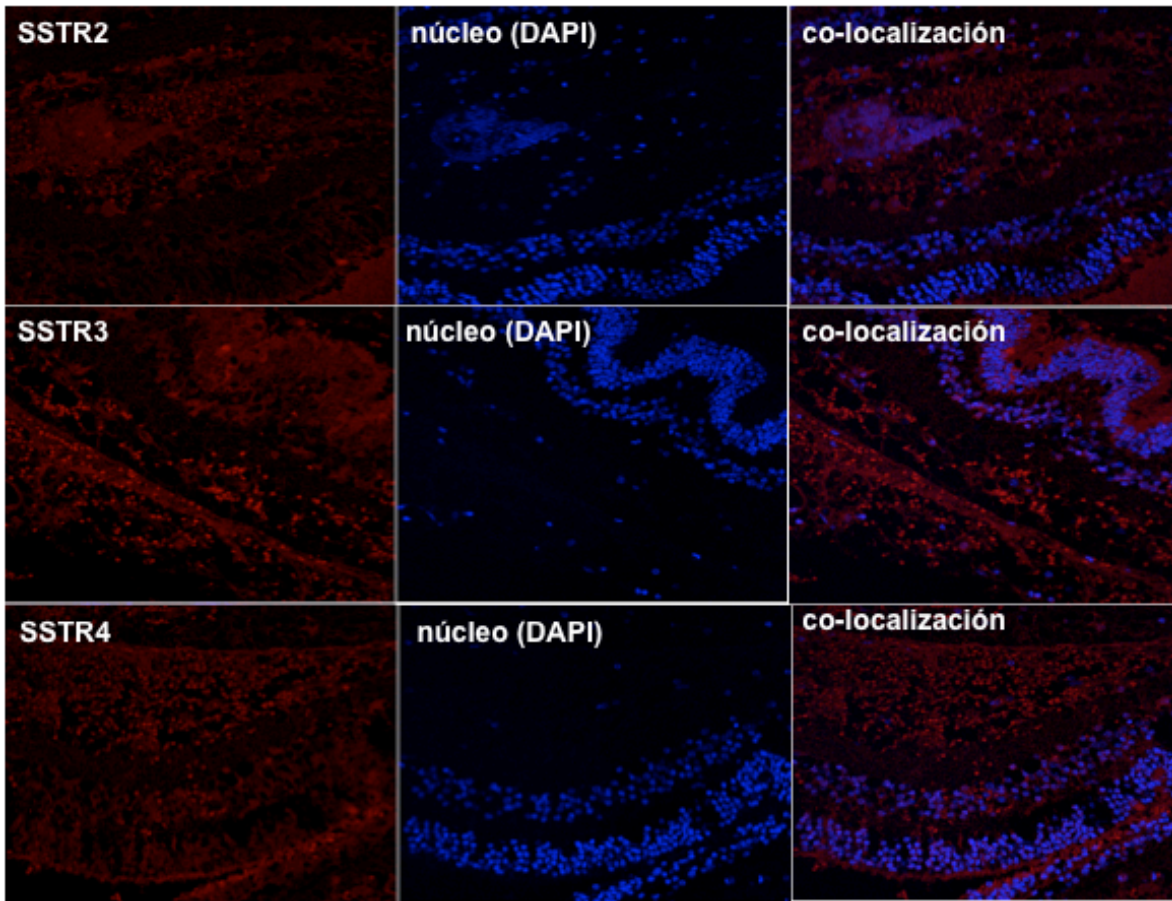


Figura 25: Microscopía confocal que muestra la inmunoreactividad de SSTR2, SSTR3 y SSTR4 en retina humana. Se muestra la inmunotinción para SSTR2 (rojo), SSTR3 (rojo) y SSTR4 (rojo) en las diferentes estirpes celulares de la retina.

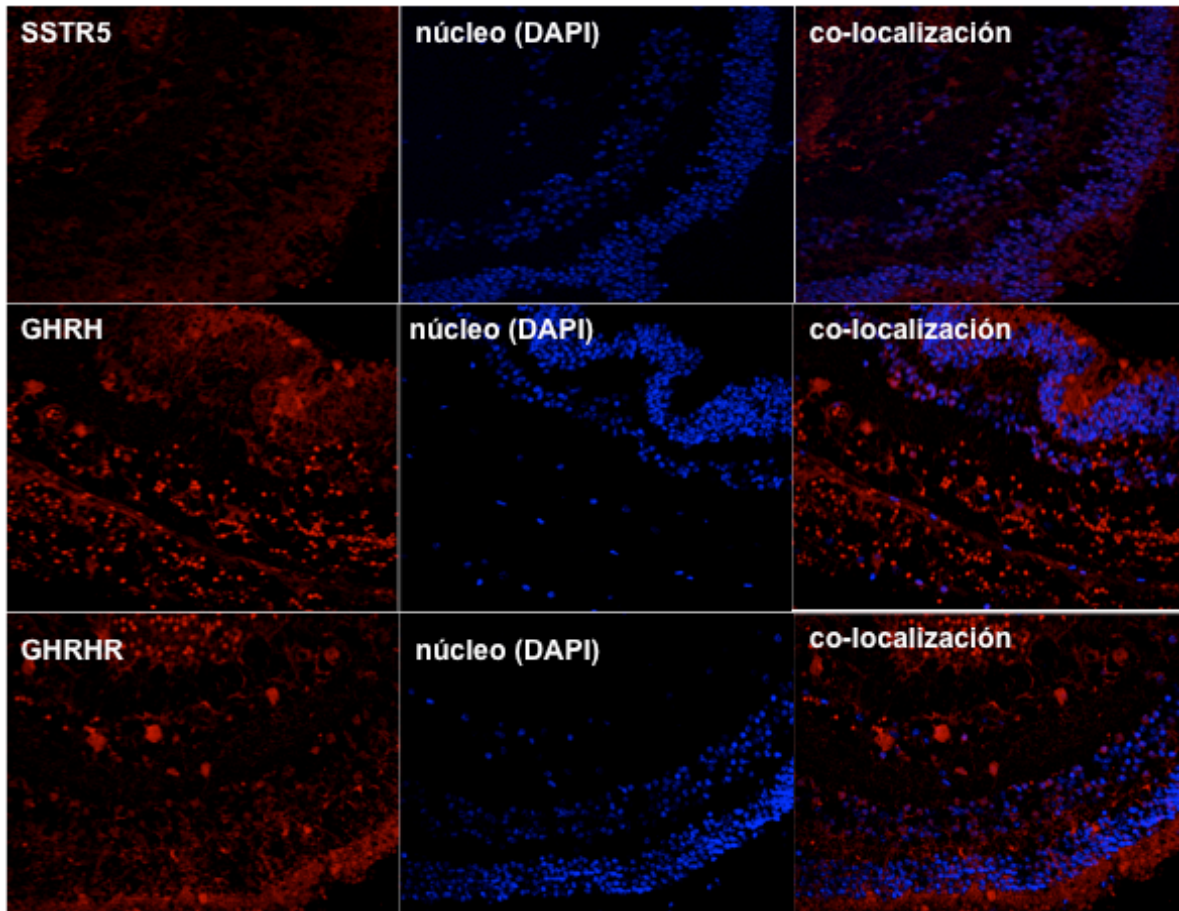


Figura 26: Microscopía confocal que muestra la inmunoreactividad SSTR5, GHRH y GHRHR en retina humana. Se muestra la inmunotinción para SSTR5 (rojo), GHRH (rojo) y GHRHR (rojo) en las diferentes estirpes celulares de la retina.

En los ensayos de inmunofluorescencia para SST se comprobó señal en coroides, retina y córnea (Cuadro 13), concordando con los resultados por qPCR (Cuadro 12). La presencia del receptor SSTR1 se encontró en coroides, retina y esclera, lo cual concuerda con lo observado por qPCR. El receptor SSTR2 se observó en retina y coroides (lo cual también concuerda con lo observado por qPCR). El receptor SSTR3 se identificó en retina, coroides y córnea (lo cual también coincide con lo observado por qPCR); las proteínas SSTR4, SSTR5, GHRH y GHRHR se identificaron sólo en retina y coroides.

Otro hallazgo interesante es que las proteínas analizadas se hallaron en todas las estirpes celulares de la retina, teniendo una mayor intensidad en conos y bastones; al igual que la GH.

Tabla 13: Resumen de los ensayos de inmunofluorescencia para posibles reguladores

TEJIDOS	SST	SSTR1	SSTR2	SSTR3	SSTR4	SSTR5	GHRH	GHRHR
retina	POS	POS	POS	POS	POS	POS	POS	POS
coroides	POS	POS	POS	POS	POS	POS	POS	POS
córnea	POS	NEG	NEG	POS	NEG	NEG	NEG	NEG
esclera	NEG	POS	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG
conjuntiva	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG
músculo recto	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG
iris	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG
músculo oblicuo inf	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG
crystalino	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG

7.4 Objetivo 4 modelo animal.- Corroborar estos hallazgos en el modelo experimental del babuino.

Debido a que la mayoría de los tejidos oculares humanos provenían de pacientes con alguna patología y para validar al babuino como modelo para estudiar la biología molecular del locus *GH*, se generó un biobanco de muestras de tejidos oculares frescos provenientes de 6 ojos de babuinos (*Papio hamadryas*) provenientes del TBRI (Cuadro 14). Como controles positivos se utilizaron tejidos de pituitarias de babuinos (Cuadro 15).

Cuadro 14: Biobanco de tejidos oculares oculares de babuinos.

fecha de colecta	ID del animal	edad y género
12/02/2013	15607	hembra, 17 años
13/02/13	14871	hembra, 15 años
20/03/13	27845	hembra, 7 años
21/03/13	27927	hembra, 7 años
26/03/13	28347	hembra, 7 años

Cuadro 15: Biobanco de tejidos hipofisarios de babuinos.

fecha de colecta	ID del animal	edad y género
30/10/2002	1X2942	hembra, 34 años
13/12/2002	1X1962	hembra, 40 años
05/09/2002	2X0281	hembra, 30 años
29/08/2002	1X2199	hembra, 35 años
28/08/2003	1X1927	hembra, 36 años
12/08/2003	2X0209	hembra, 32 años
13/08/2003	1X2574	hembra, 35 años

7.4.1 PCR cuantitativa en tiempo real (qPCR)

Al igual que el humano, se investigó si el resto de los genes del locus GH también se expresaban en retina, así como en el resto de los tejidos oculares. Se realizaron ensayos de qPCR para cada uno de los genes utilizando sondas Taqman (Figura 27). Como control positivo para GH y GHR se utilizó cDNA proveniente de pituitarias de baboon y como control positivo para las hormonas placentarias: GH-2, CHS-1 y CSH-2, se optó por cDNA proveniente de placenta humana; esto debido a que no se contaba con este tejido del babuino.

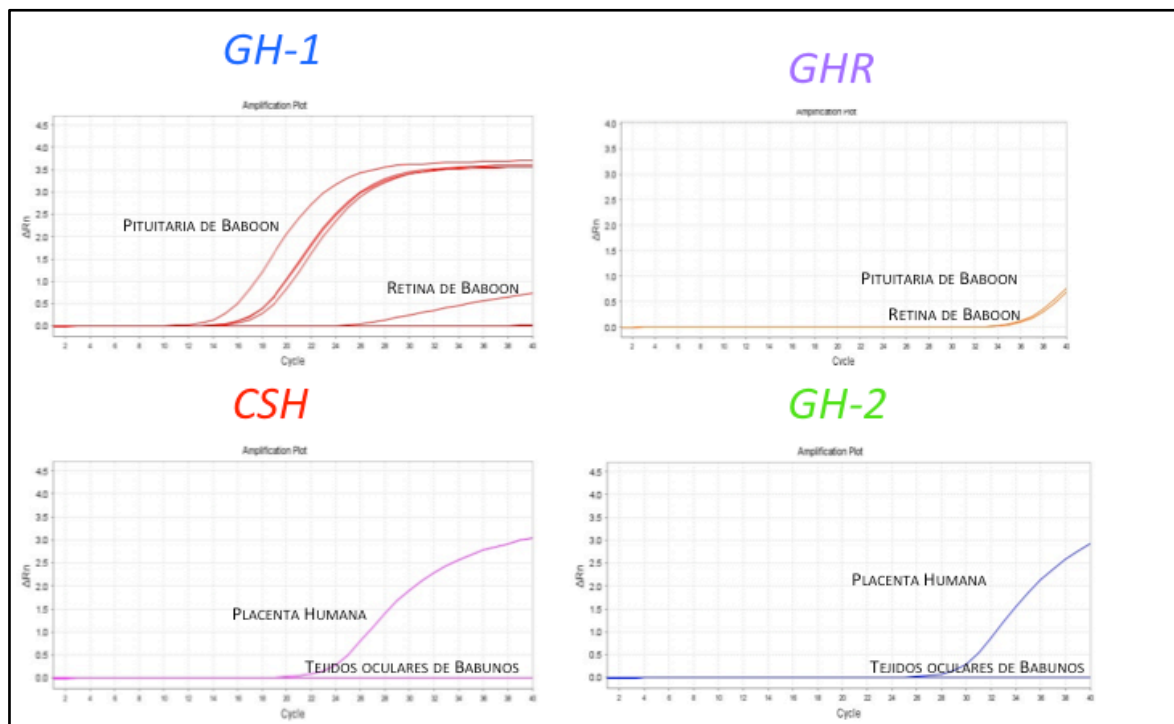


Figura 27: Curva de amplificación de tejidos oculares de babunos para los genes: *GH-1*, *GH-2*, *CSH-1/CSH-2* y *GHR*.

El ARNm de *GH-1* en el babuino se encontró en retina-coroides. En el babuino para los ensayos de biología molecular no se pudieron separar las capas retina y coroides debido a que en UTSA no se contaba con el equipo necesario para realizar la microdissección, y es por eso que tampoco se tuvo acceso a trabéculo. Para *GHR*, éste se identificó en córnea, coroides y retina. Estos hallazgos concuerdan con lo encontrado en el humano (Cuadro 16).

Tabla 16: Resumen de los ensayos de qPCR en babuino

TEJIDOS	<i>GH1</i>	<i>GH2</i>	<i>CSH</i>	<i>GHR</i>
retina-coroideas*	POS	NEG	NEG	POS
córnea	NEG	NEG	NEG	POS
iris	NEG	NEG	NEG	NEG
conjuntiva	NEG	NEG	NEG	NEG
esclera	NEG	NEG	NEG	NEG
nervio óptico	NEG	NEG	NEG	NEG
cristalino	NEG	NEG	NEG	NEG

Nota: En verde se señala coincidencia con el humano

Para corroborar los hallazgos observados por qPCR en tejidos oculares humanos y validar el modelo animal, se realizaron estos ensayos determinado por sondas Taqman la expresión de los siguientes genes del babuino: *Pit-1*, *GHRH*, *GHRHR*, *SST* y de sus receptores *SSTR1*- *SSTR5* (Figura 28).

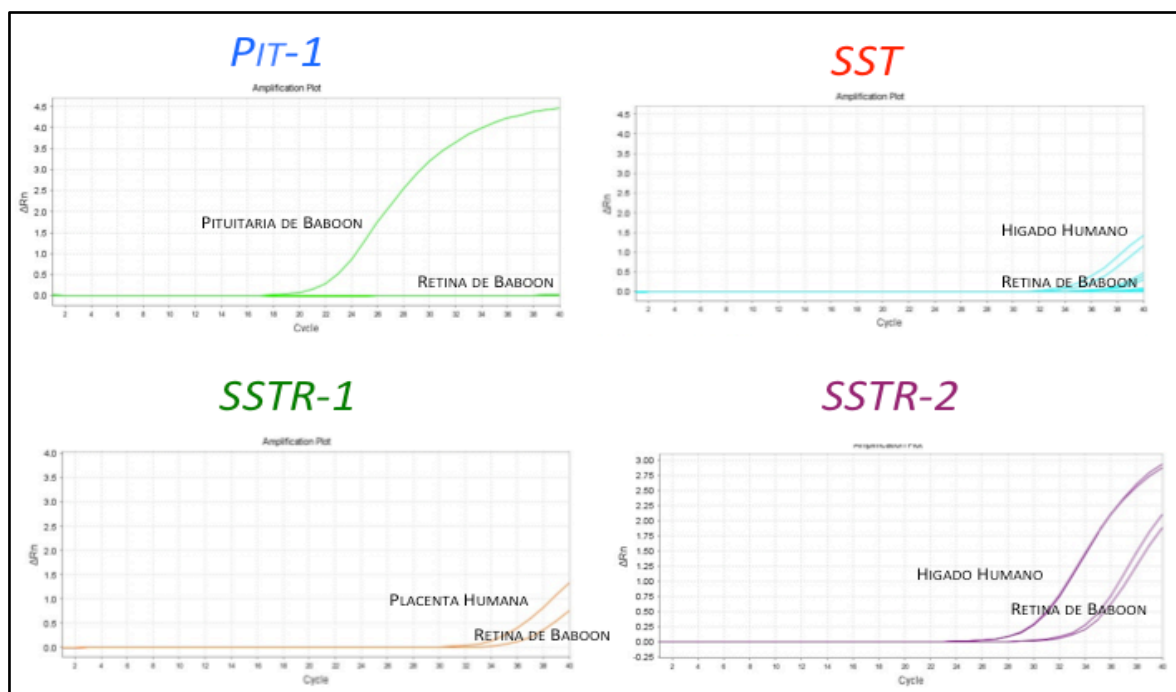


Figura 28: Curva de amplificación de tejidos oculares de babuinos para los genes: *Pit-1*, *GHRH*, *GHRHR*, *SST* y sus receptores (*SSTR1*-*SSTR5*).

El ARNm de SST y el receptor SSTR1 se detectaron en retina-coroides y nervio óptico del babuino. Estos hallazgos concuerdan con lo encontrado en humano. Para SSTR3 se identificó el receptor en retina-coroides, córnea, nervio óptico, conjuntiva, córnea, iris y cristalino (siendo estos últimos negativos para el humano).

Los ARNms de SSTR2, SSTR4, SSTR5, GHRH y GHRHR del babuino, se identificaron en retina-coroides, al igual que el humano. En el babuino no se encontró la expresión de Pit-1, por lo que al parecer, ni en humanos ni tampoco en babuinos la regulación de la GH es independiente de Pit-1.

Cuadro 17: Resumen de los ensayos de qPCR en babuinos para Pit-1 y otros posibles reguladores

TEJIDOS	PIT-1	SST	SSTR1	SSTR2	SSTR3	SSTR4	SSTR5	GHRH	GHRHR
retina-coroides	NEG	POS	POS	POS	POS	POS	POS	POS	POS
córnea	NEG	NEG	NEG	NEG	POS	NEG	NEG	NEG	NEG
iris	NEG	NEG	NEG	NEG	POS	NEG	NEG	NEG	NEG
conjuntiva	NEG	NEG	POS	NEG	POS	NEG	NEG	NEG	NEG
esclera	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG
nervio óptico	NEG	NEG	POS	NEG	POS	NEG	NEG	NEG	NEG
cristalino	NEG	NEG	NEG	NEG	POS	NEG	NEG	NEG	NEG

Nota: En verde se señala coincidencia con el humano

7.4.2 Ensayos de inmunofluorescencia

Para corroborar los hallazgos observados por qPCR y determinar las estirpes celulares del ojo del babuino en donde se encontraban las proteínas GH, GHR, GHRH, GHRHR, SST y sus receptores (SSTR1- SSTR5), se realizaron ensayos de inmunofluorescencia utilizando anticuerpos específicos para cada una de las proteínas antes mencionadas (Figura 29 y 30).

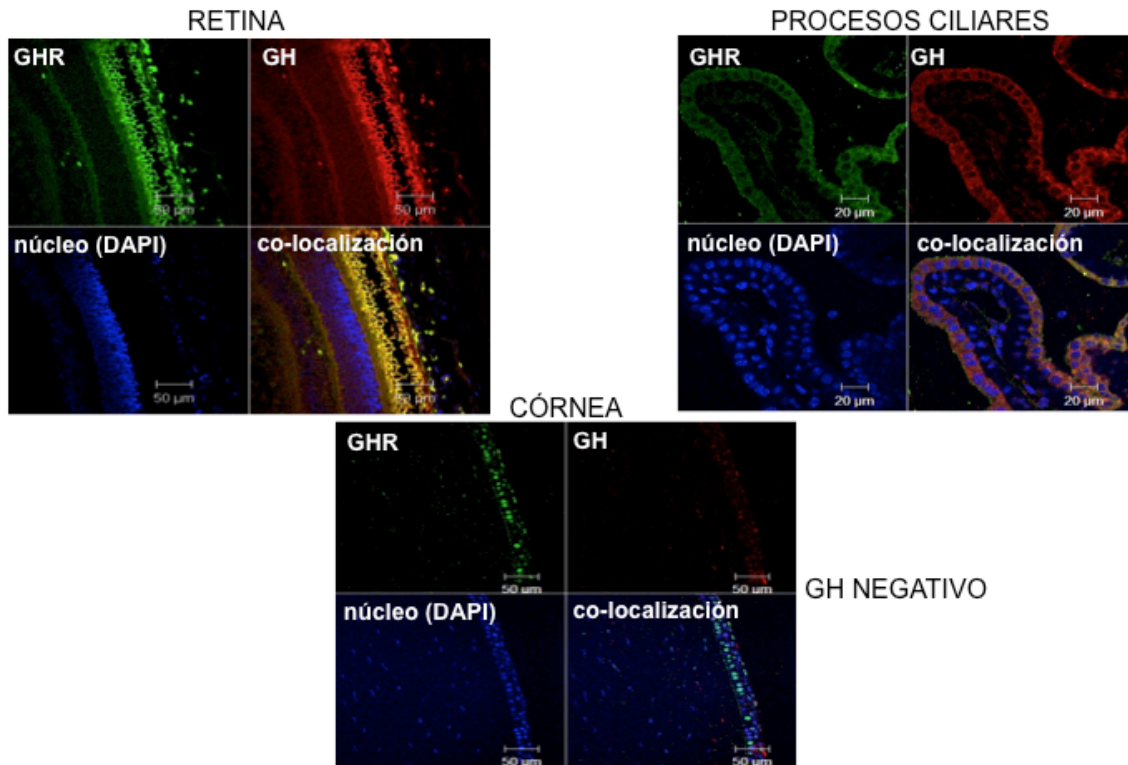


Figura 29: Microscopía confocal que muestra la inmunoreactividad de GH y GHR en tejidos oculares de babuinos. Se muestra la inmunotinción para GH (rojo), GHR (verde) en distintos tejidos oculares de babuinos: córnea, retina y procesos ciliares.

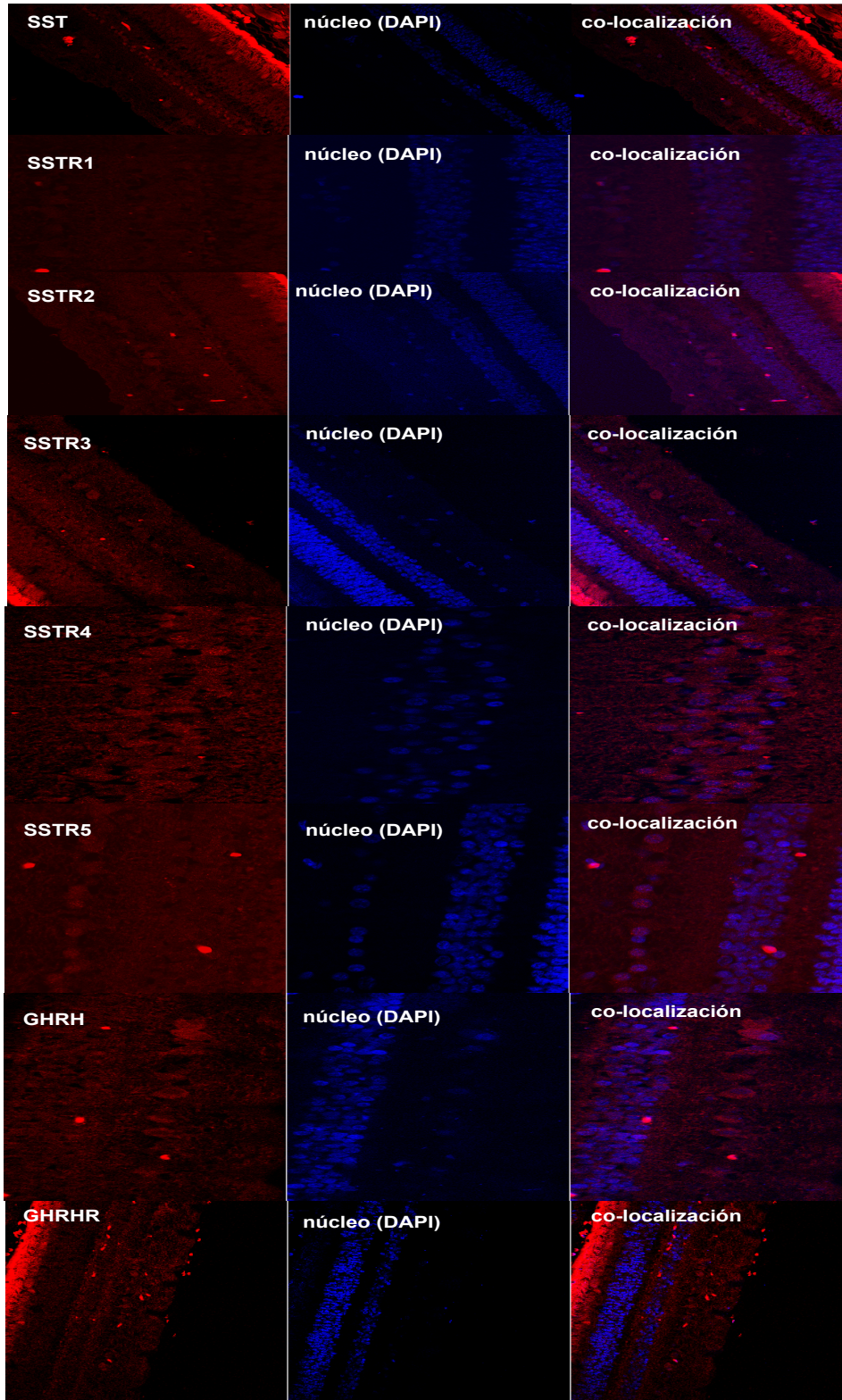


Figura 30: Microscopía confocal que muestra la inmunoreactividad de SST, sus receptores (SSTR1-SSTR5), GHRH y GHRHR en tejidos oculares de babuinos. Se muestra la inmunotinción para GH (rojo), GHR (verde) en distintos tejidos oculares de babuinos: córnea, retina y procesos ciliares.

La presencia de GH y GHR se detectó en células ganglionares y en otras estirpes celulares de la retina del babuino (conos y bastones, amacrinas y bipolares). También se encontró en córnea, al igual que en humanos. Sin embargo, de igual forma se encontraron estas dos proteínas en procesos ciliares, que son células encargadas de formar el humor acuoso.

Las proteínas SST y SSTR1 se encontraron en retina, coroides y nervio óptico (concordando con lo observado en los ensayos de qPCR). Mientras que SSTR3 se identificó en retina, coroides y conjuntiva. Estos resultados no concuerdan con lo observado por qPCR, por lo que se impone repetir estos ensayos para salir de dudas.

Las proteínas SSTR2, SSTR4, SSTR5, GHRH y GHRHR se identificaron en coroides y retina del babuino (Cuadro 18). Los mismos hallazgos se observaron en el humano.

Cuadro 18: Resumen de los ensayos de inmunofluorescencia en tejidos oculares de babuinos.

TEJIDOS	GH	GHR	SST	SSTR1	SSTR2	SSTR3	SSTR4	SSTR5	GHRH	GHRHR
retina-coroides	POS	POS	POS	POS	POS	POS	POS	POS	POS	POS
córnea	NEG	POS	NEG	NEG	NEG	POS	NEG	NEG	NEG	NEG
iris	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG
conjuntiva	NEG	NEG	POS	NEG	NEG	POS	NEG	NEG	NEG	NEG
esclera	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG
crystalino	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG

Nota: En verde se señala coincidencia con el humano

7.4.3 Ensayos de proteómica

Se realizaron ensayos de proteómica en vítreo de babuinos para determinar las isoformas de GH presentes en ojo y para descartar la posibilidad de la presencia de otros miembros del locus *GH* (los cuales no se hubieran podido detectar por qPCR). El análisis de las muestras se llevó a cabo por espectrometría de masas por la técnica de LC-FT/MS-MS (Figura 32), con la que sólo se encontró la presencia de la GH-1 de 22 kDa.

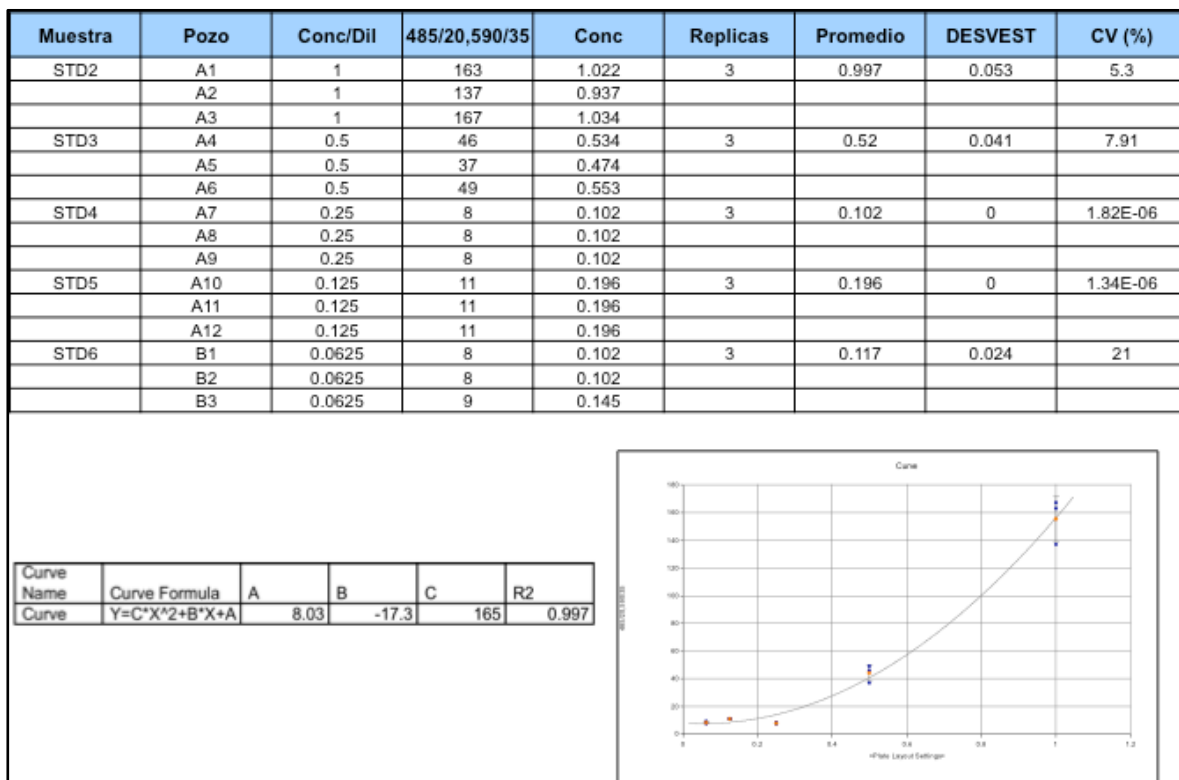


Figura 28: Cuantificación de las muestras de vítreo de babuinos por el método EZQ. Se muestra la curva estándar de BSA a distintas concentraciones de 1 a 0.0625 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$. En el recuadro de la inferior izquierdo se muestra la ecuación de la recta.

Protein View: B1A4G6_HUMAN

Growth hormone 1 isoform 1 OS=Homo sapiens GN=GH1 PE=3 SV=1

Database: Trembl
 Score: 37
 Nominal mass (M_r): 25117
 Calculated pI: 5.29
 Taxonomy: [Homo sapiens](#)

Sequence similarity is available as [an NCBI BLAST search of B1A4G6_HUMAN against nr](#).

Search parameters

MS data file: C:\Data\2013\5_130906222415.raw
 Enzyme: Trypsin: cuts C-term side of KR unless next residue is P.
 Fixed modifications: [Carbamidomethyl \(C\)](#)
 Variable modifications: [Deamidated \(NQ\)](#), [Oxidation \(M\)](#), [TMT6plex \(K\)](#), [TMT6plex \(N-term\)](#)

Protein sequence coverage: 13%

Matched peptides shown in **bold red**.

```

1 MATGSRTSL LAFGLLCLPW LQEGSAFPTI PLSRLFDNAM LRAHRLHQLA
51 FDTYQEFEEA YIPKEQKYSF LQNPQTSLCF SESIPTPSNR EETQQKSNLE
101 LLRISLLLIQ SWLEPVQFLR SVFANSLVYG ASDSNVYDLL KDLEEGIQTL
151 MGRLEDGSPR TGQIFKQTYS KFDINSHNDD ALLKNYGLLY CFRKDMDKVE

```

Figura 29: Resultados de los ensayos de proteómica in vitro de babuinos. Se muestra los datos arrojados al comparar la secuencia detectada con la base de datos NCBI blast, en donde nuestra secuencia proteica coincide con la isoforma 1 de la GH (22 kDa).

8. DISCUSIÓN

1. Expresión extrapituitaria del locus *GH*

La visión de que la GH es sólo secretada por la glándula pituitaria para fungir como un factor endocrino para regular el crecimiento, desarrollo y metabolismo⁹ está cambiando. Ya existen múltiples reportes en la literatura que indican que la GH se expresa en muchos tejidos extrapituitarios²⁹; incluso que ésta y su receptor (GHR) se encuentran en la retina de muchas especies, como pollos, roedores e incluso el humano²⁸. Sin embargo quedan muchas interrogantes por contestar, como: ¿qué pasa con el resto de los genes del locus?, ¿sólo se expresa la GH en retina o también lo hace en otros tejidos oculares?, ¿actúa la GH ocular de manera autocrina y/o paracrina?, ¿cuál es la función de la GH ocular?, ¿existen isoformas en el ojo diferentes a la reportada (22 kDa)?, ¿cuál es el mecanismo de regulación del gen de la GH ocular?, y ¿existen diferentes patrones de expresión del gen de la *GH* en las distintas patologías oculares?; entre otras.

Para contestar las interrogantes antes mencionadas, en el presente trabajo se investigaron muestras de tejidos oculares de humanos y de babuinos. De babuino, porque al igual que el humano, este primate superior posee un locus de *GH* multigénico; además de que fisiológicamente los resultados arrojados en este modelo son extrapolables al humano. Las investigaciones iniciaron generando biobancos de bioespecímenes de ambas especies, procurando coleccionar al menos tres ejemplares de cada tipo de bioespecímen.

2.- Biología molecular del locus *GH* en el ojo

Para descartar la presencia del resto de los genes del locus humano, se realizaron ensayos de expresión por qPCR utilizando sondas específicas para cada uno de los genes miembros del locus (*GH-2*, *CHS-1* y *CSH-2*). Del locus *GH* sólo se detectó la expresión del gen *GH-1*; no sólo en las muestras oculares de humano, sino también en las muestras oculares de babuino. La falta de expresión ocular del resto de los genes en ambos primates es un hallazgo inédito; aunque no es una sorpresa, ya que se ha reportado que en la mayoría de los tejidos extrapituitarios sólo se ha encontrado una GH idéntica a la de la pituitaria (del gen *GH-1*)²⁹. En algunos tejidos humanos, como testículo y ovario, se ha reportado la expresión de los otros genes miembros del locus *GH*, notándose que los ARNm de las hormonas placentarias *CSH-1* y *CHS-2* se expresan en mayor proporción que el de la *GH-1*^{76,77}, lo que indica que estos tejidos poseen su propio

patrón de expresión del locus GH y que las hormonas placentarias probablemente tengan otra función de la que se les ha asignado tradicionalmente⁹.

3.- Localización celular y subcelular

Por medio de ensayos de expresión por qPCR se determinó que el ARNm del gen *GH-1* en el humano no sólo se encuentra en retina, como previamente se había reportado por Harvet y cols.⁴⁷, sino también en otros tejidos oculares, incluidos coroides y trábeculo. En el babuino se encontró en retina-coroides, sin embargo no se pudo corroborar su expresión en trábeculo debido a que no se tuvo acceso a este tejido. Estos hallazgos se confirmaron por medio de ensayos de inmunofluorescencia, que permitieron determinar además las estirpes celulares donde estuviera la GH-1, encontrándose no sólo en células ganglionares de retina (como anteriormente se había reportado)^{47, 48} sino también en las demás estirpes celulares de este tejido, tanto en humanos como en babuinos. Esto difiere de lo que anteriormente se había reportado en humanos⁴⁷, en donde sólo se encontró la presencia de GH y GHR en las células ganglionares de retina. En nuestro caso no sólo encontramos inmunoreactividad (IR) en todas las estirpes celulares de la retina, sino que también una mayor señal en conos y bastones, tanto en babuinos como en humanos. Estos hallazgos apuntan a que la GH pudiera tener otras funciones además de la función neuroprotectora sugerida en células RGC^{59, 60}. Se observó una misma distribución de las proteínas GH y GHR en retina de humanos y babuinos, por lo que probablemente éste sea un efecto conservado en primates.

Otro hallazgo interesante es que la GH y el GHR se encontraron tanto a nivel citoplasmático como a nivel nuclear (tanto en babuinos como en humanos). La presencia de la GH en citoplasma era de esperarse, debido a la traducción de su ARNm por parte de los ribosomas. Sin embargo, la GH nuclear fue un hallazgo inesperado. La IR de GH en núcleo se ha reportado en muchos tejidos extrapituitarios²⁹, al igual que también se ha documentado la presencia de su receptor^{78, 79}. No se ha dilucidado la función del GHR en núcleo, sin embargo se ha propuesto que la GH actúe de manera directa⁷⁹. En pollos⁵⁷ y en ratas²⁸ se ha reportado una IR de GHR a nivel nuclear, así como que muchas citocinas y factores de crecimiento se localizan a nivel nuclear funcionando como factores intracrininos²⁸, por lo que probablemente la GH funcione de manera similar.

Tanto el ARNm como la proteína de GHR se encontraron en córnea, coroides y retina de humanos y babuinos. Un hallazgo importante es la identificación de GHR en las células

basales del epitelio corneal. El epitelio corneal es esencial para la transparencia corneal y se encuentra en continua renovación a lo largo de la vida, derivándose de la población de células madre limboconales⁸⁰. Por lo que se propone que probablemente la GH participe como un factor de proliferación celular en córnea.

Al encontrarse co-expresión del receptor y la hormona se postula acción autocrina de la GH. La expresión del *GHR* también se detectó en tejidos oculares distintos a los de la expresión de *GH*, por lo tanto se postula para estos acción paracrina.

4.-Regulación del locus *GH* en ojo.

La regulación de la GH pituitaria es dependiente del factor de transcripción Pit-1, ya que en su ausencia la GH no se sintetiza en las células somatotrofas de la hipófisis³⁴. Para determinar si la GH ocular en primates estaba regulada por Pit-1, se analizó la expresión del ARNm por medio de ensayos de qPCR. Ninguno de los tejidos oculares expresó este factor. Por lo que se concluye que la regulación de la expresión de la GH ocular es independiente de Pit-1; lo cual era de esperarse, ya que la mayoría de los tejidos extrapituitarios no expresan *Pit-1*³⁴, por lo que se ha propuesto que probablemente factores tejido específicos, diferentes a los descritos, participen en la regulación de esta hormona.

La regulación de la expresión de *GH* es un mecanismo complejo en el que no sólo participan factores de transcripción, sino también neurotransmisores; amén de que la retina es un tejido de tipo neural. Para arrojar luz en este otro tema, se analizó tanto por qPCR como por inmunofluorescencia la presencia del ARNm y proteínas de SST y sus receptores (SSTR1-SSTR5), así como de GHRH y su receptor (GHRHR), localizándolos principalmente en retina y coroides, tanto de humanos como de babuinos (tejidos que también expresaron GH). Se propone que estos dos neurotransmisores podrían estar involucrados en la regulación de la GH ocular. Se ha reportado que en la línea celular QNR/D, que corresponde a RGC de codorniz, al ser incubadas con GHRH recombinante de pollo, se incrementan los niveles de GH⁸¹. En este estudio se determinó la viabilidad celular por la técnica de TUNEL y se observó que al inmunoneutralizar la GH se vio un aumento en la apoptosis; este efecto también se observó cuando en las células se inmunoneutralizó GHRH, concluyendo que GHRH tienen un acción secretagoga en estas células. Sin embargo existen reportes de que aunque GHRH es producida por tejido mamario, la hormona es incapaz de estimular la producción de GH en dicho tejido⁸²; lo que apunta a que probablemente los mecanismos de regulación del gen de la GH

extrapituitaria son distintos a la regulación del gen de la GH de la pituitaria.

5.- Proteómica y GH ocular

Algunos tejidos extrapituitarios que expresan GH como el testículo (en humanos), además de expresar *GH-1* también expresan GH-V; en este tejido en particular se expresan dos productos de splicing alternativo que originaron dos isoformas de la *GH-V*: GH-V2 (230 aa; 26 kDa) y la GH-VD4 (219 aa; 25 kDa). Se ha propuesto que estas isoformas poseen funciones tejido específicas, actuando de manera local regulando la biosíntesis de testosterona y/o la espermatogénesis⁷⁶. Así como que algunas isoformas de GH sean específicas de tejidos y puedan tener funciones diferentes. Debido a esto y para descartar la posibilidad de la presencia de otros miembros del locus *GH* (los cuales no se hubieran podido detectar por qPCR) se realizaron ensayos de proteómica en vítreo de babuinos por la técnica de LC-FT/MS-MS. Se encontró la presencia de únicamente la isoforma de la GH-1 de 22 kDa, por lo que en este primate se descarta la presencia en vítreo de otras isoformas de la GH y/o de los otras hormonas derivables de los otros genes restantes miembros del locus *GH* humano.

9. CONCLUSIONES

De los cinco genes que componen el locus de la *GH* humana, sólo se detectó la expresión de transcritos de *GH-1*, más no así de los genes *GH-2*, *CSH-1*, *CSH-2* y *CHS-L*, descartando la producción de sus respectivas hormonas en el ojo humano y de babuino.

La *GH-1* no sólo se encontró en retina en células ganglionares, sino también en las demás estirpes celulares de este tejido, tanto en humanos como en babuinos. Lo anterior apunta a que la *GH-1* puede tener otras funciones además de la función neuroprotectora en células ganglionares.

En primates, la *GH-1* probablemente actúa de manera autocrina y paracrina, al estar presente su receptor en varios de los tejidos de este órgano.

La expresión del gen de la *GH-1* en el ojo parece ser independiente del factor transcripcional hipofisiario Pit-1. De entre los posibles candidatos a regular están los neurotransmisores GHRH y SST.

Aunque aún falta mucho por entender sobre el papel de la *GH* en el ojo, dados los hallazgos, se postula para ésta una función neuroprotectora en retina, mientras que en el caso de córnea, posiblemente contribuya a su regeneración celular.

10. BIBLIOGRAFÍA

1. Harper ME, Barrera-Saldaña HA, Saunders GF. Chromosomal localization of the human placental lactogen-growth hormone gene cluster to 17q22-24. *Am J Hum Genet.* 1982 Mar;34(2):227-34.
2. Baumann GP. Growth hormone isoforms. *Growth Horm IGF Res.* 2009 Aug;19(4):333-40. Epub 2009 May 24.
3. Baumann G. Growth hormone heterogeneity in human pituitary and plasma. *Horm Res.* 1999;51 Suppl 1:2-6.
4. Barrera Saldaña HA, Seeburg PH, Saunders GF. Two structurally different genes produce the same secreted human placental lactogen hormone. *J Biol Chem.* 1983 Mar 25;258(6):3787-93.
5. Reséndez-Pérez D, Ramírez-Solís R, Varela-Echavarría A, Martínez-Rodríguez HG, Barrera-Saldaña HA. Coding potential of transfected human placental lactogen genes. *Nucleic Acids Res.* 1990 Aug 25;18(16):4665-70
6. Yoo EJ, Cajiao I, Kim JS, Kimura AP, Zhang A, Cooke NE, Liebhaber SA. Tissue-specific chromatin modifications at a multigene locus generate asymmetric transcriptional interactions. *Mol Cell Biol.* 2006 Aug;26(15):5569-79
7. **Atsushi P. Kimura, Stephen A. Liebhaber and Nancy E. Cooke.** Epigenetic Modifications at the Human Growth Hormone Locus Predict Distinct Roles for Histone Acetylation and Methylation in Placental Gene Activation. *Molecular Endocrinology* 2004, 18 (4): 1018-1032.
8. G Untergasser. M Hermann1, H Rumpold and P Berger. Complex alternative splicing of the GH-V gene in the human Testis. *European Journal of Endocrinology* (1998) 139 424–427.
9. Pérez-Ibave DC, Rodríguez-Sánchez IP, Garza-Rodríguez MD, Barrera-Saldaña HA. Extrahypothalamic growth hormone synthesis in humans. *Growth Horm IGF Res.* 2014 Feb 12. pii: S1096-6374(14)00019-7. doi: 10.1016/j.ghir.2014.01.005.
10. M.L. Baudet, B. Martin, Z. Hassanali, E. Parker, E. J. Sanders, and S. Harvey. Expression, Translation, and Localization of a Novel, Small Growth Hormone Variant. *Endocrinology* 148(1):103–115.
11. Corine M.Lecomte, André Renard and Joseph A.Martial. A new natural hGH variant-17.5 kd-reduced by alternative splicing. An additional consensus sequence which might play a role in branchpoint selection. *Nucleic Acid Research* Volume 15 Number 16 1987.
12. Baumann GP. Growth hormone isoforms. *Growth Horm IGF Res.* 2009 Aug;19(4):333-40. Epub 2009 May 24.
13. G Untergasser. M Hermann1, H Rumpold and P Berger. Complex alternative splicing of the GH-V gene in the human Testis. *European Journal of Endocrinology* (1998) 139 424–427.
14. Ray J, Jones BK, Liebhaber SA, Cooke NE. Glycosylated human growth hormone variant. *Endocrinology.* 1989 Jul;125(1):566-8.
15. Cesar L. Boguszewski, Per-Arne Svensson, Thomas Jansson, Ross Clark, Lena M. S. Carlsson and Björn Carlsson. Cloning of Two Novel Growth Hormone

- Transcripts Expressed in Human Placenta. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 1998 83: 2878-2885, doi: 10.1210/jc.83.8.2878
- Transcripts Expressed in Human Placenta. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 1998 83: 2878-2885, doi: 10.1210/jc.83.8.2878.
16. Corine M.Lecomte, André Renard and Joseph A.Martial. A new natrl hGH varant-17.5 kd-reduced by alternative splicing. An additional consensus sequence which might play a role in branchpoint selection. *Nucleic Acid Research* Volume 15 Number 16 1987.
 17. Nickel BE, Cattini PA. Nuclease sensitivity of the human growth hormone-chorionic somatomammotropin locus in pituitary and placenta suggest different mechanisms for tissue-specific regulation. *Mol Cell Endocrinol.* 1996 Apr 19;118(1-2):155-62.
 18. Nachtigal MW, Nickel BE, Cattini PA. Pituitary-specific repression of placental members of the human growth hormone gene family. A possible mechanism for locus regulation. *Biol Chem.* 1993 Apr 25;268(12):8473-9.
 19. Cattini PA, Yang X, Jin Y, Detillieux KA. Regulation of the human growth hormone gene family: possible role for Pit-1 in early stages of pituitary-specific expression and repression. *Neuroendocrinology.* 2006;83(3-4):145-53. Epub 2006 Oct 13.
 20. Castrillo JL, Bodner M, Karin M. Purification of growth hormone-specific transcription factor GHF-1 containing homeobox. *Science.* 1989 Feb 10;243(4892):814-7.
 21. Lemaigre FP, Courtois SJ, Durvieux SM, Egan CJ, LaFontaine DA, Rousseau GG. Analysis of cis- and trans-acting elements in the hormone-sensitive human somatotropin gene promoter. *J Steroid Biochem.* 1989;34(1-6):79-83.
 22. Bodner M, Karin M. A pituitary-specific trans-acting factor can stimulate transcription from the growth hormone promoter in extracts of nonexpressing cells. *Cell.* 1987 Jul 17;50(2):267-75.
 23. Lemaigre FP, Courtois SJ, Lafontaine DA, Rousseau GG. Evidence that the upstream stimulatory factor and the Sp1 transcription factor bind in vitro to the promoter of the human-growth-hormone gene. *Eur J Biochem.* 1989 May 15;181(3):555-61.
 24. Jesús Devesa, Luis Lima, and Jesús A.F. Tresguerres. Neuroendocrine Control of Growth Hormone Secretion in Humans. *TEM* Vol. 3, No. 5, 1992.
 25. Kelly E. Mayo, Paul A. Godfrey, Steven T. Suhr, David J. Kulik, and Jason O. Rahal. Growth Hormone-Releasing Hormone: Synthesis and Signaling. *Recent Progress in hormone research.* Vol.50.
 26. Christin Carter-Su, Jessica Schwartz, and Lisa S. Smit. Molecular Mechanism of growth hormone action. *Annu. Rev. Physiol.* 1996. 58:187-207.
 27. Diamanti-Kandarakis, E., et al., Hormones in sports: growth hormone abuse. *Hormones (Athens).* 2004. 3(1): p37-45.
 28. Harvey S, Martin BT, Baudet ML, Davis P, Sauve Y, Sanders EJ. Growth hormone in the visual system: comparative endocrinology. *Gen Comp Endocrinol.* 2007 Aug-Sep;153(1-3):124-31.
 29. Harvey S. Extrapituitary growth hormone. *Endocrine.* 2010 Dec;38(3):335-59. doi: 10.1007/s12020-010-9403-8. Epub 2010 Oct 23. Review.

30. Bodner M, Karin M. A pituitary-specific trans-acting factor can stimulate transcription from the growth hormone promoter in extracts of nonexpressing cells. *Cell*. 1987 Jul 17;50(2):267-75.
31. Lemaigre FP, Courtois SJ, Lafontaine DA, Rousseau GG. Evidence that the upstream stimulatory factor and the Sp1 transcription factor bind in vitro to the promoter of the human-growth-hormone gene. *Eur J Biochem*. 1989 May 15;181(3):555-61.
32. Simmonds, D.M., Voss, J.W., Ingraham, J.M., Holloway, R.S., Broide, R.S., Rosenfeldt, M.G., and Swanson, L.W. 1990. Pituitary cell phenotypes involve cell-specific Pit-1 mRNA translation and synergistic interactions with other classes of transcription factors. *Genes Dev*. **4**: 695–711.
33. Chen, H.T., Schuler, L.A., and Schultz, R.D. 1997. Growth hormone and Pit-1 expression in bovine fetal lymphoid cells. *Dom. Anim. Endocrinol*. **14**: 399–407.
34. Harvey S, Azumaya Y, Hull KL. Pituitary and extrapituitary growth hormone: Pit-1 dependence. *Can J Physiol Pharmacol*. 2000 Dec;78(12):1013-28.
35. Slominski A, Malarkey WB, Wortsman J, Asa SL, Carlson A: Human skin expresses growth hormone but not the prolactin gene. *J Lab Clin Med* 2000, 136(6):476-481.
36. Deplewski D, Rosenfield RL: Growth hormone and insulin-like growth factors have different effects on sebaceous cell growth and differentiation. *Endocrinology* 1999, 140(9):4089-4094.
37. Liu J, Zheng D, Deng J, Xiao S, Liu S, Shi Y: Immunoreactive growth hormone in human peripheral T lymphocytes: encoding sequence of cDNA identical to that of the pituitary human growth hormone. *Chin Med J (Engl)* 1997, 110(5):362-365.
38. Untergasser G, Kranewitter W, Schwarzler P, Madersbacher S, Dirnhofer S, Berger P: Organ-specific expression pattern of the human growth hormone/placental lactogen gene-cluster in the testis. *Mol Cell Endocrinol* 1997, 130(1-2):53-60.
39. Schwarzler P, Untergasser G, Hermann M, Dirnhofer S, Abendstein B, Madersbacher S, Berger P: Selective growth hormone/placental lactogen gene transcription and hormone production in pre- and postmenopausal human ovaries. *J Clin Endocrinol Metab* 1997, 82(10):3337-3341.
40. Lacroix MC, Guibourdenche J, Fournier T, Laurendeau I, Igout A, Goffin V, Pantel J, Tsatsaris V, Evain-Brion D: Stimulation of human trophoblast invasion by placental growth hormone. *Endocrinology* 2005, 146(5):2434-2444.
41. Raccurt M, Lobie PE, Moudilou E, Garcia-Caballero T, Frappart L, Morel G, Mertani HC: High stromal and epithelial human gh gene expression is associated with proliferative disorders of the mammary gland. *J Endocrinol* 2002, 175(2):307-318.
42. Costa A, Zoppetti G, Benedetto C, Bertino E, Marozio L, Fabris C, Arisio R, Giraudi GF, Testori O, Ariano M *et al*: Immunolike growth hormone substance in

- tissues from human embryos/fetuses and adults. *J Endocrinol Invest* 1993, 16(8):625-633.
43. Kyle CV, Evans MC, Odell WD: Growth hormone-like material in normal human tissues. *J Clin Endocrinol Metab* 1981, 53(6):1138-1144.
 44. Weigent DA, Blalock JE: Expression of growth hormone by lymphocytes. *Int Rev Immunol* 1989, 4(3):193-211.
 45. Wu H, Devi R, Malarkey WB: Localization of growth hormone messenger ribonucleic acid in the human immune system a Clinical Research Center study. *J Clin Endocrinol Metab* 1996, 81(3):1278-1282.
 46. Hattori N, Saito T, Yagyu T, Jiang BH, Kitagawa K, Inagaki C: GH, GH receptor, GH secretagogue receptor, and ghrelin expression in human T cells, B cells, and neutrophils. *J Clin Endocrinol Metab* 2001, 86(9):4284-4291.
 47. Harvey S, Parker E, Macdonald I, Sanders EJ: Growth hormone is present in the human retina and vitreous fluid. *Neurosci Lett* 2009, 455(3):199-202.
 48. Sanders EJ, Parker E, Harvey S: Endogenous growth hormone in human retinal ganglion cells correlates with cell survival. *Mol Vis* 2009, 15:920-926.
 49. Costa A, Zoppetti G, Benedetto C, Bertino E, Marozio L, Fabris C, Arisio R, Giraudi GF, Testori O, Ariano M *et al*: Immunolike growth hormone substance in tissues from human embryos/fetuses and adults. *J Endocrinol Invest* 1993, 16(8):625-633.
 50. Sundler F, Alumets J, Hakanson R: Growth hormone-like immunoreactivity in gastrin cells and gastrinomas. *Histochemistry* 1979, 59(4):343-346.
 51. Otteson DC, Cirenza PF, Hitchcock PF. Persistent neurogenesis in the teleost retina: evidence for regulation by the growth-hormone/insulin-like growth factor-I axis. *Mech Dev.* 2002 Sep;117(1-2):137-49.
 52. Harvey S, Martin BT, Baudet ML, Davis P, Sauve Y, Sanders EJ. Growth hormone in the visual system: comparative endocrinology. *Gen Comp Endocrinol.* 2007 Aug-Sep;153(1-3):124-31. Epub 2007 Jan 11.
 53. Wainwright N, Hayden J, Rothstein H. Total disappearance of cell proliferation in the lens of a hypophysectomized animal: in vivo and in vitro maintenance of inhibition with reversal by pituitary factors. *Cytobios.* 1978;23(90):79-92.
 54. Baudet ML, Sanders EJ, Harvey S. Retinal growth hormone in the chick embryo. *Endocrinology.* 2003 Dec;144(12):5459-68.
 55. Harvey S, Johnson CD, Sanders EJ. Growth hormone in neural tissues of the chick embryo. *J Endocrinol.* 2001 Jun;169(3):487-98.
 56. Harvey S1, Kakebeeke M, Murphy AE, Sanders EJ. Growth hormone in the nervous system: autocrine or paracrine roles in retinal function? *Can J Physiol Pharmacol.* 2003 Apr;81(4):371-84.
 57. Harvey S, Kakebeeke M, Sanders EJ. Growth hormone localization in the neural retina and retinal pigmented epithelium of embryonic chicks. *J Mol Neurosci.* 2004;22(1-2):139-45.

58. Sanders EJ, Walter MA, Parker E, Arámburo C, Harvey S. Opticin binds retinal growth hormone in the embryonic vitreous. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2003 Dec;44(12):5404-9.
59. Harvey S, Baudet ML, Sanders EJ. Growth hormone-induced neuroprotection in the neural retina during chick embryogenesis. *Ann N Y Acad Sci.* 2009 Apr;1163:414-6.
60. Sanders EJ, Lin WY, Parker E, Harvey S. Growth hormone expression and neuroprotective activity in a quail neural retina cell line. *Gen Comp Endocrinol.* 2010 Jan 1;165(1):111-9.
61. Harvey S, Baudet ML, Sanders EJ. Growth hormone and cell survival in the neural retina: caspase dependence and independence. *Neuroreport.* 2006 Nov 6;17(16):1715-8.
62. Sanders EJ, Parker E, Harvey S. Retinal ganglion cell survival in development: mechanisms of retinal growth hormone action. *Exp Eye Res.* 2006 Nov;83(5):1205-14. Epub 2006 Aug 7.
63. James CR and Cotlier E. Fate of insulin in the retina: an autoradiographic study. *Br J Ophthalmol.* Feb 1983; 67(2): 80–88.
64. Sanders EJ, Parker E, Harvey S. Endogenous growth hormone in human retinal ganglion cells correlates with cell survival. *Mol Vis.* 2009;15:920-6. Epub 2009 May 4.
65. Hellstrom A, Svensson E, Carlsson B, Niklasson A, Albertsson-Wikland K: Reduced retinal vascularization in children with growth hormone deficiency. *J Clin Endocrinol Metab* 1999, 84(2):795-798.
66. Alzaid AA, Dinneen SF, Melton LJ, 3rd, Rizza RA: The role of growth hormone in the development of diabetic retinopathy. *Diabetes Care* 1994, 17(6):531-534.
67. Wilkinson-Berka JL, Wraight C, Werther G: The role of growth hormone, insulin-like growth factor and somatostatin in diabetic retinopathy. *Curr Med Chem* 2006, 13(27):3307-3317.
68. Sall JW, Klisovic DD, O'Dorisio MS, Katz SE: Somatostatin inhibits IGF-1 mediated induction of VEGF in human retinal pigment epithelial cells. *Exp Eye Res* 2004, 79(4):465-476.
69. Grant MB, Caballero S: Somatostatin analogues as drug therapies for retinopathies. *Drugs Today (Barc)* 2002, 38(11):783-791.
70. Koller EA, Green L, Gertner JM, Bost M, Malozowski SN: Retinal changes mimicking diabetic retinopathy in two nondiabetic, growth hormone-treated patients. *J Clin Endocrinol Metab* 1998, 83(7):2380-2383.
71. Hellstrom A, Carlsson B, Niklasson A, Segnestam K, Boguszewski M, de Lacerda L, Savage M, Svensson E, Smith L, Weinberger D *et al*: IGF-I is critical for normal vascularization of the human retina. *J Clin Endocrinol Metab* 2002, 87(7):3413-3416.
72. Harvey S, Baudet ML, Sanders EJ. Retinal growth hormone in perinatal and adult

- rats. *J Mol Neurosci*. 2006;28(3):257-64.
73. Liu JC, Makova KD, Adkins RM, Gibson S, Li WH. Episodic evolution of growth hormone in primates and emergence of the species specificity of human growth hormone receptor. *Mol Biol Evol*. 2001 Jun;18(6):945-53.
74. Pérez-Maya AA, Rodríguez-Sánchez IP, de Jong P, Wallis M, Barrera-Saldaña HA. The chimpanzee GH locus: composition, organization, and evolution. *Mamm Genome*. 2012 Jun;23(5-6):387-98. doi: 10.1007/s00335-012-9392-4.
75. Wallis OC, Zhang YP, Wallis M. Molecular evolution of GH in primates: characterisation of the GH genes from slow loris and marmoset defines an episode of rapid evolutionary change. *J Mol Endocrinol*. 2001 Jun;26(3):249-58.
76. Untergasser G, Kranewitter W, Schwarzler P, Madersbacher S, Dirnhofer S, Berger P: Organ-specific expression pattern of the human growth hormone/placental lactogen gene-cluster in the testis. *Mol Cell Endocrinol* 1997, 130(1-2):53-60.
77. Schwarzler P, Untergasser G, Hermann M, Dirnhofer S, Abendstein B, Madersbacher S, Berger P: Selective growth hormone/placental lactogen gene transcription and hormone production in pre- and postmenopausal human ovaries. *J Clin Endocrinol Metab* 1997, 82(10):3337-3341.
78. Lobie, P. E., Barnard, R., Waters, M.J. The nuclear growth hormone receptor binding protein. Antigenic and physicochemical characterization. 1991. *J. Biol. Chem.* 226, 22645-22652.
79. Lobie, P.E., Garcia-Aragon J., Lincoln, D.T., Barnard, R., Wilcox, J.N, Waters, M.J., 1993. Localization and ontogeny of growth hormone receptor gene expression in the central nervous system. *Develop. Brain Res.* 74, 225-233.
80. Fernández A, Moreno J, Prósper F, García M, Echeveste J. Regeneration of the ocular surface: stem cells and reconstructive techniques. *An Sist Sanit Navar*. 2008 Jan-Apr;31(1):53-69.
81. Martínez-Moreno CG, Giterman D, Henderson D, Harvey S. Secretagogue induction of GH release in QNR/D cells: Prevention of cell death. *Gen Comp Endocrinol*. 2014 Apr 19. pii: S0016-6480(14)00134-8.
82. Mol JA, van Garderen E, Rutteman GR, Rijnberk A. New insights in the molecular mechanism of progestin-induced proliferation of mammary epithelium: induction of the local biosynthesis of growth hormone (GH) in the mammary glands of dogs, cats and humans. *J Steroid Biochem Mol Biol*. 1996 Jan;57(1-2):67-71.
83. www.salud.gob.mx/ssa_app/noticias/datos/2005-04-09_1319.html.
84. Tabares-Ochoa JC. Genésis del pterigión. Una aproximación desde la biología molecular. *Rev Mex Oftalmol*; Noviembre-Diciembre 2006: 80 (6): 318-324.
85. Mertani HC, Pechoux C, Garcia-Caballero T, Waters MJ, Morel G. Cellular localization of the growth hormone receptor/binding protein in the human anterior pituitary gland. *J Clin Endocrinol Metab*. 1995 Nov;80(11):3361-7.
86. Hill DJ, Freemark M, Strain AJ, Handwerker S, Milner RD. Placental lactogen and growth hormone receptors in human fetal tissues: relationship to fetal plasma

- human placental lactogen concentrations and fetal growth. *J Clin Endocrinol Metab.* 1988 Jun;66(6):1283-90.
87. Rivera JC, Aranda J, Riesgo J, Nava G, Thebault S, López-Barrera F, Ramírez M, Martínez de la Escalera G, Clapp C. Expression and cellular localization of prolactin and the prolactin receptor in mammalian retina. *Exp Eye Res.* 2008 Feb;86(2):314-21. Epub 2007 Nov 12.
88. Farreras-Rozman: *Medicina Interna*, 14ª Edición. Ediciones Harcourt S.A. 2000.
89. Verhaeghe J, Pintiaux A, Van Herck E, Hennen G, Foidart JM, Igout A. Placental GH, IGF-I, IGF-binding protein-1, and leptin during a glucose challenge test in pregnant women: relation with maternal body weight, glucose tolerance, and birth weight. *J Clin Endocrinol Metab.* 2002 Jun;87(6):2875-82
90. Chellakooty M, Vangsgaard K, Larsen T, Scheike T, Falck-Larsen J, Legarth J, Andersson AM, Main KM, Skakkebaek NE, Juul A. A longitudinal study of intrauterine growth and the placental growth hormone (GH)-insulin-like growth factor I axis in maternal circulation: association between placental GH and fetal growth. *J Clin Endocrinol Metab.* 2004 Jan;89(1):384-91.
91. Walker WH, Fitzpatrick SL, Barrera-Saldaña HA, Resendez-Perez D, Saunders GF. The human placental lactogen genes: structure, function, evolution and transcriptional regulation. *Endocr Rev.* 1991 Nov;12(4):316-28. Review
92. Felber JP, Zaragoza N, Benuzzi-Badoni M, Genazzani AR. The double effect of human chorionic somatomammotropin (HCS) and pregnancy on lipogenesis and on lipolysis in the isolated rat epididymal fat pad and fat pad cells. *Horm Metab Res.* 1972 Jul;4(4):293-6.
93. León Perlemuter: *Anatomo-fisiología*, Masson S.A., 1999.
94. *Oftalmología básica para estudiantes de medicina y residentes de Atención Primaria*. Elsevier España S.L., 2008.
95. Baudet ML, Hassanali Z, Sawicki G, List EO, Kopchick JJ, Harvey S. Growth hormone action in the developing neural retina: a proteomic analysis. *Proteomics.* 2008 Jan;8(2):389-401. doi: 10.1002/pmic.200700952.

11. ANEXOS

11.1 Ensayos de inmunofluorescencia

11.1.1 Recolección de tejidos oculares para ensayos de inmunofluorescencia

11.1.1.1 Solución de carnoy

Para una solución de 100 ml mezclar los siguientes componentes:

Etanol absoluto60 ml

Ácido acético glacial.....10 ml

Cloroformo.....30 ml

Una vez preparada la solución tapar con parafilm y almacenarla a temperatura ambiente.

11.1.1.2 Paraformaldehído al 4%

- Preparar una solución de paraformaldehído al 40%: Disolver 40 g de paraformaldehído (formaldehído) en 100 ml de agua bidestilada calentando a 65°C y con agitación continua. Posteriormente se añade NaOH al 4% (hidróxido de sodio) gota a gota hasta que la solución este transparente. Dejar enfriar antes de usar. Guardar en frascos limpios de cristal a 4° y en oscuridad. Es estable durante algunas semanas (de preferencia utilizarlo fresco).
- Solución tampón: Preparar la solución tampón dos veces más concentrada que su uso final (normalmente 0.1 M). Ajustar pH y osmolaridad a los niveles deseados.
- Solución de trabajo: A 50 ml de solución tampón añadir 10 ml de paraformaldehído al 40% para tener una concentración final del 4%. Esta solución es estable durante 3 o 4 semanas almacenada a 4°C en oscuridad.

11.1.2 Tinción hematoxilina-eosina (método de Harris)

11.1.2.1 Hematoxilina

Hematoxilina en polvo 0.5 g

Alcohol absoluto5 ml

Alumbre de potasio y amonio.....10 g

Agua destilada100 ml

Óxido rojo de mercurio.....0.25 g

Disuelva la hematoxilina en alcohol y el alumbre en el agua caliente, se saca del fuego y se mezclan las soluciones, póngalas a hervir rápidamente con agitación por 1 minuto. Se quita del fuego y se agrega al óxido rojo de mercurio lentamente. Se vuelve a calentar hasta que tome un color morado oscuro, se quita del fuego y se pone a enfriar sobre hielo. El colorante esta listo para ser usado en cuanto se enfría y se le agregan de 2-4 ml de ácido acético glacial por cada 100ml de solución de hematoxilina, filtrar antes de usar.

11.1.2.2 Alcohol acidulado

Mezclar los siguientes componentes:

Alcohol al 70%1000ml

Ácido clorhídrico concentrado..... 10 ml

11.1.2.3 Agua amoniacal

Mezclar los siguientes componentes:

Agua destilada.....1000 ml

Hidróxido de amonio concentrado 10 ml

11.1.2.4 Eosina

- Solución stock de eosina al 1%: Mezclar 1 g de eosina Y soluble en agua en 20 ml de agua destilada y 80 ml de alcohol etílico al 96%.
- Solución de trabajo de eosina: Mezclar 25 ml de solución stock de eosina al 1% en 75 ml de alcohol etílico al 80% y adicionar 500 µl de ácido acético glacial en 100 ml de eosina.

11.1.3 Reacción de inmunofluorescencia

11.1.3.1 Buffer de citrato de sodio 10 mM y 0.05% de triton a pH 6

Para preparar una solución de 1 litro: Mezclar 2.94 g de citrate de sodio en 900 ml de agua desionizada, mezclar bien hasta ver disuelto completamente el solute. Ajustar el pH a 6 con ácido clorhídrico (HCl) 1 N y añadir 0.5 ml de triton. Mezclar bien. Almacenar a 4°C hasta su uso.

11.1.3.2 TBS 1x

Tris.....12 g

NaCl.....90 g

Timerosal.....0.04 g

Adicionar estos componentes en 900 ml de agua destilada, mezclar bien, ajustar el pH a 7.6 y aforar a 1 litro. Guardar a 4°C, utilizarlo diluido 1X (50 ml de stock + 450 ml agua destilada).

11.1.3.3 Solución de bloqueo para peroxidasa endógena.

Para una solución de 40 ml mezclar: 20 ml de metanol absoluto, 20 ml de TBS 1x y 4 ml de peróxido de hidrógeno al 30%.

11.1.3.4 Solución de borohidrato de sodio al 1%

Pesar 0.01 g de borohidrato de sodio y diluir en 10 ml de TBS 1x.

11.1.3.5 Leche descremada al 5%

Para una solución de 40 ml mezclar: 2 g leche descremada libre de ácidos grasos en 40 ml TBS 1x. Esta solución se almacena a 4°C y es estable por 5 días.

11.1.3.6 TTBS 1x

Tris.....12 g

NaCl.....90 g

Timerosal.....0.04 g

Adicionar estos componentes en 900 ml de agua destilada, mezclar bien, ajustar el pH a 7.6 y aforar a 1 litro. Guardar a 4°C, utilizarlo diluido 1X (50 ml de stock + 450 ml agua destilada + 5 ml de tritón).

11.1.3.7 Leche al 1%

Para una solución de 100 ml mezclar: 1g leche descremada libre de ácidos grasos en 100 ml TTBS 1X.

11.1.3.8 DAPI solución de trabajo

- Solución stock DAPI 1000x: Pesar 0.2 mg en 1 ml de agua destilada. Guardar a -20°C en oscuridad.
- Solución de trabajo: Diluir 2 μ l en 100 ml de agua destilada. Almacenar a 4°C en oscuridad. La solución es estable por 1 mes.

11.2 Extracción de proteínas en tejidos de babuinos utilizando el buffer de lisis RIPA.

11.2.1 PBS 10x

Para preparar 1 litro de solución se mezclan los siguientes componentes: 80 g de NaCl (cloruro de sodio), 2 g de KCl (cloruro de potasio), 14.4 g de Na₂HPO₄ (fosfato de sodio monobásico) y 2.4 g KH₂PO₄ (fosfato de potasio dibásico). Ajustar el pH a 7.4. Almacenar a temperatura ambiente.

11.2.2 Buffer lisis RIPA

Para preparar 1 litro de solución mezclar los siguientes reactivos: 8.76 g de NaCl (cloruro de sodio), 10 ml de Tris 1 M pH 7.2, 10 ml de SDS al 10%, 1 ml de tritón x-100, 10 g de deoxicolato de sodio y 10 ml de EDTA 0.5 M a pH 8.

- Tris 1 M: Disolver 121.1 g de tris base en 700 ml de agua destilada. Llevar el pH entre 7.5 y 8.0 con HCl (ácido clorhídrico) concentrado. Llevar a un volumen de 1 litro con agua destilada. Filtrar la solución con filtro microcon de 0.5 micras. Autoclavear la solución y almacenarla a temperatura ambiente.
- SDS 10%: Disolver 80 g de SDS en 80 ml de agua destilada, mezclar bien y después aforar a 100 ml. Esta solución es estable por seis meses a temperatura ambiente.
- EDTA 0.5 M pH 8: Disolver 7.31 g de EDTA en 40 ml de agua ajustar el pH 8 y después aforar a 50 ml.

11.3 Cuantificación de proteínas con el reactivo EZQ

11.3.1 solución HAC

Para 100 ml de solución mezclar: 20 ml de metanol, 10 ml de ácido acético y 70 ml de agua HPLC ultra pura.

11.4 Inmunoprecipitación

11.4.1 Protein G Binding/Washing buffer 1x

Preparar una solución 57.7 mM de Na₂HPO₄ y 42.3 mM NaH₂PO₄ a pH 7.0.

- Para preparar una solución de 25 ml pesar 204.77 mg de Na₂HPO₄ y 126.8789 mg de NaH₂PO₄ ajustar el pH a 7.

11.4.2 Protein G elution buffer 1x

Preparar una solución 0.2 M de Glicina/HCl a un pH de 2.5.

- Pesar 375.35 mg de glicina y disolverlos en 20 ml de agua destilada. Ajustar el pH a 9 y aforar a 25 ml.

11.4.3 Protein G neutralization buffer 1x

Preparar una solución 1 M de Tris-HCl a pH 9.

- Para esto pesar 3.9415 mg de Tris-HCl y disolver en 20 ml de agua destilada. Ajustar el pH a 9 y aforar a 25 ml.

11.5 Preparación de las muestras con perlas magnéticas de fase reversa (M² C8 beads)

11.5.1 Buffer de equilibrio

Preparar una solución 200 mM de NaCl y 0.1% de TFA (ácido trifluoreacético).

- Pesar 11.688 de NaCl y disolver en 999 ml de agua destilada. Mezclar bien. Por último adicionar 1 ml de TFA.

11.5.2 Buffer TEAB

Preparar una solución 40 mM de bicarbonato de trietilamonio.

- Para esto pesar 6.528 g de TEAB y disolver en un litro de agua destilada.

11.5.3 DTT 10 mM

Pesar 1.5425 g de DTT en 1 litro de agua destilada.

11.5.4 Ácido acético 50 mM

Para su preparación mezclar: 28.7 µl de ácido acético en 9.97 ml de agua destilada. Mezclar bien y almacenar a temperatura ambiente.

11.5.5 Hidroxilamida al 5%

Pesar 1 g de clorhidrato de hidroxilamida y disolverlo en 19 ml de etanol absoluto.

ARTÍCULOS PRODUCIDOS

- Olfactomedin-like 3 (OLFML3) gene expression in baboon and human ocular tissues: cornea, lens, uvea, and retina. Rodríguez-Sánchez IP, Garza-Rodríguez ML, Mohamed-Noriega K, Voruganti VS, Tejero ME, Delgado-Enciso I, Pérez-Ibave DC, Schlabritz-Loutsevitch NE, Mohamed-Noriega J, Martínez-Fierro ML, Reséndez-Pérez D, Cole SA, Cavazos-Adame H, Comuzzie AG, Mohamed-Hamsho J, Barrera-Saldaña HA. *J Med Primatol.* 2013 Jun;42(3):105-11. doi: 10.1111/jmp.12037.
- Growth hormone synthesis in humans. Authors: Pérez-Ibave DC, Rodríguez-Sánchez IP, Garza-Rodríguez ML and Barrera-Saldaña HA. *Growth Horm IGF Res.* 2014 Apr-Jun;24(2-3):47-53. doi: 10.1016/j.ghir.2014.01.005. Epub 2014 Feb 12.
- **En proceso:** Growth hormone and prolactin mRNAs are expressed in the baboon eye. Diana Cristina Pérez-Ibave, Irám Pablo Rodríguez-Sánchez, María de Lourdes Garza-Rodríguez, Antonio Alí Pérez-Maya, Carlos Arámburo, Maricela Luna, Cun Li, Natalia E. Schlabritz-Loutsevitch, Andrew Tsin, Humberto Cavazos Adame, Jesús Mohamed Hamsho, Hugo Alberto Barrera-Saldaña