



FACULTAD DE CIENCIAS BIOQUÍMICAS Y FARMACÉUTICAS  
UNIVERSIDAD NACIONAL DE ROSARIO

Tesis de Doctorado

“Identificación y caracterización de nuevos miembros de la familia de  
receptores de hormona de crecimiento en peces teleósteos”

Presentada por Cecilia Mayra Di Prinzio

Rosario, Argentina

2012

**“Identificación y caracterización de nuevos miembros de la familia de receptores de hormona de crecimiento en peces teleósteos”**

Cecilia Mayra Di Prinzio  
Licenciada en Biotecnología, UNR

Esta tesis es presentada como parte de los requisitos para optar al grado académico de Doctor en Ciencias Biológicas de la Universidad Nacional de Rosario y no ha sido presentada previamente para la obtención de otro título en esta u otra Universidad. La misma contiene los resultados obtenidos en investigaciones llevadas a cabo en el Instituto de Biología Molecular y Celular de Rosario (IBR-CONICET-UNR) y Área Biología, Departamento de Ciencias Biológicas, dependiente de la Facultad de Ciencias Bioquímicas y Farmacéuticas, durante el período comprendido entre Abril de 2007 y Diciembre de 2011, bajo la dirección de Silvia. E. Arranz.

***A Vir***

***A mi familia***

[...] la realidad no está solamente fuera sino también dentro del hombre,  
constituída por una unidad sujeto-objeto que no puede ser escindida.  
El conocimiento es la manifestación de esta interacción entre el mundo exterior  
y el hombre.

**Ernesto Sábató.**  
*Uno y el Universo.*

## **AGRADECIMIENTOS**

Quiero darle las gracias a la Dra. Silvia Arranz por haberme permitido formar parte de su grupo de trabajo hace ya tantos años, dándome la oportunidad de capacitarme en múltiples disciplinas, tanto en el país como en el extranjero, y principalmente por todos estos años de aprendizaje.

Agradezco también a las instituciones nacionales (CONICET y UNR) e internacionales que hicieron posible el desarrollo de esta tesis. Gracias por las ayudas económicas otorgadas para la realización de mis estudios y para los viajes de capacitación, intercambio y asistencia a reuniones científicas.

Gracias a todos chicos del Lab 0, actuales y pasados: Emma, Pablo, Matías, Vani M., Darío, Quique, Andrés, Juan, Ignacio, Vani V., Paula, Emilia, por las miles de horas que hemos compartido; por su ayuda, colaboración y también su compañía, que ha hecho el tiempo más ameno. Especialmente quiero agradecer a Emma, no solo por todo lo que me enseñó, ayudó y compartió conmigo, sino por regalarme una amistad maravillosa. También particularmente gracias a Matías C., por su paciencia en mis inicios como mentora y por todo lo que aprendí a su lado mientras le enseñaba.

Gracias a los Profesores e investigadores del Área Biología: Ángel Rucci, Claudia Banchio, Patricia Marini, Pablo Armas, Gabriela Coux, Javier Girardini, Nora Calcaterra, por sus charlas, discusiones y aportes a mi formación y a mi trabajo diario.

Muchas gracias a las chiquis y los chiquis del Área: Clau, Emy, Marian, Vale, Lore, Jime, Luchi, Anto, Solange, Pablito, Juan Manuel, Ezequiel, por hacer más ameno el día a día del trabajo y por tirar para adelante cuando hacía falta. También a los que pasaron por allí, y ahora tienen nuevos rumbos, pero que siempre quedan junto a uno: Vero L., Juli M., Mosca.

Gracias Seba G., por la ayuda, enseñanza y buena onda en el acuario.

Gracias a la Profesora Hebe Bottai de la cátedra de estadística de la FcByF-UNR, por la ayuda y gentileza en el análisis de los datos.

Gracias a Alejandra Martinez, por su colaboración en la realización de los cortes histológicos y por su amplia predisposición para con la ejecución de tareas que resultaban desafíos absolutos.

Gracias a los Dres. Ariel Reyes y Jaume Pérez-Sánchez, por la colaboración con el equipo de trabajo, por su predisposición y por las charlas enriquecedoras que contribuyeron enormemente a mi formación.

Todo este trabajo no hubiese sido posible sin el maravilloso apoyo de una mujer maravillosa e incondicional, gracias Vir.

Especialmente gracias también a mi familia, siempre incondicional y apoyándome en todos mis sueños y proyectos.

Gracias a mis amigos, de la facu, de la vida, del mundo: Mae, Celi, Jime, Gaby, Pauli y Sole, por tantos hermosos momentos compartidos; Fer, Rosa y Clara, por su maravillosa compañía, hospitalidad y cariño.

Gracias a Analía B. y Laura M., por acompañarme y cuidarme todos estos años.

Gracias a todos los que de alguna forma u otra hicieron posible este logro.

## DIVULGACIÓN

Parte de los resultados que se describen en este trabajo de tesis han sido publicados en la siguiente revista internacional:

- **Di Prinzio C.M**, Botta P.E., Barriga E.H., Ríos E.A., Reyes A.E., Arranz S.E. 2010. *Growth hormone receptors in zebrafish (Danio rerio): Adult and embryonic expression patterns*. *Gene Expr. Patterns*, 10, 214–225.

Parte de los resultados que se describen en este trabajo de tesis han sido presentados en las siguientes reuniones científicas:

- **Di Prinzio C.**, Carnevale M., Arranz S. “*Growth hormone receptor type I: functional studies during zebrafish embryonic development*”. 2011. 8° Congreso de la Asociación Ibérica de Endocrinología Comparada. Madrid, España.
- **Di Prinzio C.**, Carnevale M., Barriga E., Reyes A., Arranz S. 2010. “*Expression profiling of ghrs transcripts and proteins during zebrafish development*”. 5<sup>th</sup> International Meeting of the Latin American Society for Developmental Biology (LASDB). Santa Cruz, Chile.
- **Di Prinzio C.**, Reyes A. & Arranz S. 2009. “*Growth hormone receptors in zebrafish: expression patterns and associated functions*”. 2<sup>da</sup> Conferencia Latinoamericana sobre Cultivo de Peces Nativos. Chascomús, Buenos Aires, Argentina.
- **Di Prinzio C.** & Arranz S. 2009. “*Estudio del receptor de hormona de crecimiento en pez cebra: caracterización de isoformas alternativas*”. VII Simposio Nacional de Biotecnología REDBIO Argentina – II Congreso Internacional REDBIO. Rosario, Santa Fe, Argentina.
- Carnevale M. **Di Prinzio C.** & Arranz S. 2009. “*Expresión de proteínas recombinantes para la generación de anticuerpos anti-receptores de hormona de crecimiento de Danio rerio*”. Jornadas de Ciencias y Tecnología - U.N.R. Rosario, Santa Fe, Argentina.
- **Di Prinzio C.** & Arranz S. 2008. “*Growth hormone receptors in zebrafish (Danio rerio): adult and embryonic expression patterns*”. 4<sup>th</sup> International

Meeting of the Latin American Society for Developmental Biology (LASDB).  
Capital Federal, Buenos Aires, Argentina.

- **Di Prinzio C.**, Botta P. & Arranz S. 2007. "*Isolation and characterization of growth hormone receptors subtypes in zebrafish (Danio rerio)*". XLIII Reunión Anual de la Sociedad Argentina de Investigación en de Bioquímica y Biología Molecular (SAIB). Mar del Plata, Buenos Aires, Argentina.

## ÍNDICE

AGRADECIMIENTOS .....	i
DIVULGACIÓN .....	iii
ÍNDICE .....	v
NOMBRES DE PECES .....	ix
ABREVIATURAS .....	xi
INTRODUCCIÓN .....	2
Acuicultura y desafíos .....	2
Los peces: clasificación y relaciones filogenéticas .....	3
El modelo de estudio: <i>Danio rerio</i> .....	5
Características generales y ciclo de vida .....	6
Algunas consideraciones en torno al desarrollo embrionario del pez cebra	8
El crecimiento en los peces .....	10
Endocrinología del crecimiento en peces .....	11
GH: características y funciones .....	13
Los receptores de GH: GHRs (del inglés growth hormone receptors) .....	14
SL: características y funciones .....	17
Desarrollo embrionario y eje somatotrófico.....	18
¿Qué se sabe en el pez cebra acerca del eje somatotrófico? .....	20
Objetivos .....	22
MATERIALES Y MÉTODOS .....	24
Material Biológico .....	24
Animales .....	24
Obtención y mantenimiento de embriones.....	24
Alimentación y mantenimiento de alevines y juveniles de pez cebra .....	25
Identificación de estadios del desarrollo embrionario de pez cebra .....	25
Remoción del corion de los embriones .....	25
Desvitelinización de embriones y/o larvas .....	25
Obtención de tejidos y órganos de pez cebra adulto .....	26
Obtención de extractos proteicos totales.....	26
Obtención de extractos proteicos enriquecidos en membranas plasmáticas mediante gradiente discontinuo de sacarosa .....	27

Determinación de la concentración proteica.....	27
Separación electroforética de proteínas mediante geles de poliacrilamida desnaturalizantes: SDS-PAGE .....	28
Transferencia de proteínas.....	28
Ensayos de Western Blot .....	28
Extracción de ARN total .....	29
Extracción de ADN genómico.....	29
Determinación de la concentración de ADN y ARN.....	30
Determinación de la integridad de las muestras de ARN .....	30
Electroforesis en geles de agarosa .....	30
Purificación de fragmentos de ADN a partir de geles de agarosa .....	30
Retrotranscripción (RT) del ARNm .....	31
Reacciones de PCR .....	31
<i>Amplificación de las secuencias completas de los ADNc de los ghrs</i> .....	32
Amplificación de las regiones internas .....	32
Amplificación de los extremos 5' y 3' no traducibles o RACEs 3' y 5' (del inglés "Rapid Amplification of cDNA ends").....	33
<i>PCRs de ADN genómico</i> .....	33
Amplificaciones de las isoformas de los ghrs.....	33
Estudio de los patrones de expresión de <i>ghra</i> y <i>ghrb</i> por RT-PCR y Southern Blot .....	34
RT-PCR semi-cuantitativa de embriones con y sin vitelo .....	35
Clonado de los fragmentos de amplificación .....	36
<i>Transformación y selección de células bacterianas</i> .....	36
<i>Crecimiento de células bacterianas</i> .....	37
Cepas Bacterianas.....	37
Plásmidos .....	37
Conservación de las células transformadas con el ADN plasmídico .....	39
Preparación de ADN plasmídico .....	39
Secuenciación.....	40
Hibridación <i>in situ</i> de embriones y larvas enteros de pez cebra.....	40
Inmunofluorescencia en embriones completos.....	40
Microinyección de embriones de pez cebra.....	41
<i>Preparación de las microagujas</i> .....	42

Preparación de los embriones .....	42
<i>Proceso de microinyección</i> .....	43
Transgénesis transiente y estable: dominantes negativos para GHRa y GHRb .....	44
Procedimiento .....	46
Construcción de los vectores para la transgénesis .....	46
Obtención del ARNm de la transposasa por transcripción in vitro.....	47
Obtención del ADN plasmídico a microinyectar .....	48
Soluciones de microinyección y dosis .....	48
Digestión del ADN plasmídico con endonucleasas de restricción .....	48
Ensayos de disminución específica de la expresión o “ <i>knockdown</i> ” utilizando oligonucleótidos morfolinos .....	49
Análisis bioinformáticos .....	50
Análisis densitométrico de las bandas.....	50
Análisis estadístico .....	51
Observación y digitalización de imágenes de embriones .....	51
Mediciones de longitud estandar de las larvas de pez cebra .....	51
Mediciones espectrofotométricas .....	51
RESULTADOS.....	53
CAPÍTULO I: Caracterización molecular de los ghrs/slrs de pez cebra.....	55
INTRODUCCIÓN .....	55
RESULTADOS Y DISCUSIÓN .....	60
Clonado y secuenciación de los ADNc completos de los zghrs/zslrs....	60
Análisis filogenético.....	70
Organización génica de los receptores .....	72
Análisis de las regiones promotoras.....	74
CAPÍTULO II: Estudio de los patrones de expresión de los ghrs a nivel del ARNm y las proteínas.....	81
INTRODUCCIÓN .....	81
RESULTADOS y DISCUSIÓN .....	83
Patrones de expresión de ghra y ghrb en tejidos de peces adultos .....	83
Caracterización de las isoformas de los receptores .....	87
Posibles mecanismos para la generación de las isoformas de GHRa y GHRb.....	92

Patrones de expresión de ghra y ghrb durante el desarrollo embrionario	96
Expresión temporal de los ARNm de los receptores: estudios mediante RT-PCR y <i>Southern blot</i>	96
Expresión espacio-temporal de los receptores: estudios mediante hibridación <i>in situ</i> en embriones enteros	102
PCRs semi-cuantitativas en embriones con y sin vitelo	108
Desarrollo de Anticuerpos policlonales anti-zGHRs	110
Puesta a punto de los <i>Western Blots</i> anti-exGHRa de extractos proteicos totales	110
Detección de GHRa en extractos enriquecidos en membranas plasmáticas	116
Patrones de expresión de GHRa durante el desarrollo embrionario	117
<i>Expresión temporal de GHRa: análisis por Western Blot</i>	117
<i>Expresión espacio-temporal de GHRa: ensayos de inmunolocalización en embriones completos</i>	121
CAPÍTULO III: Estudios funcionales de los receptores durante el desarrollo embrionario temprano y tardío	127
INTRODUCCIÓN	127
RESULTADOS Y DISCUSIÓN	131
Obtención de peces transgénicos sobreexpresantes de receptores dominantes negativos fusionados a la proteína verde fluorescente	131
Estudios para <i>ghra</i>	132
<i>Estudio del efecto del dnGHRa por expresión transiente</i>	135
Estudios para <i>ghrb</i>	138
Ensayos de disminución específica de la expresión o “knockdown” utilizando oligonucleótidos morfolinicos	139
Estudios con el tMO- <i>ghra</i>	140
<i>Curva de calibración del tMO-ghra</i>	140
<i>Análisis del efecto de la disminución específica de GHRa mediante el tMO-ghra</i>	145
CONCLUSIONES	156
RESUMEN	160
BIBLIOGRAFÍA	163

## NOMBRES DE PECES

Lista de los nombres científicos y comunes de los peces teleósteos mencionados en este trabajo. Como referencia para el uso del nombre común en español se han usado las bases de datos del sitio web <http://www.fishbase.org>. Cuando existía más de una posibilidad se ha optado por la utilizada por la FAO. En ausencia de un nombre común en español se ha usado el nombre común en inglés.

<b>Nombre científico</b>	<b>Nombre común</b>
<b>Anguiliformes</b>	
<i>Anguilla japonica</i>	Anguila japonesa
<b>Beloniformes</b>	
<i>Oryzias latipes</i>	Medaka
<b>Cipriniformes</b>	
<i>Carasius auratus</i>	Pez rojo
<i>Catla catla</i>	Catla
<i>Cirrhinus cirrhosus</i>	<i>Mrigal carp</i>
<i>Ctenopharygodon idella</i>	Carpa china
<i>Cyprinus carpio</i>	Carpa
<i>Danio rerio</i>	Pez cebra
<i>Labeo rohita</i>	Labeo Roho
<i>Pimephales promelas</i>	Carpita cabezona
<b>Gadiformes</b>	
<i>Gadus morhua</i>	Bacalao del Atlántico
<b>Gasterosteiformes</b>	
<i>Gasterosteus aculeatus</i>	Espinoso
<b>Perciformes</b>	
<i>Acanthopagrus schlegelii</i>	<i>Black sea bream</i>
<i>Cichlasoma dimerus</i>	Chanchita
<i>Dentex dentex</i>	Dentón

<i>Dicentrarchus labrax</i>	Lubina
<i>Epinephelus coioides</i>	Mero de pintas naranjas
<i>Lates calcarifer</i>	Perca gigante
<i>Oreochromis mossambicus</i>	Tilapia de Mozambique
<i>Oreochromis niloticus</i>	Tilapia del Nilo
<i>Ophiocephalus argus cantor/Channa argus argus</i>	Cabeza de serpiente
<i>Pagrus auratus</i>	Red sea bream
<i>Pagrus major</i>	Dorada del Japón
<i>Sparus aurata</i>	Dorada

### **Pleuronectiformes**

<i>Hippoglossus hippoglossus</i>	Fletán del Atlántico
<i>Paralichthys adspersus</i>	Lenguado fino
<i>Paralichthys olivaceus</i>	Falso halibut del Japón
<i>Scophthalmus maximus</i>	Rodaballo

### **Salmoniformes**

<i>Oncorhynchus masou</i>	Salmón japonés
<i>Oncorhynchus mykiss</i>	Trucha arco iris
<i>Oncorhynchus keta</i>	Keta
<i>Oncorhynchus kisutch</i>	Salmón plateado
<i>Salmo salar</i>	Salmón del Atlántico

### **Siluriformes**

<i>Ictalurus punctatus</i>	Bagre del canal
<i>Silurus meridionalis</i>	Southern catfish

### **Tetraodontiformes**

<i>Takifugu rubripes</i>	Fugu
<i>Tetraodon nigroviridis</i>	Spotted green pufferfish

## ABREVIATURAS

ADN	ácido desoxirribonucleico
ADNc	ADN complementario
ARN	ácido ribonucleico
Aa.	aminoácidos
ADNasa	desoxirribonucleasa
BCIP	5-Bromo-4- Cloro-3-Indolil fosfato de p-toluidina
$\beta$ -ME	$\beta$ -mercaptoetanol
BSA	Albúmina de suero bovino
CHAPS	3-(cloroamido propil)- dimetilamonio-1-propanosulfato
c.s.p.	cantidad suficiente para
DMSO	dimetil sulfóxido
D.O.	densidad óptica
DTT	dithiothreitol
EDTA	ácido etilendiaminotetraacético
E. coli	<i>Escherichia coli</i> DH5 $\alpha$
GST	glutación S-transferasa
hpf	horas post fecundación
kDa	kilodalton
NBT	nitro blue tetrazolium
RT	retrotranscripción
LB	Luria Bertani
pb	pares de bases
PBS	tampón fosfato salino
PBST	PBS-Tween 20
PBST	PBS-Tritón X-100
PMSF	fenil metil sulfonil fluoruro
rpm	revoluciones por minuto
SDS	dodecil sulfato de sodio
SDS-PAGE	electroforesis en gel de poliacrilamida con SDS
TAE	Tris-acetato-EDTA
TBE	Tris-borato-EDTA
p/v	peso en volumen
v/v	volumen en volumen
X-gal	5-Bromo-4-cloro-3-indoil- $\beta$ -D-galactósido

# INTRODUCCIÓN



## INTRODUCCIÓN

### Acuicultura y desafíos

De las aproximadamente 55.000 especies existentes de vertebrados, más de la mitad de ellas, cerca de 28000, son peces. Estos organismos, definidos como vertebrados acuáticos, que utilizan branquias para obtener oxígeno del agua y poseen aletas (Thurman & Webber, 1984), exhiben un elevado nivel de biodiversidad, que afecta su morfología, ecología y comportamiento, así como también muchos otros aspectos de su biología. Esta gran variabilidad, los hace extremadamente atractivos para el estudio de una gran cantidad de interrogantes biológicos, mecanismos de evolución, desarrollo embrionario y adaptación, entre muchas de sus utilidades, sin dejar de lado su importancia como una fuente de alimento para el hombre (Nelson, 2006). Por otra parte, los organismos acuáticos representan el 70% del total de las especies animales del planeta. Es por ello que el hombre ha aprovechado este recurso a lo largo de miles de años realizando, en general, actividades extractivas, y para satisfacer la creciente demanda de alimento, desarrollando actividades como la acuicultura (Martínez-Porchas et al., 2009). Dicha actividad, definida como la cría o cultivo de organismos acuáticos (peces y crustáceos) con técnicas encaminadas a aumentar, por encima de las capacidades naturales del medio, la producción de los organismos en cuestión, se encuentra en constante crecimiento (Saera-Vila, 2009).

Existen cientos de diferentes especies acuáticas con potencial para ser cultivadas y todas ellas tienen un ciclo de vida similar que se puede resumir en: nacer, crecer, reproducirse y morir. Por años se ha considerado a la reproducción y el crecimiento, como los aspectos más importantes en el desarrollo de la acuicultura, sin embargo, hoy en día, es claro que también es fundamental el conocimiento sobre las etapas tempranas de la vida de los peces (huevos, larvas, alevines y juveniles). La experiencia ha demostrado que los principales cuellos de botella en la industria acuícola se producen en las primeras etapas de vida, disminuyendo los esfuerzos de comercialización de nuevas especies de producción. En general, las tasas de supervivencia durante

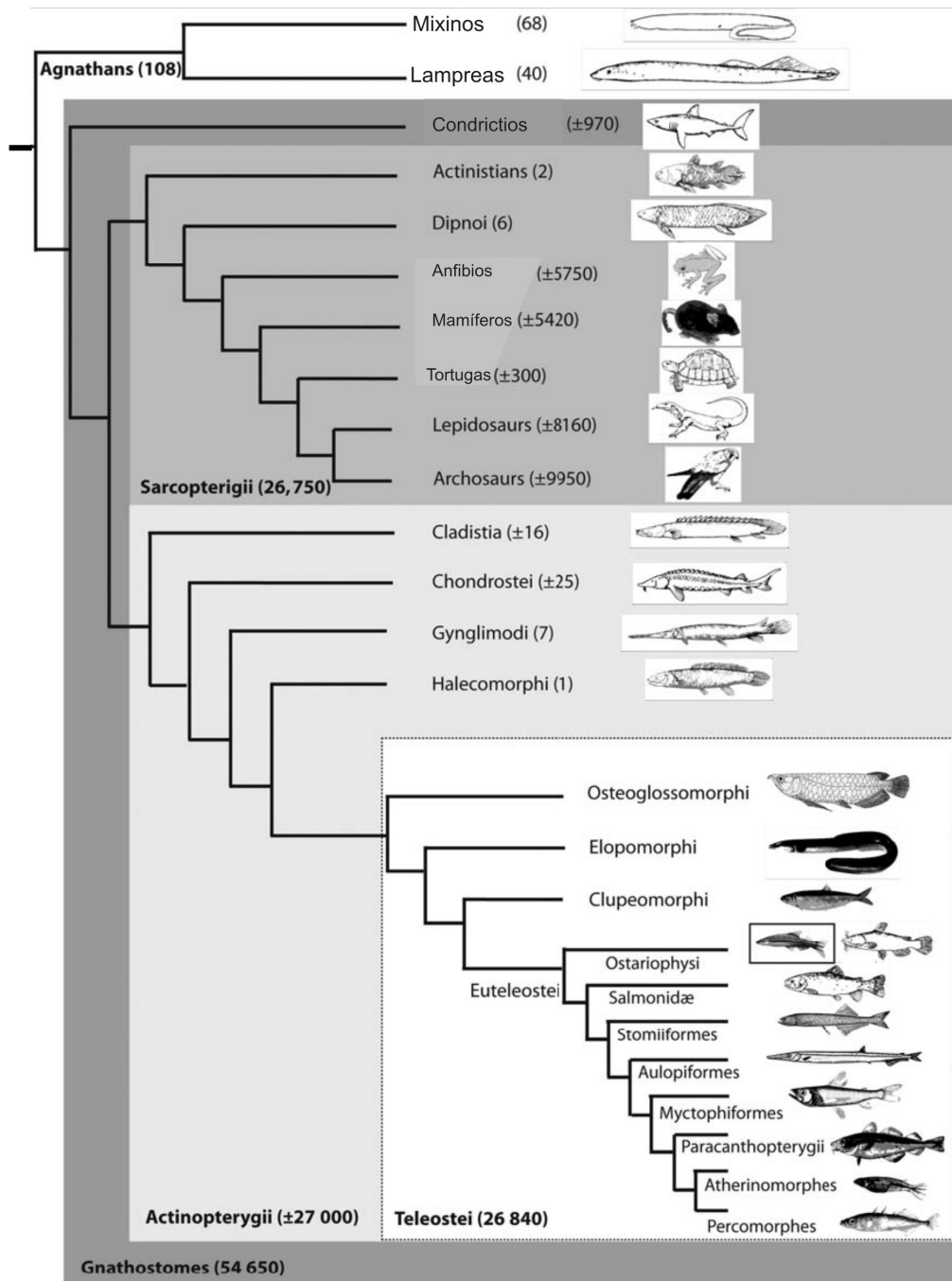
las primeras etapas de vida suelen ser muy bajas, y en muchos de los casos se debe al hecho de que los requerimientos físico-químicos y nutricionales durante este estadio suelen desconocerse o conocerse muy poco y, a diferencia de lo que ocurre en los adultos, los márgenes de tolerancia en ellas son muy pequeños. Sumado a ello, las causas de las malformaciones permanentes a menudo surgen en el las primeras etapas del desarrollo, en detrimento del bienestar de los peces y el rendimiento en la producción. Además, todos los órganos y los sistemas biológicos del organismo se desarrollan durante las etapas embrionarias y larvarias, y cómo estos sistemas se han establecido durante el desarrollo temprano influirá en el desempeño del pez a lo largo de su vida (Helvik et al., 2009).

Por ende, la industria de la acuicultura depende de los avances en investigación y desarrollo, ya que la base para la producción es el control y la manipulación de sistemas biológicos complejos. En cuanto a las poblaciones silvestres, conocimientos básicos sobre las etapas tempranas de la vida de estos organismos, además de contribuir al vasto campo de la biología, pueden dar una idea de cómo se adaptan a su entorno y sobreviven en diversas condiciones, lo que podría permitir, por ejemplo, hacer un mejor manejo de los recursos naturales y establecer normas para su adecuado cuidado.

### **Los peces: clasificación y relaciones filogenéticas**

Como se mencionó anteriormente, los peces son un grupo extremadamente diverso de animales vertebrados. Ellos incluyen a los peces primitivos sin mandíbula (Agnatos), a los peces cartilagosos (Condrictios) y a los peces óseos, los cuales están situados dentro del clado de los Teleostomos que incluye; a los actinopterygios y sarcopterygios (clado en el que también se encuentran los tetrápodos) (**Fig. 1**). Como se puede evidenciar, los peces no forman un único grupo monofilético diferente de los tetrápodos, por ello se piensa que los peces óseos están más relacionados a los tetrápodos que a los peces sin mandíbula y cartilagosos. Debido a esto, existen muchas características embriológicas que unen a los peces con el resto de los vertebrados, por lo que estos organismos son particularmente adecuados como

sistemas modelo para el estudio de la embriogénesis de vertebrados, así como también para estudios genéticos y fisiológicos (Kardong, 2006; Nelson, 2006).



**Figura 1.** Relaciones filogenéticas entre vertebrados, mostrando los distintos clados que contienen organismos que pueden incluirse dentro del término peces. Entre paréntesis se indica el número de especies conocidas hasta la fecha en cada uno de los clados mencionados. El rectángulo gris oscuro comprende a todos los vertebrados mandibulados (Gnatostomados), divididos en Sarcoperigios (gris medio) y Actinopterygios (Gis claro). El grupo de los teleósteos ha sido aumentado (cuadrado blanco con línea de puntos) de forma de mostrar dentro de él la localización del pez cebra (rectángulo). Adaptado de (Perry, 2010)

Dentro de la clase Actinopterygios (*peces de aletas con radios*) encontramos la división de los **Teleósteos** -Teleostei- (*peces óseos modernos*), dentro de la cual se encuentran la mayoría de los peces de importancia para el cultivo, exceptuando a los esturiones (**Fig. 1**). Algunas especies de teleósteos son particularmente estudiadas a niveles genéticos y genómicos, y se disponen por así, de bases de datos de libre acceso, como es el caso del pez cebra, medaka y los peces globo fugu y *Tetraodon nigroviridis*; y los recientemente incorporados espinoso y bacalao del Atlántico. Además, para el caso de las dos primeras especies mencionadas, existen en el mundo miles de laboratorios y consorcios trabajando en distintos aspectos de su biología, lo que los convierte en poderosas herramientas para la investigación científica y tecnológica.

### **El modelo de estudio: *Danio rerio***

El pez cebra, *Danio rerio* (Hamilton, 1822) es un pequeño ciprínido bentopelágico originario de Asia, que habita las aguas dulces del Río Ganges (India), Pakistán, Bangladesh, Nepal y Myanmar.

A continuación se destaca su clasificación taxonómica obtenida de la base de datos del NCBI (del inglés *National Center for Biotechnology Information*):

Reino: Metazoa

Phylum: Chordata

Subphylum: Craniata

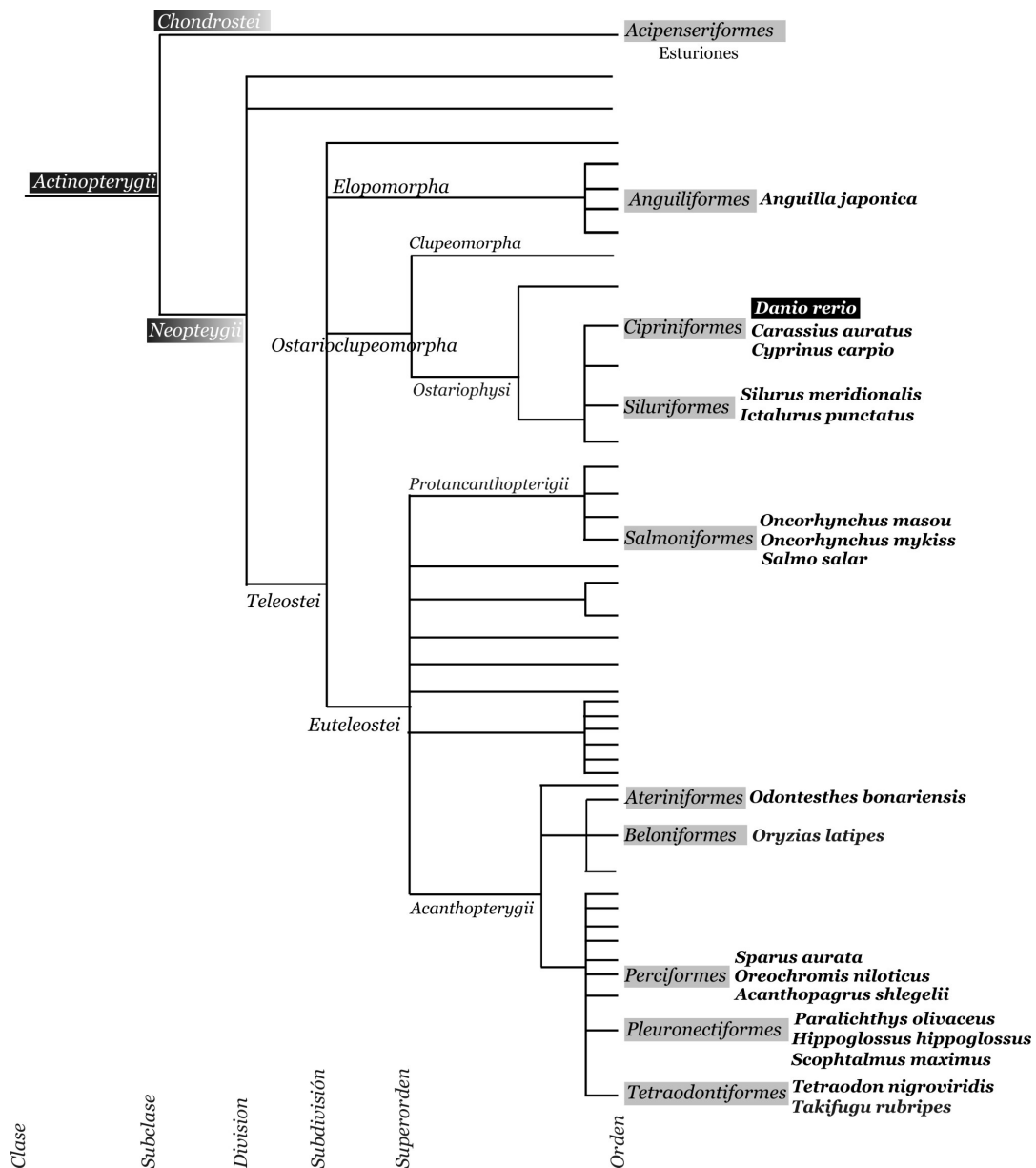
Clase: Actinopterygii

Orden: Cypriniformes

Familia: Cyprinidae

Género especie: ***Danio rerio***

En la **Figura 2** se encuentra representado un árbol filogenético mostrando las relaciones entre *Danio rerio* y el resto de los miembros de la clase Actinopterygii. Además, en el mismo árbol se encuentran indicados los principales órdenes y sus miembros respectivos que incluyen a peces de relevancia en acuicultura, con excepción de: medaka, pez cebra y los peces globo.

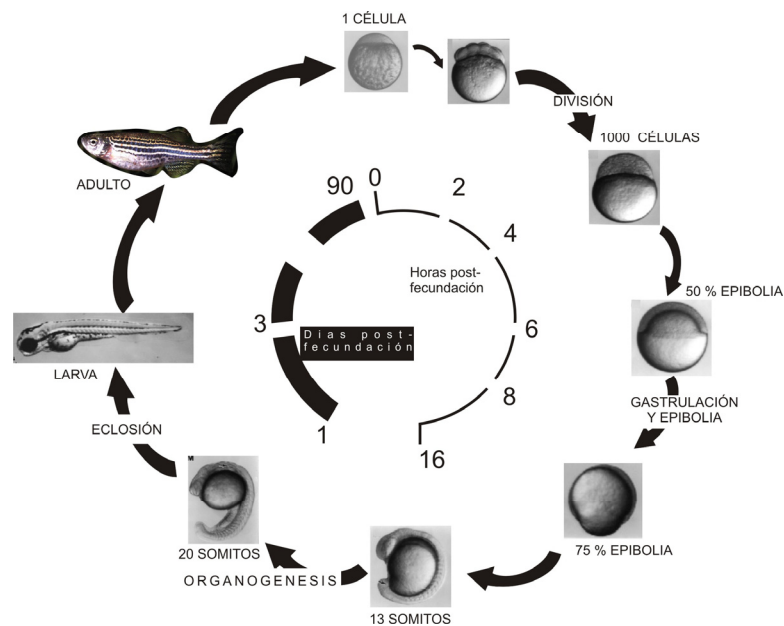


**Figura 2.** Relaciones filogenéticas entre *Danio rerio* y algunas otras especies de peces Actinopterygios, muchas de las cuales son de importancia a nivel científico y/o comercial. Adaptado de (Nelson, 2006).

### Características generales y ciclo de vida

El pez cebra es un pez tropical ovíparo, que crece rápidamente a una temperatura de entre 26 y 28.5 °C y completa su ciclo de vida en aproximadamente 3 meses, alcanzando una longitud máxima de 6 cm (**Fig. 3**). Es una especie que se reproduce fácilmente, de bajo costo, de mantenimiento

sencillo, y bajo condiciones apropiadas, puede producir un gran número de embriones completamente transparentes. Debido a esta y otra serie de características, se ha convertido en un modelo muy importante en neurobiología, toxicología, fisiología, así como también en biología del desarrollo. Además, las conclusiones obtenidas a partir del mismo pueden ser extrapoladas a otras especies, entre ellas a los humanos (Briggs, 2002; Nusslein-Volhard, 1994; Rubinstein, 2003; Westerfield & ZFIN., 2000).



**Figura 3.** Esquema del ciclo de vida del pez cebra a 28.5 °C, indicando los principales eventos que tienen lugar durante el desarrollo embrionario temprano y tardío.

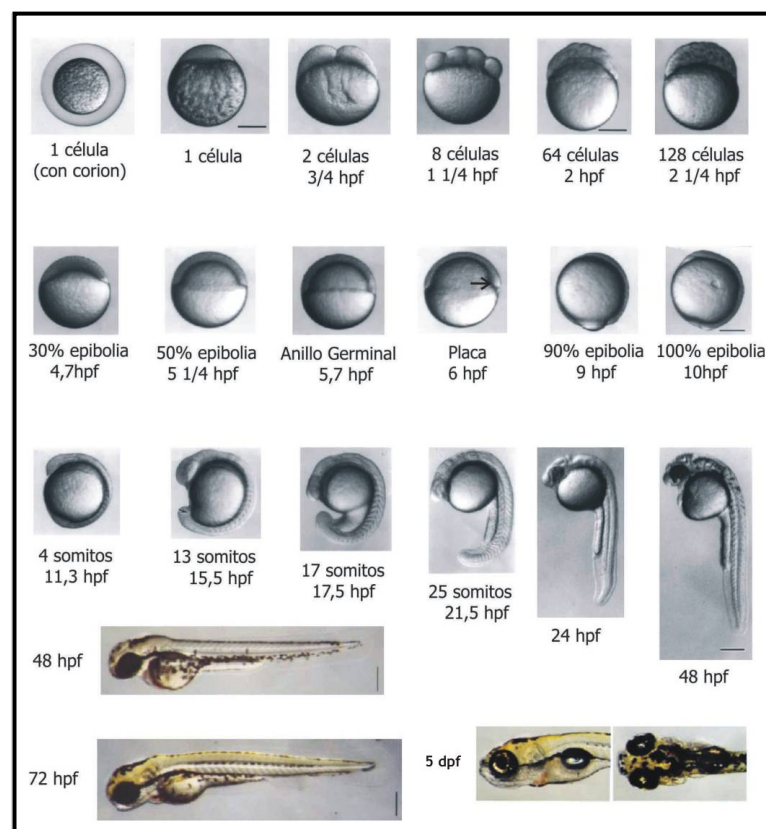
Dentro de las características más sobresalientes de *Danio rerio*, que lo vuelven atractivo para ser utilizado como sistema modelo, podemos mencionar:

- Tamaño pequeño y buena tolerancia a elevadas densidades de población, pudiendo mantenerse grandes poblaciones en un laboratorio de reducidas dimensiones.
- Tiempo de generación de 90-120 días.
- Producción de desoves durante todo el año, pudiendo poner la hembra entre 50 -100 ovocitos en cada uno de ellos.
- Fecundación y desarrollo embrionario externos, siendo así todos los estadios del desarrollo accesibles.

- Desarrollo embrionario muy rápido y a su vez, el embrión y la larva son completamente transparentes, lo que permite monitorear visualmente todo el desarrollo embrionario del pez.
- Existencia de una gran variedad de herramientas genéticas disponibles para su estudio y del genoma casi completamente secuenciado y disponible en la base de datos **Ensembl** ([www.ensembl.org/Danio\\_rerio](http://www.ensembl.org/Danio_rerio)).

#### *Algunas consideraciones en torno al desarrollo embrionario del pez cebra*

El desarrollo embrionario del pez cebra se ha dividido en una serie de estadios agrupados en siete períodos. A cada período se le ha dado un nombre característico, que lo hace más fácil de ser reconocido. Es importante tener en cuenta que un estadio define más que un instante en el tiempo, ya que es una forma para poder localizar aproximadamente una parte de la continuidad del desarrollo. Los distintos estadios del desarrollo pueden relacionarse con las horas post-fecundación (hpf) a 28,5°C (temperatura estándar de incubación de los embriones) (**Tabla 1, Fig. 4**).



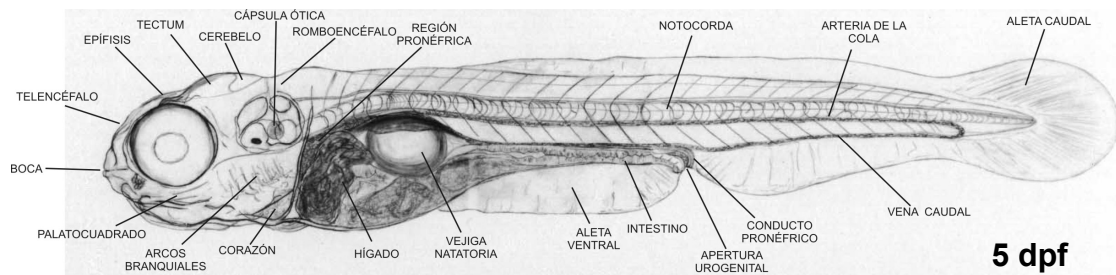
**Figura 4.** Principales estadios del desarrollo embrionario de *Danio rerio*. Se indica la denominación del estadio y las hpf a 28,5°C. La flecha muestra la localización del escudo embrionario. Las barras representan: 250 μm. Adaptado de (Kimmel et al., 1995).

## Estadios del desarrollo embrionario a 28, 5 ° C

Estadio	hpf	Descripción
<i>Periodo de cigoto</i>		
1 célula	0	El huevo recién fecundado completa el 1 <sup>er</sup> ciclo de división celular
<i>Periodo de división</i>		
2 células	0,75	Los ciclos de división del 2 al 7 ocurren rápidamente y de manera sincrónica
4 células	1	
8 células	1,25	
16 células	1,50	
32 células	1,45	
64 células	2	
<i>Periodo de blástula</i>		
128 células	2,25	Ciclos de división rápidos y metasincrónicos dan lugar a otros más lentos y asincrónicos al momento de ocurrir la transición de la blástula media (TBM). Luego comenzará la epibolia.
256 células	2,50	
512 células	2,45	
1000 células	3	
Alto	3,3	
Rectangular	3,7	
Esfera	4	
Cúpula "Dome"	4,3	
30 % de epibolia	4,7	
<i>Periodo de Gástrula</i>		
50 % de epibolia	5,25	Hacia el final de la epibolia, movimientos morfogenéticos de involución, convergencia y extensión, forman el epiblasto, hipoblasto y los ejes embrionarios,
Anillo germinal	5,7	
Escudo	6	
75 % de epibolia	8	
90 % de epibolia	9	
Brote caudal	10	
<i>Periodo de Segmentación</i>		
1 somito	10,3	Se desarrollan los somitos, los primordios de los arcos faríngeos y los neurómeros. Comienza la organogénesis, los movimientos tempranos y la cola.
5 somitos	11,7	
14 somitos	16	
20 somitos	19	
26 somitos	22	
<i>Periodo de Faríngrula</i>		
Prim-5	24	El eje corporal se endereza respecto de la curvatura temprana que tenía en torno al saco vitelino. La circulación, pigmentación y las aletas comienzan a desarrollarse.
Prim-15	30	
Prim-25	36	
"High-pec"	42	
<i>Periodo de eclosión</i>		
"Long-pec"	48	Se completa la morfogénesis de los sistemas de órganos primarios. Se desarrollan los cartílagos de la cabeza y las aletas pectorales. La eclosión ocurre de manera asincrónica.
"Pec-fin"	60	
<i>Periodo de larva temprana</i>		
Boca sobresaliente	72	Se ha completado la mayor parte de la morfogénesis y se produce la eclosión del corion.

**Tabla 1.** Breve descripción de los periodos y estadios del desarrollo embrionario del pez cebra a 28.5°C. Los estadios denominados "prim", se refieren a la posición de una estructura particular: el primordio de la línea lateral posterior. Adaptado de (Kimmel et al., 1995).

Durante el 3<sup>o</sup> dpf (72 hpf) los embriones comienzan a eclosionar del corion, y reciben el nombre de larvas. Entre el 4<sup>o</sup> y 5<sup>o</sup> dpf se infla la vejiga natatoria, y larva comienza a nadar y a mover sus mandíbulas en busca de alimento. Para este momento, la extensión del saco vitelino ha prácticamente desaparecido y el tubo intestinal se ha colocado en posición más ventral (**Fig. 4 y 5**) (Kimmel et al., 1995; Shrader et al., 2003).



**Figura 5.** Esquema mostrando las principales estructuras anatómicas de una larva de 5 dpf. Adaptado de (Haffter et al., 1996).

## El crecimiento en los peces

El crecimiento es el aumento del tamaño y número de células, así como de las estructuras de un organismo, lo cual conlleva a un aumento de su tamaño total. Existen dos tipos de crecimiento, el crecimiento somático y el crecimiento en masa. El crecimiento somático es el progreso del organismo en dimensiones longitudinales, como resultado de la multiplicación celular y la aposición de sustancias celulares. El crecimiento en masa es el aumento en volumen debido a la acumulación de reservas energéticas y formación de órganos reproductores. Tanto el crecimiento como la división celular dependen de la capacidad de los organismos acuáticos para asimilar y utilizar los nutrientes que se encuentran en su hábitat. De este modo, los nutrientes del alimento son usados por los organismos acuáticos para construir nuevas estructuras celulares y para la obtención de energía (anabolismo y catabolismo). Sin embargo, existen múltiples y diversos factores que afectan este proceso (Martínez-Porchas et al., 2009).

Por otra parte, si se consideran los patrones y estrategias de crecimiento, los peces ocupan una posición única dentro de los vertebrados. Con algunas excepciones, los peces crecen indefinidamente, de manera que su talla final nunca se fija. Una de estas excepciones la constituye el pez cebrá, considerado recientemente un pez de crecimiento definido (Biga & Goetz, 2006). En general, los peces invierten la mayor parte de este crecimiento en aumentar el tejido muscular, mayormente las fibras musculares blancas y

anaeróbicas, también denominadas fibras rápidas (los peces también poseen fibras oxidativas lentas denominadas fibras rojas). Esto es lógico, ya que el músculo suele constituir más de la mitad de la masa corporal del pez. El crecimiento no es lineal, y aún bajo óptimas condiciones el mismo depende de alteraciones endógenas en las hormonas y sus receptores (Mommsen, 2001). Otra diferencia única de los peces es que tanto la hiperplasia como la hipertrofia muscular contribuyen al crecimiento post-larval mientras que en otros vertebrados sólo la hipertrofia contribuye a dicho crecimiento (Rowlerson et al., 1997).

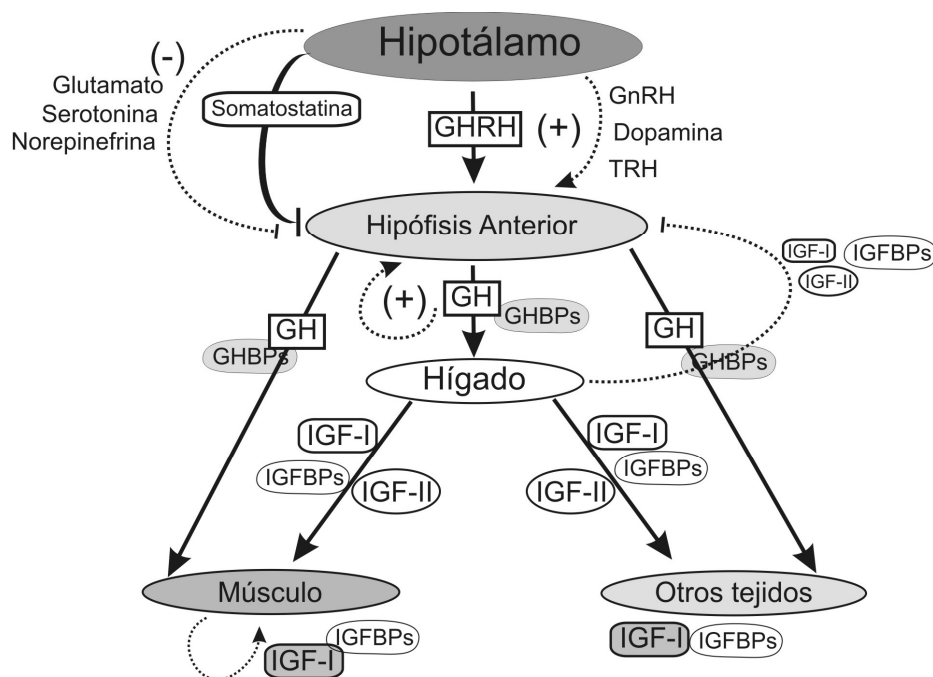
### **Endocrinología del crecimiento en peces**

El crecimiento es el resultado de un proceso enormemente complejo en el que interactúan factores ambientales, nutricionales y genéticos. El eje somatotrópico, con la hormona de crecimiento (GH) como pieza central, regula el crecimiento de los vertebrados integrando todos estos factores.

En los teleósteos el eje endocrinológico más significativo en el control del crecimiento consiste en la GH, sus hormonas efectoras y respectivas proteínas de unión y receptores. Esta hormona hipofisiaria actúa principalmente sobre el hígado, estimulando la producción del factor de crecimiento de tipo insulina I (IGF-I del inglés *insuline like growth factor I*) de forma mayoritaria, al igual que ocurre en mamíferos, y a diferencia de estos últimos, GH también estimula la producción de IGF-II (Reinecke et al., 2005). Estos factores tienen potente actividad mitogénica y median así, gran parte de las actividades fisiológicas de GH. Sin embargo, GH también puede actuar de manera directa sobre otros tejidos, estimulando en ellos la producción de IGFs, o mediando funciones directas independientes de estos factores, para las cuales se desconocen los mecanismos de acción (Florini et al., 1996; Reinecke et al., 2005; Wong et al., 2006). Además, es importante mencionar que algunos paradigmas del control del crecimiento cambiaron al descubrirse que la mayoría de los tejidos son capaces de sintetizar IGFs (Le Roith et al., 2001). Por otra parte, hipótesis recientes formuladas en base a investigaciones desarrolladas principalmente en vertebrados superiores, postulan que las IGFs, más que meros efectores de la acción de la GH, son hormonas que amplifican las acciones anabólicas de

esta hormona, a la vez que contrarrestan sus efectos sobre el metabolismo de lípidos y azúcares (Kaplan & Cohen, 2007). La complejidad de este sistema refleja la cantidad de elementos que componen el mismo.

En la **Figura 6**, se representa un esquema simplificado de lo que se conoce en peces hasta la fecha. Como puede observarse, la secreción hipofisaria de GH está básicamente regulada por dos neuropéptidos hipotalámicos: la hormona liberadora de GH (GHRH, acción estimuladora) y la somatostatina (SRIF, acción inhibitoria), además de la Ghrelina, proveniente del estómago (acción estimuladora), y el péptido de origen gástrico, entre otros. A su vez, tanto IGF-I como IGF-II podrían actuar en un loop regulatorio largo, que terminaría inhibiendo la secreción hipofisaria de GH (Wong et al., 2006). Una vez liberada al torrente circulatorio, la GH se acompleja con proteínas de transporte específicas (GHBP), descritas más adelante en esta sección. Finalmente, la GH ejerce su acción uniéndose a receptores de membrana específicos, situados en la superficie celular de los tejidos diana.



**Figura 6.** Esquema simplificado del eje endocrinológico del crecimiento en peces. Los signos (+), implican un efecto estimulador y los (-), un efecto inhibitorio. En el esquema se han indicado los principales componentes que pueden tener relevancia para este trabajo de tesis, aunque no todos. Otros tejidos podrían incluir a: las gónadas, el tejido adiposo, entre otros. Abreviaturas: IGFBPs, proteínas de unión a IGFs; GHBP, proteínas de unión a GH; TRH, hormona liberadora de tirotrófina; GnRH, hormona liberadora de gonadotrofina. Adaptado de (Wong et al., 2006).

Por último, tanto GH, como IGF-I y también insulina (producida y liberada por las células beta pancreáticas) son consideradas hormonas miogénicas en peces, y son capaces de ejercer acciones promotoras del crecimiento (Mommsen, 2001).

#### *GH: características y funciones*

Se trata de una hormona peptídica de simple cadena de entre 20-22 kDa, (dependiendo la especie), que es sintetizada y liberada por la hipófisis anterior. Dada su similitud estructural y solapamiento funcional, clásicamente se han englobado dentro de la misma familia proteica a GH y a prolactina (PRL), en la que se han incorporado como nuevos miembros los lactógenos placentarios (PLs) de mamíferos (Niall et al., 1971) y la somatolactina (SL) de peces (Ono et al., 1990; Rand-Weaver et al., 1991). Estudios recientes sugieren que PRL y SL estarían más relacionadas evolutivamente entre sí que a GH, habiendo evolucionado de un ancestro común (Kawauchi & Sower, 2006).

En los peces, GH es una hormona pleiotrópica y además de su rol preponderante en el crecimiento, participa en la mayoría de los procesos fisiológicos importantes del organismo: regula el balance iónico y osmótico, interviene en el metabolismo lipídico, proteico y de los carbohidratos, tiene funciones en la reproducción, así como también inmunitarias, entre otras (Reinecke et al., 2005). Con respecto a sus acciones promotoras del crecimiento, puede ejercerlas a varios niveles (Mommsen, 2001):

- Afectando el sistema nervioso central (SNC). La hormona puede alterar la agresión, los patrones de actividad física, o el apetito.
- Influyendo directamente sobre la síntesis proteica en el músculo, a través de sus receptores en este tejido, o por medio de la producción local de IGF-I. También de manera indirecta, a través de la producción hepática de IGF-I.
- Controlando el “suministro lateral”: incrementando el crecimiento intestinal, la capacidad digestiva y los fenómenos de transporte, entre otros.

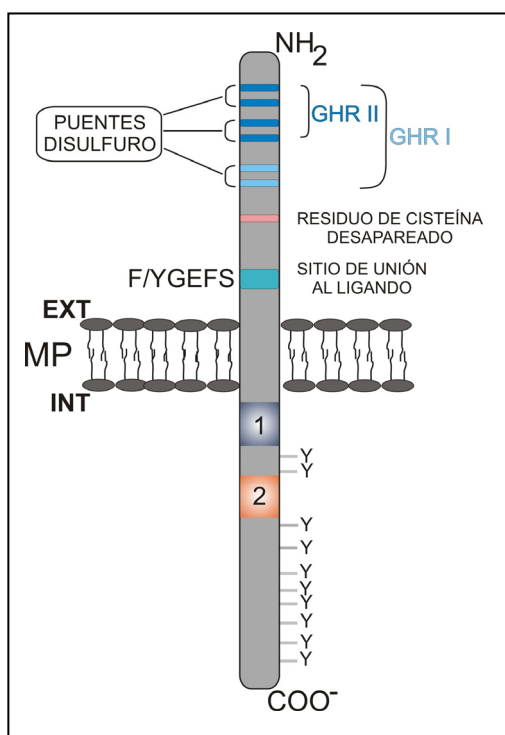
Sumado a la complejidad intrínseca del sistema cabe destacar que estudios recientes indican que la expresión del gen de GH no estaría confinada a la glándula pituitaria. La misma ha sido detectada en tejidos neuronales,

inmunológicos, reproductivos, digestivos y respiratorios y en los sistemas integumentario, muscular, esquelético y cardiovascular, en los cuales podría actuar localmente en lugar de hacerlo de manera endócrina. Se piensa que estas acciones estarían involucradas en la proliferación y diferenciación de las células y los tejidos, previo a la ontogenia de la glándula pituitaria. También es probable que la GH local complemente sus acciones endócrinas y las mantenga luego de la senescencia de la glándula pituitaria y de la somatopausa. Las acciones parácrinas y autócrinas de GH son sin embargo mediadas través de diferentes mecanismos de señalización que los que median sus acciones endócrinas y éstos pueden promover la oncogénesis. Por ende, esta GH extrapituitaria podría tener no sólo relevancia fisiológica sino también fisiopatológica (Harvey, 2010). En peces, los transcriptos tanto de GH como de IGF-I han sido detectados en muchos tejidos no relacionados al eje somatotrófico y también previo a la formación del mismo (Li et al., 2007).

*Los receptores de GH: GHRs (del inglés growth hormone receptors)*

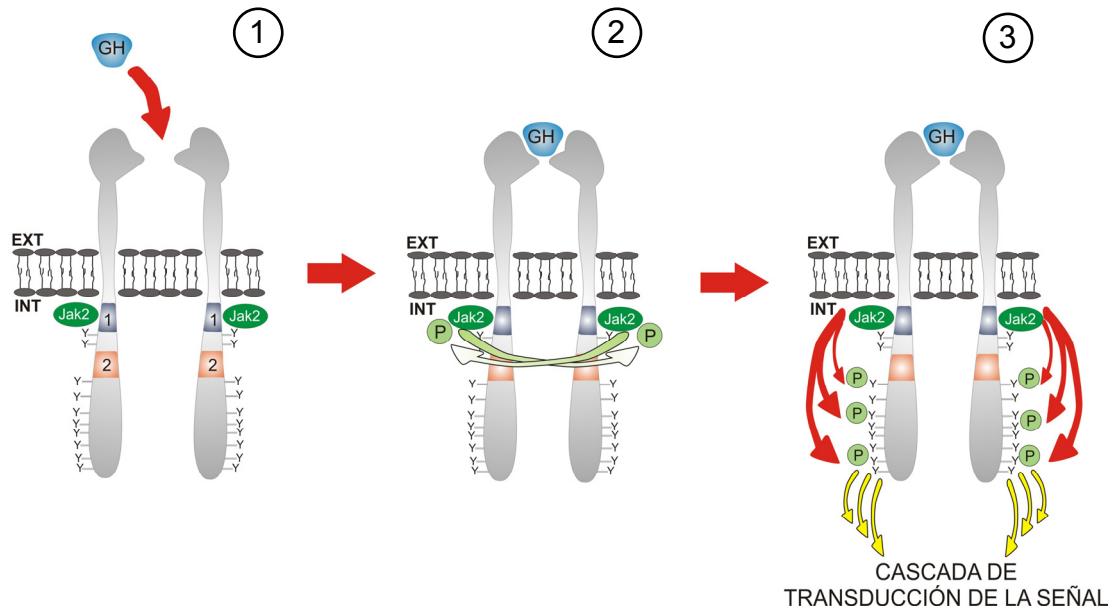
GH, al igual que los demás miembros de la familia (PRL y SL) actúa a través de receptores (GHRs) situados en la membrana celular de los tejidos blanco, y se asume que sus acciones están gobernadas por la abundancia de sus receptores más que por sus niveles en circulación. Estos receptores, que pertenecen a la superfamilia de receptores de citoquina clase I, son proteínas transmembrana de simple paso, con una longitud que varía entre los 500 a los 650 aa., dependiendo de la especie (Kopchick & Andry, 2000). Todos los miembros de la superfamilia comparten características comunes: un dominio extracelular simple con varios pares de cisteínas conservados; un dominio de unión al ligando característico F/YGEFS, y un dominio intracelular con dos cajas conservadas (1 y 2) y varios residuos de tirosinas, implicados en la transducción de la señal por cascadas de fosforilación (Rowland et al., 2005; Zhu et al., 2001). De las cajas de señalización conservadas, la caja 1 estaría involucrada en la unión a las tirosinas kinasas de la familia Janus (**JAK**), de forma mayoritaria, y la caja 2, en la internalización del receptor mediada por ubiquitinación (Govers, 1999) (**Fig. 7**).

Además, este receptor es una proteína altamente glicosilada (posee sitios de *N*-glicosilación, observados en la mayoría de las especies estudiadas hasta el momento) y estaría sometida también a poli-ubiquitinación (Kopchick & Andry, 2000).



**Figura 7.** Esquema simplificado de un GHR. En la región extracelular se pueden observar los residuos de cisteína (C) y el dominio de unión a ligando; y en la región intracelular, las cajas de señalización conservadas y los residuos de tirosina (Y). Se ha indicado una de las regiones diferenciales entre los GHR de tipo I y II (mencionados más adelante en esta sección). Dos ó 4 (dependiendo del tipo de GHR) de los residuos de cisteína formarían puentes disulfuro intracatenarios. El 5<sup>o</sup> ó 7<sup>o</sup> residuo, podría formar un puente disulfuro intermolecular (dimerización del receptor). Abreviaturas: EXT, región extracelular; INT, región intracelular; MP, membrana plasmática; NH<sub>2</sub>, extremo aminoterminal, COO<sup>-</sup>, extremo carboxilo terminal. Adaptado de (Kopchick & Andry, 2000).

Según estudios realizados en mamíferos, los GHRs actúan en forma de dímeros que se encuentran pre-formados en la superficie celular y con las kinasas **JAK** unidas a sus respectivos sitios de cada monómero. La acción de GH se inicia cuando la misma se une a su receptor en el tejido blanco e induce una rotación del complejo, lo que permitiría que las kinasas queden lo suficientemente próximas como para transfosforilarse mutuamente y volverse activas. Una vez activas, serían capaces de fosforilar los residuos de tirosina del GHR, iniciando así la cascada de transducción de la señal (**Fig. 8**) (Lanning & Carter-Su, 2006; van den Eijnden et al., 2006). En esta cascada están implicadas proteínas que contienen sitios de homología a Src2 (SH2), como las activadoras de la transcripción y transductoras de señal (**STAT**), entre las que podemos destacar a STAT 5, así como también las proteínas kinasas activadas por mitógenos (MAPK) y la vía de la fosfatidil inositol 3 kinasa (PI3K) (Lanning & Carter-Su, 2006; Waters et al., 2006).



**Figura 8.** Esquema simplificado del mecanismo de acción de GH-GHR. Los números enmarcados en círculos indican la secuencia en que se darían los eventos. En el esquema se han indicado las cajas de señalización, las kinasas de la familia Jak, los dímeros del GHR, así como los eventos de transfosforilación y fosforilación. Las letras P (círculos verdes), simbolizan el grupo fosfato adicionado durante el proceso de fosforilación. Adaptado de (Lanning & Carter-Su, 2006; Waters et al., 2006).

Es importante destacar que los niveles de GH en circulación dependen no sólo del ritmo de secreción por parte de la hipófisis, sino también de la velocidad y el modo en que es eliminada de la misma. Esto está relacionado en gran medida a las proteínas de unión a GH (GHBPs), que modifican el índice de recambio y la vida media, y por ende los niveles de hormona libre disponible para unirse a su receptor. En la mayoría de las especies de mamíferos estudiadas se ha observado que las GHBP son formas glicosiladas y solubles (Bass et al., 1991), que corresponden a la porción extracelular del receptor (Hadden & Prout, 1964). Los estudios indican que en algunas especies, las GHBPs provienen de proteólisis de la parte extracelular del GHR (humanos, cerdo y pollo), mientras que en ratón y rata, las GHBPs, provienen del procesamiento alternativo de los transcritos de ARNm que codifican para el receptor. Para el caso de peces, han sido caracterizadas GHBPs en pocas especies y sus mecanismos de generación son aún desconocidos (Björnsson et al., 2002).

Con respecto a la distribución tisular del receptor en peces, se ha demostrado la presencia de GHRs principalmente en hígado (al igual que en mamíferos) pero también en otros órganos como cerebro (Perez Sanchez et al., 1991), gónadas (Gomez et al., 1999), branquias, intestino, riñones (Sakamoto & Hirano, 1991) y músculo (Tse et al., 2003) entre otros.

Durante el transcurso de la última década, los ADNc de los *ghrs* de varias especies de peces fueron clonados y su estructura primaria indicaba que si bien contenían todos los dominios funcionales de otros vertebrados existía una baja homología de secuencia entre ellos, a diferencia de lo que ocurría en mamíferos (Pérez-Sánchez et al., 2002). Cuando la secuencia de aminoácidos de varios GHRs se alineaban se observaba que las mismas se agrupan en dos clados que fueron denominados **GHR tipo I** y **GHR tipo II** (Fukamachi et al., 2005; Jiao et al., 2006; Saera-Vila et al., 2005). Los miembros de ambos clados, compartían las características comunes antes mencionadas, pero diferían en el número de cisteínas extracelulares y en el de tirosinas intracelulares (**Fig. 7**). Por otra parte, también se observó la existencia de mayor similitud entre las secuencias de los GHRs de tipo I y las de tetrápodos, que entre estas últimas y los de tipo II.

Como consecuencia de ensayos de unión y estudios filogenéticos, recientemente se ha postulado que los GHR I podrían ser en realidad receptores para SL (SLR), y los de tipo II, los verdaderos receptores de GH (Fukamachi et al., 2005). Los SLR han sido caracterizados sólo en dos especies de peces; medaka (Fukamachi et al., 2005) y salmón japonés (Fukada et al., 2005) y llamativamente al realizar análisis filogenéticos integrando a todos los GHRs, los SLRs agrupan con los GHR tipo I. Por otro lado, si bien la expresión de ambos GHRs es ubicua, las concentraciones relativas de los mismos en cada tejido son significativamente diferentes (Jiao et al., 2006).

SL: características y funciones

A diferencia de GH y PRL, SL es una hormona exclusiva de los peces y está relacionada estructural, evolutiva y quizás también funcionalmente con GH y PRL. Según estudios recientes, se habría perdido durante la evolución del

linaje de los vertebrados que condujo a los tetrápodos (Fukamachi & Meyer, 2007). Su actividad biológica es aún poco conocida, aunque ha sido involucrada en diversos procesos fisiológicos como: pigmentación, lipólisis, reproducción, balance ácido-base y estrés (Fukamachi et al., 2004; Fukamachi et al., 2006), adaptación ambiental (Zhu & Thomas, 1996; Zhu & Thomas, 1998) y regulación de la homeostasis energética en dorada (Vega-Rubin de Celis et al., 2003). Se desconocen cuáles son los tejidos blanco para SL, así como sus efectores principales. Los SLR sólo han sido caracterizados en dos especies de peces, como se mencionó anteriormente y filogenéticamente agrupan con los GHR I de otras especies de peces, lo que ha fundamentado parte de la incertidumbre acerca de la real existencia de dos receptores para GH, y que uno de ellos sea en realidad un SLR.

Por otra parte, estudios en trucha arco iris y ciprínidos han revelado la presencia de dos copias parálogas de SL, que se habrían generado con la duplicación genómica específica de los teleósteos. No obstante, no todos los teleósteos han conservado ambas formas, ya que se ha comprobado que *fugu* y *Tetraodon nigroviridis* presentan una única copia de SL (Zhu et al., 2004).

#### Desarrollo embrionario y eje somatotrófico

Poco se sabe acerca del rol de las hormonas del eje durante el desarrollo embrionario temprano y tardío, no sólo en peces, sino en vertebrados en general, debido principalmente a las limitaciones asociadas al desarrollo de los mamíferos, que es donde se han llevado adelante la mayoría de los estudios funcionales conocidos hasta el momento. En principio existen discrepancias con respecto a las denominaciones en este sentido, ya que probablemente no se podría hablar de eje durante la embriogénesis cuando todos sus componentes no se han desarrollado por completo. Es por ello que en este punto, se hace referencia muchas veces a la presencia de las hormonas (aunque no esté el órgano que la sintetiza) pero sugiriendo probablemente un rol autócrino/parácrino que muy bien podría diferir de su rol endócrino.

Existen varios estudios en peces, aunque algunos son controversiales. Sin embargo, no se debe dejar de tener presente la enorme diversidad en sus formas de vida y de su biología en general.

En los peces se sabe que aunque el eje somatotrófico (ST) es la fuente principal de GH e IGF-I circulantes, una vez que la glándula pituitaria se ha desarrollado y el hígado es funcional; los transcriptos que codifican para estas hormonas también están presentes en muchos tejidos no relacionados a dicho eje, así como también en embriones, previo a que el eje ST y el hígado sean funcionales. Estas fuentes de GH no pituitaria e IGF-I no hepática parecen regular una serie de eventos celulares, probablemente a través de interacciones parácrinas o autócrinas. Muchos estudios demuestran que los ARNm de las isoformas de GH (cuando existen) y de los IGFs, y sus receptores, están presentes en los ovocitos y embriones de mamíferos y peces (antes de la formación del eje ST) y los datos de RT-PCR cuantitativa sugieren que los genes son expresados activamente (Li et al., 2007). Lo mismo ocurre para SL, cuyos transcriptos junto a los de GH y PRL, han sido detectados en ovocitos no fecundados y en los primeros estadios del desarrollo, previo a la transcripción del genoma del cigoto en embriones de trucha arcociris (Yang et al., 1999) y en estadios embrionarios tempranos de la dorada (Herrero-Turrion et al., 2003a; Herrero-Turrion et al., 2003b). El rol de SL durante el desarrollo embrionario y larval no es conocido. Sin embargo, al igual que para las otras hormonas pituitarias, se ha sugerido que podría tener un rol en el desarrollo larvario temprano de forma autócrina/parácrina. Se ha sugerido que SL tendría un rol en la adaptación ambiental de los embriones y larvas y en el desarrollo de fibras nerviosas (Herrero-Turrion et al., 2003a). Además, algunos estudios sugieren que, en el desarrollo temprano, SL estaría involucrada en la movilización energética (glicogenólisis y la subsecuente glucólisis), lo que podría estar asociado a la rápida reabsorción del saco vitelino, el metabolismo lipídico y de los carbohidratos, la respuesta al estrés y la regulación del calcio, el cual participa en la división celular y la mineralización de los huesos (Herrero-Turrion et al., 2003a). Estos resultados han alimentado la especulación sobre el papel de estas hormonas en la maduración de los ovocitos y la división celular del embrión temprano, aunque los roles específicos aún no han sido establecidos. Se ha propuesto que los productos de estos genes juegan un papel importante en los complejos procesos epigenéticos que tienen lugar a medida que el genoma del ovocito es silenciado y el genoma del embrión se expresa (Li et al., 2007).

Con respecto a lo estudiado en mamíferos, en humanos las diferentes isoformas de los transcritos de *ghr* han sido detectados a partir del tercer trimestre de la vida fetal en adelante (Kenth et al., 2008). Sin embargo, en este punto es importante tener en cuenta las diferencias a nivel del desarrollo embrionario temprano entre mamíferos y peces, principalmente supeditadas por la oviparidad (en general) de estos últimos.

Por otro lado, se ha visto, que los efectos de un incremento considerable en el crecimiento mediados por la sobreexpresión de GH comienzan a partir del estado larvario y no parecen incidir durante las primeras etapas del desarrollo embrionario (Devlin et al., 1994).

¿Qué se sabe en el pez cebra acerca del eje somatotrófico?

En esta especie, existe una única isoforma de GH, y dos isoformas de SL (SL alfa y SL beta).  $SL\alpha$ , es similar a la mayoría de las SL de otros teleósteos, mientras que  $SL\beta$ , posee baja identidad de aminoácidos con las SL de otras especies, y sólo ha sido identificada en trucha arcoiris, pez rojo, el bagre de canal, la trucha arcoiris y la anguila (Zhu et al., 2004).

Una particularidad de estos organismos, es que durante su crecimiento en el ovario, los ovocitos acumulan ARNm de origen materno que les servirá a los embriones para llevar adelante los primeros eventos de desarrollo embrionario, debido a que la transcripción a partir del genoma del embrión comienza recién en el estadio de 512 células (3 hpf a 28°C), estadio conocido como transición de la blástula media (TBM). Con respecto a GH y SL en estadios tempranos del desarrollo, si bien la hipófisis comienza a desarrollarse entre las 15 y 20 hpf (Guner et al., 2008; Herzog et al., 2003) y su primordio puede diferenciarse histológicamente recién a las 24 hpf (Chapman et al., 2005), en este período ya pueden observarse altos niveles de los transcritos correspondientes a GH,  $SL\alpha$  y  $SL\beta$ , los cuales se van localizando en los sitios específicos correspondientes a medida que avanza el desarrollo (Lopez et al., 2006). Así mismo, los transcritos para IGF-I y II y sus receptores pueden ser detectados a partir de las 0 hpf (Maures et al., 2002). Por ende, los transcritos de los efectores de GH, estarían presentes antes que el ARNm de la hormona y los

transcriptos de GH y SL estarían presentes antes de que se haya desarrollado por completo el órgano que los sintetiza. Esto podría implicar funciones en el desarrollo temprano y tardío de ambas hormonas, independientes de su función en el adulto.

A pesar de que se han observado múltiples efectos biológicos tanto para GH como para SL, sus mecanismos de acción y de transducción de la señal permanecen aún sin dilucidar en peces. Además, los posibles roles de estas hormonas durante el desarrollo embrionario son interrogantes recientes, para los que se tiene muy pocas respuestas, no sólo en peces, sino en el resto de los vertebrados incluyendo los mamíferos.

Por otra parte, al momento de comenzar este trabajo no habían sido caracterizados aún en el pez cebra, los receptores de GH y/o de SL y existía escasa información acerca de los componentes del eje somatotrófico tanto en el adulto como a nivel embrionario. En el trabajo de Jiao y cols. (Jiao et al., 2006), se hacía referencia a dos contigs genómicos con secuencias putativas de GHR para el pez cebra; y en nuestro laboratorio habíamos identificado en el genoma de este organismo 2 genes putativos para GHR/SLR comparando secuencias conocidas de GHR I y II de peces. Por estudio de las secuencias de aminoácidos que resultaban de transcritos predichos para ambos genes, habíamos determinado que uno de los genes podía generar una proteína que agrupaba, en un estudio filogenético, con los GHR I de otros teleósteos y la SLR de salmón y medaka, mientras que la proteína putativa derivada del otro gen agrupaba con los GHR de salmón y de medaka y los GHRII de otros peces teleósteos.

## Objetivos

**El objetivo general** de este trabajo de tesis fue ahondar en el conocimiento de los mecanismos de acción tanto de GH como de SL. Para ello nos propusimos dilucidar la estructura y función de él o los GHRs, así como también del SLR de pez cebra. Buscamos determinar en qué momento del desarrollo embrionario comienzan su expresión y en qué tejidos, algunos aspectos de su regulación y fundamentalmente, dilucidar su rol en el desarrollo embrionario temprano.

Para poder cumplir con el objetivo general, se plantearon los siguientes **objetivos específicos**:

- Caracterizar la secuencia de los transcritos de él o los GHRs y del SLR del pez cebra y determinar la organización y estructura de sus respectivos genes.
- Determinar su distribución tisular en adultos.
- Estudiar su patrón de expresión temporal y espacio-temporal durante el desarrollo embrionario
- Realizar estudios funcionales de los receptores durante el desarrollo embrionario empleando dos enfoques: estudiando sus patrones de expresión proteica, y mediante la utilización de técnicas de transgénesis y de silenciamiento génico temporal ver los efectos fenotípicos y fisiológicos de su ausencia.

# MATERIALES Y MÉTODOS



## MATERIALES Y MÉTODOS

### Material Biológico

#### *Animales*

Los peces cebra (*Danio rerio*) fueron criados en nuestro laboratorio, bajo un sistema cerrado de recirculación de agua, en peceras con menos de 1 ejemplar cada 2 litros de agua corriente filtrada (filtro de partículas + filtro de ósmosis reversa previo al ingreso al sistema). La temperatura fue mantenida a 28,5 °C y se respetó un fotoperíodo de 14 horas de luz y 10 horas de oscuridad. Los peces fueron alimentados tres veces por día, alternando hojuelas secas para peces de agua templada (Formulado comercial TetraMin®) y *Artemia sp.*

#### *Obtención y mantenimiento de embriones*

Los embriones fueron obtenidos mediante puestas programadas. Para ello, el día anterior al apareamiento, a última hora de la tarde, se separaron en canastas (situadas dentro de las peceras de reproducción) hembras y machos por separado. Las canastas de red se emplean para evitar que los peces adultos ingieran los huevos depuestos y permiten que a medida que tiene lugar la reproducción los embriones vayan cayendo al fondo de la pecera, quedando disponibles para ser colectados de forma rápida y sencilla. A la mañana del día de apareamiento, una vez encendida la luz del acuario, se juntaron machos y hembras en una proporción de 1 macho cada 2 hembras, manteniendo una densidad no mayor a 6 ejemplares por canasta de reproducción y se permitió el apareamiento por un tiempo de entre 15 a 30 min. Luego, se retiraron los reproductores, se quitó la canasta de reproducción, y se colectaron los embriones del fondo de la pecera. Los mismos se lavaron con agua filtrada a 28,5 °C y se dejaron desarrollar hasta la eclosión en medio de embriones E3 (NaCl 5 mM, KCl 0,17 mM, CaCl<sub>2</sub> 0,33 mM, 0,33 mM MgSO<sub>4</sub>) en placas de Petri plásticas en estufa a 28,5 °C (Estufa de embriones). Una vez eclosionadas, las larvas se mantuvieron en vasos de precipitado de 250 ml conteniendo también medio de embriones en estufa de alevinaje (contiene luz con fotoperíodo 14/10) a 28,5 °C. En todos los casos, el medio E3 fue renovado dos veces al día.

### *Alimentación y mantenimiento de alevines y juveniles de pez cebra*

Las larvas se mantuvieron en vasos de precipitado de 250 ml en estufa de alevinaje hasta el 5<sup>to</sup> día post fecundación (dpf) momento en el que comenzaron a ser alimentados con paramecios a razón de 4 veces por día, hasta los 14 dpf. A partir de ese día los ejemplares fueron transferidos a acuarios con sistema de recirculación y se comenzó a alimentarlos con “pasta” (alimento TetraMin® finamente molido mezclado con paramecios). En este módulo permanecieron hasta alcanzar un tamaño adecuado para ser transferidos a los módulos de engorde, donde recibieron la misma ración de alimento que los adultos.

### *Identificación de estadios del desarrollo embrionario de pez cebra*

Se emplearon los criterios descritos por (Kimmel et al., 1995).

### *Remoción del corion de los embriones*

Para el caso de embriones de estadios anteriores a 72 hpf, el corion fue retirado manualmente con la ayuda de pinzas de relojero N° 5 bajo una lupa estereoscópica binocular.

### *Desvitelinización de embriones y/o larvas*

El protocolo utilizado fue adaptado de (Link et al., 2006). El mismo permite la eliminación del saco vitelino de los embriones y/o larvas mientras que mantiene vivos a los mismos. Fue utilizado para embriones/larvas de 24 hpf hasta 120 hpf. Para ejemplares de estadios más tempranos, el vitelo fue eliminado manualmente bajo lupa binocular utilizando una aguja hipodérmica. El procedimiento consiste en colocar entre 30 y 50 embriones/larvas decorionados (cuando corresponda) en un tubo Eppendorf de 1,5 ml en hielo 1 min, para que se depositen en el fondo del tubo, y poder así eliminar la mayor cantidad de medio E3 posible. Luego, se agrega 1ml de solución Ginzburg Fish Ringer (NaCl 55 mM, KCl 1,8 mM, NaHCO<sub>3</sub> 1,25 mM, CaCl<sub>2</sub> 7 mM) y se procede a pipetear los ejemplares, de a uno por vez, con micropipeta p200, de manera de aplicar una presión mecánica sobre el vitelo. Una vez realizado esto, se agitan en vortex a 1100 rpm durante 5 min., monitoreando durante

todo el proceso el estado de los embriones/larvas. Este tiempo puede variar según el grado de ruptura observado. Finalmente, el tubo es centrifugado por 30 seg a 300 g a 4°C, se elimina el sobrenadante y se lava con 1 ml de Buffer de Lavado (NaCl 110 mM, KCl 3,5 mM, CaCl<sub>2</sub> 2,7 mM, 10 mM Tris-HCl pH 8,5) agitando durante 2 min a 600 rpm. El proceso de centrifugación y lavado se repite una vez más, y luego se procede a utilizar los embriones para la obtención de extractos proteicos.

#### *Obtención de tejidos y órganos de pez cebra adulto*

Peces adultos (aproximadamente 600 mg y un año de edad) fueron sacrificados por sobredosis de anestesia con benzocaína en un vaso de precipitado de 100 ml conteniendo agua del acuario. Los ejemplares sin vida se ubicaron sobre cámaras frías (placas de Petri de vidrio conteniendo hielo molido) y se realizó un corte con tijera sobre la cavidad ventral, desde la región caudal hasta el extremo de la cabeza. Bajo la lupa binocular, se extrajeron los órganos y tejidos de interés y fueron procesados por separado en TRIZOL (Invitrogen Co. Carlsbad, CA, USA), para la extracción de ARN total, o procesados para la obtención de extractos proteicos.

#### **Obtención de extractos proteicos totales**

Se homogeneizaron embriones y/o larvas (con o sin vitelo) o un pool de órganos proveniente de 1 macho y 1 hembra adultos con pilón y Eppendorf o *Potter-Elvehjem* respectivamente, en hielo, utilizando 1,2 µl de buffer de lisis [20 mM Hepes pH 7,9, 150 mM NaCl, 10 mM MgCl<sub>2</sub>, 1mM PMSF, 1mM EDTA, 1mM DTT, 0,5% v/v Tritón X-100, 1% de Cocktail de Inhibidores de proteasas p8340® (Sigma-Aldrich)] por cada embrión o 200 µl del mismo por cada unidad de tejido. El homogenado fue incubado 15 min. en hielo y se centrifugó a 15.400 g durante 15 min. a 4 °C. El sobrenadante fue extraído y almacenado a -70 °C hasta su posterior uso. En algunos casos se utilizó un buffer de lisis modificado, al cual se le adicionó 10 mM de Ortovanadato de Sodio (NaVO<sub>4</sub>) y 10 mM de NaF, ó en vez de ello, se eliminó el MgCl<sub>2</sub> y se suplementó al buffer con mayor cantidad de NaCl con el fin de mantener constante la concentración iónica.

### **Obtención de extractos proteicos enriquecidos en membranas plasmáticas mediante gradiente discontinuo de sacarosa**

Se homogeneizaron 200 larvas de 4 dpf sin vitelo ó un pool de 4 hígados provenientes de 2 machos y 2 hembras adultos con pilón y Eppendorf en hielo, en 800  $\mu$ l de Sacarosa 0,3 M fría suplementada con 0,3 % de Cocktail de Inhibidores de proteasas p8340® (Sigma-Aldrich). Luego, el homogenado se centrifugó a 500 g durante 10 min a 4 °C para obtener los sobrenadantes post-nucleares. Se tomaron 700  $\mu$ l de este sobrenadante y se le agregaron 1,3 ml de sacarosa 0,3 M suplementada con 0,3 % del Cocktail de inhibidores de proteasas. Luego, se agregaron 2,85 ml de sacarosa 2 M suplementada con inhibidores de modo de llegar a una concentración final de sacarosa de 1,3 M. Esto se mezcló adecuadamente, y se le agregó cuidadosamente (gota a gota) 2 ml de sacarosa 0,3 M más inhibidores, de manera de obtener un gradiente discontinuo de sacarosa. El gradiente se centrifugó 1 hora a 200.000 g a 4°C en Ultracentrífuga Beckman L8-80M y luego de la centrifugación, se extrajo la banda clara observable en el tubo, correspondiente a la fracción de membranas plasmáticas, utilizando pipetas Pasteur de punta fina. Esta fracción se colocó en un nuevo tubo, se llevó a volumen final de 5 ml con agua doblemente destilada estéril fría suplementada con inhibidores y se centrifugó nuevamente por 1 hora a 200.000 g a 4 °C. El pellet obtenido de esta centrifugación fue resuspendido en buffer de resuspensión de geles 2D [(7 M Urea, 2 M de tiourea, 4 % Chaps, 100 mM DTT, 1% de Cocktail de Inhibidores de proteasas p8340® (Sigma-Aldrich)] y conservado a -70°C hasta su uso.

### **Determinación de la concentración proteica**

La concentración de proteínas fue determinada utilizando el Kit Pierce® BCA Protein Assay (Thermo Scientific, Rockford, USA). Se siguieron las indicaciones del proveedor y se ajustó el volumen final de reacción a 500  $\mu$ l, de forma de poder medir pequeños volúmenes de muestra. En algunos casos, se utilizó también el fluorímetro Qubit® 2.0 (Invitrogen Co., Carlsbad, CA, USA), utilizando albúmina sérica bovina como patrón.

## **Separación electroforética de proteínas mediante geles de poliacrilamida desnaturalizantes: SDS-PAGE**

Los extractos proteicos fueron incubados durante 5 min. a 100 °C en solución de siembra (SDS 2%; azul de bromofenol 60 mg/l; glicerol 8,7 %; Tris-HCl 80 mM pH 6,8) conteniendo 100 mM DTT, luego centrifugados durante 3 min. a máxima velocidad, y sembrados en un minigel. La electroforesis en condiciones desnaturalizantes se llevó a cabo según (Laemmli, 1970). Se utilizaron minigeles verticales del sistema MiniProtean III (BioRad, CA, USA) de 1 mm a 1,5 mm de espesor, según el experimento. Los geles de concentración se prepararon al 5% de acrilamida y los de separación al 10 %, o 12% según el experimento. Las corridas se llevaron a cabo a temperatura ambiente a 12 mA.

### **Transferencia de proteínas**

Las proteínas separadas por SDS-PAGE se electrotransfirieron a membranas de nitrocelulosa o PVDF (del inglés *polyvinylidene difluoride*) (Hybond, Amersham Life Sciences, CA, USA) según el experimento, siguiendo las indicaciones del proveedor. Los geles fueron previamente equilibrados con solución de transferencia (metanol 20%, glicina 192 mM, Tris 25 mM) durante 10 min., y luego transferidos con intensidad constante de 250 mA durante dos horas a 4 °C. A las membranas de nitrocelulosa y PVDF se las tiñó con Rojo Ponceau o Coomassie G-250, respectivamente, para corroborar la transferencia y carga proteica. Finalmente, fueron enjuagadas en agua destilada o metanol 50% y luego con PBST, y conservadas a - 20 °C húmedas hasta su uso (membranas de PVDF) o enjuagadas en agua destilada y secadas a temperatura ambiente hasta su uso (membranas de nitrocelulosa).

### **Ensayos de Western Blot**

La inmunodetección de GHRA fue realizada utilizando una dilución 1/1000 del anticuerpo policlonal anti-exGHRA desarrollado en nuestro laboratorio, de acuerdo al siguiente protocolo: (todas las incubaciones se realizaron en agitación a TA)

- ✓ Se equilibró la membrana con PBST (PBS-Tween 0,05%) por 10 min.

- ✓ Se bloqueó 1 hora con Bloto-Tween (5% p/v de leche descremada en PBST).
- ✓ Se incubó el anticuerpo primario anti-exGHRa 1,5 horas en Bloto-Tween.
- ✓ Se realizaron 3 lavados de 15 min. cada uno con Bloto-Tween.
- ✓ Se incubó el anticuerpo secundario 1 hora en Bloto-Tween.
- ✓ Se realizó 1 lavado de 15 min. con Bloto-Tween.
- ✓ Se realizaron 2 lavados de 15 min. cada uno con PBST.
- ✓ Se detectó por quimioluminiscencia ECL (Thermo Scientific SuperSignal West Pico Substrate).

Se utilizó un anticuerpo secundario conjugado a HRP provisto en el sistema de detección de quimioluminiscencia ECL (Thermo Scientific SuperSignal West Pico Substrate). Como control de carga de siembra de los ensayos de Western Blot las membranas fueron reutilizadas previo lavado con 0,2 N NaOH durante 5 min. ("striping"), para las membranas de nitrocelulosa, ó con solución de "striping" (62,5 mM Tris pH 6,5, 2% SDS, 0,75%  $\beta$ -mercaptoetanol) por 10 min. a 65°C, para las membranas de PVDF. Una vez enjuagadas y equilibradas con PBST, fueron utilizadas para inmunodetectar actina (anti-actina I-19, Santa Cruz Biotechnology, CA, USA) o tubulina (monoclonal anti- $\alpha$ tubulina T5168, Sigma, St. Luis, MO, USA).

### **Extracción de ARN total**

Una masa conocida de tejido proveniente de dos machos y dos hembras adultos (1 año de edad) de pez cebra o 100 embriones decorionados y/o 100 larvas se homogeneizaron en TRIZOL (Invitrogen Co. Carlsbad, CA, USA) con *Potter-Elvehjem* según lo indicado por el proveedor. En los casos de órganos muy pequeños, como el bazo y el cerebro, se siguieron las instrucciones del proveedor para la purificación de ARN total a partir de pequeñas cantidades de tejido (1-10 mg), utilizándose glucógeno libre de ARNasa (10  $\mu$ g) como transportador de la fase acuosa para facilitar la precipitación del ARN total.

### **Extracción de ADN genómico**

El ADN genómico se extrajo a partir de 50 larvas de 8 dpf utilizando el Kit ChargeSwitch® gDNA Micro Tissue (Invitrogen Co. Carlsbad, CA, USA) de acuerdo a las instrucciones del proveedor

### **Determinación de la concentración de ADN y ARN**

La concentración de ADN y ARN total fue determinada utilizando el fluorímetro Qubit® 2.0 (Invitrogen Co., Carlsbad, CA, USA).

### **Determinación de la integridad de las muestras de ARN**

Para el análisis de integridad de las muestras se sembró 1 µg de ARN total de cada muestra en un gel de agarosa y luego de la corrida electroforética se determinó la calidad del ARN por análisis de las bandas correspondientes a los ARNr 28S y 18S (Sambrook & Russell, 2001).

### **Electroforesis en geles de agarosa**

Para la separación de ADN y ARN se empleó la técnica de electroforesis en geles de agarosa mediante el sistema tipo submarino (Sambrook & Russell, 2001). El gel se preparó con una concentración de 1:10000 de SYBR® Safe (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA). La corrida se llevó a cabo utilizando una intensidad de corriente de 50-80 mA. Como marcador del tamaño molecular se utilizó ADN del fago λ (Promega, Madison WI, USA) digerido con la enzima de restricción HindIII, o doblemente digerido con las enzimas de restricción HindIII y EcoRI. Para geles de separación de ADN la agarosa se usó en una concentración de 1-1,5% p/v en solución TAE 1X y la corrida se llevó a cabo en solución TAE 1X mientras que para geles de separación de ARN la agarosa se utilizó en una concentración de 1% p/v en solución TBE 0,5X y la corrida se realizó en solución TBE 0,5X. Las muestras se sembraron en una proporción 5:1 con Solución de Siembra (azul de bromofenol 0,15% p/v, xilene cyanol 0,15% p/v, glicerol 20% v/v). Las bandas correspondientes a los distintos fragmentos de ácidos nucleicos se observaron con el transiluminador Safe Imager™ Blue-Light (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA).

### **Purificación de fragmentos de ADN a partir de geles de agarosa**

Luego de la separación electroforética en geles de agarosa, los fragmentos de ADN de interés fueron extraídos del gel utilizando un bisturí y purificados mediante el sistema QIAEX II Gel Extraction (QIAGEN, St. Diego, CA, USA).

## Retrotranscripción (RT) del ARNm

Las reacciones de síntesis de los ADNc simple hebra a partir del ARNm para el caso del pool de tejidos y órganos se llevaron a cabo en un volumen final de 20  $\mu$ l, el cual contenía 200 unidades de la enzima transcriptasa reversa M-MLV y Buffer de reacción 1X (Promega, Madison WI, USA), 4,5  $\mu$ g de ARN total tratado con 3 U de ADNsal® (Promega, Madison WI, USA), 2 mM de cada dNTP, 24 unidades de inhibidor de ribonucleasas RNasin® (Promega, Madison WI, USA) y 0,5  $\mu$ M de cebador específico R810, GHR4 o 3  $\mu$ M de oligodT QT (Bio-Synthesis), ver **Tabla 2**. Las mezclas se incubaron 5 min a 70 °C antes del agregado de la enzima, el buffer y los dNTPs, y luego la reacción se dejó cursar por 2 hs a 37 °C. Luego, las mezclas de reacción fueron diluidas a volumen final de 200  $\mu$ l con agua destilada doblemente estéril y conservadas a -20 °C hasta posterior uso.

Para el caso de la obtención del ADNc a partir de ARN total del pool de embriones y/o larvas se utilizó el Kit Transcriptor High Fidelity cDNA Synthesis® (Roche, Mannheim, Alemania) siguiéndose las indicaciones del proveedor. El ARN total también fue previamente tratado con 3 U de ADNsal® (Promega, Madison WI, USA) y las mezclas de reacción obtenidas fueron diluidas como se mencionó anteriormente.

## Reacciones de PCR

Las reacciones de PCR se realizaron en un volumen final de 25  $\mu$ l o 50  $\mu$ l, dependiendo del experimento. Se emplearon 0,5  $\mu$ M de cada cebador específico, 200  $\mu$ M de cada dNTP y 1% de DMSO, en todos los casos. Según el experimento, se utilizaron alternativamente 1,5 mM de MgCl<sub>2</sub>, buffer Taq 1X y 0,5 unidades de *Taq* ADN polimerasa (Invitrogen Co., Carlsbad, CA, USA) ó 1,25 U de GoTaq® ADN polimerasa y buffer GoTaq 1X (Promega, Madison WI, USA). Como molde se emplearon alternativamente 5  $\mu$ l de lisado de células de *E.coli* transformadas con ADN plasmídico, 0,6 ng de ADN plasmídico, 1  $\mu$ l de ADNc purificado de gel o 10  $\mu$ l de una dilución 1:10 de los productos generados en las reacciones de retrotranscripción.

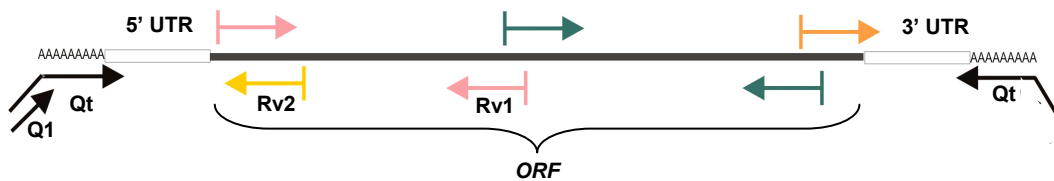
En todas las reacciones se incluyó un control negativo en el que no se adicionó ADN molde y en las amplificaciones sobre los productos de

retrotranscripción se incluyó además un control de contaminación con ADN genómico, en el cual se colocaron 60 ng de ARN total como molde.

Se utilizó un termociclador PERKIN ELMER modelo GeneAmp PCR System 2400 ó el termociclador *Eppendorf* Master Cycler Personal®, según el experimento.

#### *Amplificación de las secuencias completas de los ADNc de los ghrs*

En base a las secuencias de los *ghrs* localizadas en el genoma de pez cebra se diseñaron cebadores específicos de manera de amplificar los ADNc completos de ambos receptores. Para ello, se extrajo ARN total de hígado de ejemplares de pez cebra adultos (se sacrificaron 2 ejemplares de cada sexo, de manera de normalizar la variabilidad por el sexo), y se utilizó como molde para las reacciones de retrotranscripción.



**Figura 9.** Diagrama de la estrategia utilizada para la obtención de los ADNc completos de los *ghrs*. En la figura se esquematiza el ADNc a amplificar, localizando sobre el mismo los cebadores utilizados en las reacciones de PCR.

#### *Amplificación de las regiones internas*

Para la amplificación de las regiones internas de ambos *ghrs*, es decir el marco abierto de lectura u ORF del inglés *Open reading frame*, de cada receptor, se utilizaron alícuotas de ADNc retrotranscrito con el oligodT QT (Bio-Synthesis) y dos pares de cebadores específicos para cada receptor, diseñados de manera de que los fragmentos amplificados tuviesen un secuencia solapante de aproximadamente 200 pb (**Fig. 9** cebadores verde y rosa). Para amplificar los fragmentos de *ghra* se utilizaron los pares de cebadores GHR5-GHR10 y GHR1-GHR4 (**Tabla 2**) y el siguiente ciclado térmico: 2 min 95 °C seguido de 40 ciclos de tres etapas de 1 min a 94 °C, 1 min a 65 o 68 °C (para el primer y segundo par, respectivamente) y 1,5 min a

72 °C y por último un paso de extensión final de 10 min a 72 °C. Para amplificar los fragmentos internos de *ghrb* se utilizaron los pares de cebadores F743-R1443 y F354-R810 (**Tabla 2**) y el siguiente ciclado térmico: 30 seg a 97 °C y 4 min 95 °C seguido de 40 ciclos de tres etapas de 1 min a 94 °C, 1 min a 65 o 67 °C (para el primer y segundo par, respectivamente) y 1,5 min a 72 °C, con un paso de extensión final de 10 min a 72 °C.

Amplificación de los extremos 5' y 3' no traducibles o RACEs 3' y 5' (del inglés "*Rapid Amplification of cDNA ends*")

La amplificación de las regiones 5' y 3' no traducibles "UTRs" (del inglés "*UnTranslated Regions*") de los *ghrs* fue realizada basándose en el método descrito por (Frohman, 1994). Se utilizaron alícuotas de ADNc retrotranscripto con el OligodT Qt, para amplificar los UTRs 3' de ambos receptores, y alícuotas retrotranscriptas con un cebador específico reverso (**Rv1, Fig. 9**): GHR4 ó R810, para amplificar los UTRs 5' de *ghra* y *ghrb* respectivamente. De esta manera, para la amplificación de los UTRs 5' se obtuvieron ADNc específicos para cada receptor, los cuales se purificaron y se ligaron a una secuencia poli(A) adaptadora y se utilizaron para las reacciones de PCR. Como cebadores directos en las reacciones de PCR se utilizaron los cebadores GHR11 ó F1410 (**Fig. 9**, cebador naranja, amplificación de los 3'UTRs) y el GHR12 ó F354 como cebadores reversos (**Rv2, Fig. 9**, amplificación de los 5' UTRs), para el caso de *ghra* ó *ghrb*, respectivamente (**Tabla 2**). El clonado de los fragmentos de amplificación se realizó como se describe más adelante.

#### *PCRs de ADN genómico*

Las reacciones de PCR se llevaron adelante como se describió anteriormente utilizando como molde 100 ng de ADN genómico y los siguientes pares de cebadores: GHR13–GHR10 y GHR5–GHR10 para el caso de *ghra* y F743–R1443 y F1332–R1443 para el caso de *ghrb* (**Tabla 2**). El clonado de los fragmentos de amplificación se realizó como se describe más adelante.

#### *Amplificaciones de las isoformas de los ghrs*

Las amplificaciones de las isoformas de *ghra* y *ghrb* se realizaron mediante reacciones de PCRs anilladas, utilizando los mismos pares de cebadores

empleados para los estudios de RT-PCR. El clonado se realizó como se describe más adelante.

### **Estudio de los patrones de expresión de *ghra* y *ghrb* por RT-PCR y Southern Blot**

Para los estudios de los patrones de expresión se utilizaron alícuotas de ADNc obtenidos a partir de retrotranscripción con OligodT QT de 4,5 µg ARN total tratado con ADNsal® (Promega, Madison WI, USA) de un pool de tejidos u órganos o de embriones y/o larvas, como se mencionó anteriormente, exceptuando en el caso de ovario, donde se utilizaron 12 µg de ARN total. Esto se debió a las proporciones de ARN ribosomal respecto a ARN total que hay presente en este tejido (1% en vez de 10%). Las reacciones de PCR se llevaron adelante como se describió anteriormente y los pares de cebadores utilizados para la amplificación de *ghra* fueron GHR13–GHR10 y F743–R1443 para el caso de *ghrb*, respectivamente (ver **Tabla 2**). El ciclado térmico fue el siguiente: 30 seg. a 97 °C y 2,30 min. a 95 °C, seguido de 40 ciclos de 1 min a 94 °C, 1 min. a 64 ó 65 °C (para el primer y el segundo par, respectivamente) y 1 min. a 72 °C con un paso final de extensión de 7 min. a 72 °C. Como control se amplificó un fragmento del factor de elongación 1 alfa (EF1 $\alpha$ ) (ver **Tabla 2**). El protocolo para la amplificación de EF1 $\alpha$  fue: 30 seg. a 97 °C, 2.30 min. a 95 °C, seguido de 35 ciclos de 40 seg. a 94 °C., 40 seg. a 59 °C y 40 seg a 72 °C con un paso final de extensión de 7 min. a 72 °C. Los productos de PCR se resolvieron mediante geles de agarosa al 1.8%, como se mencionó anteriormente, y fueron transferidos de forma pasiva por capilaridad a membranas de Nylon cargadas positivamente (Hybond H+, Amersham Biosciences, NJ, USA). Los *Southern blots* se realizaron utilizando sondas marcadas con digoxigenina (DIG). Las sondas se generaron amplificando por PCR los insertos previamente clonados. Los pares de cebadores utilizados para estas amplificaciones fueron: GHR5–GHR10 ó F1068–R1443 para *ghra* y *ghrb*, respectivamente. Luego de la amplificación, los productos fueron lavados y concentrados utilizando un Centricon YM-100 (Amicon, Millipore Corporation, Bedford, MA, USA). Los productos eluidos fueron separados por electroforesis (como se describió anteriormente) y purificados a partir del gel con el kit QIAEX (QIAGEN, St. Diego, CA, USA). Dos microgramos de cada sonda purificada

fueron marcados con DIG utilizando el Kit Label IT Digoxin® Nucleic Acid Labeling (Mirrus, Madison, WI, USA) de acuerdo a las instrucciones del proveedor. Las hibridaciones se llevaron adelante durante toda la noche a 65 °C in 10 ml de Dig Easy Hib solution® (DIG Northern Starter Kit – Roche Diagnostics, Mannheim, Germany) conteniendo 100 ng/ml de cada sonda específica. Las membranas fueron lavadas 2 veces por 5 min in 2 X SSC, 0.1% SDS a TA y 2 veces por 15 min en 0.1X SSC, 0.1% SDS a 65 °C. La detección de las sondas se llevó adelante utilizando el Kit DIG Northern Starter ® (Roche Diagnostics, Mannheim, Germany) de acuerdo a las instrucciones del proveedor y utilizando placas radiográficas a distintos intervalos de tiempo.

### **RT-PCR semi-cuantitativa de embriones con y sin vitelo**

En primer lugar se validó la RT-PCR semi-cuantitativa llevando adelante reacciones de PCR a diferente número de ciclos para cada gen en estudio, cuantificando densitométricamente los productos de amplificación separados electroforéticamente y construyendo curvas estándar. Los pares de cebadores utilizados para *EF1 $\alpha$* , *ghra* y *ghrb* fueron los mismos que los utilizados para los estudios de expresión por RT-PCR y Southern Blot. El número de ciclos a utilizar para cada gen en estudio se eligió considerando que el mismo estuviese por debajo de la mitad de la amplificación máxima de la reacción de PCR y en un rango donde la señal (banda) fuera adecuadamente detectada en el gel. Los ADNc utilizados como molde para las reacciones de PCR fueron preparados a partir de 3,5  $\mu$ g de ARN total extraído de embriones de 28 hpf con y sin vitelo. Las reacciones de PCRs semi-cuantitativas se realizaron por triplicado en un volumen final de 25  $\mu$ l como se describió anteriormente. Se utilizaron 17 ciclos para *EF1 $\alpha$* , 32 para *ghra* y 27 para *ghrb*. Los productos de reacción fueron separados por electroforesis en geles de agarosa y teñidos como se describió anteriormente. La intensidad de las bandas de *ghra* ó *ghrb* se cuantificó y normalizó con respecto a la intensidad de las bandas de *EF1 $\alpha$*  (proporción de densidad óptica) y se graficó esta proporción.

**Tabla 2.** Secuencias de los cebadores utilizados.

Nombre	Secuencias (5' → 3')	Nombre	Secuencia (5' → 3')
<i>Cebadores para las reacciones de Retrotranscripción y RACEs</i>		<i>Cebadores de EF1 <math>\alpha</math></i>	
Oligo dt Qt	GAGGACTCGAGCTCAAGC(TTT) <sub>5</sub> TT	EF1 $\alpha$ Fw	CTGGAGGCCAGCTCAAACAT
Q1	GAGGACTCGAGCTCAAGCTT	EF1 $\alpha$ Rev	ATCAAGAAGAGTAGTACCGCTAGCATTAC
<i>Cebadores para ghra</i>		<i>Cebadores para ghrb</i>	
GHR1	ATGGCTCACTCGCTCTCTCTCA	F743	TTACGGCTGTGCTGGTCTTTACTGC
GHR4	CGACCGGAATCGTCGTCGTT	R1443	CTTGGGTGGGTTTGGTTTATTGTGA
GHR5	GCCAGACTTCTACCACGAGGAC	R810	ACGCGAAACTACAATCAGCATCAAG
GHR10	AGTACTGGGGCTGGAGGAGGTT	F354	CCATGGAGAAAGTCCTTTTCATCTG
GHR11	GCGATTACCTGGTGTCTGT	R458	GTTGTAGGAAGCACATTTTGT
GHR12	CCAGGCTCAGAGAGGTTTC	F1410	CAGCGCCCATCACAATAAACCAA
GHR13	GCAAAGAATCAACGTTTCCGATG	F1068	CAAGGATGATGATTCGGGATGG
BamGHRa	CTCGGATCCTGGGAGATGACA	F1332	CCATGGGTGCGAGTTCATAGAGGTG
HindGHRa	GGAATAAGCTTATGGCTCACTCG	SupHind	AGCTTCGATATCTGCAGTCGACGCCCGGG
		InfBam	GATCCCCGGGCGTCTGACTGCAGATATCGA
		HindGHRb	AGGCTTCCATGGAGAAAGTCC
		PstIGHRb	CTGCAGACGCGAAACTACAATCA

## Clonado de los fragmentos de amplificación

Los fragmentos de amplificación a clonar, fueron extraídos de los geles de agarosa, purificados (como se menciona anteriormente) y ligados a los distintos plásmidos de interés, de forma de obtener moléculas de ADN recombinante. En las reacciones de ligación se utilizaron 15 ng ó 50 ng del vector, según el experimento, 3 unidades de T4 ADN ligasa y buffer ligasa 1X (Promega, Madison WI, USA), y 30 ng de ADN purificado. Las mezclas de ligación se incubaron durante toda la noche a 4 °C y fueron utilizadas luego para la transformación de células bacterianas.

### *Transformación y selección de células bacterianas*

Para la transformación de células bacterianas con ADN plasmídico se utilizó el método químico de CaCl<sub>2</sub> (Sambrook & Russell, 2001). Las células transformadas se recuperaron en medio LB líquido sin selección durante 1,5 horas a 37 °C, luego se sembraron con espátula de *Drigalski* en placas de Petri conteniendo medio de cultivo LB-agar en presencia del antibiótico Ampicilina y

se dejaron crecer durante toda la noche a 37 °C. Para realizar el control negativo de la transformación no se colocó ADN en la mezcla de transformación. Las células transformadas con el fragmento de interés se detectaron por ensayos de colonias blancas y azules, agregando 20 µl de X-gal 5% p/v por cada 15 ml de medio LB-agar. De entre las colonias blancas observadas, se seleccionaron 10 de ellas y se obtuvo un lisado de células a partir de las mismas, el cual fue utilizado para realizar la técnica de PCR en colonia. Para la obtención del lisado de células, una muestra de cada colonia se resuspendió de manera individual en 150 µl de agua destilada estéril y se la incubó durante 10 min a 100 °C.

#### *Crecimiento de células bacterianas*

Se empleó el medio de cultivo líquido LB y el medio de cultivo sólido LB-agar. Las células se crecieron a 37 °C, con agitación en el caso de los cultivos líquidos. Como agente de selección se empleó el antibiótico Ampicilina en una concentración final de 0,1 mg/ml.

#### *Cepas Bacterianas*

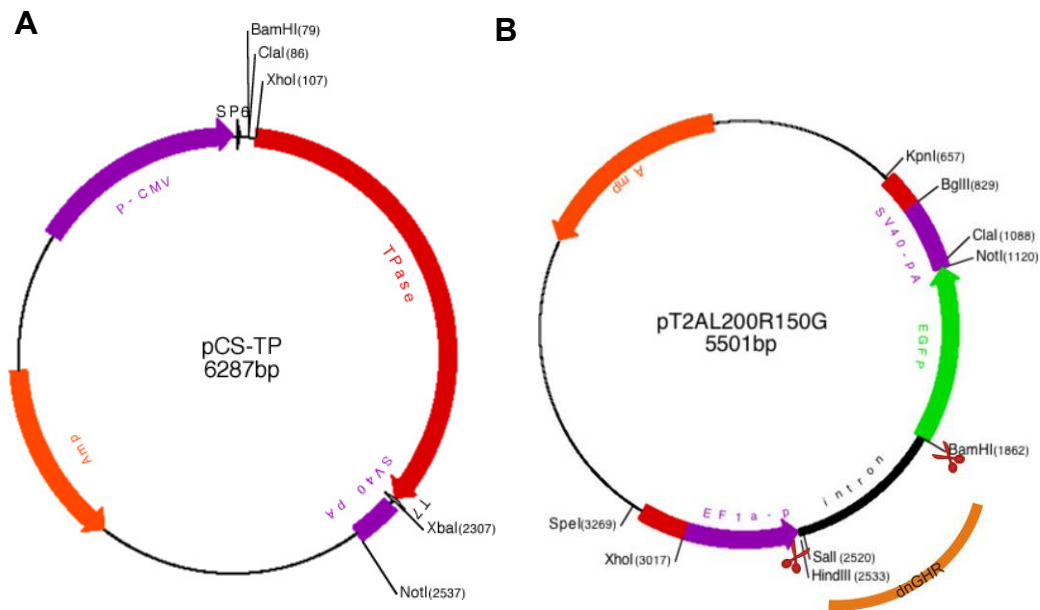
Para realizar las distintas transformaciones y para el mantenimiento de los clones se utilizó la cepa de *Escherichia coli* DH5α [F- supE44 ΔlacV169 (φ80 lacZ ΔM15) hsdR17 (rk mk) recA1 endA1 gyrA96 thi1 relA1 deoR Δ(lacZYA-argF) U169 λ-].

#### *Plásmidos*

Para el clonado de productos de PCR obtenidos con la enzima Taq ADN polimerasa se utilizó el plásmido pGEM-Teasy® (Promega, Madison WI, USA), de 3015bp mediante clonado por extremos T/A, que contiene un origen de replicación y un gen que confiere resistencia a Ampicilina, permitiendo su propagación y selección en *E.coli*. Además, contiene a ambos lados del sitio de múltiple clonado los promotores para las polimerasas de ARN T7 y Sp6 por lo que se puede realizar la transcripción *in vitro* de una u otra hebra del fragmento clonado. El vector permite identificar los clones que hayan recibido el inserto mediante ensayo de colonias blancas y azules, por el fenómeno de inactivación

insercional del gen que codifica para el péptido alfa de la enzima  $\beta$ -galactosidasa.

Para la obtención de los peces cebra transgénicos dominantes negativos se empleó el mecanismo de transposición (mencionado más adelante en esta sección) el cual consta de dos vectores plasmídicos que fueron cedidos gentilmente por el *Dr. Koichi Kawakami*, del Instituto Nacional de Genética de Japón. Uno de los vectores, el **pCS-TP**; posee la secuencia que codifica el ARNm de la enzima transposasa (TPasa) corriente abajo del promotor Sp6 y del promotor del Citomegalovirus (p-CMV), además de un gen de resistencia a Ampicilina. Este vector permite generar altas cantidades de ARNm de la transposasa por transcripción *in vitro* (**Fig. 10A**). El otro vector (**pT2AL200R150G**) posee el promotor del factor de elongación 1 alfa (*pEF1alfa*) de *Xenopus leavis*, el intrón del gen de  $\beta$ -globina de conejo, el ORF de la proteína verde fluorescente ó GFP (del *inglés green fluorescent protein*) y la señal de poliadenilación del virus SV-40. En los extremos de la secuencia del intrón del gen de  $\beta$ -globina se encuentran los sitios de reconocimiento para las enzimas de restricción Sall, HindIII y BamHI, que se utilizan para digerir el plásmido, eliminar el intrón y clonar en estos sitios el fragmento de interés, como se esquematiza en la **Figura 10 B**. Esto permitirá la expresión de GFP o de una proteína de fusión a GFP, para el caso del plásmido con el intrón o el plásmido con secuencia de interés, respectivamente, en cualquier célula eucariota. Todas estas secuencias mencionadas se encuentran flanqueadas por los sitios de reconocimiento de la enzima transposasa. Así, la enzima, podrá cortar la región del plásmido situada entre las secuencias de reconocimiento e insertará la construcción en una región al azar en el genoma (**Fig. 10B**).



**Figura 10.** Vectores utilizados en el sistema de transposición desarrollado por Koichi Kawakami (Kawakami, 2007). A) Vector que posee la secuencia de la transposasa (**pCS-TP**). B) Vector en el cual se clona el transgén del interés (**pT2AL200R150G**). En el mismo se reemplaza la secuencia del intrón, por la secuencia de interés, en este caso del dominante negativo de GHR (dnGHR), la cual incluye solo la región extracelular y transmembrana del receptor.

### *Conservación de las células transformadas con el ADN plasmídico*

A partir de una colonia transformante aislada se inició un cultivo líquido en 2 ml de medio LB con Ampicilina como agente de selección. Éste se incubó 16 hs a 37 °C. Se mezclaron 600 µl de cultivo con 400 µl de glicerol 87% v/v o 1 ml de cultivo con 7 µl de Dimetil sulfóxido (DMSO). La mezcla se conservó a – 70 °C.

### *Preparación de ADN plasmídico*

El ADN plasmídico se preparó a partir de cultivos celulares de *E. coli* DH5α conteniendo los plásmidos de interés, utilizando el sistema comercial Wizzard® Plus SV Minipreps DNA Purification System (Promega, Madison WI, USA), siguiendo las indicaciones del proveedor.

### *Secuenciación*

Los fragmentos de ADN de interés ó los plásmidos purificados conteniendo los fragmentos de ADN de interés fueron enviados a secuenciar al servicio de secuenciación de la Universidad de Maine, Estados Unidos o a la empresa MacroGen®, Maryland, Estados Unidos.

### **Hibridación *in situ* de embriones y larvas enteros de pez cebra**

Esta técnica se realizó gracias a la colaboración con algunos miembros del equipo de investigación del Dr. Ariel Reyes del Laboratorio de Biología del Desarrollo (Facultad de Ciencias Biológicas, Universidad Andrés Bello) de Santiago de Chile. Para ello, los embriones se crecieron hasta el estadio de interés, de acuerdo a los protocolos mencionados anteriormente, y se fijaron en 4% de formaldehído en PBS 1X. La hibridación *in situ* se realizó como se describe en (Jowett & Lettice, 1994). Las sondas de ARN fueron diseñadas para contener 898 bases de la secuencia de *ghra*, abarcando la mayor parte de la región intracelular incluyendo el dominio transmembrana y 797 bases para el caso de *ghrb*, comprendiendo la región extracelular y transmembrana del receptor. El control negativo se realizó utilizando una sonda sentido para ambos ARNs. Los embriones se montaron en metilcelulosa al 5% en E3 y fueron observados con el estereomicroscopio Leica MZ12.5 o el microscopio Olympus BX-61 y fotografiados con la cámara digital Leica DC300F.

### **Inmunofluorescencia en embriones completos**

Para realizar la detección de GHRa en embriones completos se debió poner a punto un protocolo de inmunolocalización de un receptor de membrana en embriones completos. Para ello, se probaron 6 protocolos diferentes de inmunodetección adaptados de (Harding et al., 2008) y (Guille, 1999) hasta llegar finalmente al protocolo que se detalla a continuación (en todos los casos se trabajó en agitación suave):

- ✓ Los embriones fijados con formaldehído al 4% en PBS 1X, deshidratados y conservados en 100% de Metanol a -20 °C, fueron rehidratados mediante lavados con soluciones alcohólicas de concentración decreciente

(MeOH/PBS-Tw 0,1 %) hasta llegar finalmente a PBS-Tw y posteriormente H<sub>2</sub>O destilada.

- ✓ Se permeabilizaron durante 7 min. con acetona a -20 °C. y luego se rehidrataron 5 min. con H<sub>2</sub>O destilada y 5 min. con PBS.
- ✓ Se bloquearon con solución de bloqueo (20% suero fetal bovino, 1% DMSO, 0,1% Tween en PBS 1X) durante 40 min. a TA y luego se los incubó con el anticuerpo 1° anti-exGHRa (1/100) diluido en solución de bloqueo ó con el suero pre-inmune en la misma dilución durante 72 horas a 4 °C.
- ✓ Se lavó el anticuerpo 1° ó suero pre-inmune, según corresponda, 4 veces por 30 min. con PBSTw 0,1% y se bloqueó nuevamente.
- ✓ Finalmente se incubaron con el anticuerpo 2° anti-rabbit acoplado al fluoróforo Cy3 (Chemicon, International) en una dilución de 1/800 en solución de bloqueo durante toda la noche a 4°C en oscuridad.
- ✓ Luego se lavaron, también en oscuridad, 6 veces por 30 min. con PBSTw 0,1% y se montaron en solución de montaje (75% glicerol/PBSTw 0,1%), previo pasaje por soluciones de concentración creciente de glicerol.
- ✓ Las muestras montadas fueron analizadas y fotografiadas con el microscopio confocal Nikon Eclipse TE-2000-E2 (Natick, MA).

Los controles se realizaron utilizando sólo el anticuerpo secundario (control del anticuerpo secundario) ó el suero pre-inmune en lugar de anticuerpo primario anti-exGHRa. Para el caso de embriones de más de 30 hpf se realizó un protocolo de blanqueamiento, de manera de eliminar los pigmentos (melanóforos). Para ello, luego de la primer rehidratación y previo a la permeabilización, los embriones fueron incubados por un tiempo variable (hasta observación de desaparición de los pigmentos) en H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> al 3% y luego lavados con H<sub>2</sub>O destilada por 5 minutos.

### **Microinyección de embriones de pez cebra**

Fue realizada de acuerdo a lo descrito en el (Guille, 1999). Brevemente, consistió en introducir una micro-aguja en el vitelo del embrión y mediante un pulso corto de presión de aire emitir un volumen conocido de la solución a inyectar, realizando el procedimiento bajo estereomicroscopio Nikon SMZ1 (Nikon UK Limited, Surrey, UK). El pulso de presión de aire fue ejercido por un

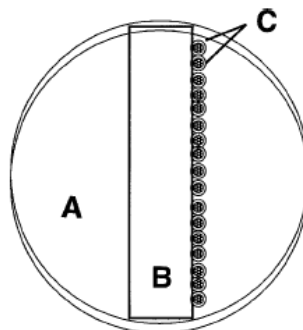
micro-inyector MPPI-2 Pressure Inyector (Applied Scientific Instrumentation; Eugene, OR, USA) conectado a un tubo de gas N<sub>2</sub> controlado por un pedal accionado por el operador. Se utilizaron microagujas elaboradas a partir de capilares estirados de Borosilicato de 10 cm de longitud, 1,2 mm de diámetro externo y 0,69 mm de diámetro interno sin filamento (Narishige, Japón).

#### *Preparación de las microagujas*

El estiramiento de los capilares para elaborar las microagujas se realizó con un “puller” (Modelo PC-10, Narishige, Japón) a 64,3 °C y peso máximo. De esta manera, por cada capilar se obtuvieron dos agujas casi idénticas para utilizarse en la micro-inyección. Las agujas se cargaron con la solución a inyectar con puntas plásticas descartables Eppendorf microloader® (Eppendorf, Hamburg, Germany).

#### *Preparación de los embriones*

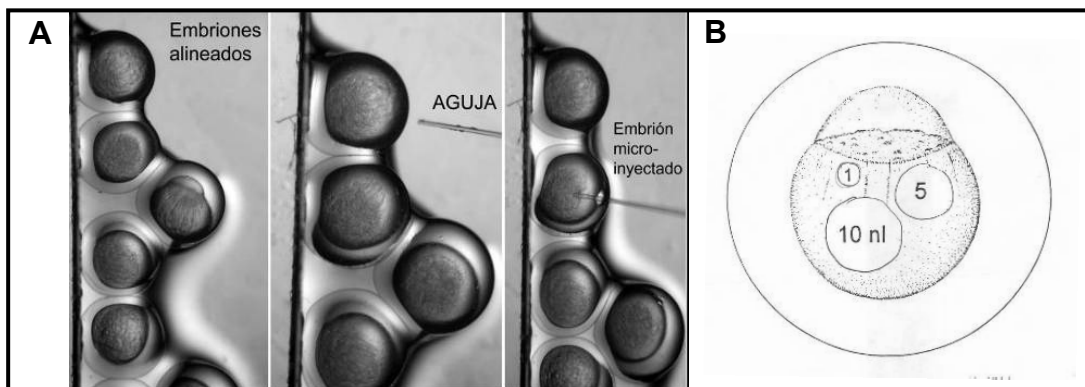
Los embriones de pez cebra, obtenidos por el proceso de puestas programadas, fueron recolectados rápidamente una vez que tubo lugar la fecundación, de forma de obtener embriones en los estadios de una o dos células. Una vez limpios, se posicionaron en línea para poder ser microinyectados, utilizando un dispositivo que consistió en un portaobjetos situado sobre la tapa de una placa de Petri plástica, actuando el portaobjetos como barrera de contención. Se ubicó la placa bajo la lupa binocular, de manera de ir siguiendo la microinyección de los embriones alineados y se procedió a microinyectar (**Fig. 11**).



**Figura 11.** Esquema del dispositivo de microinyección adaptado del (Guille, 1999). A) Placa de Petri. B) Portaobjetos. C) Embriones de pez cebra.

### Proceso de microinyección

Los embriones fueron microinyectados de a uno con la microaguja previamente estirada y cargada. El mecanismo consistió en la inserción de la aguja a través del corion, para luego penetrar el vitelo y una vez allí se presionó el pedal para que la solución ingrese al embrión de acuerdo a la presión de aire ejercida. Se observó mediante la lupa el ingreso de la solución en el vitelo del embrión, que al ser de distinta densidad genera un círculo de tamaño comparable con los mostrados en la **Figura 12**. Por este método es sencillo estimar la cantidad de nanolitros (nl) microinyectados en el embrión, y como la concentración de la solución a inyectar es conocida, se puede calcular la cantidad (ng) inyectada en el embrión. De forma de corroborar que este método es lo suficientemente preciso, el volumen inyectado también se estimó emitiendo la solución a inyectar sobre una gota de aceite mineral situada sobre una regla de microscopía. Se midió el diámetro y utilizando la fórmula  $\frac{4}{3}\pi r^3$  se calculó el volumen de la gota. Una vez que todos los embriones de la placa fueron inyectados se pasaron a una placa con medio de embriones (E3) y se colocaron en la estufa de embriones para permitir su desarrollo.



**Figura 12.** Proceso de microinyección y estimación del volumen a inyectar. A) Proceso de microinyección paso a paso. B) Esquema que indica la cantidad de solución que se está inyectando de acuerdo al tamaño de gota generada en el vitelo del embrión.

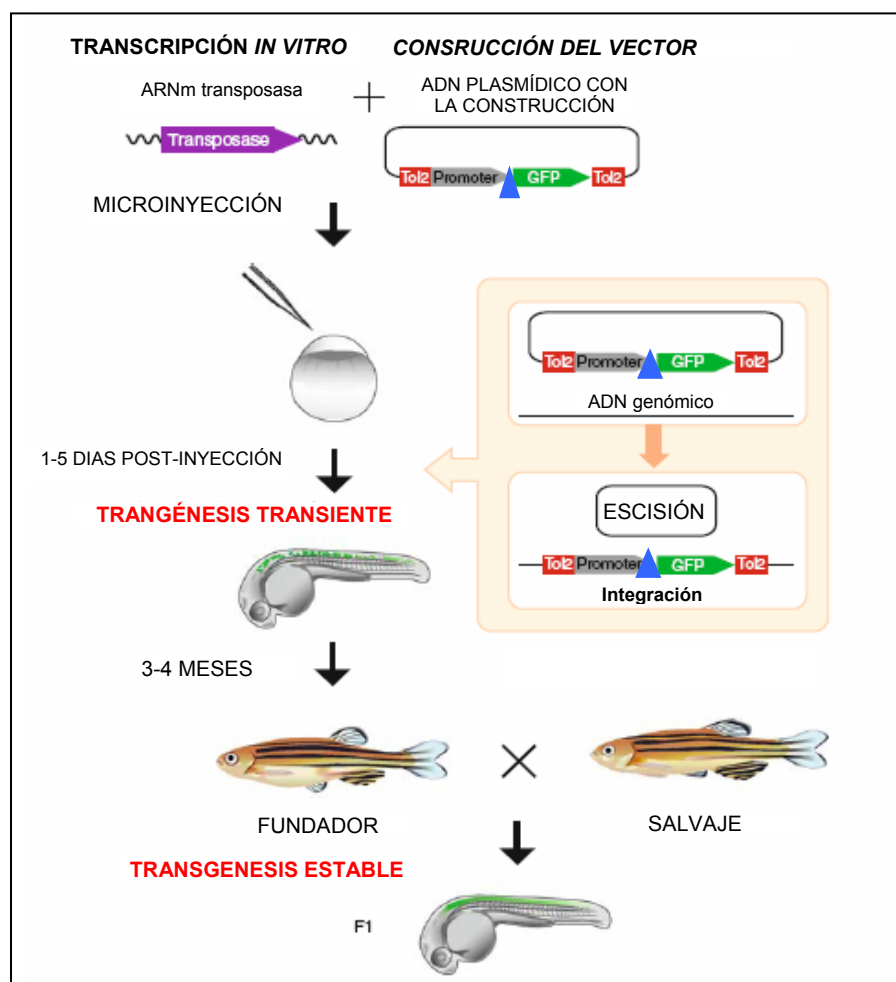
## Transgénesis transciente y estable: dominantes negativos para GHRa y GHRb

Para la obtención de los peces cebra transgénicos dominantes negativos para los receptores se empleó el mecanismo de transposición descrito por (Kawakami, 2004; Kawakami, 2005). Este mecanismo consiste en la utilización de una transposasa activa (Tol2 de medaka – *Oryzias latipes*-), la cual insertará cualquier secuencia de ADN de interés, en una región al azar del genoma, siempre que la misma esté flanqueada por las regiones de reconocimiento de la transposasa. El mecanismo consta de dos vectores plasmídicos: **pCS-TP**, que posee la secuencia del ARNm de la transposasa y el vector **pT2AL200R150G** donde se clona la secuencia de interés, ambos descritos anteriormente en esta sección.

Para la generación de los dominantes negativos de los GHRs (**dnGHR**), se eliminó el intrón del vector **pT2AL200R150G** mediante digestión enzimática y se clonó en su lugar una secuencia de ADN que consiste en la región extracelular y transmembrana del *ghr* (dominante negativo), de manera que dicha secuencia permanezca en fase y corriente arriba del marco abierto de lectura de la proteína verde fluorescente ó GFP (**Fig. 10B**).

El proceso de generación de los peces transgénicos consistió en microinyectar a los embriones de pez cebra en el estadio de una o dos células (descrito anteriormente) el plásmido circular que lleva el transgén de interés (**pT2AL200R150G – dnGHR**) junto con el ARNm de la transposasa obtenido por transcripción *in vitro*. Este ARNm se traducirá a proteína en el interior celular y podrá efectuar la transposición de la construcción. Luego de 24 horas de realizada la microinyección y hasta el quinto día post-inyección, se puede observar fluorescencia en mosaico que demuestra que el transgen se está expresando, ya sea a partir del plásmido o a partir de su inserción en el cromosoma de las células (**Transgénesis transciente**). La misma se evidencia observando los embriones a través de una lupa o microscopio de fluorescencia. El transgén se expresa en forma de mosaico porque muchas veces el plásmido no se reparte equitativamente entre todas las células del organismo, por lo tanto luego de transcurridas algunas horas del desarrollo, algunas células

expresarán el transgén y otras no. La expresión se considera transiente debido a que la fluorescencia en el embrión puede deberse a la proteína de fusión producto de un ARNm transcripto a partir del vector y/o de la secuencia que ha sido transpuesta en el genoma. Luego del quinto día post-inyección, se considera que el vector se ha degradado por completo y, por ende, el transgén es estable. Luego de analizar cada uno de los embriones microinyectados, aquellos en los que se observó fluorescencia se dejaron crecer hasta alcanzar la madurez sexual, de acuerdo a lo mencionado anteriormente. Una vez obtenida la madurez, los ejemplares se pueden cruzar de forma individual con peces cebra salvajes, y se busca en la primera generación filial embriones fluorescentes, los cuales poseerán el transgén de interés. Los peces que dan descendencia fluorescente, serán los que poseen el transgén en las células germinales, y se denominan fundadores (**Fig. 13**).



**Figura 13.** Esquema mostrando los distintos pasos hasta la obtención de peces transgénicos integrales. Los triángulos azules representan el inserto de interés. Adaptado de (Kawakami, 2007).

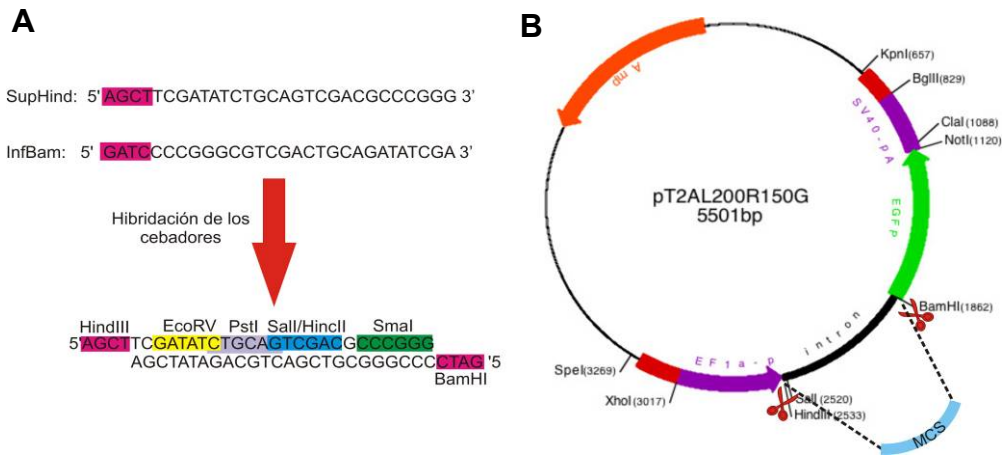
## Procedimiento

### *Construcción de los vectores para la transgénesis*

Para el caso de **GHRa**, se amplificó por PCR el fragmento de interés (región extracelular más transmembrana) a partir de un plásmido que posee el ADNc completo de *ghra*, utilizando el par de cebadores BamGHRa y HindGHRa, los cuales poseen sitios de reconocimiento para las enzimas de restricción HindIII y BamHI situadas en el vector **pT2AL200R150G** (**Tabla 2**). Una vez obtenido el fragmento, se clonó en el vector pGEMT-easy® (Promega, Madison WI, USA), y posteriormente, se liberó de dicho vector por digestión enzimática con las enzimas anteriormente mencionadas. El fragmento liberado, se ligó al vector **pT2AL200R150G**, previamente digerido con HindIII y BamHI. La construcción obtenida se secuenció para constatar que ninguna de las secuencias de interés (dnGHR y ORF de GFP) hubiese sufrido mutaciones durante todo el procedimiento. Una vez constatado el vector, se procedió a realizar las microinyecciones.

Para el caso de **GHRb**, la estrategia de construcción del vector **pT2AL200R150G-dnGHRb** no pudo llevarse adelante por simple digestión enzimática, como en el caso de GHRa, debido a que la secuencia de interés de *ghrb* posee sitios internos de reconocimiento para la enzima BamHI. Debido a ello se diseñó una estrategia alternativa para la obtención de las construcciones. La misma consistió en generar un vector **pT2AL200R150G** que contenga un sitio de múltiple clonado (MCS del inglés *Multiple Cloning Sites*), incluyendo enzimas que no se encuentren en la secuencia de *ghrb*. Para ello se diseñaron dos cebadores que contienen, en sus extremos; las secuencias que sobresalen luego de haberse realizado una digestión con BamHI y con HindIII, y en la región interna; los sitios de reconocimiento para diferentes enzimas de restricción (MCS) (**Tabla 2**). Ambos cebadores son complementarios entre sí, de manera de poder mediante una hibridación, lograr una secuencia doble hebra que será ligada al vector **pT2AL200R150G** (**Fig. 14**). También se diseñaron dos cebadores para amplificar la secuencia de interés de *ghrb*; HindGHRb y PstIGHRb, los cuales contienen sitios de reconocimiento para HindIII y PstI respectivamente, de manera de una vez

obtenido el vector con el MCS, digerirlo con estas enzimas y ligarlo al fragmento obtenido el cual contendrá estos sitios (**Tabla 2**). Los pasos posteriores son los mismos que los mencionados para GHRa.



**Figura 14.** Esquema mostrando la estrategia utilizada para la obtención del vector **pT2AL200R150G** con el sitio de múltiple clonado (**pT2AL200R150G-MCS**). A) Los cebadores diseñados son sometidos a hibridación. B) Una vez hibridados, el fragmento doble hebra obtenido es ligado al vector **pT2AL200R150G** previamente digerido con HindIII y BamHI.

#### *Obtención del ARNm de la transposasa por transcripción in vitro*

El ARNm de la transposasa fue obtenido por transcripción *in vitro*, previa digestión del vector **pCS-TP** con la enzima **NotI**, de forma limitar el molde de ADN, para que no se generen ARNm de longitud no deseada. La digestión del vector se realizó como se menciona más adelante en esta sección y se corroboró mediante corrida electroforética de una pequeña alícuota de la digestión. El vector digerido se extrajo de la mezcla de digestión con una mezcla 1:1 de fenol/cloroformo.

La reacción de transcripción *in vitro* se llevó adelante en un volumen final de 25  $\mu$ l, el cual contenía 2  $\mu$ g de del vector **pCS-TP** digerido con NotI, buffer de transcripción 5 X (Promega, Madison WI, USA), DTT 0.1 M, 2,5 mM de ATP, 2,5 mM de GTP, 2,5 mM de UTP, 2,5 mM de CTP, 16 unidades de inhibidor de ARNasa RNAsin (Promega, Madison WI, USA), 40 Unidades de la enzima Sp6 ARN polimerasa (Promega, Madison WI, USA), 2,5 mM de G(5')ppp(5')A RNA Cap Structure Analog (New England Biolabs, Ipswich, MA, USA). La

reacción se dejó cursar por 20 min a 37°C y luego se suplementó con 2,5 mM de GTP, y se incubó por 2 hs más a 37°C. Finalmente, se trató la mezcla de reacción con ADNsa RQ1 (Promega, Madison WI, USA) por 20 min. a 37°C para eliminar el molde de ADN. Utilizando una alícuota de esta mezcla se analizó en gel de agarosa el ARNm sintetizado y la degradación del ADN molde. El ARNm transcripto se precipitó con 1  $\mu$ l de LiCl 10 M y 100  $\mu$ l de EtOH absoluto frío durante toda la noche a -70°C. Luego de la precipitación, el ARNm se centrifugó a máxima velocidad a 4°C durante 20 min. y se lavó dos veces con EtOH 75 % frío. El pellet obtenido se secó, se resuspendió en 20  $\mu$ l de agua libre de nucleasas y se determinó la concentración de ARN como se menciona más adelante en esta sección.

#### *Obtención del ADN plasmídico a microinyectar*

El ADN plasmídico a microinyectar se obtuvo a partir de un cultivo crecido toda la noche de células de *E.coli* que poseían el vector con la construcción de interés, utilizando el sistema comercial Wizzard Plus SV (Promega, Madison WI, USA).

#### *Soluciones de microinyección y dosis*

Para las microinyecciones se prepararon las siguientes mezclas de inyección: 125 ng del plásmido de interés (pT2AL-GFP ó dnGHRa), 0.2 M de KCl, y 125 ng del ARNm de la transposasa en un volumen final de 5  $\mu$ l. Luego de cargar adecuadamente las microagujas, se procedió a inyectar entre 5-6 nl de dicha mezcla en embriones de 1-2 células, de forma de inyectar aproximadamente 125 pg de vector por embrión.

### **Digestión del ADN plasmídico con endonucleasas de restricción**

Para la digestión del ADN plasmídico se utilizaron las endonucleasas de restricción mencionadas en cada caso, de los proveedores Promega (Promega, Madison WI, USA) ó Fermentas (Thermo Fisher Scientific Inc., Two Rivers, WI, USA). La mezcla de reacción constó de 1,5  $\mu$ g de ADN plasmídico y se siguieron las indicaciones del proveedor en cada caso. Una vez realizadas las

digestiones, las mezclas de reacción se sometieron a electroforesis en gel de agarosa y los fragmentos de interés se purificaron a partir del gel, como se mencionó anteriormente.

### **Ensayos de disminución específica de la expresión o “*knockdown*” utilizando oligonucleótidos morfolinos**

Los estudios de disminución específica de la expresión o “*knockdown*” utilizando oligonucleótidos morfolinos (MOs) se realizaron para el caso de GHRa de acuerdo con (Bill et al., 2009; Ekker & Larson, 2001). Estos oligonucleótidos fueron adquiridos de la Empresa Gene Tools, LLC (Philomath, OR, USA) y diseñados con asistencia del servicio técnico del proveedor. Se diseñaron dos oligonucleótidos MOs diferentes: uno de ellos que bloquea la traducción de la proteína; **tMO-ghra** (del inglés *translation-blocking morpholino*) y el otro que evita el procesamiento o “*splicing*” del ARNm de *ghr*; **sMO-ghra** (del inglés *splice junction morpholino*). Como control negativo en los experimentos se microinyectó un morfolino control (**MO-Ctrol**) provisto por el proveedor, el cual está diseñado para bloquear la traducción del ARNm de la  $\beta$ -globina humana. Las secuencias de los MOs específicos diseñados se listan a continuación:

**zghra-tMO:**           CATGGCTTTTGCGATCTCCTCAGCC  
**zghra-sMO:**         GAGCATTTTGACAGAACTCACCTAT

Para determinar la dosis de trabajo del **tMO-ghra** se realizó una curva de calibración que consistió en microinyectar diferentes concentraciones del MO e ir observando efectos dosis dependiente. En el caso de **tMO-ghra** se ensayaron 6 concentraciones diferentes, y el **MO-Control** fue inyectado a las mayores concentraciones de trabajo. Se determinó como concentración final a microinyectar 6 ng MO/embrión. En todos los casos, los MOs fueron inyectados en el estadio de 1-2 células y se inyectó un volumen de 5 nl por embrión, estimado como se describió anteriormente. Los oligonucleótidos MOs específicos y controles se diluyeron en agua para obtener las soluciones **STOCK**. Al momento de realizarse los ensayos, se tomó una determinada

cantidad de las soluciones *STOCK* y se llevó a la concentración final de trabajo con solución de Denieau's (58 mM NaCl, 0,7 mM KCl, 0,4 mM MgSO<sub>4</sub>, 0,6 mM Ca(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub>, Hepes pH 7, 6 5 mM).

### **Análisis bioinformáticos**

Las secuencias fueron ensambladas utilizando el programa Ape-A plasmid Editor v1.11 (Wayne Davis, Universidad de Utah). El análisis de homología entre las secuencias se realizó con el programa Clustal X versión 2.0 (Larkin et al., 2007) utilizando los parámetros por defecto. Para la construcción del árbol filogenético se utilizó el programa MEGA3 (versión 3.1) (Kumar et al., 2004). Las proteínas codificadas por los ADNc secuenciados fueron analizadas con el servidor SignalP 3.0 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>) (Bendtsen et al., 2004) para predecir el péptido señal; con el servidor NetNGlyc 1.0 Server (<http://www.cbs.dtu.dk/services/NetNGlyc/>), para evaluar los sitios de N-glicosilación en la región extracelular y con el servidor NetPhos 2.0 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/NetPhos>) (Blom et al., 1999), para predecir los sitios putativos de fosforilación. Las regiones transmembrana se predijeron con el servidor ProtScale (<http://www.expasy.ch/tools/protscale>) (Gasteiger et al., 2005). La organización genómica de los genes *ghra* y *ghrb* fue establecida utilizando la base de datos genómica de pez cebra *Ensembl versión 46.7 (Zv7)* (<http://www.ensembl.org>). El análisis de los sitios potenciales de unión de factores de transcripción se llevó a cabo con el software MatInspector (<http://www.genomatix.de>), con un punto de corte en el rango de similitud de 0.75 en una matriz de similitud optimizada.

### **Análisis densitométrico de las bandas**

Las bandas correspondientes a los productos de amplificación de PCR o las bandas inmunoreactivas de *Western Blot (WB)* se cuantificaron mediante análisis densitométrico (Gel Pro Analyzer v4.0, Media Cybernetics, Inc). En los ensayos de WB o RT-PCR se graficó, en unidades arbitrarias, la banda en función de la densidad óptica integrada (IOD) relativizada. Los datos fueron relativizados a actina ó tubulina (*WB*) y a EF1 $\alpha$  (RT-PCR).

### **Análisis estadístico**

Los datos fueron analizados mediante la prueba estadística t-student para comparar medias de datos pareados, y mediante la prueba estadística no paramétrica de Kruskal-Wallis – Método de Dunn, para la comparación de grupos. También se utilizó la prueba de chi-cuadrado para el análisis de variables discretas. Los análisis se realizaron utilizando el software BioEstat 5.0 (Manuel Ayres, Belém, Pará, Brasil). La significancia estadística está indicada en el texto de cada análisis.

### **Observación y digitalización de imágenes de embriones**

La observación y el fotografiado de los embriones se realizaron utilizando una lupa estereoscópica Olympus MVX10 y una cámara digital Olympus DP72 acopladas a una PC, respectivamente. Para obtención de fotografías a partir de ejemplares vivos, los embriones y/o larvas fueron anestesiados durante 1 min con aceite de clavo de olor al 0,4 % en E3 y montados en una solución de agarosa 0,1 % en medio E3.

### **Mediciones de longitud estandar de las larvas de pez cebra**

La longitud estandar de las larvas de pez cebra fue cuantificada midiendo la distancia lineal desde el extremo de la cabeza (a la altura de la boca) hasta el extremo del tronco (inicio de la aleta caudal). Las mediciones se realizaron utilizando el software de la lupa estereoscópica Olympus MVX10, que permite realizar análisis y cálculos sobre las imágenes digitalizadas.

### **Mediciones espectrofotométricas**

Se realizaron en un espectrofotómetro JASCO V-630.

# RESULTADOS



## RESULTADOS

Los resultados obtenidos en este trabajo de tesis se han organizado en tres capítulos. En el Capítulo I se muestran los resultados de la caracterización molecular de los *ghrs*; la amplificación de las secuencias completas de los mismos, su organización génica, un análisis filogenético de ambos receptores y de sus regiones promotoras. En el Capítulo II se muestran los estudios de los patrones de expresión de ambos receptores a nivel del ARNm y de las proteínas, tanto en adultos como durante el desarrollo embrionario. Finalmente, el Capítulo III hace referencia a los estudios funcionales llevados adelante para el caso de GHRa durante el desarrollo embrionario temprano y tardío.

# CAPÍTULO I



## ***CAPÍTULO I: Caracterización molecular de los ghrs/slrs de pez cebra***

### INTRODUCCIÓN

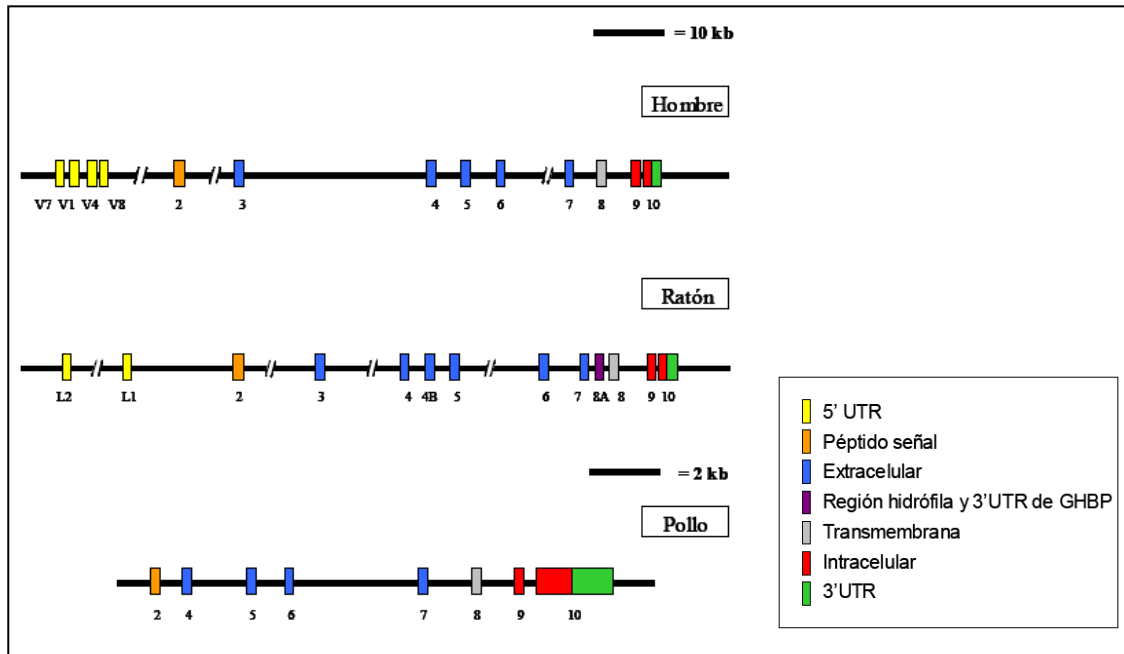
Como se mencionó en la introducción general, en teleósteos se conocen dos tipos de receptores, los GHR de tipo I y los de tipo II, lo que se evidencia al alinear las secuencias aminocídicas de los GHRs de peces con la aparición de dos clados. Ambos tipos de receptores comparten las características comunes oportunamente mencionadas, pero difieren en el número de cisteínas extracelulares y en el de tirosinas intracelulares, pudiendo esto implicar mecanismos diferentes de unión al ligando y transducción de la señal. Si bien los GHRs han sido caracterizados en varias especies diferentes de peces hasta la fecha; como es el caso de *Carassius auratus* (Lee et al., 2001), *Acanthopagrus schlegeli* (Tse et al., 2003), *Sparus aurata* (Calduch-Giner et al., 2003; Saera-Vila et al., 2005) *Anguilla japonica* (Ozaki et al., 2006a), *Silurus meridionalis* (Jiao et al., 2006), *Oncorhynchus masou* (Fukada et al., 2004) y *Oreochromis niloticus* (Ma et al., 2007), entre otros, sus características funcionales y mecanismos de regulación son escasamente conocidos en peces. Por otra parte, diversos estudios han demostrado que los dos tipos de GHRs co-existen en una misma especie; como en el caso de *Sparus aurata* (Saera-Vila et al., 2005), *Acanthopagrus schlegeli* (Jiao et al., 2006), *Oreochromis niloticus* y *O. mossambicus* (Ma et al., 2007; Pierce et al., 2007). Ensayos *in vitro* realizados para medir actividad biológica de los receptores aislados (GHRI y GHRII) mostraron que ambos poseen diferencias en los mecanismos de transducción de la señal (Saera-Vila et al., 2005).

Como consecuencia de ensayos de unión y estudios filogenéticos, recientemente se ha postulado que los GHR I podrían ser receptores para SL (SLR); y los GHR II, los verdaderos receptores de GH; pudiendo los primeros también unir GH, aunque con menor afinidad (Fukamachi et al., 2005). Además, se ha postulado que en teleósteos los SLRs serían los parálogos de los GHRs, adquiridos luego de la duplicación del genoma ocurrida hace 450 millones de años de forma exclusiva en los teleósteos (Fukamachi & Meyer, 2007; Nakatani et al., 2007). Sin embargo, los SLRs sólo han sido

caracterizados en tres especies de peces hasta la fecha; salmón japonés, medaka y chanchita (Canepa et al., 2012; Fukada et al., 2005; Fukamachi et al., 2005). Al realizar estudios filogenéticos, los SLR agrupan con los GHR I de otras especies de peces, lo que ha fundamentado parte de la incertidumbre acerca de la real existencia de dos receptores para GH, y de que uno de ellos sea en realidad un SLR.

Con respecto a la **estructura génica del GHR**, la misma ha sido descrita en varias especies de vertebrados, principalmente mamíferos y aves. Para el caso de los mamíferos y aves se ha estudiado en profundidad en el hombre (Godowski et al., 1989; Zou et al., 1997), el ratón (Moffat et al., 1999) y el pollo (Agarwal et al., 1994) (**Fig. 15**). Esta estructura se ha conservado a lo largo de la evolución mostrando varios exones alternativos que codifican para la región 5'UTR, seguidos de exones que codifican para el péptido señal, la región extracelular, la región transmembrana y la región intracelular seguida de la 3'UTR. No obstante, existen ciertas variaciones intra- e interespecíficas y se han identificado dos 5'UTR alternativas en los transcritos de oveja y pollo, 5 en rata y ratón, y al menos 8 en el hombre (Saera-Vila, 2009). Estas variantes se han asociado a diferentes secuencias promotoras, y si bien la función de las mismas no está totalmente clara, debido a la compleja regulación tisular y fisiológica de este receptor, se han asociado a una diferente estabilidad del mensajero y/o regulación de los promotores (Edens & Talamantes, 1998; Saera-Vila, 2009).

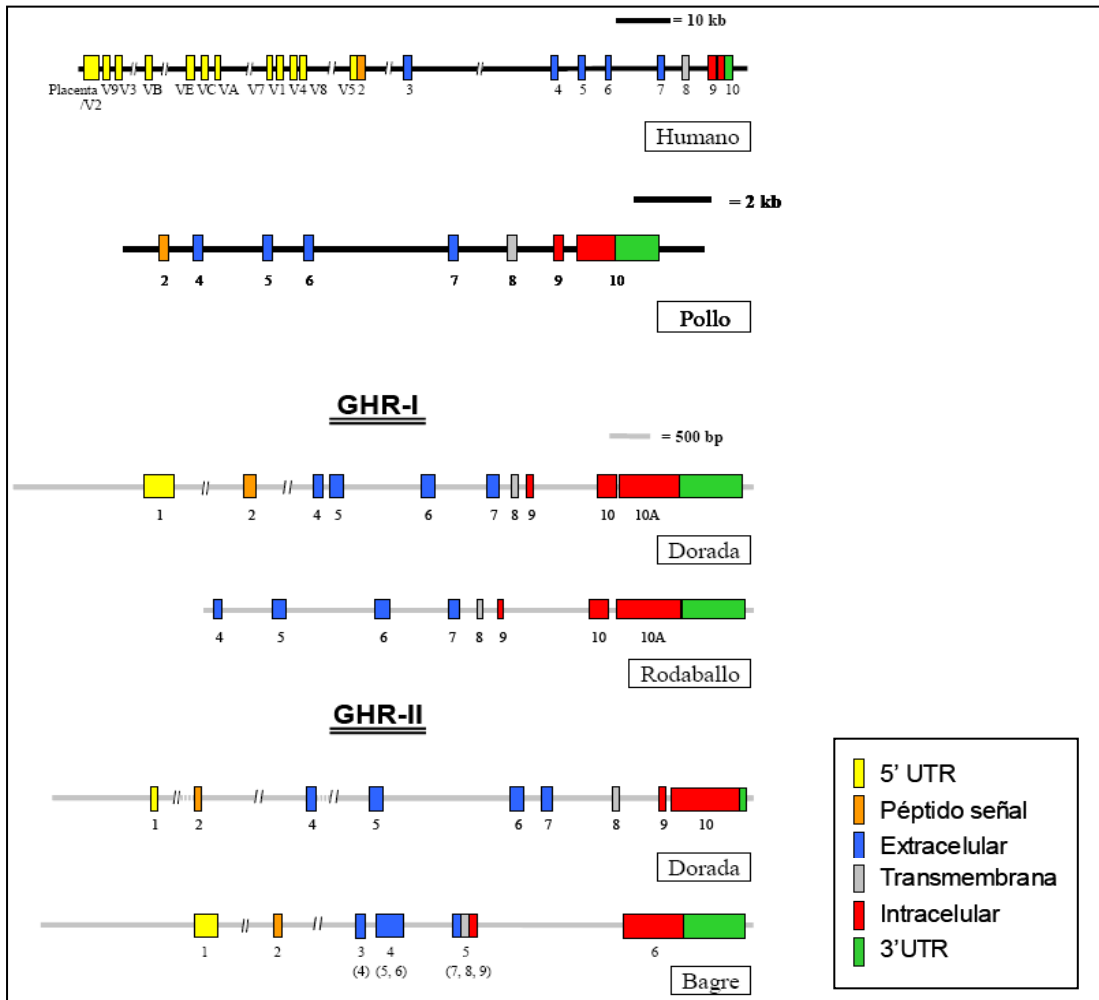
La estructura general exón-intrón del GHR también presenta pequeñas variaciones inter-específicas. Una de las más interesantes de mencionar es la presencia de un exón alternativo en ratón (exón 8A), también presente en rata, el cual está implicado en la formación de las GHBP (**Fig. 15**). Estas GHBP se generan mediante un procesamiento alternativo del mensajero del GHR que da lugar a un ARNm más corto en el que, después del exón 7, se inserta el exón 8A en lugar del 8. Este exón codifica para los últimos 27 aa hidrofílicos y la 3'UTR de las GHBP, excluyendo la región transmembrana (hidrofóbica) y la región intracelular (Edens & Talamantes, 1998; Saera-Vila, 2009).



**Figura 15.** Estructura del gen del GHR del hombre, ratón y pollo. Adaptado de (Saera-Vila, 2009).

La **organización génica de los GHR de peces** fue descrita por primera vez por el grupo del Dr. Pérez-Sánchez, para el caso del GHRI de dorada y rodaballo (Pérez-Sánchez et al., 2002) y luego completada para el GHR II de la primera especie (Saera-Vila et al., 2005). También ha sido descrita para el GHRI del falso halibut del Japón (Nakao et al., 2004) y el GHR II del bagre de canal (Small et al., 2006). La organización génica de los GHR de dorada permitió comprobar que estos genes presentan una estructura muy similar a la descrita en vertebrados superiores, lo que indica una gran conservación a lo largo de la evolución. Este hecho se aprecia perfectamente al comparar los GHR de dorada y rodaballo con el GHR de mamíferos y aves (**Fig. 16**). De hecho, los GHRI y II de dorada presentan una estricta conservación de los puntos de unión entre los diferentes exones (Saera-Vila, 2009). Sin embargo, en el GHR II del bagre del canal no se observa esta estricta conservación (Small et al., 2006). En este GHR aparecen fusionados los exones 5 y 6 por un lado; y los exones 7, 8 y 9 por otro. Además, es importante mencionar que, en función de lo caracterizado hasta el momento, el GHRI de los peces presenta un intrón adicional (10/10A) en el extremo C-terminal que no aparece en el

resto de los vertebrados (Pérez-Sánchez et al., 2002; Tse et al., 2003). Por otra parte, los GHR de aves y peces no contienen un exón homólogo al exón 3 del GHR humano (Saera-Vila, 2009).



**Figura 16.** Esquema de la organización exón-intrón de los GHRs de dorada, rodaballo, bagre del canal, pollo y hombre. La numeración se corresponde con la del gen humano, en el bagre de canal se indica entre paréntesis. Adaptado de (Saera-Vila, 2009).

Con respecto a las **regiones promotoras** de los GHR (sitio de inicio de la transcripción y región flanqueante en 5'), como se mencionó anteriormente, los GHR de **mamíferos y aves** presentan varios exones que codifican para las diferentes 5'UTR alternativas (**Fig. 15**). En el hombre, estas variantes aparecen agrupadas en dos bloques, una se expresa mayoritariamente en hígado y el otro muestra un patrón ubicuo de expresión (Goodyer et al., 2001; Orlovskii et

al., 2004). Esta organización parece estar conservada en el resto de mamíferos, y por otra parte cada bloque actúa bajo mecanismos de regulación transcripcional diferentes. Así, la 5'UTR de expresión ubicua de humanos, ratón, rata y rumiantes contiene un consenso CCAAT y una secuencia rica en GC (con sitios de unión para Sp1) en el promotor (Saera-Vila, 2009). Por otra parte, la 5'UTR específica de hígado en humanos y en ratón, presenta un consenso TATA funcional (Saera-Vila, 2009).

En **peces** sólo se han estudiado las secuencias promotoras de los GHRI y GHRII de dorada (Saera-Vila et al., 2007b) y del GHRI del falso halibut del Japón (Nakao et al., 2004). Para el caso de la dorada, se ha observado una estructura mucho menos compleja que la de mamíferos; dos genes con un único sitio de inicio de la transcripción cada uno. Por otra parte, no se observaron consensos TATA cerca del sitio de inicio de la transcripción en ninguno de los receptores. Sin embargo, aparecen secuencias similares al consenso *Inr* (del inglés *Initiator*), similar a lo descrito para la 5'UTR ubicua en el GHR bovino, ovino y de ratón (Saera-Vila, 2009). El *Inr* es un elemento funcionalmente similar al consenso TATA que contiene el sitio de inicio de la transcripción (Saera-Vila, 2009). A diferencia de la dorada, en el falso halibut del Japón se observaron 3 sitios diferentes de inicio de la transcripción, aunque al igual que en dorada no se observó presencia del consenso TATA dentro de la región flanqueante 5' (Nakao et al., 2004).

Con respecto a los factores regulatorios, mediante análisis bioinformáticos se han encontrado una gran cantidad de sitios para diferentes factores en la región flanqueante 5' del GHRI y II de dorada reflejando el carácter pleiotrópico de la GH (Saera-Vila et al., 2007b). Así, la GH además de regular el crecimiento, estaría implicada en diversos procesos fisiológicos, hecho que se ha observado en diversos trabajos hasta la fecha (Calduch-Giner et al., 1995; Calduch-Giner et al., 1997; Yada & Nakanishi, 2002).

Debido a todos los antecedentes mencionados, tanto en esta sección como en la introducción general, y acorde a los objetivos planteados, en el presente capítulo se desarrollarán los resultados acerca de la caracterización de los receptores de GH y/o de SL en el pez cebra. Como primera etapa se planteó caracterizar molecularmente a los GHRs/SLRs del pez cebra, determinando las

secuencias completas de sus ADNc. Luego se buscó determinar su organización génica y su relación filogenética con los GHRs/SLRs caracterizados hasta la fecha. Por último, se realizó una aproximación al estudio de las regiones promotoras utilizando análisis bioinformáticos.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### *Clonado y secuenciación de los ADNc completos de los zghrs/zslrs*

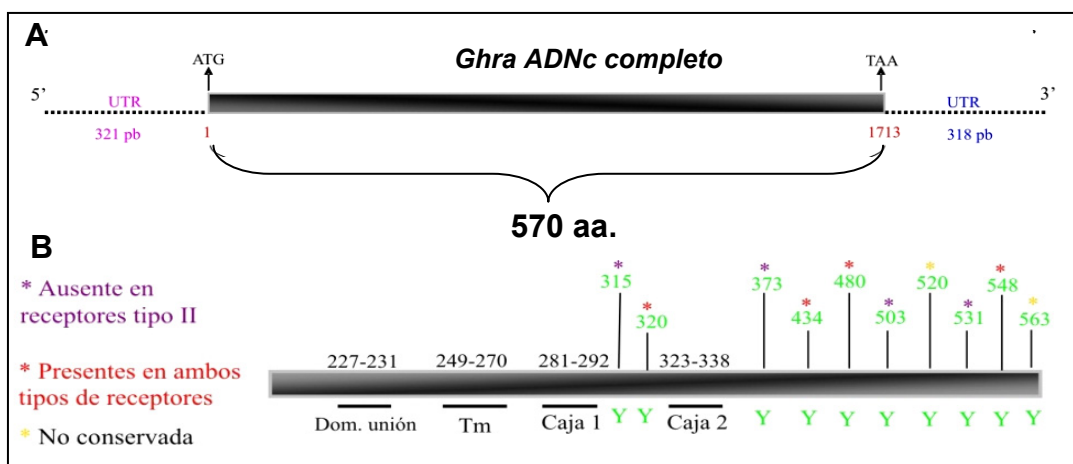
En base a las secuencias de los *ghrs* localizadas en el genoma de pez cebra se diseñaron cebadores específicos de manera de amplificar los ADNc completos de ambos receptores. Se partió de ARN total extraído de hígado de ejemplares de pez cebra adultos (aproximadamente 1 año de edad) de ambos sexos de forma de normalizar la variabilidad debida al sexo, ya que en muchas especies de peces se observó dimorfismo en el crecimiento relacionado al sexo y correlacionado a variaciones en el eje GH-IGF-I (Filby & Tyler, 2007; Parker, 1992). Utilizando estrategias de RT-PCR y 5' y 3' RACEs, se obtuvieron los diferentes fragmentos de los ADNc completos. Los cebadores empleados y los protocolos de trabajo utilizados se detallan en la correspondiente sección de materiales y métodos del presente trabajo. Los diferentes fragmentos de ADNc obtenidos para cada receptor, se clonaron y se secuenciaron a partir de ambos extremos. Las secuencias obtenidas se ensamblaron *in silico* y se obtuvieron dos ADNc aparentemente completos: uno de ellos de 2352 pb y el otro de 2975 pb. La traducción *in silico* de los marcos abiertos de lectura (ORFs del inglés *Open Reading Frames*) de ambos ADNc dio como producto dos proteínas; una de 570 aa. y otra de 555 aa., respectivamente, que se utilizaron para realizar los estudios filogenéticos (que se mencionan más adelante en esta sección). Al realizar dichos estudios, se observó que la proteína de 570 aa. agrupaba dentro del clado de los GHRI/SLRs y la otra, de 555 aa., en el clado de los GHR II. Basados en esta información y en las características específicas observadas en ambas secuencias (mencionadas a continuación) se decidió nombrar a estas secuencias de ADNc como ***ghra*** (GHR de tipo I) y ***ghrb*** (GHR de tipo II), respectivamente, de acuerdo a la nomenclatura actual del pez cebra

para la designación de genes duplicados. Si bien el *ghra* podría tratarse de un SLR, se decidió no utilizar esta designación, debido a la carencia de información funcional que avale la misma.

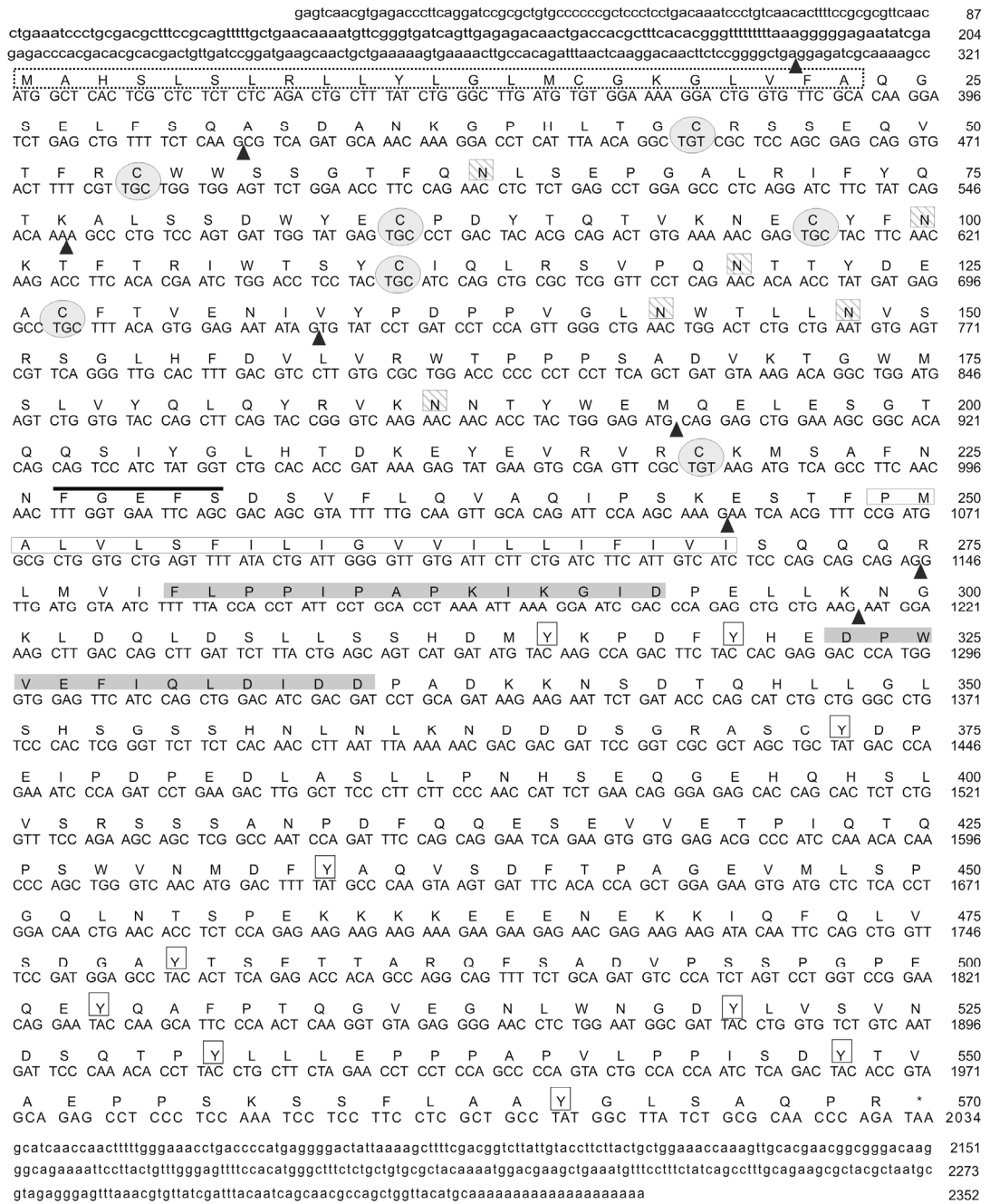
En este punto es importante mencionar que aún en la actualidad existe un gran conflicto respecto a la designación de los GHRs y sobre todo existe gran disconformidad en llamar SLRs a los GHR de tipo I, sin poseer pruebas funcionales de los mismos. Por otra parte, muchos de los receptores caracterizados a lo largo de los años han sido depositados en la bibliografía sin una adecuada clasificación, por lo que su nomenclatura suele llevar a confusión al haber sido designados simplemente como GHRs. Sumado a esto, la existencia de múltiples genes de GHRs en salmónidos, que entre otras especies, están considerados tetraploides recientes, pudiendo ser éste el origen de las diferentes isoformas descritas, ha hecho que en general por años se hable de los GHRs de salmónidos y de GHRs de no salmónidos (Benedet et al., 2005; Very et al., 2005).

La secuencia del ADNc completo para *ghra* fue depositada en el la base de datos *Genbank* bajo el número de referencia **NM\_001083578.1**. Esta secuencia, de 2352 pb, contenía un ORF de 1713 pb; con regiones 5' y 3' UTRs de 321 pb y 318 pb, respectivamente. La secuencia y características de este receptor se pueden observar en el esquema mostrado en la **Figura 17**, así como también en la **Figura 18**. En la región 3' UTR, corriente arriba a la cola de poli(A), no se encontró una señal de poliadenilación próxima. Sin embargo, un análisis mas exhaustivo de la región genómica corriente abajo de la cola de poli(A), sugiere que la secuencia amplificada no estaría completa, careciendo de aproximadamente 230 pb. La región UTR 3' completa predicha contendría entonces, aproximadamente 550 pb de longitud. Esta deducción se realizó debido a la existencia de una señal de poliadenilación (ATTAAA) y un elemento GT/T rico localizado 230 pb corriente debajo de la secuencia poli(A) interna encontrada. El ORF de *ghra* codifica para una proteína de 570 aa., con un péptido señal predicho de 23 aa., seguido de un dominio extracelular de 224 aa., con 6 sitios posibles de *N*-glicosilación; 4 de los cuales son exclusivos de los receptores de tipo I (sitios 2, 3, 5 y 6), encontrándose ausentes en los GHR II de teleósteos, 7 residuos de cisteína conservados y el motivo de unión a ligando FGEFS, característico de los GHRs. Seguido a esta región se

encuentra un dominio hidrofóbico de 22 aa. (dominio transmembrana) y una región intracelular con las cajas 1 y 2 de señalización conservadas y 10 residuos de tirosina (Y). De estos residuos; 4 son característicos de los receptores de tipo I (Y315, Y373, Y503 e Y531) y el resto se encuentran presente tanto en receptores de tipo I como de tipo II (Y320, Y434, Y480 e Y548) (**Fig. 17 inferior** y **Fig. 18**). De todos estos residuos sólo 5 de ellos se fosforilarían según la predicción de NetPhos; Y320, Y434, Y480, Y503 e Y520.



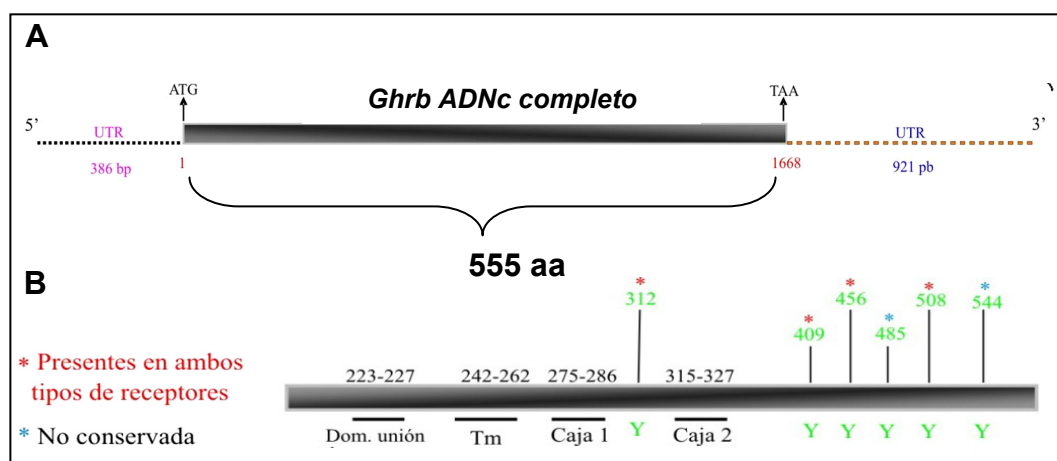
**Figura 17.** Esquemas del ADNc completo de *ghra* y de su producto proteico. A) ADNc completo de *ghra*. B) Esquema de GHRa obtenida por traducción *in silico* del ADNc. Se indican: el dominio de unión a ligando, la región transmembrana, las caja 1 y 2 y los diferentes residuos de Tyr (Y) de la región intracelular, indicando para cada uno de ellos las características antes mencionadas.



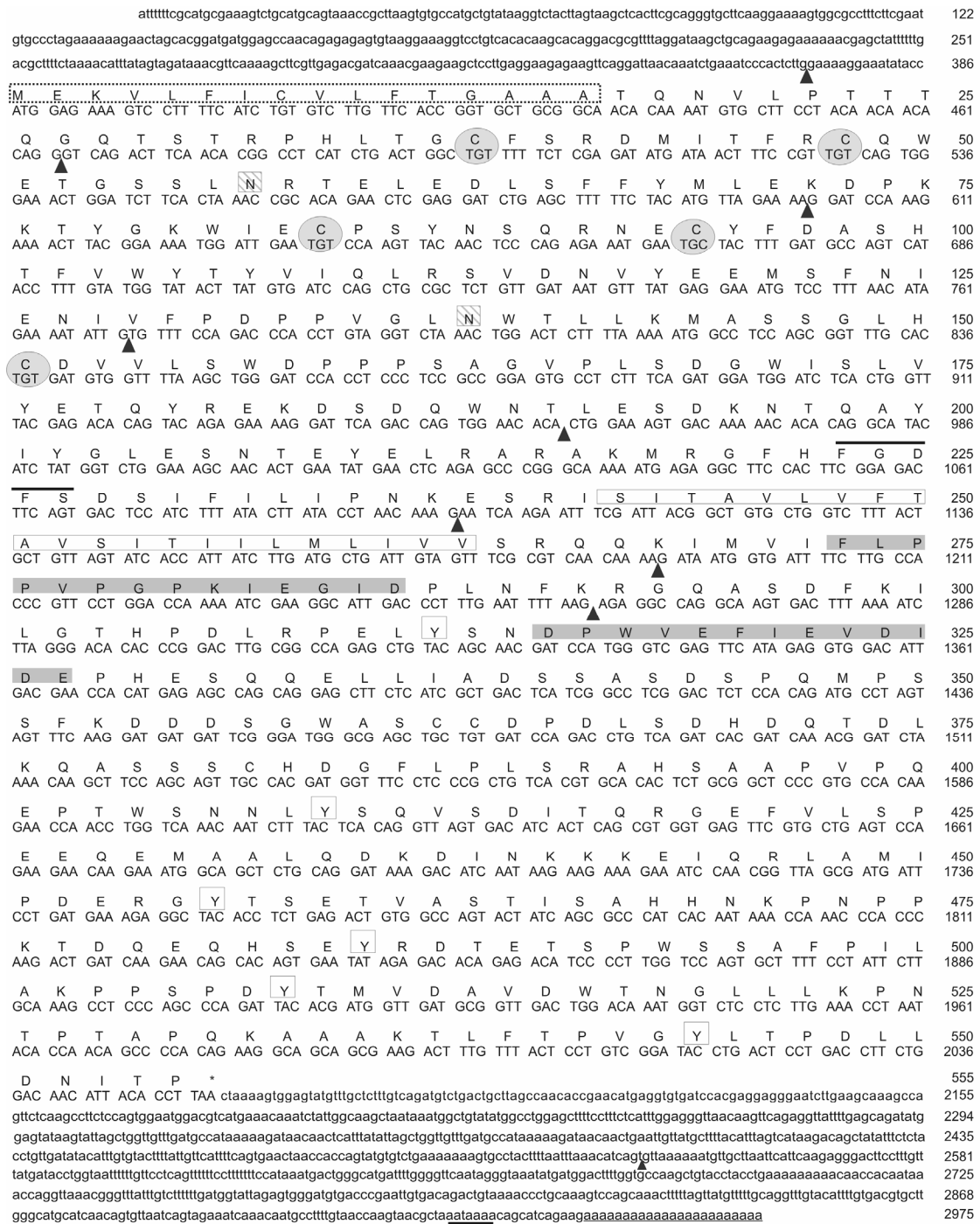
**Figura 18.** Secuencia nucleotídica y aminoacídica (deducida) de *zghra* (GHRI). Los nucleótidos (secuencia superior), y aminoácidos (secuencia inferior) están numerados en el lado derecho. Las regiones putativas se indican como sigue: el péptido señal (rectángulo punteado), residuos de cisteína conservados (círculos grises), sitios potenciales de N-glicosilación (cuadrados a rayas), motivo FGEFS (línea gruesa superior), dominio transmembrana (rectángulo con línea continua), cajas 1 y 2, (rectángulos grises), residuos de Tyr intracelulares (rectángulos), codón de stop (asterisco), límites exón-intrón (triángulos negros).

La secuencia del ADNc completo para *ghrb* fue depositada en la base de datos *Genbank* bajo el número de referencia **NM\_001111081.1**. Esta

secuencia, de 2975 pb, posee un ORF de 1668 pb, una región 5' UTR de 386 pb y una región 3' UTR 921 pb incluyendo la cola de poli(A). La secuencia y características del mismo se pueden observar en el esquema mostrado en la **Figura 19**, así como también en la **Figura 20**. En este caso, a diferencia de *ghra*, si se encontró una señal de poliadenilación (aataaa) dentro de la región UTR 3', situada a 13 pb corriente arriba de la cola de poli(A) (subrayada en **Fig. 20**). El ORF de *ghrb* codifica para una proteína de 555 aa.; con un un péptido señal predicho de 16 aa., seguido de una región extracelular de 225 aa.; la cual posee 2 sitios posibles de *N*-glicosilación, conservados en los GHRs de teleósteos en general (Pérez-Sánchez et al., 2002) y a diferencia de GHRI, sólo posee 5 residuos de cisteína. Además, el dominio de unión a ligando es ligeramente diferente a los observados en los GHRs y consiste en la secuencia FGDFS. A continuación, encontramos un dominio hidrofóbico (región transmembrana) de 22 aa. que precede a la región intracelular, la cual posee las cajas 1 y 2 de señalización y 6 residuos de tirosina. De entre estos residuos, dos de ellos no se encuentran conservados entre los GHRs de teleósteos; el residuo Y485 y el Y544 (**Fig. 19**), siendo este último una particularidad de esta especie, ya que el GHRa es el único de entre los GHRs de teleósteos caracterizados hasta el momento que posee dicha característica. De los residuos conservados entre los GHRs de teleósteos, sólo 4 se fosforilarían (Y312, Y409, Y 456 e Y508), según la predicción de NetPhos.



**Figura 19.** Esquemas del ADNc completo de *ghrb* y de su producto proteico. A) ADNc completo de *ghrb*. B) Esquema de GHRb obtenida por traducción *in silico* del ADNc. Se indican: el dominio de unión a ligando, la región transmembrana, las caja 1 y 2 y los diferentes residuos de Tyr (Y) de la región intracelular, indicando para cada uno de ellos las características antes mencionadas.



**Figura 20.** Secuencia nucleotídica y aminoacídica (deducida) de *zghrb* (GHRII). Los nucleótidos (secuencia superior), y aminoácidos (secuencia inferior) están numerados en el lado derecho. Las regiones putativas se indican como sigue: el péptido señal (rectángulo punteado), residuos de cisteína conservados (círculos grises), sitios potenciales de N-glicosilación (cuadrados a rayas), motivo FGE/DFS (línea gruesa superior), dominio transmembrana (rectángulo con línea continua), cajas 1 y 2, (rectángulos grises), residuos de Tyr intracelulares (rectángulos), codón de stop (asterisco), sitio de poliadenilación (subrayado), límites exón-intrón (triángulos negros)

Para el caso de ambos receptores no se encontraron secuencias alternativas 5' o 3' UTRs, como se ha observado para el caso de mamíferos y aves [Revisado en (Saera-Vila, 2009)], lo que se condice con lo observado para otros peces. Sin embargo, no se debe dejar de tener en cuenta que sólo se trabajó en un único tejido (hígado) y las variantes podrían encontrarse en los diferentes tejidos, como se ha observado en mamíferos.

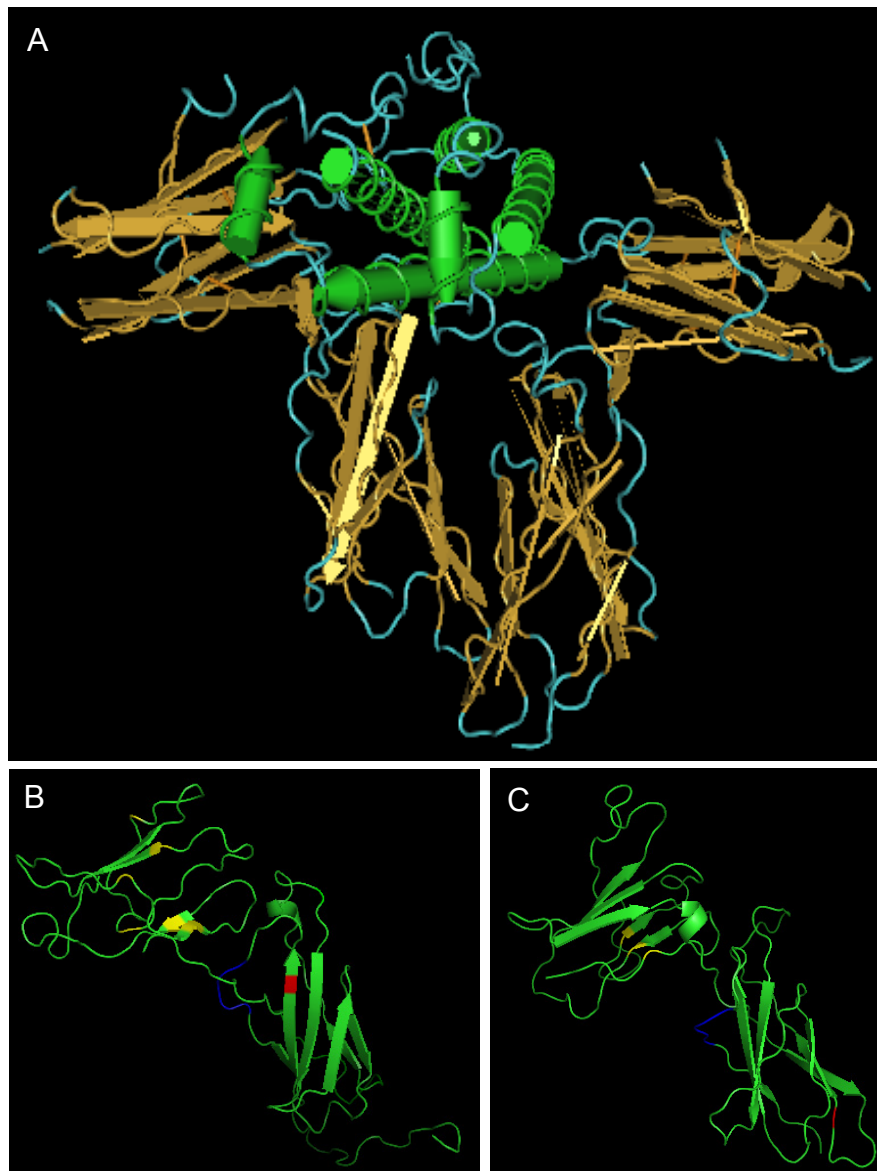
Al alinear las secuencias aminoacídicas de todos los GHRs de peces y SLRs caracterizados hasta la fecha (información no mostrada), se pudo observar la ausencia de un par de residuos de cisteína extracelular en los GHRs de tipo II (C5-C6), y 4 residuos de tirosina intracelulares conservados (ver Y2, Y4, Y5 e Y9 GHRa, Y8 GHRb **Fig. 21**), con la excepción del GHRII de la anguila japonesa el cual posee el par de cisteínas exclusivos de los GHRI C5-C6 y muchos otros residuos de tirosina no conservados, y el SLR del salmón japonés, el cual carece del último residuo de tirosina. Es importante mencionar que si bien en la **Figura 21** el residuo de GHRa Y531, numerado como Y8, alinea con el residuo de GHRb Y508, en los alineamientos realizados utilizando todas las secuencias de peces (mencionados anteriormente –no mostrados–), es en realidad el residuo Y9 de GHRa el que alinearía con este último de GHRb (lo que se observa también en los entornos de los residuos; DYT para ambos). Sin embargo, en alineamientos de dos secuencias, los criterios de penalización para los *gaps* que emplean los programas, muchas veces hacen que se observen este tipo de discrepancias.

El alineamiento de las secuencias proteicas de GHRa y GHRb de pez cebra, obtenidas por traducción *in silico*, mostró que poseen un 36 % de identidad entre ellas y las características distintivas antes mencionadas (**Fig. 21**). En la región intracelular comparten las cajas de señalización 1 y 2 y un tercer dominio conservado, que se denominó caja 3, el cual se evidenció también al realizar alineamientos de GHRs a gran escala utilizando tanto secuencias de tetrápodos como de peces (información no mostrada). Este dominio ácido, que posee la siguiente secuencia conservada: DDDSGRA/TSCY/CD/EPD/E, no ha sido descrito o asociado a ninguna función hasta la fecha. Sin embargo, el alto grado de conservación observado en todas las secuencias de los GHRs de vertebrados podría sugerir un rol clave en la transducción de la señal o en su procesamiento.



a 72 aa. corriente arriba del dominio de unión a ligando, lo que podría ser una característica distintiva del superorden Ostariophysi, del cual las especies mencionadas anteriormente son miembros. Teniendo en cuenta que en mamíferos se ha observado que el correcto plegamiento del receptor involucra la formación de puentes S-S entre residuos de cisteína próximos y que el residuo desapareado ha sido involucrado en el proceso de dimerización de los receptores (van den Eijnden et al., 2006), estas diferencias podrían implicar mecanismos de unión a ligando y dimerización de los receptores diferentes al resto de los teleósteos. La caracterización de secuencias de GHRs de tipo II de otros Ostariophysi, y sobre todo de ciprínidos, permitirá ampliar el conocimiento en lo que refiere a esta novedosa característica, ya que se debe tener en cuenta que el *ghrb* amplificado del pez cebra es el primer y único receptor de tipo II de ciprínidos caracterizado hasta el momento.

Por otra parte, teniendo en cuenta que la función de los puentes disulfuro intramoleculares es mantener la estructura tridimensional de la proteína (Lodish, 2000), la ausencia de alguno de ellos podría dar lugar a una diferente conformación de la región extracelular (**Fig. 22**) y alterar las interacciones ligando-receptor. Podría pensarse entonces, en una diferencia en la capacidad de unir posibles ligandos entre los GHRI y los GHRII. Estudios de mutagénesis-dirigida en el GHR de conejo (van den Eijnden et al., 2006) indican que el primer puente disulfuro es importante en la maduración del receptor, mientras que el segundo lo es en la unión al ligando. Por el contrario, las mutaciones que eliminan el tercer puente disulfuro no afectan de forma aparente el proceso de señalización intracelular. De esta manera, aunque los GHR de peces puedan presentar una diferente conformación tridimensional en su región extracelular, la presencia o ausencia del tercer puente disulfuro podría no afectar significativamente a su funcionalidad.



**Figura 22.** Estructura del complejo formado por la GH y la región extracelular de dos GHR humanos (A) (de Vos et al., 1992). Representación de la estructura de la región extracelular del GHRa (B) y GHRb (C) de pez cebra predicha por el *Swiss-modelling server* (0H<http://swissmodel.expasy.org/SWISS-MODEL.html>). Amarillo, residuos de cisteína que forman puentes disulfuro intracatenarios. Rojo, residuo de cisteína que forma puentes disulfuro inter-moleculares. Azul, motivo FG/DEFS.

Con respecto a la **región intracelular**, ambos GHRs del pez cebra tienen residuos de tirosina exclusivos, no conservados en otras especies de teleósteos (Y520, Y563 en GHRa, e Y485 en GHRb). De éstos, solo el residuo Y520 de GHRa se fosforilaría de acuerdo a la predicción de NetPhos. Dos de

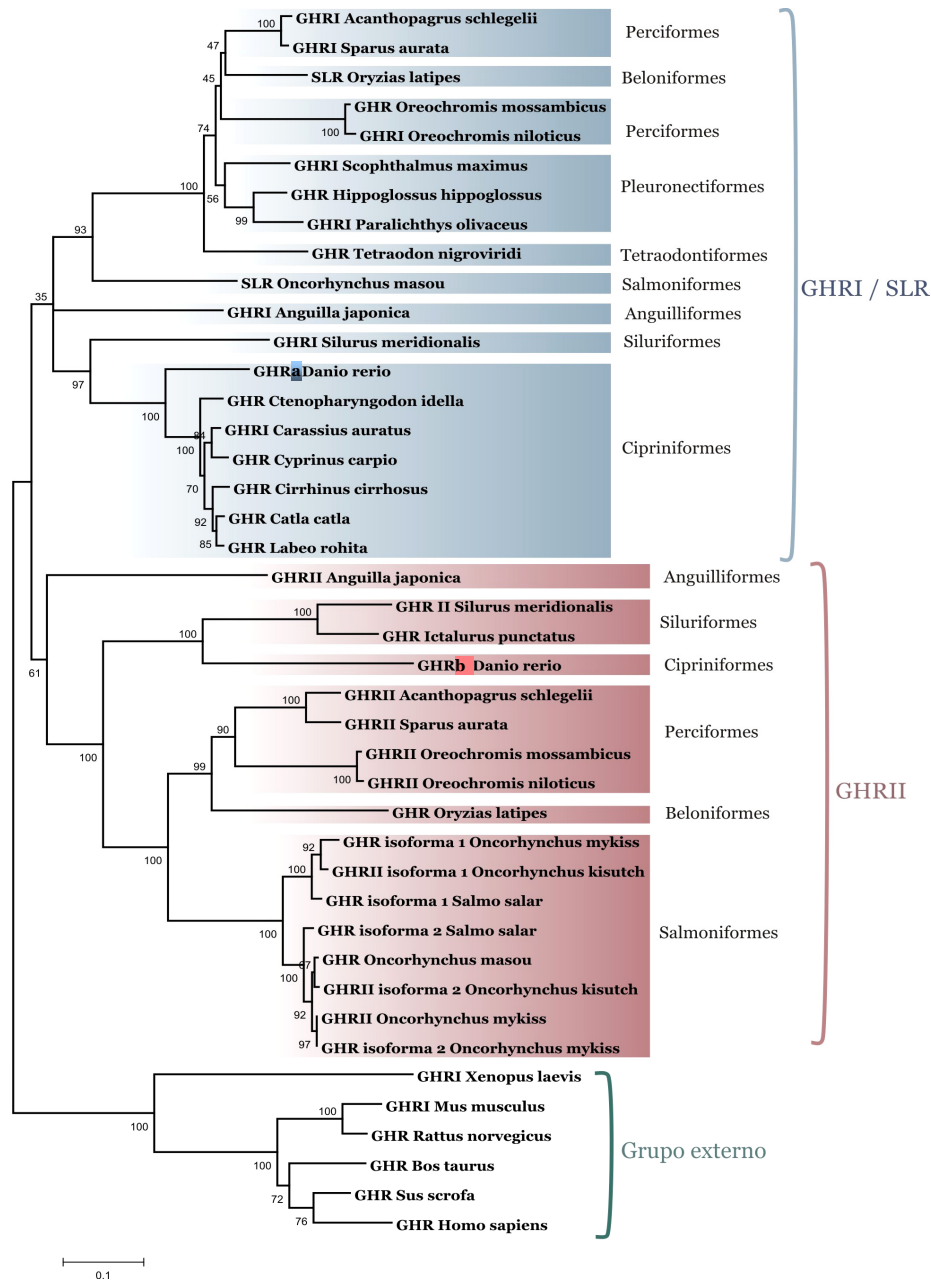
los cuatro residuos de tirosina exclusivos de los receptores de tipo I de GHRa (Y315 e Y503) (**Fig. 17**) se encuentran conservados en los receptores de tetrápodos, lo que sugiere que GHRa es más similar a los receptores de tetrápodos que GHRb. Como se mencionó anteriormente, el residuo Y544 de GHRb (Y10 **Fig. 21**), conservado entre los GHRs de teleósteos (información no mostrada), está ausente en el GHRa del pez cebra y en el GHRII de la tilapia de Mozambique.

Si se comparan los residuos de tirosina de los GHRs de peces con los residuos del GHR de humanos, aquellos que se fosforilarían en respuesta a GH serían: el Y320, Y434, Y480 e Y503, para el caso de GHRa, y el Y312, Y409, Y456 e Y544 para el caso de GHRb (Tiulpakov et al., 2005; Wang et al., 1996) (**Fig. 17 y 19**). Teniendo en cuenta que de estos residuos sólo el cuarto de ellos no está conservado entre ambos receptores de pez cebra, se puede concluir que a pesar de las diferencias encontradas, sólo uno de los residuos podría representar diferencias a nivel funcional, siempre y cuando los mecanismos de transducción de señal estudiados en mamíferos, estén conservados en teleósteos.

#### *Análisis filogenético*

El análisis filogenético de los receptores amplificados se realizó mediante la construcción de un árbol consenso (1000 réplicas), utilizando el método de enlace-vecinal NJ (del inglés *Neighbour –Joining*), considerado adecuado debido a que el mismo no asume que las velocidades de evolución de los linajes son constantes y construye un árbol de manera jerárquica. Como puede observarse en el filograma de la **Fig. 23**, los receptores agrupan en dos grandes clados: los GHRI/SLR por un lado y los GHR II por otro; agrupando GHRa y GHRb de pez cebra en cada uno de los clados, respectivamente. A su vez, dentro de ambos clados, los receptores de las diferentes especies se agrupan en función del orden taxonómico al que pertenecen, exceptuando los GHRI de perciformes. Esta particularidad se mantiene al realizar análisis filogenéticos por diferentes métodos (información no mostrada). Si bien los valores *bootstrap* en las dos grandes ramas (GHRI-GHRII) son bajos (indicados sobre cada rama **Fig. 23**), esto también se repite al realizar los estudios por

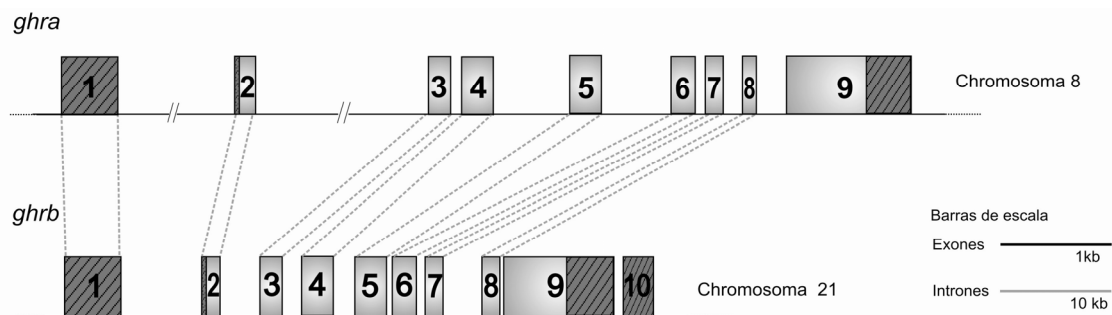
diferentes métodos (información no mostrada). También se observó que GHRa de pez cebra agrupó en una rama diferente a los GHRs de cipriniformes caracterizados hasta la fecha, lo que puede ser importante al comparar resultados de estudios funcionales entre diferentes miembros de este orden.



**Figura 23.** Análisis filogenético de las secuencias de los GHRI/SLR y GHRII de teleósteos. Las secuencias de los GHRs de tetrápodos se utilizaron como grupo comparativo externo. Sobre cada rama se muestran los valores *bootstrap* como % luego de 1000 repeticiones, indicando la credibilidad de cada rama. Las longitudes de las ramas son proporcionales al número de cambios en la secuencia de aa. en la rama. Las denominaciones de las secuencias utilizadas se condicen con lo informado por la base de datos *GenBank* del NCBI.

### Organización génica de los receptores

Utilizando las secuencias de los ADNc obtenidos para los receptores y la base de datos *Ensembl 46.7* (Versión 7), mediante análisis bioinformático se determinó la estructura génica de ambos *zghrs* (**Fig. 24**).



**Figura 24.** Organización génica de los *zghrs*. Los exones se encuentran representados con rectángulos lisos, y con rayas horizontales se indica la porción correspondiente a las 5' y 3' UTRs. Las líneas de puntos que se extienden entre los exones de ambos genes simbolizan la correspondencia entre los mismos.

Para el caso de *ghra*, se obtuvo un gen localizado en el cromosoma 8, codificado en la hebra reversa, que consta de 9 exones y 8 intrones, el cual daría lugar a un transcripto primario de aproximadamente 138 kilopares de bases (kbp). El exón 1 y 16 pb del exón 2, codifican para la región 5' UTR y la última porción del exón 9, para la región 3' UTR. Los exones 2-6 codifican para el dominio extracelular, con el péptido señal codificado en el exón 2. El exon 7 para el dominio transmembrana, y los exones 8-9 para el dominio intracelular. *Ghra* tiene dos grandes intrones (1 y 2) de aproximadamente 32 kpb y 85 kbp, respectivamente.

*Ghrb* está localizado en el cromosoma 21, consta de 10 exones y 9 intrones, está codificado en la hebra directa, y daría lugar a un transcripto primario de aproximadamente 22,5 kpb. La región 5' UTR se encuentra codificada en el exón 1 y parte del exón 2, y la 3' UTR en parte del exón 9 y todo el exón 10. Los exones 2-6 codifican para el dominio extracelular, el exon 7 para la región transmembrana, y los exones 8-9 para el dominio intracelular.

Para el caso de ambos *zghrs* todas las secuencias situadas en los límites exón-intrón siguen la regla GT-AG, y los nucleótidos a su alrededor están en concordancia con las secuencias consenso encontradas cerca de los sitios de corte y empalme.

Como puede observarse en la **Figura 24**, los tamaños de los genes de los *ghrs* de pez cebra difieren mucho respecto de lo informado para las otras especies de peces (Nakao et al., 2004; Pérez-Sánchez et al., 2002), en las que la secuencia de los *ghrs* no se extiende por más de entre 6 u 8 kb, siendo los intrones relativamente pequeños. En cambio, la enorme longitud observada para los genes de los *ghrs* de pez cebra, debida mayoritariamente a sus enormes intrones, se parece más a lo observado en vertebrados superiores, como el ratón y el hombre (ver **Fig. 15**). Esta discrepancia podría estar relacionada con mecanismos regulatorios similares, presentes en pez cebra y en vertebrados superiores, teniendo en cuenta que por un lado los intrones son secuencias con una gran presencia de elementos regulatorios (Lodish, 2000) y por otra parte que tanto pez cebra como las especies mencionadas y/o estudiadas presentan crecimiento definido. La descripción de un mayor número de genes de *ghrs* tanto de peces como de otros vertebrados podría aportar mucha información en este punto.

Por otra parte, existe un alto grado de conservación en la organización exón-intrón entre ambos genes (**Fig. 24**), lo que estaría en concordancia con la teoría de que los receptores son producto de la duplicación completa del genoma que sufrieron los teleósteos, conocida por las siglas **FSGD** del inglés *fish-specific genome duplication*, ocurrida hace aproximadamente 450 millones de años (Fukamachi & Meyer, 2007; Volff, 2005) Por ende, los GHRI/SLR serían una copia producto de una duplicación específica de un GHR ancestral, cuyo pariente mas próximo podría estar representado por los *ghrs* caracterizados en esturión (*Huso dauricus*) y en el pez pulmonado *Protopterus dolloi* (Fukamachi & Meyer, 2007).

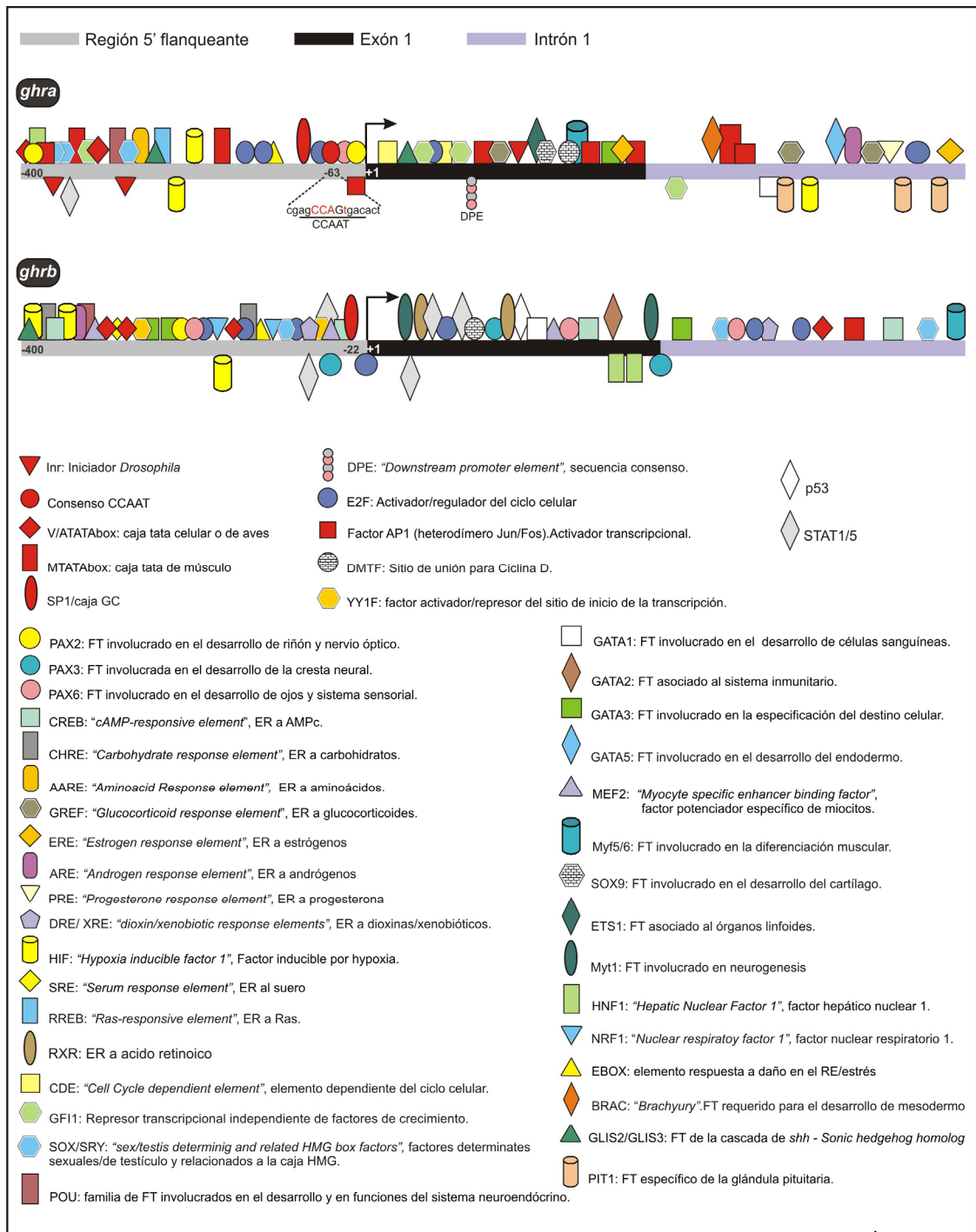
Con respecto a los **genes de *ghrs* de peces** caracterizados hasta el momento, ninguno de los *ghrs* de pez cebra muestra una exacta correspondencia con ellos. Por un lado, carecen del exón complementario 10A que codifica para la última parte de la región intracelular y el 3' UTR. Tanto para *ghra* como para *ghrb*, la región intracelular se encuentra codificada en dos

exones y no en tres, como en dorada y falso halibut del Japón (Nakao et al., 2004; Saera-Vila et al., 2007a), mostrando mayor similitud con el GHRII del bagre de canal (Small et al., 2006). Esto último podría deberse a la mayor proximidad filogenética entre el pez cebra; un ciprínido y el bagre de canal; un silúrido, que con un perciforme o pleuronectiforme, respectivamente.

#### *Análisis de las regiones promotoras*

Un análisis *in silico* realizado con el software EIDorado, permitió corroborar que la organización exón-intrón deducida para los *ghrs* (**Fig. 24**) se condecía con lo predicho por dicho software. Por otra parte, dicho análisis predijo para ambos genes regiones promotoras en torno al exón 1 de aproximadamente 600 pb, abarcando las mismas tanto la región 5' flanqueante como parte del exón 1. Además, confirmó que las regiones 5' UTRs amplificadas estarían aproximadamente completas. En función de lo mencionado, se asignaron los sitios probables de inicio de la transcripción para ambos genes, los que se correspondieron con el primer par de bases de las secuencias 5' UTRs amplificadas. Es importante aclarar, que si bien muchas de las predicciones se condicen con lo experimental; reforzando por ende las mismas, y que las condiciones de trabajo respecto a la amplificación de las regiones 5' UTRs se optimizaron de forma de asegurar obtenerlas completas, para la asignación, sin lugar a dudas, de los sitios de inicio de la transcripción se requiere aún de comprobación experimental mediante otro tipo de técnicas.

Una vez establecidos los sitios probables de inicio de la transcripción se analizaron las regiones 5' flanqueantes; el exón 1 y parte del intrón 1 mediante el software Matinspector, de forma de buscar sitios de unión para factores de transcripción y factores regulatorios y poder predecir las regiones promotoras. Se analizaron 400 pb de bases corriente arriba del sitio probable de inicio de la transcripción (-400), el exón 1 completo y 400 pb del intrón 1, debido a que para muchos genes se ha observado que regiones próximas del primer intrón suelen contener elementos regulatorios (Lodish, 2000). Los resultados (información no mostrada) se esquematizan en la **Figura 25**.



**Figura 25.** Representación esquemática de las regiones promotoras predichas para los *ghrs* de pez cebra y regiones regulatorias anexas. Sobre cada una de las regiones se encuentran situados símbolos que representan los sitios de unión a los factores de transcripción que se listan. Para el caso del intrón 1 sólo se han analizado y esquematizado los primeros 400 pb. Los factores localizados por encima y por debajo de las barras representan la localización de su secuencia; hebra (+) y hebra (-), respectivamente. Han sido indicados la mayoría de los sitios analizados en el estudio, aunque no todos. Abreviaturas: FT, factor de transcripción; ER, elemento respuesta.

Como puede observarse a simple vista, las secuencias flanqueantes 5' de los *zghrs* son sumamente diferentes, así como las demás regiones regulatorias analizadas, si bien el alineamiento entre ambas regiones (información no mostrada) indica que presentan aproximadamente un 50 % de identidad entre ellas. El análisis de las secuencias reveló que ambos *ghrs* presentan una estructura relativamente compleja, con mayor similitud a lo observado en mamíferos que a lo observado en dorada o el falso halibut del Japón (Nakao et al., 2004; Saera-Vila, 2009), evidenciándose la presencia de secuencias consenso del tipo CCAAT, islas CpG, así como Inrs, además de cajas TATA.

Para el caso de la **región flanqueante 5' de *ghra*** se observó la presencia de una región promotora probable en parte del exón 1 y la región corriente arriba del mismo; con la presencia, en la región proximal (-63), de la secuencia consenso CCAAT y una secuencia similar al consenso del “*Downstream promoter element*” (DPE); situada a 93 pb en dirección 3' del sitio predicho de inicio de la transcripción (+1). Rodeando al consenso CCAAT, se encontraron zonas ricas en GC (sitios de unión de factores Sp1), sitios de unión para proteínas activadoras (AP-1) y para factores de transcripción de la familia E2F. Se encontraron también 4 cajas TATA situadas a diferentes distancias corriente arriba del sitio +1; dos de ellas específicas de músculo, y también secuencias consenso Inr corriente arriba y corriente abajo del sitio de inicio, varias de ellas rodeadas de sitios de unión a proteínas activadoras (AP-1).

Los consensos CCAAT aparecen en cualquier orientación entre las posiciones - 60 y - 80 del sitio de inicio de la transcripción y están conservados entre especies (Mantovani, 1999). Los CCAAT normalmente están rodeados de otros elementos importantes para la actividad del promotor, como Sp1 (Wright et al., 1995) y su interacción es necesaria para el comienzo de la transcripción (Mantovani, 1999). La presencia de zonas ricas en GC (sitios de unión de factores como Sp1) es común en este tipo de promotores, y en los promotores de las variantes ubicuas del GHR de mamíferos se han identificado tanto sitios CCAAT como Sp1 funcionales (Goodyer et al., 2001).

En primera instancia, podría decirse que el promotor de *ghra* es una combinación entre lo observado en mamíferos y lo observado en la dorada. En este punto podrían tenerse en cuenta varias posibilidades; o bien que las cajas TATA actuaran como en el caso de mamíferos (Goodyer et al., 2001),

regulando la transcripción tejido específica y en ese caso las secuencias 5' UTR encontradas para hígado estarían incompletas; o bien, que fuese a la inversa de ellos, y que las cajas TATA se utilizasen para la expresión ubicua del *ghra*, y en cambio la transcripción en hígado estuviese dictada por la secuencias consenso antes mencionadas. Por otra parte, al alinear las secuencias de las regiones mencionadas anteriormente correspondientes al pez cebra y a la carpa china (información no mostrada), se observó una altísima conservación entre ambas; con un porcentaje de similitud mayor al 70% entre éstas, encontrándose la secuencia consenso CCAAT y la zona rica en GC exactamente conservadas entre ambas especies, así como las regiones flanqueantes a las mismas. Esto podría indicar un alto grado de conservación entre las secuencias promotoras para las especies de una misma familia, como en este caso los ciprínidos.

Para el caso de la **región flanqueante 5' de *ghrb*** se observó la presencia de una región promotora probable en la región corriente arriba del sitio de inicio de la transcripción; con la presencia, en la región proximal, de zonas ricas en GC (sitios de unión de factores como Sp1), así como también, factores activadores del sitio de inicio de la transcripción (YY1F). A diferencia de *ghra*, no se encontraron secuencias consenso CCAAT en la región promotora, pero al igual que en éste, se encontraron tres posibles cajas TATA corriente arriba del sitio de inicio de la transcripción, con secuencias proximales de unión a proteínas activadoras (YY1F) y proteínas de la familia E2F.

Con respecto a los demás sitios potenciales de unión de factores de transcripción identificados, aunque existen algunas similitudes, se pueden destacar varias diferencias interesantes entre ambos *ghrs*. En primer lugar, ambos genes presentan un elevado número de sitios potenciales de regulación relacionados con el desarrollo, la hematopoyesis y el sistema inmune, así como también elementos respuesta a hipoxia. Esto último refuerza lo observado a bajas tensiones de oxígeno; donde se evidenció un retraso en el crecimiento de larvas de pez cebra correlacionado con una disminución en la expresión de los *ghrs* (Ariel Reyes, comunicación personal). Con respecto a las diferencias entre ambos receptores; ***ghrb*** presenta un gran número de sitios de unión a factores de transcripción del tipo STAT1/5 en las regiones proximales, que podrían actuar en un loop regulatorio del receptor. Además, presenta sitios

potenciales de unión a ácido retinoico, un regulador clave en procesos fundamentales del desarrollo embrionario (Schier, 2001). Otra diferencia llamativa es la presencia de un sitio de unión a p53, ausente en *ghra*. Según estudios desarrollados en mamíferos, este factor de transcripción actúa como supresor tumoral de ciertos tipos de tumores, desempeñando un papel importante en la regulación del proceso de apoptosis y en el control del ciclo celular (Lodish, 2000). Para el caso del pez cebra, se ha observado que p53 es altamente similar al p53 de mamíferos, tanto en estructura como en función (Storer & Zon, 2010). Por ende, la presencia de un sitio de unión a p53 en *ghrb*, podría sugerir que este receptor podría estar asociado a funciones de control en el proceso de proliferación celular, desencadenado de forma indirecta por GH (vía IGF-I) o de forma directa por la hormona, por mecanismos aún poco conocidos. Esto permitiría asociar a GH a procesos tanto proliferativos como de muerte celular, pudiéndola involucrar en mecanismos de recambio celulares.

Además, presenta gran cantidad de potenciales elementos respuesta a hormonas esteroideas y sitios consenso CRE (elementos respuesta a AMPc del inglés “*cAMP-response element*”) rodeando a las cajas TATA o islas CpG, similar al caso de dorada. Estos elementos están relacionados con la respuesta al estrés. El consenso CRE interactúa con la familia de factores ATF/CREB, todos ellos factores relacionados con la respuesta al estrés (Saera-Vila, 2009). De hecho, el factor ATF3 se ha descrito como un represor transcripcional ligado a la respuesta hepática al estrés (Saera-Vila, 2009).

Por último, es importante destacar que uno de los sitios para unión a factores de transcripción de la familia *Hlff* de *ghrb*, es específico para el heterodímero *Clock/Bmal1* (perteneciente a la familia *Hlff*), regulador transcripcional asociado a los ritmos circadianos. Por ende, esto podría ser un punto de conexión entre las oscilaciones estacionales en el crecimiento y las variaciones en los niveles de expresión de los *ghrs* observadas en muchas especies de peces. Los peces exhiben ritmos diarios de locomoción y comportamiento alimentario impulsados por osciladores en el cerebro que están sincronizados con ciclos ambientales y coordinados con relojes periféricos que regulan sistemas fisiológicos, incluyendo la síntesis proteica por ejemplo (ritmos circadianos). Cómo los ritmos diarios y/o estacionales de

alimentación y crecimiento muscular podrían estar regulados en los peces, es un tema aún muy poco estudiado, y del cual se tienen muchas expectativas para el futuro. Recientemente se ha demostrado que *myoD* es un blanco de los reguladores transcripcionales asociados a los ritmos circadianos *Clock* y *Bmal1*. Estos y otros genes “reloj” de mamíferos están ampliamente conservados en teleósteos y están regulados por señales ambientales (Johnston et al., 2011).

Si bien las hipótesis aquí planteadas requieren de comprobación experimental, abren lugar a muchas aristas de discusión/experimentación en un tema tan importante para la productividad en la acuicultura como es el crecimiento somático en los peces y los mecanismos de integración fisiológicos conectados con las circunstancias ambientales, estacionales y demás, que terminarán influenciándolo directa o indirectamente.

# CAPÍTULO II



## ***CAPÍTULO II: Estudio de los patrones de expresión de los ghrs a nivel del ARNm y las proteínas***

### INTRODUCCIÓN

Gran variedad de estudios se han llevado adelante en lo que respecta a los patrones de expresión de los ARNm de los GHRs en tejidos de peces, tanto a nivel cualitativo (RT-PCR) como cuantitativo (PCR en tiempo real). Como consecuencia de ellos, se ha demostrado que los GHRs estarían presentes de forma casi ubicua en peces adultos, habiéndose detectado en cerebro (Perez Sanchez et al., 1991) gónadas (Gomez et al., 1999), branquias, intestino, riñones (Sakamoto & Hirano, 1991) y músculo (Jiao et al., 2006), entre otros, con predominancia en el hígado, blanco principal de la acción de GH. A su vez, los niveles de expresión observados para los GHR de tipo I ó los de tipo II en un tejido en particular no siempre se correlacionan entre especies, habiéndose observado múltiples dependencias en la expresión de los mismos, ya sea en lo que respecta a la edad, estatus fisiológico del animal, tipo de alimentación, entre otros (Pérez-Sánchez et al., 2002). Como contraparte, existen muy pocos estudios de expresión de los GHRs a nivel de proteínas en peces, existiendo escasas publicaciones acerca de los mismos a nivel proteico hasta la fecha, en especies como la dorada, el fletán del Atlántico, la trucha arcoiris y el pez rojo, entre otras (Calduch-Giner et al., 2003; Gray & Tsai, 1994; Hildahl et al., 2008; Liao & Zhu, 2004; Sohm et al., 1998; Sun et al., 1997; Zhang & Marchant, 1999).

Por otro lado, en vertebrados han sido descritas un gran número de variantes del ARNm de *ghr*, originadas por procesamiento alternativo del transcrito primario de dicho gen. Algunas de ellas codifican para las proteínas de unión a GH (GHBPs, *del inglés GH binding proteins*), las cuales son proteínas solubles circulantes (ver más adelante) y otras, originan formas truncadas del receptor, que son isoformas ancladas a la membrana las cuales carecen de la mayor parte del dominio intracelular del mismo (Edens & Talamantes, 1998). En peces, estas formas truncadas han sido identificadas en peces planos como el rodaballo, el falso halibut del Japón y el fletán del Atlántico (Calduch-Giner et al., 2001; Hildahl et al., 2007; Nakao et al., 2004), y

probablemente actúen como reguladores negativos de la acción de GH (Calduch-Giner et al., 2001).

Además, es importante mencionar que GHR está sujeto a modificaciones post-traduccionales durante su síntesis, entre las que se pueden destacar la glicosilación y, en algunas especies, la proteólisis específica. Asociado a este proceso, se debe tener en cuenta que la GH no se encuentra de forma libre en circulación, sino asociada a las proteínas de unión mencionadas (GHBPs). Si bien se desconoce su rol exacto dentro del eje GH-IGF-I, estudios en mamíferos indican que las mismas aumentarían la vida media de la hormona, y controlarían la disponibilidad de la misma para unirse a los receptores. En mamíferos, el 60% de la GH plasmática está unida a GHBPs de alta afinidad (Baumann, 1995; Baumann, 2002). Por otra parte, según estudios realizados también en mamíferos, las GHBP son proteínas glicosiladas que se corresponden con el dominio extracelular de GHR, es por ello que algunos autores suelen denominarlas “formas solubles del receptor” (Baumann, 1995; Baumann, 2002). Con respecto a su origen, las GHBPs se puede generar a partir del receptor por dos mecanismos diferentes: por **proteólisis** del GHR anclado a membrana (humanos, cerdos, monos, entre otros) o por **procesamiento alternativo del ARNm** que codifica para el GHR, mecanismo que conduce a la pérdida de las regiones del transcripto que codifican para la los dominios transmembrana y citoplasmático y que se ha visto que ocurren principalmente en el caso de la rata y el ratón, y también en el pollo y el mono (Kopchick & Andry, 2000). Para el caso de los peces, han sido caracterizadas GHBPs en la trucha arcoiris, en el pez rojo y recientemente en el lenguado fino, pero los mecanismos por los cuales se producen son aún desconocidos (Björnsson et al., 2002; Fuentes et al., 2012).

Además, y como se mencionó en otras secciones, no se debe dejar de tener en cuenta que se ha postulado que los receptores de tipo I, podrían ser en realidad receptores para SL, y los de tipo II, los verdaderos receptores de GH (Fukamachi et al., 2005), lo que ha derivado en la generación de una enorme controversia respecto a este punto.

En los peces se sabe que aunque el eje somatotrófico (ST) es la fuente principal de GH e IGF-I circulantes, una vez que la glándula pituitaria se ha desarrollado y el hígado es funcional; los transcriptos que codifican para estas

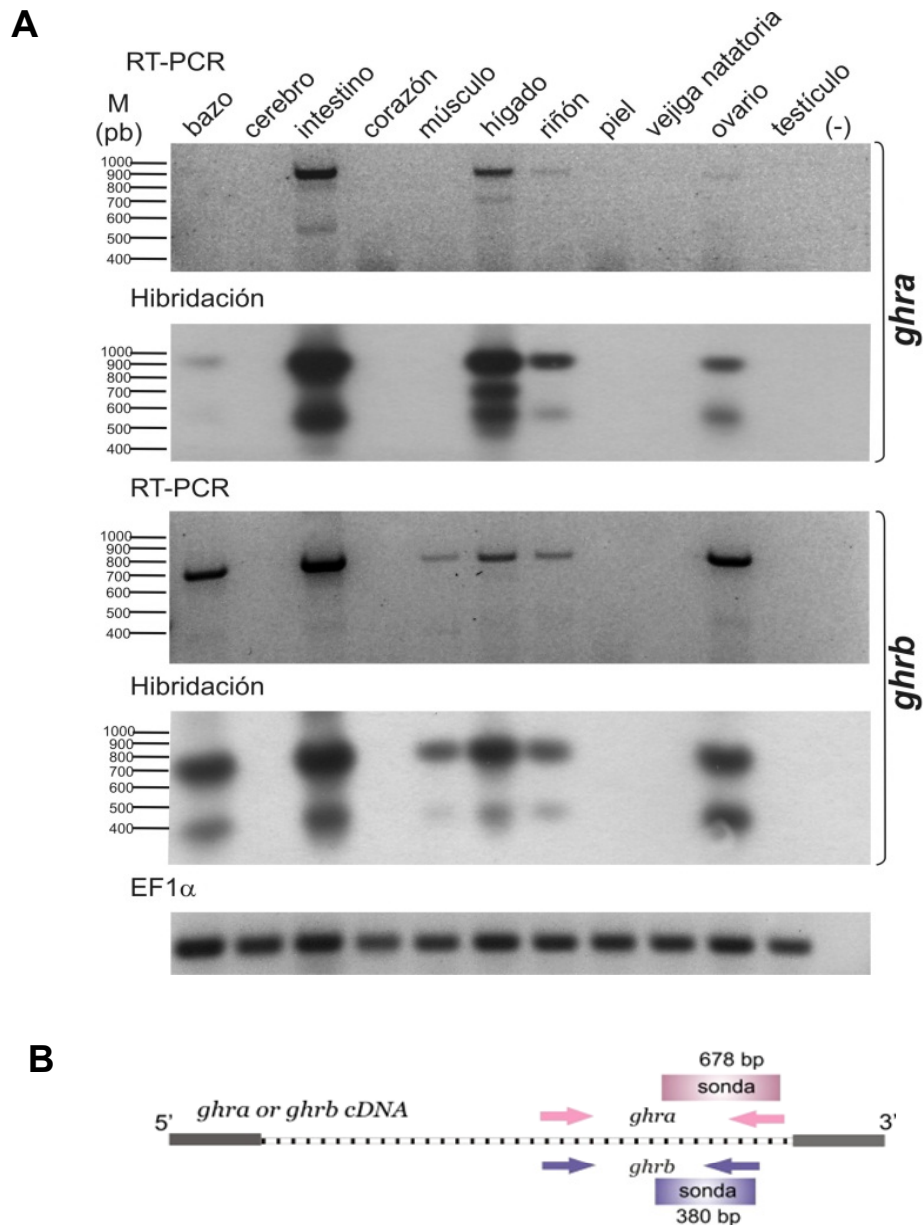
hormonas también están presentes en muchos tejidos no relacionados a dicho eje, así como también en embriones, previo a que el eje ST y el hígado sean funcionales (Li et al., 2007).

En función de todo lo mencionado y aprovechando las ventajas del pez cebra en lo que respecta a las particularidades y su amplio conocimiento sobre el desarrollo embrionario, se planteó el estudio de la expresión de los ARNm de los *zghrs* en los tejidos del pez cebra y durante el desarrollo embrionario temprano y tardío. También se realizaron estudios a nivel proteico, para los cuales no existían antecedentes en otros peces. Los resultados de estos enfoques se desarrollarán al lo largo del presente capítulo.

## RESULTADOS y DISCUSIÓN

### *Patrones de expresión de ghra y ghrb en tejidos de peces adultos*

Se estudiaron los patrones de expresión de los receptores en los tejidos de peces adultos, mediante la técnica de RT-PCR, utilizando un par de cebadores específicos para amplificar el fragmento de interés correspondiente a cada receptor. También se realizó la amplificación del mensajero del factor de elongación 1 alfa (EF1 $\alpha$ ) como control. Los patrones de expresión se validaron por hibridación de tipo *Southern* utilizando sondas específicas marcadas con digoxigenina. Los cebadores específicos utilizados fueron diseñados de forma que hibriden en exones diferentes, para evitar la amplificación de ADN genómico contaminante y comprenden la mayor parte de la región intracelular de cada receptor incluyendo la región transmembrana (**Fig. 26B**). La elección de su localización estuvo relacionada con el hecho de que se ha informado en algunas especies de peces y en mamíferos la presencia de receptores truncos (que carecen de la región intracelular completa) y también de variantes de menor longitud, como se mencionó anteriormente (Amit et al., 1997; Caldusch-Giner et al., 2003; Dastot et al., 1996). Por ende, utilizando esta estrategia de trabajo, el tamaño del producto de amplificación permite discriminar si se está observando la expresión del receptor de longitud completa o una variante del mismo. Los fragmentos de amplificación esperados para los receptores de longitud completa poseían 898 pb y 701 pb, para *ghra* y *ghrb* respectivamente.



**Figura 26.** Patrones de expresión de *ghra* y *ghrb* en tejidos de peces adultos. A) Se muestran los patrones estudiados por RT-PCR e hibridación de tipo *Southern* para el mensajero de cada receptor. Los mensajeros de EF1alfa se amplificaron como control. (-) controles negativos para los distintos pares de cebadores, que consistieron en reacciones de PCR en las cuales se colocó agua en lugar de la muestra. B) Esquema de los ADNc de *ghra* y *ghrb*, las posiciones aproximadas de los cebadores utilizados en las reacciones de PCR y de las sondas empleadas en las hibridaciones.

Para el caso de *ghra* se observó expresión del transcripto de la longitud completa esperada (898 pb) en bazo, intestino, hígado, riñón y ovario (**Fig. 26 A**). Al realizar la hibridación con las sondas específicas se evidenció la presencia de fragmentos de amplificación de menor longitud; uno de aproximadamente 550 pb, presente en todos los tejidos positivos para el producto de longitud esperada (898 pb); y otro de aproximadamente 700 pb, exclusivo de hígado (**Fig. 26 A**). Con respecto a *ghrb* se observó expresión en los mismos tejidos que para *ghra* y, además, en músculo. Al igual que en el caso anterior, luego de realizar la hibridación se observó la presencia de un fragmento de amplificación de menor longitud, de aproximadamente 450 pb, presente en todos los tejidos positivos para el fragmento de longitud completa (700 pb). Bajo las condiciones experimentales de trabajo no se observó expresión de los transcriptos de *ghra* ó *ghrb* en las muestras de cerebro, corazón, piel, vejiga natatoria y testículo en peces adultos (**Fig. 26 A**).

La expresión de los transcriptos de los *ghrs* en hígado ha sido reportada en todas las especies de peces y mamíferos analizados hasta la fecha, debido a que el hígado es el principal órgano blanco para la hormona de crecimiento (Kaplan & Cohen, 2007). La expresión de ambos *ghrs* en intestino ha sido reportada en muchas especies de peces, aunque en bajos niveles (Filby & Tyler, 2007; Jiao et al., 2006; Lee et al., 2001; Li et al., 2007), sin embargo, no existe demasiada información acerca de la posible función directa de GH en este órgano digestivo, el cual tiene una importancia especial en el caso de un pez sin estómago como el pez cebra. Ambos receptores también fueron detectados en tejidos relevantes a nivel inmunitario como son el riñón y el bazo. A pesar de que el efecto inmunomodulatorio de GH ha sido reportado en peces (Yada, 2007), los mecanismos de acción de GH en este sentido, permanecen aún sin dilucidar. Cabe mencionar, además, que SL también ha sido asociada a funciones inmunitarias (Calduch-Giner et al., 1998).

Por otra parte, se observó expresión de los *ghrs* asociada al género, siendo detectados ambos receptores en ovario pero no en testículo, con una importante expresión para el caso de *ghrb*. Si bien en la mayoría de las especies donde se ha estudiado la expresión de ambos *ghrs* se ha detectado su expresión tanto en ovario como en testículo, en general, en éste último los niveles de expresión de los receptores suelen ser muy inferiores respecto al

ovario. Existe considerable evidencia que el eje GH/IGFI posee un rol importante en la reproducción, pero no está claro si es a través de mecanismos endocrinos o parácrinos/autócrinos (Canosa et al., 2007; Reinecke, 2009). Los transcritos de GH y GHR y sus correspondientes productos proteicos han sido detectados en ovocitos, células de la granulosa y células del estroma de mujeres y fetos (Abir et al., 2008), y en ovocitos y células de la granulosa de ratas (Lobie et al., 1990). En teleósteos, se ha observado una localización específica de los transcritos de los *ghrs* en el citoplasma y el núcleo de ovocitos inmaduros, y en células de la granulosa y la teca rodeando a ovocitos vitelogénicos de tilapia del Nilo (Ma et al., 2007). De forma similar, se ha reportado la presencia de los transcritos de los *ghrs* en muestras de testículos de la carpita cabezona, la trucha arcoiris y la tilapia del Nilo (Filby & Tyler, 2007; Gomez et al., 1998; Ma et al., 2007). Sin embargo, en la carpita cabezona, (pez más próximo filogenéticamente al pez cebra) los niveles de expresión del GHR de tipo I observados en testículo por PCR en tiempo real, son extremadamente bajos; y en tilapia del Nilo, la expresión muestra una alta dependencia con el estado de desarrollo de las gónadas durante el ciclo reproductivo (Filby & Tyler, 2007; Ma et al., 2007). Esto podría implicar que la ausencia de los transcritos de los *ghrs* en testículo de pez cebra (**Fig. 26 A**) podría estar relacionada al estatus reproductivo de los individuos seleccionados para este estudio o podría deberse a un problema de sensibilidad de la técnica de detección.

Para el caso de la muestra de músculo se observó una diferencia significativa en la expresión de ambos receptores, detectándose sólo el transcrito de *ghrb*, lo cual sugiere un rol específico de este receptor en músculo de peces adultos.

A pesar de que los *ghrs* han sido detectados en casi la mayoría de los tejidos en otras especies de teleósteos, incluyendo el cerebro, no podemos descartar diferencias especie específicas; ya que el pez cebra posee crecimiento determinado, a diferencia de la mayoría de las especies de peces mencionadas, en las cuales la talla corporal no se fija (Biga & Goetz, 2006). Además, hay que mencionar que gran parte de los estudios de los patrones de expresión de los *ghrs* implican la amplificación de fragmentos cortos de los receptores; en cambio, en nuestro caso, los cebadores utilizados abarcan la

mayor parte de la región intracelular, (incluyendo la región transmembrana) lo que permite diferenciar entre la expresión de un receptor de longitud completa de la expresión de transcritos alternativos. Esta diferencia metodológica podría estar influenciando la detección de los transcritos en algunos tejidos, considerando la enorme longitud que poseen los transcritos y su baja abundancia.

Por otra parte, es muy importante tener en cuenta un estudio realizado recientemente en el pez cebra donde se determinó la curva de crecimiento para este organismo. En el mismo, se evidenció que la fase de crecimiento exponencial se da entre los 9 dpf y los 51 dpf, observándose un plateau en el crecimiento a partir de los 65 dpf (Gomez-Requeni et al., 2010). Podría pensarse entonces que, como en el estadio en el cual se realizaron los estudios el pez cebra no estaría creciendo, habría una regulación negativa del eje GH-IGF-I (hecho observado tanto en mamíferos como en peces) (Lai et al., 1993; Saera-Vila et al., 2007b); y por ende de los GHRs, evidenciándose los mismos sólo en aquellos tejidos donde posee un rol particular no asociado a una función específica del crecimiento.

#### *Caracterización de las isoformas de los receptores*

En función de los resultados obtenidos en lo que refiere a la amplificación de fragmentos de menor longitud, se decidió clonar y secuenciar estos fragmentos observados. Los mismos se clonaron a partir de dos tejidos diferentes (hígado e intestino) para evidenciar la posible variabilidad entre tejidos, en caso de que existiese y descartar la presencia de un artefacto de amplificación.

Para el caso de **ghra**, se clonó un fragmento de 532 pb, denominado **t<sub>1</sub>ghra** (*Genbank* GQ890150) que se corresponde con la banda de amplificación de aproximadamente 550 pb observada en todos los tejidos positivos para el fragmento de longitud completa (898 pb). La secuencia de **t<sub>1</sub>ghra** posee una delección interna de 380 pb, pero es idéntica al producto de longitud completa en ambos extremos. También se clonaron de hígado dos fragmentos cuya secuencia es diferente pero que poseen aproximadamente igual longitud; 695 bp y 697 pb, denominados **t<sub>2</sub>ghra** (*Genbank* GQ890151) y **t<sub>3</sub>ghra** (*Genbank* GQ890152) respectivamente. Es decir que en realidad, la banda de

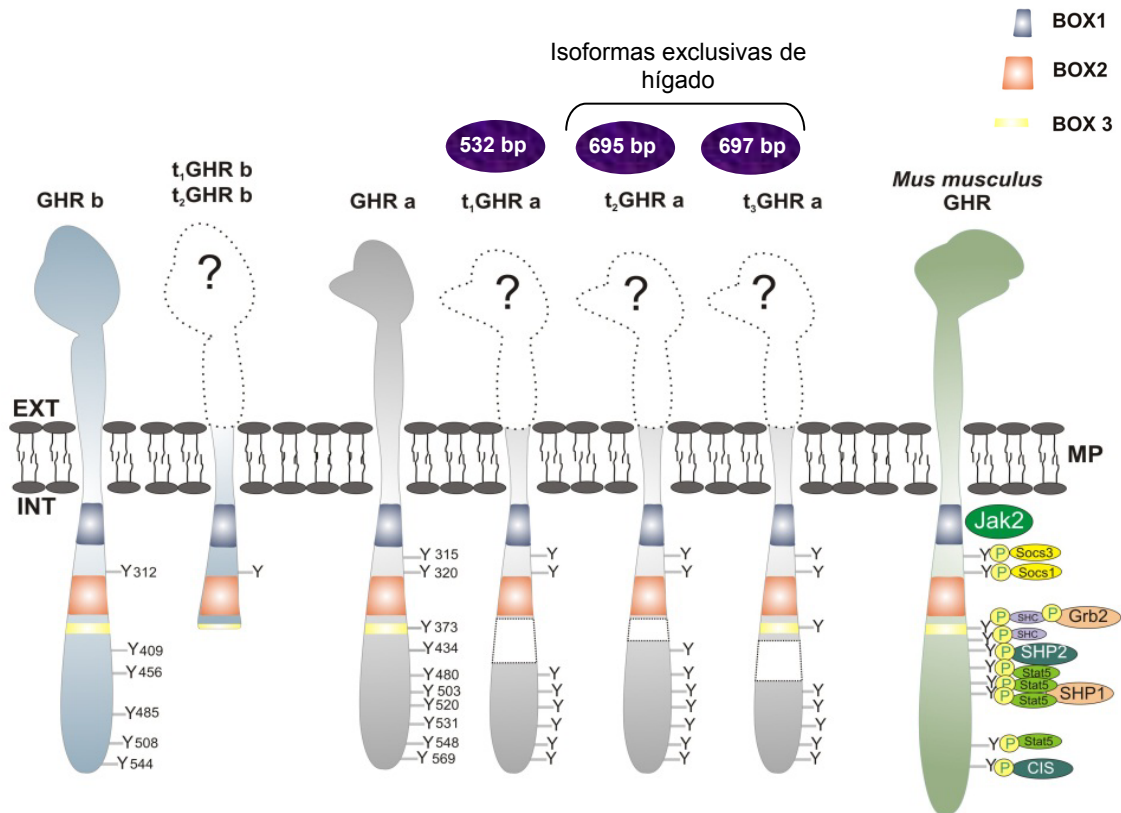
amplificación de 700 pb exclusiva de hígado, se correspondía con dos productos diferentes de aproximadamente la misma longitud.

Para el caso de **ghrb** también se clonaron dos fragmentos; uno de 420 pb y otro de 471 pb, denominados **t<sub>1</sub>ghrb** (*Genbank* GQ890153) y **t<sub>2</sub>ghrb** (*Genbank* GQ890154) respectivamente, lo que implica que la banda de amplificación de 450 pb observada en todos los tejidos también se correspondía con dos fragmentos de longitud similar pero de secuencia diferente. Comparando estos fragmentos con los transcritos de longitud completa, ambas secuencias poseen una deleción interna, careciendo de aproximadamente 280 pb en diferentes posiciones en la secuencia.

Los fragmentos secuenciados se ensamblaron *in silico*, utilizando las secuencias de las regiones corriente arriba y corriente abajo de **ghra** y **ghrb**, de manera de lograr un marco abierto de lectura completo para cada uno. Las secuencias obtenidas se tradujeron *in silico* obteniéndose las diferentes isoformas de GHRa y GHRb que se esquematizan en la **Figura 27**. En dicha figura, además de los GHR de longitud completa y sus isoformas, también se encuentra representado el GHR de ratón, en el cual los dominios asociados a la transducción de la señal han sido estudiados ampliamente (Rowland et al., 2005). La región extracelular de las isoformas alternativas tanto para GHRa como para GHRb se encuentra indicada con un signo de interrogación ya que se desconoce si su secuencia es igual o no a la de los receptores completos.

Para el caso de **ghra** todos los fragmentos (**t<sub>1</sub>ghra**, **t<sub>2</sub>ghra**, **t<sub>3</sub>ghra**) una vez ensamblados, generan por traducción *in silico*, proteínas que poseen deleciones internas y por ende carecen de diferentes residuos de Tyr según sea el caso (**Fig. 27**). La isoforma **t<sub>1</sub>GHRa**, carece de una región que abarca la Caja 3 de señalización y dos residuos de Tyr (Y373 e Y434). Uno de estos residuos es característico de los GHR I y el otro está conservado entre los GHRs de teleósteos. Además, uno de los residuos es homólogo al residuo de Tyr de ratón que une la proteína adaptadora Shc, la cual une a su vez factores de crecimiento del tipo Grb2 (del inglés *Growth factor receptor-bound protein 2*) por ende, involucrados en la función proliferativa del receptor. El otro residuo es homólogo al residuo encargado de la activación de fosfatasa que contienen dominios SH2 (SHP-2), involucradas en la detención de la señal iniciada por fosforilación (Zhu et al., 2001). La isoforma **t<sub>2</sub>GHRa** carece de una región de 70

aa. próxima a la Caja 2, que posee un único residuo de Tyr homólogo al implicado en la función proliferativa del receptor de ratón (vía activación de Grb2). Por último, la isoforma **t<sub>3</sub>GHRa**, carece de dos residuos (Y434 e Y480); uno homólogo al involucrado en la activación de fosfatasa y el otro homólogo al involucrado en la activación de STAT5 y por ende, implicado indirectamente en la activación de IGF-I, efector principal de las funciones de GH (Lanning & Carter-Su, 2006). De acuerdo a estos resultados y a las comparaciones hechas con los receptores de ratón, el pez cebra tendría diferentes isoformas de *ghra* que podrían actuar selectivamente estimulando distintas vías de señalización, si las moléculas asociadas al receptor e involucradas en las vías de señalización estuviesen conservadas entre las especies. Estudios recientes realizados en diferentes especies de peces han demostrado que muchas de las moléculas implicadas en la transducción de la señal de GHR observadas para el caso de mamíferos están conservadas en peces, habiendo evidencia para: JAK2, STAT5, MAPK y PI3K (Ahmed et al., 2011; Fuentes et al., 2011; Fuentes et al., 2012).



**Figura 27.** Isoformas de GHRa y GHRb de pez cebra obtenidas por traducción *in silico* de las secuencias ensambladas. También se encuentran representados los receptores de longitud completa de pez cebra y el receptor de ratón con las moléculas de señalización asociadas a los diferentes residuos de tirosina intracelulares. Esquema adaptado de (Rowland et al., 2005). Los residuos de tirosina de los receptores de pez cebra se encuentran localizados de manera de mostrar la homología con los residuos de ratón. Las cajas blancas localizadas sobre las isoformas de GHRa representan las regiones que estarían ausentes en cada receptor. Abreviaturas: quinasa de la familia Janus (Jak); proteína adaptadora Shc (SHC); proteína fosfatasa con dominio SH2 (SHP1 y SHP2); transductores de señal y activadores de la transcripción de tipo 5 (STAT5); proteína 2 de unión al receptor de factores de crecimiento (Grb2); supresores de la señalización por citoquinas (SOCs) y proteína con dominio SH2 inducible por citoquinas (CIS).

Tanto  $t_1ghrb$  como  $t_2ghrb$  al ser ensamblados generan ORFs que poseen codones de stop prematuros, dando lugar a proteínas truncas casi idénticas a la altura de la Caja 3 de señalización (Fig. 27). Estas proteínas truncas carecen por completo de la región intracelular situada más allá de la caja 3 de señalización. Difieren sólo en un aminoácido, poseyendo exactamente la misma secuencia en toda su longitud. Isoformas truncadas similares han sido

reportadas previamente en varias especies de mamíferos, como el hombre, el conejo, la rata y el ratón (Dastot et al., 1996; Edens & Talamantes, 1998; Leung et al., 1987). Estas isoformas análogas al GHR<sub>279</sub> del hombre, son producto de un mecanismo de procesamiento alternativo del mensajero que conduce a la delección de los primeros 26 pb del exón 9 (Ross et al., 1997). En mamíferos se ha sugerido que los GHR truncados atenuarían el efecto de los de longitud completa. En el hombre el GHR<sub>279</sub> une GH con afinidad comparable a los GHR de longitud completa (Dastot et al., 1996; Ross et al., 1997), pero es incapaz de estimular la transducción de la señal, y se ha sugerido que atenuaría la transducción de la señal actuando como un inhibidor dominante negativo del GHR de longitud completa (Ross et al., 1997). El receptor trunco de GHRb podría funcionar de forma similar en peces, debido a que los residuos de tirosina intracelulares requeridos para la activación de STAT5 no estarían presentes en **t<sub>1</sub>GHRb** y **t<sub>2</sub>GHRb**. Por otra parte, se ha demostrado que el GHR<sub>279</sub> es incapaz de ser internalizado y está fijado a la membrana celular, pero es capaz de generar grandes cantidades de GHBP soluble (Amit et al., 1997), lo que podría ser el caso de **t<sub>1</sub>GHRb/t<sub>2</sub>GHRb**, si el mecanismo de generación de GHBP por proteólisis está conservado para el caso de GHRb.

Aunque en otras especies de peces también han sido observadas isoformas de menor longitud (Calduch-Giner et al., 2001; Hildahl et al., 2007; Nakao et al., 2004), todas ellas corresponden a los GHRs de tipo I de especies de peces planos (Pleuronectiformes). En rodaballo y el falso halibut del Japón estas formas se generan por un procesamiento alternativo del ARNm que no elimina el intrón 9/10 (Nakao et al., 2004; Pérez-Sánchez et al., 2002). De esta manera, se genera un transcrito que conserva los primeros 28 aa de la región intracelular, seguidos de una secuencia divergente de unos 21 – 26 aa y una 3'UTR alternativa. Al igual que en mamíferos, a estas formas truncadas se les atribuye un papel inhibitorio, ya que carecen de la mayor parte del dominio intracelular. Estas isoformas son muy similares en su secuencia, ya que están truncadas luego del la Caja 1 de señalización, pero ninguna de ellas posee delecciones internas como las encontradas en las isoformas de GHRa, siendo más similares a las isoformas encontradas para GHRb. Podríamos por ende, estar ante la presencia de isoformas que al presentar diferencias a nivel de la región intracelular de señalización, podrían actuar como moduladores de la

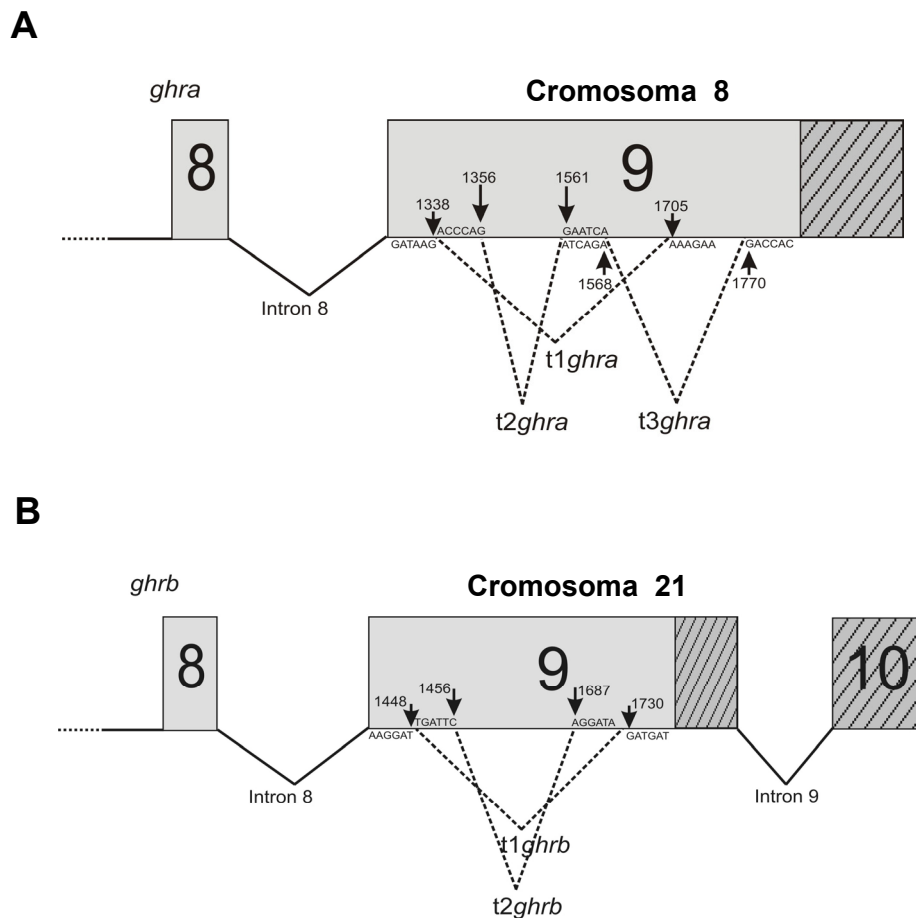
cascada de señalización (Kopchick & Andry, 2000). La caracterización de GHRs en especies de diferentes órdenes podría aportar información para clarificar cuestiones en este aspecto.

#### Posibles mecanismos para la generación de las isoformas de GHRa y GHRb

Al observar la secuencia de los transcriptos alternativos obtenidos, se plantearon dos hipótesis acerca de los posibles mecanismos de generación de los mismos. Por un lado, estos transcriptos podrían generarse por un procesamiento (corte y empalme) alternativo del mensajero que codifica para cada receptor; y la segunda hipótesis es que: existiesen en el genoma pseudogenes que codifican para estas isoformas truncas o alternativas. Esta última hipótesis se planteó debido al hecho de que si bien el genoma del pez cebra ha sido secuenciado casi en su totalidad, el mismo no ha sido ensamblado por completo, y por ende, podrían existir *contigs* (fragmentos del genoma con varios genes ensamblados) que no hayan sido incluidos aún en las bases de datos existentes.

En la **Figura 28** se pueden observar los sitios posibles de corte y empalme para la generación de los transcriptos alternativos si tuviese lugar un procesamiento alternativo en el exón 9 de ambos receptores. En ambos receptores, dicho exón codifica de manera casi completa para la región intracelular de los mismos.

Debido a que las delecciones de las secuencias amplificadas (isoformas) no tenían sitios dadores ni aceptores de “*splicing*” canónicos o poseían solo uno de ellos, decidimos evaluar la presencia de más de un gen en el genoma (Segunda hipótesis).



**Figura 28.** Posibles mecanismos de corte y empalme para la generación de las isoformas de GHRa y GHRb de pez cebra. Esquema de los exones 8 y 9 de *ghra* (A) y de los exones 8, 9 y 10 de *ghrb* (B) indicando los sitios posibles donde tendría lugar el corte y empalme. En ambos casos los exones mostrados codifican para la región intracelular completa y para las regiones 3' no traducibles (3'UTR). Los rectángulos grises oscuros con rayas transversales indican la región que codifica para el 3' UTR de cada receptor.

Para evaluar entonces esta hipótesis, se realizaron **reacciones de PCR sobre ADN genómico** extraído de un pool de larvas de pez cebra de 8 dpf. Si existiesen otros genes, diferentes a los ya informados, que codifican las isoformas encontradas; obtendríamos más de una banda de amplificación al realizar las reacciones de PCR utilizando un par de cebadores que hibridan sobre el exón 9 (exón donde se encuentran las deleciones que dan origen a las isoformas).

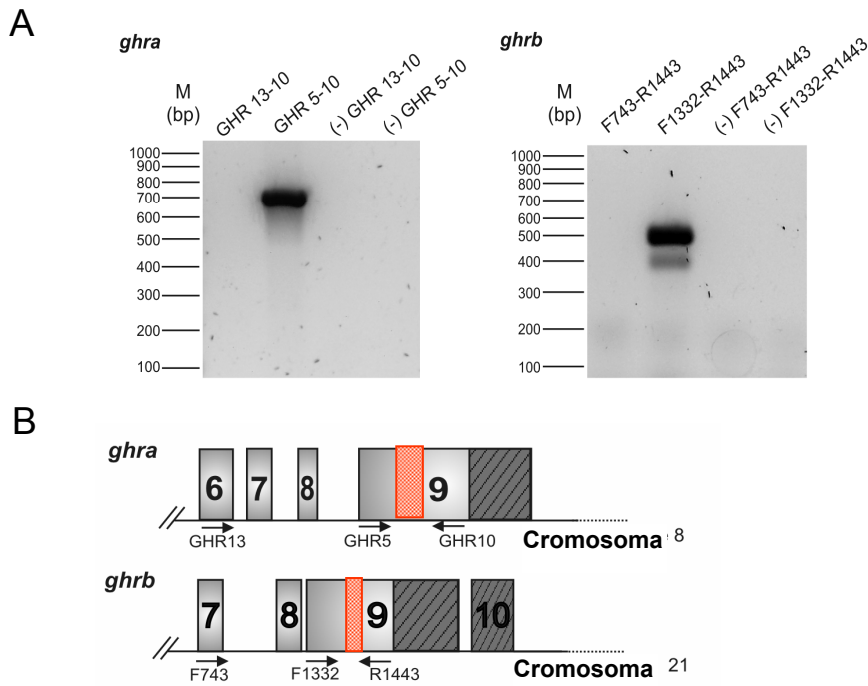
Para estas reacciones se utilizaron dos pares de cebadores específicos para cada receptor; uno de ellos era el par utilizado para amplificar estas

isoformas a partir del ADNc (empleado en los estudios de RT-PCR) e hibridaba en exones diferentes; y el otro, hibridaba sobre el mismo exón pero por fuera de la delección observada (**Fig. 29 B**).

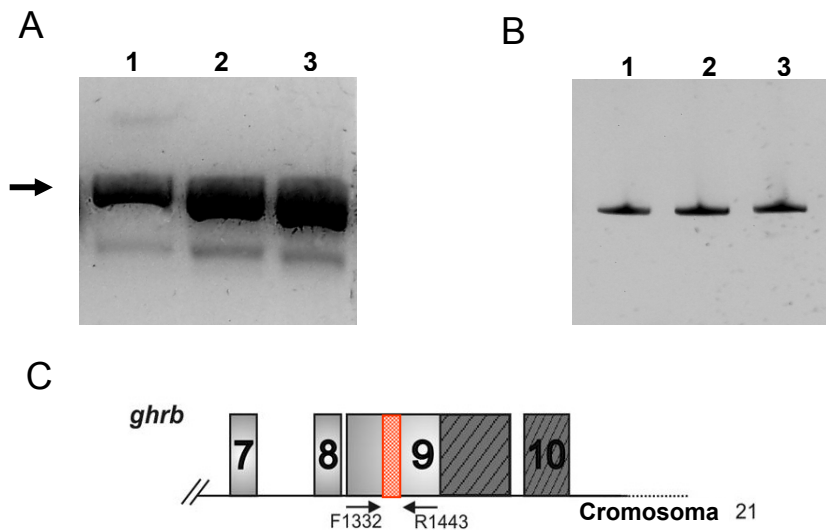
Para *ghra*, al utilizar el par de cebadores que hibrida sobre el mismo exón se observó un único producto de amplificación del tamaño correspondiente al fragmento completo. Y al utilizar el par de los estudios por RT-PCR, no se observó producto alguno, consecuencia de su localización en exones diferentes y separados por una cantidad no amplificable de pares de bases, con las enzimas utilizadas (**Fig. 29 A**).

Para *ghrb*, en cambio, al utilizar el par de cebadores que hibrida sobre el mismo exón se observaron dos productos de amplificación, uno de la longitud esperada, y otro de menor longitud, lo que nos indujo a pensar que este fragmento de menor tamaño podría ser el que codificase las isoformas (**Fig. 29 A**). Sin embargo, al intentar clonar la banda de menor longitud siempre se obtuvo la secuencia de la banda superior, es decir, la de longitud esperada. Debido a esto, se repitieron las reacciones de PCR para el caso de *ghrb* pero utilizando distintas muestras, de manera de descartar que se tratase de una particularidad de la muestra. Sin embargo, los resultados se repitieron y no se logró clonar la banda de menor longitud.

En función de estos resultados, se decidió evaluar la posibilidad de que la banda de menor longitud fuese una consecuencia de la formación de estructuras secundarias en el fragmento de ADN amplificado. Para ello, los productos de una misma reacción de PCR se resolvieron tanto mediante electroforesis en un gel de agarosa, como en un gel de poliacrilamida desnaturizante para ácidos nucleicos (**Fig. 30 A y 30 B**). Al realizar esto, en el gel de poliacrilamida desnaturizante sólo se observó la presencia de una de las bandas de amplificación, mientras que en el de agarosa se observaron ambas. Esto nos permitió concluir que la segunda banda de amplificación, era efectivamente producto de estructuras secundarias.



**Figura 29.** Reacciones de PCR sobre el ADN genómico. A) Geles de agarosa mostrando los productos de amplificación para *ghra* y *ghrb* al utilizar el par de cebadores que hibrida sobre exones diferentes y el par que hibrida sobre el mismo exón. (-) controles negativos para los distintos pares de cebadores, que consistieron en reacciones de PCR en las cuales se colocó agua en lugar de la muestra. B) Diagramas indicando la localización de los distintos pares de cebadores empleados en el estudio.



**Figura 30.** Análisis de la presencia de estructuras secundarias en los productos de amplificación de *ghrb*. A) Gel de agarosa al 1% en TBE 0,5 X. La flecha indica la banda de amplificación de la longitud esperada. B) Gel de poliácridamida al 8% en condiciones desnaturizantes (Urea 8M). Calle 1: PCR realizada sobre ADN genómico (ADNg) de un pool de larvas de 8 dpf; calle 2: PCR realizada sobre ADNg de un pool diferente de larvas; calle 3: PCR realizada sobre ADNg de pez cebra adulto. C) Esquema mostrando la localización de los cebadores utilizados.

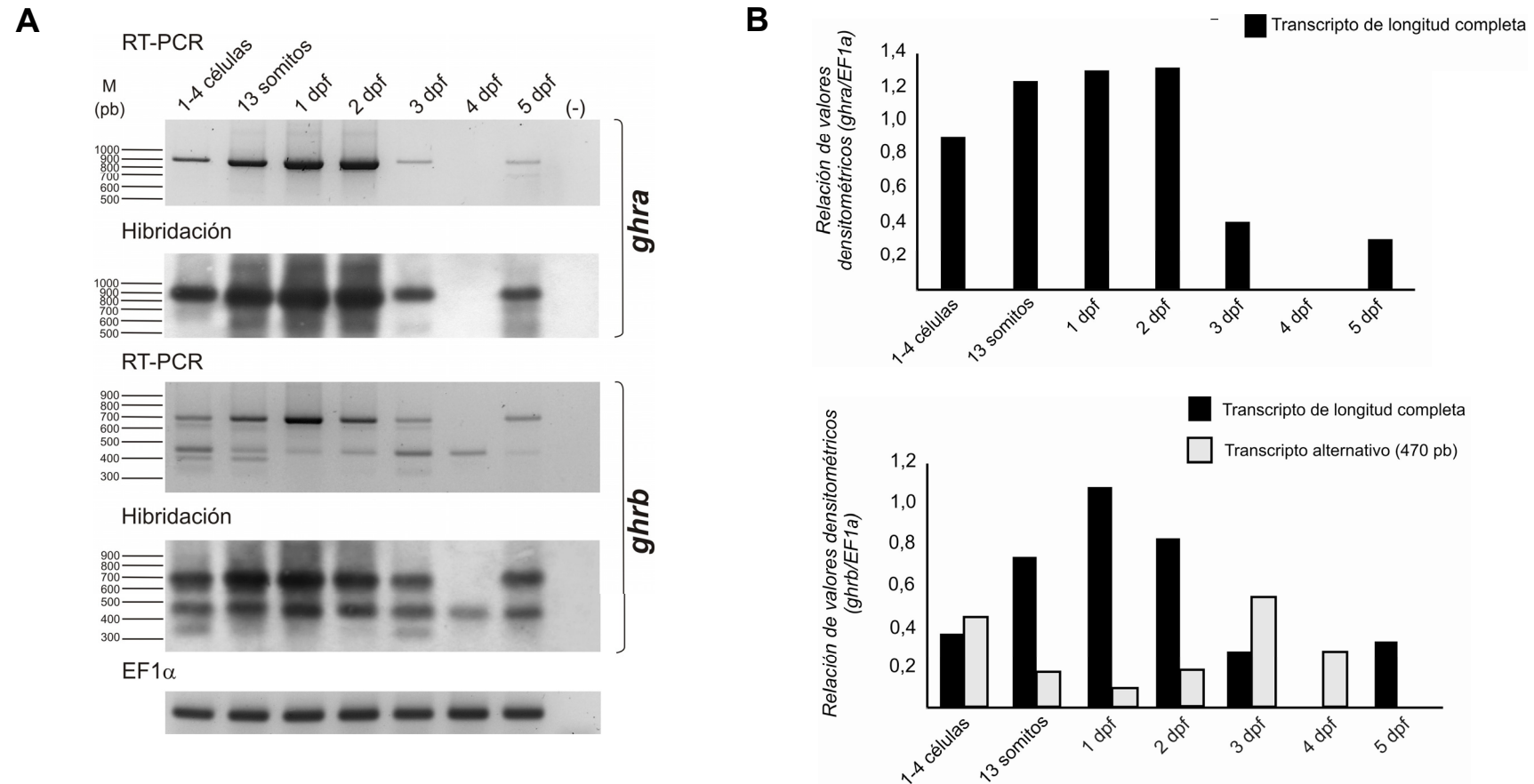
*Patrones de expresión de ghra y ghrb durante el desarrollo embrionario*

Expresión temporal de los ARNm de los receptores: estudios mediante RT-PCR y *Southern blot*

Para el estudio de los patrones de expresión durante el desarrollo embrionario, se procedió de igual forma que en el caso de los tejidos adultos. En las reacciones de PCR se utilizaron los mismos pares de cebadores que en los ensayos anteriores y se amplificó el mensajero de EF1 $\alpha$  como control. Los ensayos de hibridación de tipo *Southern* se llevaron adelante de igual forma que en el caso de los tejidos (**Fig. 31 A**).

La expresión de los mensajeros de **ambos receptores** fue detectada en todos los estadios analizados con excepción de los 4 dpf (96 hpf). Para el caso de este estadio se ensayaron diferentes condiciones de PCRs, entre ellas diferentes cantidades de ADNc molde, obteniendo siempre resultados negativos (información no mostrada). En el **panel B** de la **Figura 31** se muestra un gráfico realizado a partir de los valores densitométricos de las bandas de amplificación del panel A, normalizados con respecto a EF1 $\alpha$ . Si bien no se trata de datos cuantitativos (PCR de punto final), en el gráfico se observa claramente la presencia de un pico de expresión entre el primer y segundo día post-fecundación (dpf), luego la misma va disminuyendo gradualmente hasta ser indetectable a los 4 dpf, y a los 5 dpf la expresión vuelve a detectarse.

Para el caso de **ghra**, no se observaron productos de amplificación de menor longitud, como en el caso de tejidos. Con respecto a **ghrb**, los patrones de expresión de dicho receptor son similares a los de **ghra**, si se tiene en cuenta el fragmento de longitud completa (700 pb). Sin embargo, en este caso, también se detectó la presencia de fragmentos alternativos como en el caso de los tejidos; uno de 470 pb y otro de 420 pb. El primero de los cuales se expresa diferencialmente al de longitud completa (**Panel B Fig. 31**). Además de estos fragmentos, se detectaron dos nuevos amplicones; de 650 pb y bandas menores de 350 pb aproximadamente, cuya naturaleza se desconoce debido a que no pudieron ser clonadas.



**Figura 31.** Patrones de expresión de *ghra* y *ghrb* durante el desarrollo embrionario temprano y tardío del pez cebra. A) Resultados de las RT-PCRs y las hibridaciones de tipo Southern para ambos receptores. Los mensajeros de EF1 $\alpha$  se amplificaron como control. (-) controles negativos para los distintos pares de cebadores que consistieron en reacciones de PCR en las cuales se colocó agua en lugar de la muestra. B) Gráficos mostrando los valores densitométricos de las bandas de amplificación normalizados con respecto a EF1 $\alpha$  correspondientes al ensayo del panel A. Para el caso de *ghra* sólo se indican los valores del fragmento de amplificación de longitud completa. Para *ghrb* también se indican los valores correspondientes a la isoforma de 470 pb. Abreviaturas: dpf; días post-fecundación. Las posiciones aproximadas de los cebadores utilizados en las reacciones de PCR y de las sondas empleadas en las hibridaciones son las mismas que las mostradas en la **Figura 26**.

La presencia de transcritos de **ambos ghrs** a partir del estadio de 1-4 células implica que los mismos son de origen materno, debido a que en dicho estadio no existe transcripción del genoma del embrión (Kane & Kimmel, 1993). Esto difiere parcialmente de otras especies de peces estudiadas hasta el momento en las cuales se encontró que sólo uno de los *ghrs* es de origen materno. En medaka, por ejemplo, se observó que sólo los transcritos de GHRII eran de origen materno (Fukamachi et al., 2005); así como también en la trucha arcoiris, donde ambas isoformas de los GHRII fueron detectadas previo al inicio de la transcripción cigótica (Li et al., 2007). Para el caso de la Anguila Japonesa, en cambio, solo se observó la presencia del mensajero de GHRI tanto en ovocitos maduros como en embriones recién fecundados, ya que el mensajero de GHRII recién pudo ser detectado en larvas recientemente eclosionadas (Ozaki et al., 2006b). Es importante destacar que, hasta la fecha, en peces sólo se ha estudiado la expresión de **ambos** receptores en estadios tempranos del desarrollo embrionario en Anguila Japonesa y medaka; siendo estudiados en los demás casos, un solo tipo de receptor (Li et al., 2007) o ambos, pero en estadios más avanzados del desarrollo, preferentemente larvarios, como es el caso de la dorada, el fletán del Atlántico y el lenguado fino o el pez hermafrodita *Kryptolebias marmoratus* (Fuentes et al., 2008; Hildahl et al., 2007; Hildahl et al., 2008; Marti-Palanca & Perez-Sanchez, 1994; Rhee et al., 2012). Por otra parte, cabe mencionar que, además de requerirse mayor cantidad de estudios en este sentido, también sería necesario estandarizar la forma en que son publicados los estudios realizados a nivel del desarrollo embrionario temprano y tardío en peces, ya que resulta sumamente difícil comparar resultados obtenidos en diferentes especies, cuando sus mecanismos y tiempos de desarrollo son tan diversos.

Existe otro punto importante de analizar, además de la presencia de los transcritos de los *ghrs* previo al inicio de la transcripción cigótica, y es el hecho de que los mismos son detectados previo al desarrollo del eje somatotrófico (ST) del embrión (estadio de 13 somitos **Fig 31 A**), articulado fundamentalmente por el desarrollo de la glándula pituitaria. Teniendo en cuenta que en el pez cebra el primordio de la adenohipófisis (sitio de síntesis los miembros de la familia GH/SL/PRL) aparece en el borde anterior del sistema nervioso entre las 15 y 20 hpf (Guner et al., 2008; Herzog et al., 2003)

y que el mismo se diferencia histológicamente recién a las 24 hpf (Chapman et al., 2005), estaríamos ante la presencia de receptores para algunas de las hormonas del eje previo a que el mismo sea completamente funcional.

Esta expresión materna y embrionaria de ambos receptores sugiere que sus ligandos, GH y quizás también SL, podrían también estar presentes en estos estadios; y al revisar la bibliografía, esto efectivamente sucede. Como se mencionó anteriormente en la introducción, en varias de las especies de peces en las que se ha estudiado la expresión de los ARNm de las isoformas de *gh* y *sl*, se ha observado que las mismas son de origen materno y continúan expresándose durante el desarrollo temprano y tardío con patrones particulares para a cada especie (Li et al., 2007; Yang et al., 1999).

En el pez cebra existe cierta controversia en los resultados presentes en la bibliografía en lo que respecta a la expresión temprana de algunos de los componentes del eje ST. Herzog y cols. (Herzog et al., 2003) han reportado que los transcritos de *gh* son detectables por primera vez a partir de las 42 hpf en adelante y Lopez y cols. (Lopez et al., 2006), que la expresión de  $SL\beta$  recién es detectable a partir de las 23 hpf. Sin embargo, otros autores indican que los transcritos de GH y PRL,  $SL\alpha$  y  $SL\beta$ , pueden ser detectados en altos niveles entre las 12 hpf y las 18 hpf de desarrollo (Zhu et al., 2007) y resultados no publicados de Ariel Reyes indicarían que los transcritos de *gh* están presentes a partir de las 0 hpf en adelante, sugiriendo que los mismos son de origen materno. Reforzando esta teoría, recientemente se ha publicado que el ARNm de *gh* fue detectado tempranamente en el desarrollo (estadio de 2 células), aunque su expresión se vuelve indetectable en estadios tempranos posteriores, y recién vuelve a ser detectable a las 24 hpf (Ahmed et al., 2011). Por su parte, los principales efectores o mediadores de las acciones indirectas de GH; IGF-I e IGF-II, sus isoformas y receptores han sido detectados tempranamente en el desarrollo como transcritos maternos, y luego siguen siendo expresados por el embrión (Maures & Duan, 2002). Además, existen numerosos trabajos que demuestran la importancia del sistema IGF en el desarrollo temprano en el pez cebra, mostrando que el mismo es esencial para la supervivencia y el crecimiento de los embriones (Perry, 2010). Sin embargo, no existe demasiada evidencia para establecer que durante el desarrollo las acciones de los IGFs sean dependientes de GH o SL (hormona para la cual se desconocen los

efectores principales), por lo que en general se plantea que la acción de los IGFs en el desarrollo temprano podría ser autócrina/ parácrina e independiente de las hormonas. Un trabajo reciente (Ahmed et al., 2011) demostró que la expresión de *Igf1* en embriones era dependiente de GHRa, por lo que podría ser una evidencia de que la acción de GH o SL en el desarrollo se encuentra mediada por IGF-I. Sumado a esto, recientemente se ha demostrado que tanto *Igf1* como *Igf2a* e *Igf2b*, responderían a ambas isoformas de SL en pez cebra (Wan & Chan, 2010).

Tomando toda esta información en conjunto podríamos decir que en el pez cebra los principales componentes del eje ST serían de origen materno y tendrían un pico de expresión durante el primer día post fecundación, de forma concomitante al desarrollo de la glándula pituitaria. Debido a la ausencia de un eje ST en las primeras horas del desarrollo embrionario, probablemente GH y SL estén actuando de forma autócrina/parácrina, quizás mediando acciones directas independientes de IGFs, como se ha visto para GH (Harvey, 2010; Li et al., 2007). Presumiblemente su mecanismo de acción en el desarrollo sería diferente al observado en los adultos.

Con respecto a las posibles funciones de los GHRs en el desarrollo temprano, los mismos podrían estar participando en la división celular del embrión temprano. En estudios previos se ha encontrado que GH puede estimular el rearreglo de la actina y la polimerización de los microtúbulos (Goh et al., 1997) y el ensamblaje de los complejos multiproteicos involucrados en la adhesión celular y en el movimiento celular. Dado que los embriones experimentan movimientos celulares dinámicos en el desarrollo temprano, como los de gastrulación por ejemplo, es posible que la vía GH/SL/GHRs pueda participar en la regulación de estos movimientos celulares; y más avanzado el desarrollo, medien acciones vía los IGFs, cuando el eje ST comience a ser funcional, aproximadamente a partir del 5 dpf (Chu & Sadler, 2009; Herzog et al., 2003).

La imposibilidad de detectar ambos *ghrs* a los 4 dpf, podría estar relacionada con una disminución abrupta en los niveles de expresión de los mensajeros, asociada a su vez a cuestiones metabólicas y morfológicas particulares del desarrollo larvario del pez cebra. En este estadio en particular, la larva del pez cebra se encuentra preparándose para comenzar la

alimentación exógena, que tendrá lugar aproximadamente a los 5 dpf cuando su sistema digestivo esté completamente funcional (Wallace et al., 2005). Esta disminución en los niveles de expresión de los *ghrs* ha sido observada también para el caso del GHRII de la trucha arcoiris (Gabillard et al., 2006), donde se evidenció una disminución en los niveles del ARNm de una de las isoformas del GHRII previo a la eclosión; y también para el caso del GHRI del fletán del Atlántico, donde se observó una disminución del GHRI al comenzar la metamorfosis (Hildahl et al., 2007). En general, esta disminución previa a la eclosión también se ha observado para los posibles ligandos, como es el caso del ARNm de GH en Tilapia del Nilo o los transcritos de GH y las isoformas de SL en la dorada (Ayson et al., 1994; Herrero-Turrion et al., 2003a; Herrero-Turrion et al., 2003b).

Finalmente, con respecto a las isoformas observadas para *ghrb* durante el desarrollo y su patrón de expresión opuesto completamente al del receptor de longitud completa podría estar indicando un mecanismo regulatorio a nivel de la transducción de la señal, si asociamos estos transcritos que originarían proteínas truncas con una posible función de dominantes negativos.

Si bien en trucha arcoiris se han llevado adelante los estudios más completos con respecto a los genes que forman parte del eje ST (Li et al., 2006; Li et al., 2007; Yang et al., 1999), queda aún mucho por dilucidar, particularmente en cada especie y sobre todo con respecto a la funcionalidad de estos receptores y a la relación entre los niveles de expresión de ambos.

Finalmente, podría concluirse entonces que durante el desarrollo embrionario temprano y tardío ocurrirían dos grandes disminuciones en los niveles de expresión de los *ghrs*, una asociada al agotamiento de los ARN maternos y otra previo al inicio del proceso de eclosión. Con respecto al pez cebra en particular, la primera disminución en los niveles de expresión ha sido confirmada parcialmente para *ghra* (Ahmed et al., 2011), y se requerirían más estudios para el caso de *ghrb*. Es decir, sería necesario ampliar la ventana de estudio entre las 0 hpf y 3 hpf (TBM) y entre éste estadio y las 24 hpf. Sin embargo quizás resulte más dificultoso detectar en pez cebra las disminuciones observadas en otros peces a consecuencia de un aparente agotamiento de los ARNm maternos, ya que el período que transcurre entre la fecundación y la TBM es muy corto en esta especie (aproximadamente a las 3 hpf comienza la

transcripción del genoma del embrión). Por otra parte, también sería interesante evaluar si estas disminuciones en los niveles de los ARNm podrían deberse a la acción de microRNAs (miRNA) específicos del desarrollo embrionario temprano, como es el mir-430 y tardío, como es el mir-9, para los cuales hemos detectado sitios de reconocimiento en los ARNm de *ghra* y *ghrb* (información no mostrada).

Expresión espacio-temporal de los receptores: estudios mediante hibridación *in situ* en embriones enteros

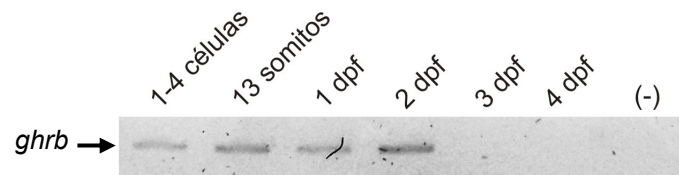
Los estudios de hibridación *in situ* que se describirán a continuación se realizaron en colaboración con el grupo de investigación del Dr. Ariel Reyes de la Facultad de Ciencias Biológicas, de la Universidad Andrés Bello, Chile.

Para el caso de *ghra*, la sonda utilizada abarca la región del mensajero que va desde el dominio transmembrana del receptor hasta una región próxima al final del marco abierto de lectura del mismo. Es decir, comprende la mayor parte del ARNm que codifica para la región intracelular del receptor. La sonda utilizada para los ensayos de *ghrb*, comprende la mayor parte del ARNm que codifica para la región extracelular incluyendo la región transmembrana. Esta particularidad en la elección de la localización de las sondas estuvo relacionada a la presencia de las diferentes isoformas de los *ghrs* discutidas en la sección anterior.

Teniendo en cuenta que en los estudios de expresión realizados durante el desarrollo, también comentados en la sección anterior, se amplificó un fragmento que comprende la mayor parte de la región intracelular, se decidió ensayar nuevamente por RT-PCR la expresión de *ghrb* durante el desarrollo; pero en este caso, utilizando cebadores que amplifican la misma región que la comprendida por la sonda utilizada en la hibridación *in situ*, de manera que los resultados obtenidos por RT-PCR pudiesen correlacionarse adecuadamente con los patrones observados por hibridación *in situ*.

Los resultados de los nuevos estudios de expresión se muestran en la **Figura 32**. Como puede observarse, al utilizar estos cebadores, la expresión de *ghrb* pudo detectarse, al igual que antes, desde el estadio de 1-4 células en adelante. Sin embargo, la expresión es indetectable a partir de los 3 dpf. Esta

diferencia con los ensayos realizados anteriormente, podría deberse a una ineficiencia durante el proceso de retrotranscripción, asociada a la longitud de los mensajeros de *ghrb* (aproximadamente 3000 pb). Probablemente la población de los ADNc retrotranscritos contiene ADNc incompletos, de longitudes menores, que no pueden ser amplificados con los cebadores utilizados.

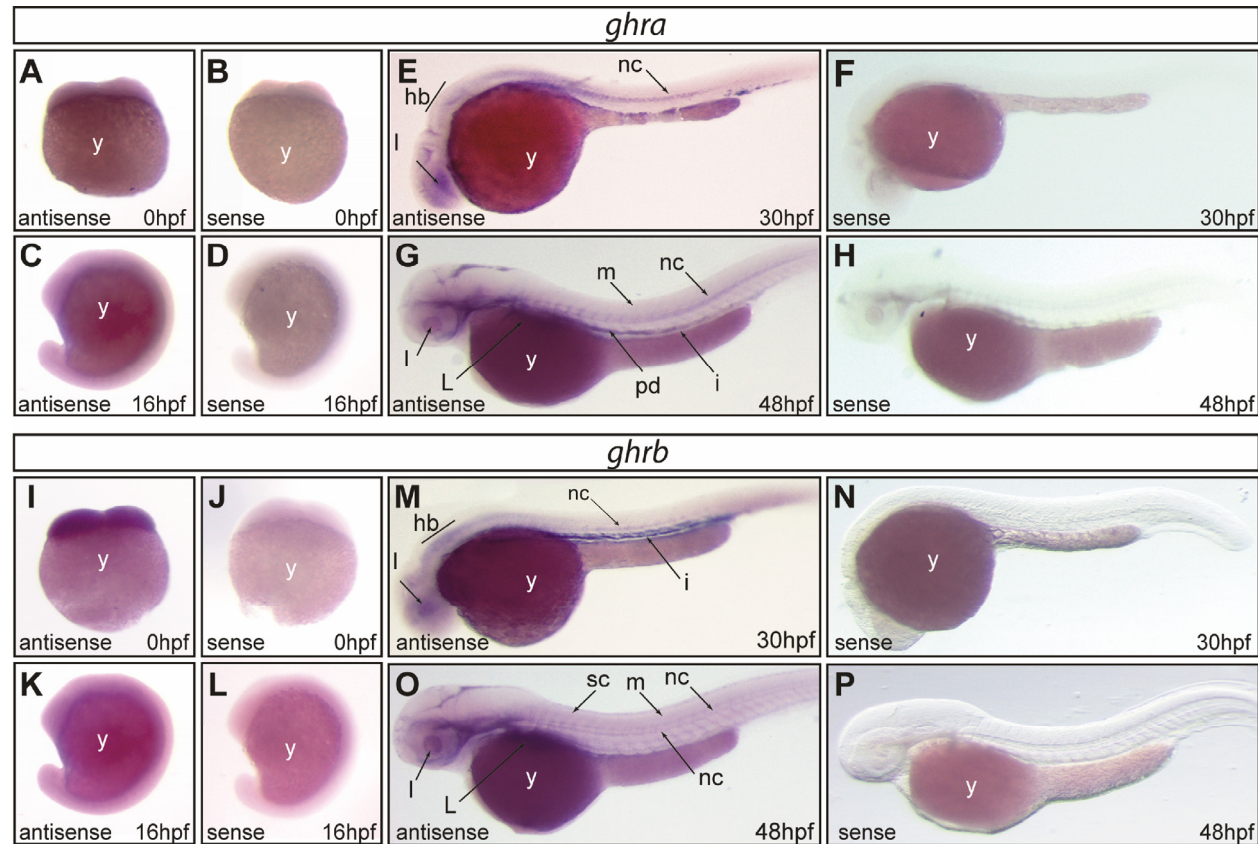


**Figura 32.** Expresión del fragmento correspondiente a la región extracelular de *ghrb* durante el desarrollo embrionario. Gel de Agarosa al 1,8 % mostrando los productos de amplificación obtenidos por RT-PCR al utilizar cebadores que hibridan en la región del mensajero de *ghrb* que codifica para la región extracelular del receptor. (-) Control negativo de la reacción de PCR, en el cual se colocó agua en lugar de la muestra.

Las hibridaciones *in situ* informadas en el presente trabajo se realizaron en los estadios de 0 hpf, 16 hpf, 30 hpf y 48 hpf. No se informan los ensayos en estadios más avanzados, como los estudiados por RT-PCR, ya que en estos estadios la expresión detectada resultó poco consistente, pudiéndose deber a cuestiones de inespecificidad, debido a la unión o depósito inespecífico de la sonda en diversas estructuras del embrión y/o larva en estos estadios más avanzados. Los ensayos control se realizaron utilizando sondas sentido (del inglés *sense*), que poseen idéntica secuencia a los ARNm a detectar. Los resultados obtenidos se muestran en la **Figura 33**.

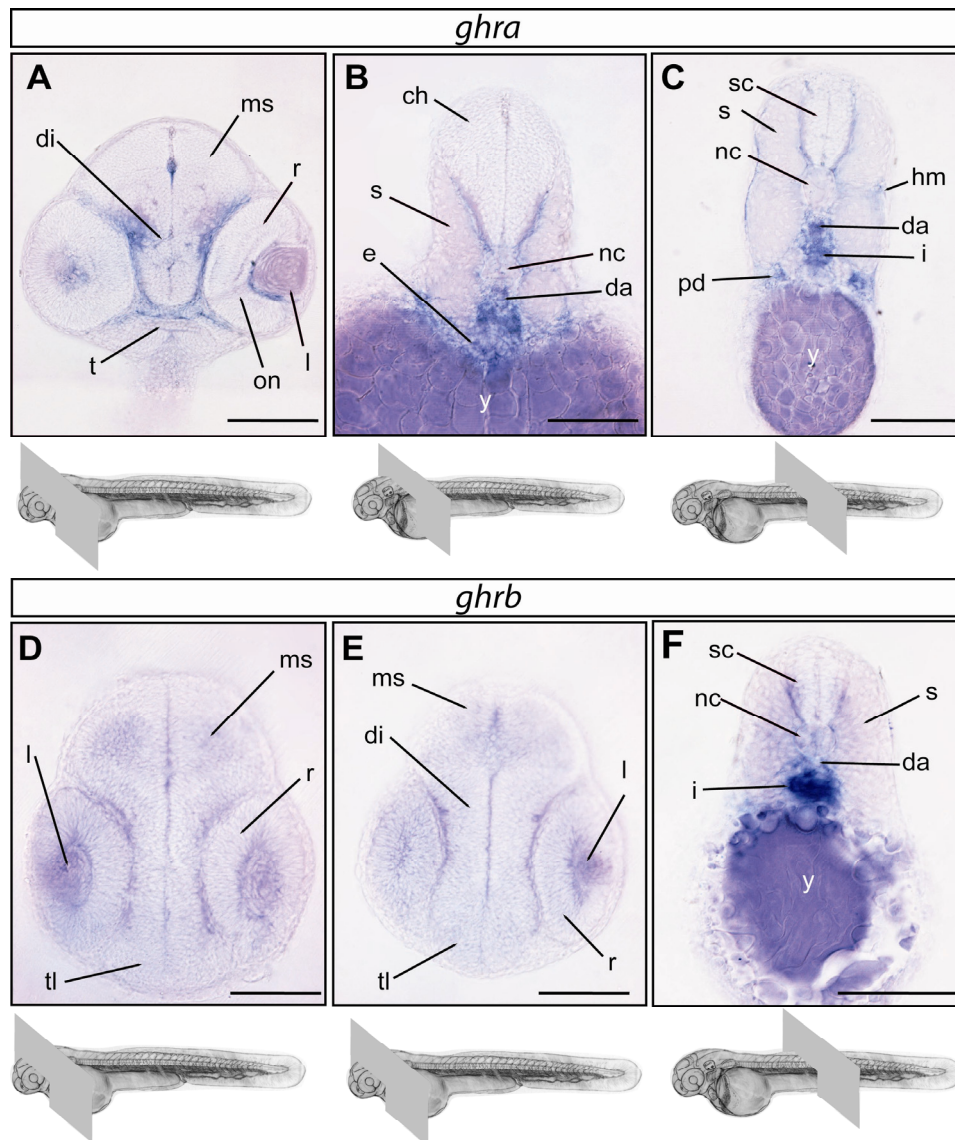
Como puede observarse en las **Figuras 33 A e I**, la expresión de ambos receptores volvió a detectarse tempranamente en el desarrollo en el estadio de 2 células, validando así los resultados obtenidos por RT-PCR que indicaban que los transcritos de los *ghrs* son de origen materno. Hasta el estadio de 16 hpf (somitogénesis), se observó una expresión ubicua para ambos receptores (**Fig. 33C y K**). A partir de las **30 hpf**, la expresión se localizó sólo en algunas estructuras embrionarias. Para el caso de *ghra* se observó expresión en la

notocorda, cerebro posterior y en el cristalino (**Fig. 33 E**). Para **ghrb** se observó expresión en las mismas estructuras y además en el intestino (**Fig. 33 M**). A las **48 hpf** la expresión de **ghra** se observó al igual que antes en la notocorda y en el cristalino y también en el primordio del hígado, los miótomos, el intestino en desarrollo y los conductos pronéfricos (**Fig. 33 G**). Para el caso de **ghrb** se observó expresión en la notocorda, el cristalino, el primordio hepático, los miótomos, y en la médula espinal (**Fig. 33 O**). En todos los estadios y para ambos receptores se observó una importante expresión en la célula vitelina (**Fig. 33 A, C, E, G, I, M, K, O**). En ningún caso se observó marcación utilizando las sondas sentido (*del inglés sense*) (**Fig. 33 B, D, F, H, J, N, L, P**).



**Figura 33.** Patrones de expresión espacio-temporal de *ghra* y *ghrb* durante el desarrollo embrionario. Las hibridaciones *in situ* se realizaron utilizando sondas de *ghra* antisentido (A,C,G,E) y sentido (controles, B, D, F, H) y sondas de *ghrb* antisentido (I, K, M, O) y sentido (controles, J, L, N, P) marcadas con digoxigenina. C, D, E, F, G, H, K, L, M, N, O, P vistas laterales. La parte anterior de los embriones se encuentra orientada hacia la izquierda. Abreviaturas: hb: hindbrain (cerebro posterior), nc: notochord (notocorda), l: lens (cristalino), i: intestine (intestino), L: liver (hígado), m: myotomes (miótomos), pd: pronephric duct (conductos pronefricos), sc: spinal cord (médula espinal), y: yolk (célula vitelina).

A fin de poder visualizar de forma precisa las estructuras particulares en las que se observó la expresión de los receptores, se realizaron cortes transversales de las hibridaciones *in situ* de los embriones de 48 hpf en distintas posiciones a lo largo del eje anteroposterior, como se indica en los diagramas de la **Figura 34**.



**Figura 34.** Cortes transversales correspondientes a las hibridaciones *in situ* de los *ghrs* de embriones de 48 hpf. Debajo de cada corte, se muestra un diagrama indicando la posición del corte a lo largo del eje anteroposterior del embrión. Abreviaturas: da: *del inglés dorsal aorta* (aorta dorsal); r: *neural retina* (retina neural); on: *optic nerve* (nervio óptico); e: endodermo; s: somito; nc: notocorda; l: *lens* (cristalino); sc: *spinal cord* (médula espinal); ch, *caudal hindbrain* (cerebro posterior caudal); hm: *horizontal myoseptum* (mioseptum horizontal); ms: mesencefalo; t: trabecula; di: diencefalo; tl: telencefalo; y: *yolk* (célula vitelina); hb, *hindbrain* (cerebro posterior); m: miótomos; pd: *pronephric duct* (conductos pronefricos); i: intestino; L: *liver* (hígado). Las barras de escala representan 50  $\mu\text{m}$ .

Para el caso de *ghra* se observó expresión en la mayor parte de los derivados ectodérmicos neurales, como son el mesencéfalo o diencefalo y la médula espinal por ejemplo (**Fig. 34 A y B**). También se pudo observar claramente la expresión en intestino, los conductos pronéfricos y la célula vitelina (**Fig. 34 C**). Para *ghrb*, se observó expresión en las mismas estructuras que para *ghra*, con excepción de los conductos pronéfricos, en los cuales no se observó expresión.

Comparando lo observado en las hibridaciones *in situ* en embriones completos y en los cortes histológicos de dichas *in situ*, se pudo evidenciar y confirmar la expresión en estructuras internas específicas del embrión, algunas de las cuales no habían podido ser observadas en las hibridaciones *in situ* de los embriones completos. Así, por ejemplo, se obtuvo en detalle el patrón de expresión neural y se confirmó la expresión diferencial de *ghra* para el caso de los conductos pronéfricos.

La expresión espacio-temporal temprana de los *ghrs* está en concordancia con lo observado previamente en la anguila japonesa, el fletán del atlántico y el lenguado fino, únicas tres especies además del pez cebra, donde se han realizado este tipo de estudios (Fuentes et al., 2008; Hildahl et al., 2008; Ozaki et al., 2006b). De forma similar a lo observado para el lenguado fino, para los *ghrs* de pez cebra se observó expresión en los somitos y la notocorda. En el fletán del atlántico, aunque los estudios se realizaron en estadios más avanzados del desarrollo, también existe correlación en la expresión, como lo es para el caso de la expresión en el músculo.

La expresión de los *ghrs* en regiones cefálicas particulares podría implicar un rol de los receptores en el desarrollo de los tejidos neurales.

Con respecto a la expresión diferencial de *ghra* en los conductos pronéfricos, se debe tener en cuenta que estas estructuras son los componentes del riñón embrionario y darán origen a los riñones en el adulto. En este punto es importante destacar que en peces teleósteos los riñones, además de cumplir una función excretora, similar a la que tienen en los mamíferos, son los órganos inmunitarios por excelencia, ya que región craneal del riñón cumple las funciones de la médula ósea de los mamíferos. De esta forma podríamos asociar la función inmunitaria de GH y también SL en peces,

reportada en numerosas publicaciones (Calduch-Giner et al., 1998; Yada, 2007; Yada et al., 1999), con los GHR I, como es *ghra*.

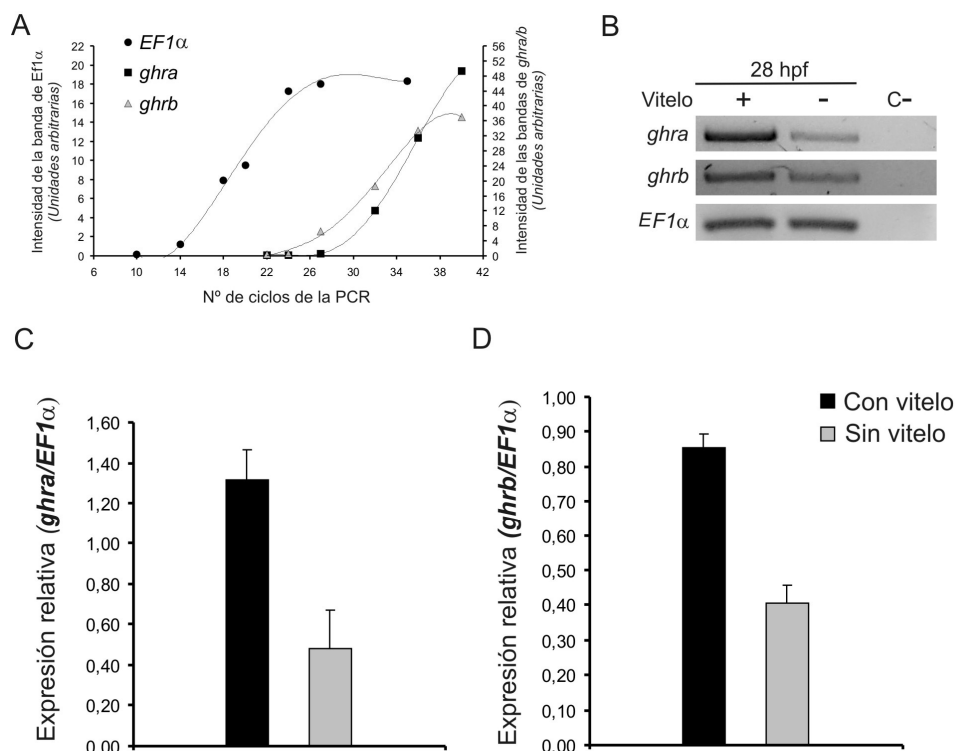
En relación a la expresión de los *zghrs* en la célula vitelina, es importante mencionar que en estudios previos, diferentes ARNm asociados a la reabsorción de las reservas de vitelo han sido detectados en la capa sincicial vitelina (CSV) (Babin et al., 1997; Mudumana et al., 2004; Poupard et al., 2000). Durante el período endotrófico de alimentación, desde la fecundación hasta la apertura de la boca, los embriones y las larvas utilizan los nutrientes endógenos del vitelo acumulados previamente en el ovocito y la CSV permite la reabsorción de estas reservas de vitelo. La misma, forma una barrera entre el embrión y la masa de vitelo y todos los nutrientes de esta reserva endógena deben pasar a través de ella para llegar al embrión y/o larva. Si bien el metabolismo lipídico de las reservas endógenas durante el desarrollo embrionario/larvario de los peces es un tema aún poco estudiado, existen evidencias que relacionan a GH y SL con el mismo. Estudios *in vivo* sugieren que GH y SL actuarían juntas, en forma complementaria, para regular las reservas lipídicas en la dorada (Company et al., 1999; Mingarro et al., 2002) y que GH tendría un rol preponderante en el control de la lipólisis en adipositos aislados de dorada (Albalat et al., 2005). Lobie y cols (Lobie et al., 1995), mediante estudios con células en cultivo, mostraron que los residuos de tirosina 333 y 338 del GHR se requieren en la respuesta celular a GH que produce un aumento en la lipogénesis y en la síntesis proteica en ratón, Teniendo en cuenta toda esta información, la misma sugiere que GH y/o SL podrían estar vinculadas al metabolismo de los componentes del vitelo durante el desarrollo embrionario de los peces.

#### PCRs semi-cuantitativas en embriones con y sin vitelo

Dada la importante expresión observada en la célula vitelina en todos los estadios estudiados mediante hibridación *in situ*, y a que muchas veces el vitelo suele unir sonda de manera inespecífica, se decidió evaluar si la expresión observada era específica del vitelo. Para ello, se analizaron los niveles de expresión de los receptores en embriones con y sin vitelo mediante la técnica de RT-PCR semicuantitativa. Se realizaron reacciones de PCR utilizando

distintos números de ciclos, tanto para los receptores como para el factor de elongación 1 alfa ( $EF1\alpha$ ) que se amplificó como control, y utilizando los valores de densitometría de las bandas de amplificación (**Fig. 35 B**), se construyeron curvas estándar (**Fig. 35 A**). Las mismas se utilizaron para escoger el número de ciclos adecuado para realizar el estudio semicuantitativo para cada gen, el cual fue aquel que se encontraba por debajo del ciclo donde se observó la mitad de la amplificación máxima (17 ciclos para  $EF1\alpha$ , 32 para *ghra* y 27 para *ghrb*).

Como puede observarse en los gráficos de la **Figura 35 C y D**, la expresión de ambos receptores es mayor en peces con vitelo, indicando que la célula vitelina hace un aporte a la cantidad total de ARNm de los receptores que hay en el embrión, y además, que la expresión observada mediante las hibridaciones *in situ* no es un componente inespecífico.



**Figura 35.** RT-PCR semicuantitativa en embriones de 28 hpf con y sin vitelo. A) Curvas estándar para  $EF1\alpha$  (control interno), *ghra* y *ghrb* construidas utilizando los valores de densitometría de las bandas de amplificación. B) Gel de agarosa al 1,2% mostrando las bandas de amplificación de cada gen estudiado (la figura representa un ejemplo de tres experimentos diferentes). Expresión relativa de *ghra* (C) y *ghrb* (D) en embriones de 28 hpf con y sin vitelo. Los datos representan la media + el desvío estándar (n=3) de los valores de densitometría las bandas de amplificación de los *ghrs* relativizados a los valores de densitometría de  $EF1\alpha$  para cada condición.

*Desarrollo de Anticuerpos policlonales anti-zGHRs*

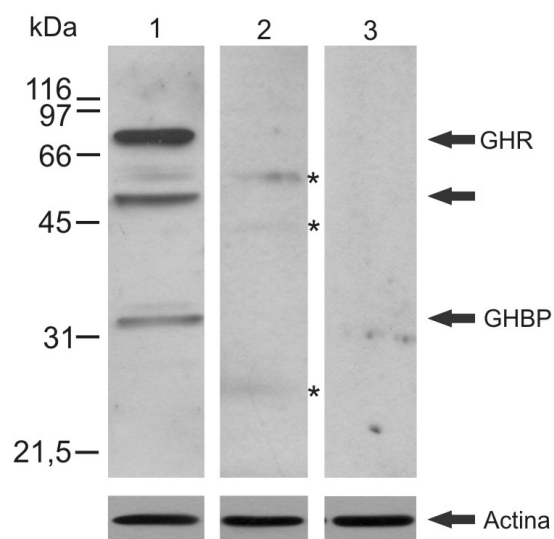
Para llevar adelante una aproximación funcional al estudio de los receptores se decidió analizar la expresión de los mismos a nivel de proteínas. Debido a la inexistencia de anticuerpos anti-GHRs heterólogos que hayan sido probados en peces (al momento de comenzar con esta parte del trabajo), y de forma de disponer de una herramienta específica en el laboratorio, se decidió desarrollar anticuerpos policlonales anti-zGHRs. Este trabajo fue realizado en el laboratorio como parte del proyecto de tesina de la Licenciatura en Genética (Universidad Nacional de Misiones) del alumno Matías Carnevale (2009-2010), el cual fue dirigido por la Dra. Silvia Arranz y co-dirigido por mí.

El objetivo inicial fue desarrollar anticuerpos policlonales en dos especies diferentes: conejo y ratón, para luego poder utilizarlos de forma conjunta en ensayos de inmunolocalización. Por otra parte, y en función de lo mencionado en la introducción respecto a las proteínas de unión de GH (GHBPs) y a los resultados obtenidos con respecto a las distintas isoformas de los *zghrs* encontradas, se decidió desarrollar anticuerpos contra las regiones extracelulares de los receptores (exGHRs) de forma que los mismos fuesen capaces de detectar tanto el receptor de longitud completa como las isoformas y las GHBPs. Se obtuvieron anticuerpos policlonales anti-exGHRa en conejo; y para el caso de GHRb, el desarrollo de los anticuerpos en ratón es un tema pendiente.

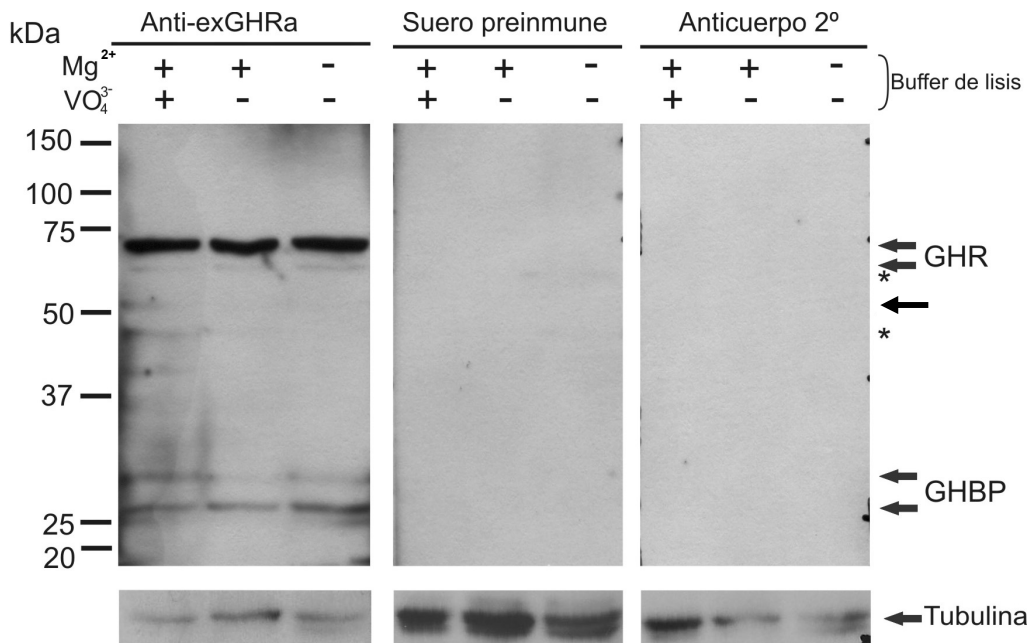
Puesta a punto de los *Western Blots* anti-exGHRa de extractos proteicos totales

Una vez obtenidos los anticuerpos anti-exGHRa; y habiéndose validado su reactividad y título óptimo (Trabajo de Tesina Matías Carnevale), se procedió a poner a punto la detección de GHRa en extractos proteicos totales mediante *Western Blots* (WB). Para la obtención de los mismos se utilizó hígado de pez cebra, debido a que es el órgano donde se ha observado la mayor abundancia del receptor y es el blanco por excelencia de GH. Se ensayaron diferentes condiciones de trabajo tanto para la preparación de los extractos totales (extractos a partir de embriones con vitelo ó sin vitelo, buffers de lisis de

distinta composición) como para la forma de resolver las proteínas (concentraciones del agente reductor en la solución de corrida y concentración del gel de separación); los soportes de transferencia (nitrocelulosa ó PVDF) y distintas condiciones de inmunodetección [ astringencia (temperatura, concentración de detergente), tiempo de bloqueo y de incubación de los anticuerpos 1º y 2º ] (ver la correspondiente sección de M&M). En las **Figuras 36 y 37** se muestran los resultados de dos experimentos representativos de inmunodetección de GHRa en extractos totales de hígado, utilizando membranas de nitrocelulosa y PVDF, **Figuras 36 y 37**, respectivamente. En ambos casos se muestran los ensayos controles llevados adelante (suero preinmune y anticuerpo secundario), para validar la especificidad de las bandas reactivas detectadas.



**Figura 36.** Detección de zGHRa mediante *Western Blot* (WB) en un extracto total de hígado. En cada calle se sembraron 60  $\mu$ g de un extracto proteico total de hígado y se resolvieron por SDS/PAGE al 10 %. Los geles fueron luego transferidos a membranas de nitrocelulosa y se les realizaron diferentes reacciones de inmunodetección según se indica: calle 1, antisuero anti-exGHRa (1:1000); calle 2, suero preinmune (1:1000) y calle 3, anticuerpo secundario (1:5000). Como control de carga se muestra la detección de actina por WB utilizando las mismas membranas luego del "striping". Las flechas indican las bandas reactivas y su posible identidad. Los asteriscos indican las bandas inespecíficas (evidenciadas mediante el ensayo con el suero preinmune). A la izquierda de la 1<sup>er</sup> calle se muestran los estándares de peso molecular en kDa.



**Figura 37.** WB anti-exGHRa de extractos proteicos de hígado obtenidos en diferentes condiciones. Mediante un SDS/PAGE al 10 % se resolvieron, en cada calle, 60  $\mu\text{g}$  de un extracto proteico total de hígado de pez cebra obtenido utilizando diferentes buffers de lisis. Los mismos fueron luego transferidos a membranas de PVDF y se les realizaron las diferentes reacciones de inmunodetección según el caso. En la parte superior se indica la presencia (+) o ausencia (-) de los distintos componentes adicionales: magnesio ( $\text{Mg}^{2+}$ ) u ortovanadato de sodio ( $\text{VO}_4^{3-}$ ) en el buffer de lisis. Como control de carga se muestra la detección de tubulina por WB sobre las mismas membranas luego del “striping”. Las flechas indican las bandas reactivas y en algunos casos su posible identidad. Los asteriscos indican las bandas inespecíficas (evidenciadas mediante el ensayo con el suero preinmune). A la izquierda de la 1<sup>er</sup> calle se muestran los estándares de peso molecular en kDa.

Como puede observarse en las **Figuras 36 y 37**, al realizar los ensayos de WB se observaron 5 bandas reactivas de los siguientes pesos moleculares (PM) aparentes: 74 kDa, 66 kDa, 51kDa, 33 kDa y 25 kDa respectivamente. Las bandas reactivas observadas podrían corresponderse con GHR, GHBP y quizás alguna de las isoformas de GHR, como se indica en la **Tabla 3**. En la misma, se muestran los pesos moleculares calculados utilizando el software *Ape-plasmid editor* y los PMs deducidos por WB.

	PM calculado según secuencia (kDa)	PM estimado por WB (kDa)
GHRa	61,5	74 y 66
GHBP	24,6	33 y 25
T <sub>1</sub> GHRa	48	51-60
T <sub>2</sub> GHRa	53,5	
T <sub>3</sub> GHRa	54	

**Tabla 3.** Pesos moleculares estimados según secuencia aminoacídica y según WB, informados en kDa. En todos los casos los PM se encuentran informados sin considerar la secuencia del péptido señal (proteína madura).

Por otro lado, los resultados de WB de los extractos obtenidos con diferentes buffers de lisis muestran que el patrón de bandas es el mismo en todos los casos ensayados con un incremento en la cantidad de bandas reactivas para el caso del extracto obtenido en presencia de ortovanadato de sodio (**Fig. 37**).

Teniendo en cuenta que el peso molecular estimado de GHRa es de 61,5 kDa (proteína madura sin péptido señal) y que posee 6 sitios de N-glicosilación, las bandas de 74 y 66 kDa observadas, podrían corresponderse con GHRa con diferentes grados de glicosilación o con otras modificaciones postraduccionales. Por otra parte, la banda de 51 kDa podría corresponderse con alguna de las isoformas de GHRa. Finalmente, las bandas de 33 y de 25 kDa, podrían corresponderse con GHBP con las modificaciones antes mencionadas para el receptor de longitud completa. Sin embargo, no se puede descartar que alguna de las bandas pueda contener una contribución de GHRb, debido a que por un lado ambos receptores poseen pesos moleculares muy similares (GHRb= 60.8 kDa) y por otro, comparten al menos dos pequeños dominios de 6 y 12 aa. idénticos que podrían ser reconocidos por alguna población del pool de anticuerpos policlonales generados.

Con respecto a la presencia de varias bandas reactivas para GHR y GHBP en WB, patrones similares también han sido observados en mamíferos como el ratón (Cerio et al., 2002), el conejo (Govers et al., 1997) y en humanos (Kopchick & Andry, 2000), incluso utilizando anticuerpos monoclonales. En

estas especies, se ha observado que la presencia de varias bandas reactivas se debería principalmente a modificaciones postraduccionales como glicosilaciones y ubiquitinaciones y que dichas modificaciones podrían generar diferencias en la movilidad electroforética de entre 20 a 40 kDa. Experimentalmente se ha determinado que cada glicosilación produciría una diferencia de 10 kDa en la banda correspondiente al receptor en geles de poliacrilamida y además, que GHR estaría sujeto a poliubiquitinación, la cual mediaría la internalización del receptor. El GHR humano, por ejemplo, posee 19 sitios potenciales de ubiquitinación (Kopchick & Andry, 2000). Por otra parte, es importante mencionar que se ha demostrado que el grado de glicosilación, así como también, el tipo de restos glicosídicos agregados a estas proteínas, varía según se trate del receptor de membrana (GHR), de GHBP del suero ó de la GHBP asociada a membrana (MA-GHBP), cuya existencia se ha demostrado sólo en roedores (Cerio et al., 2002). En estos últimos, GHBP se genera a partir de un transcripto producto del procesamiento alternativo del ARNm de GHR y posee una secuencia hidrofílica corta exclusiva de esta isoforma. Además, a nivel proteico se ha observado que habría dos isoformas diferenciales a nivel de localización y tipo de modificación postraducciona. Una de ellas, sería la isoforma presente en suero y la otra estaría anclada a membrana (MA-GHBP) mediante interacciones no covalentes, asociada principalmente a receptores completos, pudiendo actuar como dominante negativo, como los receptores truncos del GHR de humanos comentados anteriormente (Cerio et al., 2002; Gonzalez et al., 2007).

Es importante mencionar que en peces existen sólo 9 trabajos publicados acerca de los GHRs a nivel proteico hasta la fecha. En tres de ellos, se aborda particularmente el tema de las posibles GHBP (Fuentes et al., 2012; Sohm et al., 1998; Zhang & Marchant, 1999), en otros tres acerca de los GHRs (Calduch-Giner et al., 2003; Sun et al., 1997; Yao & Le Bail, 1999) y en los restantes acerca de ambos (Gray & Tsai, 1994; Hildahl et al., 2008; Liao & Zhu, 2004). Sin embargo, es importante tener en cuenta que de estos trabajos, sólo en uno de ellos se utilizaron anticuerpos homólogos desarrollados exclusivamente para el receptor de la especie en estudio, como en nuestro caso, y es para el fletán del Atlántico (Hildahl et al., 2008). Para esta especie, al realizar los WB sobre extractos de membranas hepáticas utilizando anticuerpos

desarrollados contra la región extracelular del GHRI, observaron varias bandas reactivas similares en PM a las bandas observadas para el caso del pez cebra. Las bandas observadas en el fletán del Atlántico también diferían en PM de lo calculado según la secuencia de aa. Además, y al igual que en el pez cebra, se observaron dos dobletes, uno de mayor PM de 77 y 83 kDa y el otro de menor PM, de 38 y 40 kDa. Este doblete de bajo peso molecular también fue asociado a posibles GHBPs, sugiriendo que podría tratarse de isoformas con diferentes tipos o grados de modificaciones postraduccionales. En el resto de los estudios realizados en peces, utilizan metodologías de trabajo diferente, preferentemente ensayos de unión y entrecruzamiento a la hormona marcada, y luego los complejos de unión son resueltos mediante SDS-PAGE; o ensayos de unión sobre membranas ya transferidas (*del inglés ligand blotting*). A pesar de esto, las bandas informadas en esos trabajos poseen un PM de 70 y 77 kDa, y también se observan bandas de menor peso molecular. Para los estudios particulares del pez rojo, se han observado múltiples formas de GHBPs en plasma y en hepatocitos cultivados de esta especie, de 25, 40 y 45 kDa de peso molecular mediante ensayos de *ligand blotting* (Zhang & Marchant, 1999).

Con respecto a los resultados obtenidos al utilizar diferentes buffers de lisis, podemos decir que no habría diferencias entre los buffers utilizados, ya sea a nivel de los PM de las bandas reactivas como en lo que se refiere a las bandas inespecíficas observadas (**Fig. 37**). En general, el buffer de lisis de trabajo contenía  $MgCl_2$ , cuya finalidad era la de mantener intacta la membrana nuclear de forma de evitar que durante la preparación de los extractos quedara gran cantidad de ADN genómico producto de su ruptura. Sin embargo, los cationes divalentes, como en este caso el  $Mg^{2+}$ , suelen actuar como cofactores de las proteasas, y en general, se colocan quelantes en el buffer de lisis para evitar su presencia. Al suplementar el buffer con uno de ellos, se corría el riesgo de estar potenciando la proteólisis, hecho que no fue observado. Por otro lado, se probó también la suplementación del buffer con ortovanadato ( $VO_4^{3-}$ ) y NaF (no indicado en la figura), inhibidores de tirosina fosfatasa y serina/treonina fosfatasa, respectivamente. Estos compuestos suelen utilizarse para observar diferencias en el grado de fosforilación de una proteína, debido a que los fosfatos adicionados se suman al PM y eso se puede evidenciar como una

diferencia en la movilidad electroforética de las bandas reactivas (Banchio et al., 2004). Como se muestra en la **Figura 37** no se observaron diferencias en la movilidad electroforética en las bandas reactivas en el buffer con vanadato, con respecto a los buffers que no lo poseían. Por ende, se puede concluir que bajo las condiciones de trabajo el receptor no se encontraría fosforilado o bien que no fue posible, con la metodología utilizada, determinar formas fosforiladas o no del receptor.

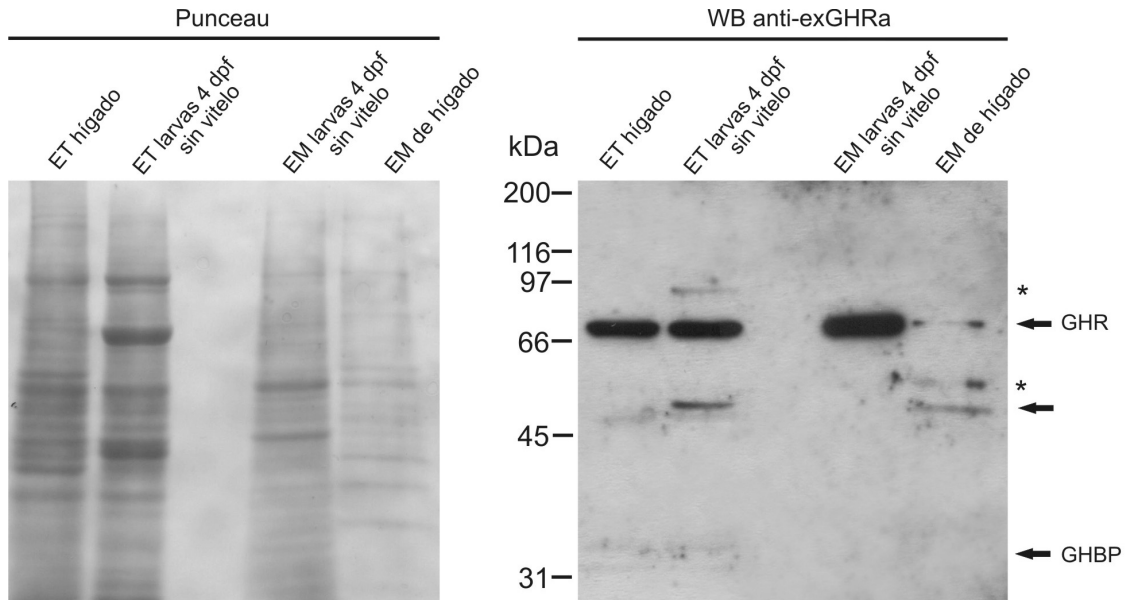
#### Detección de GHRa en extractos enriquecidos en membranas plasmáticas

Al realizar estudios trabajando con extractos proteicos totales, en general, se podría estar detectando isoformas tanto maduras como de estados intermedios de modificación postraduccionales presentes en distintos compartimentos subcelulares. Por ende, a fin de obtener las formas maduras asociadas a la membrana plasmática, que permitan deducir la naturaleza de las bandas reactivas observadas de 74 u 66 kDa (putativa GHRa), se realizaron WB contra extractos enriquecidos en membranas plasmáticas (EM) y se los comparó con extractos totales (ET) (**Fig. 38**). Se trabajó con extractos (totales y de membrana) de hígado y de larvas de pez cebra, a las que se les había eliminado previamente el vitelo, para evitar interferencias en la detección (Ver patrones de expresión de GHRa durante el desarrollo embrionario).

Para el caso de los ET se observaron las mismas bandas reactivas que se mencionaron anteriormente, y para el caso de los EM, se observó la banda reactiva de 74 kDa, la de 51 kDa (solo en el caso de hígado) y no se observó la presencia de las bandas reactivas de menor peso molecular, que podrían corresponderse con GHBP. Esto es consistente si se tiene en cuenta que estas proteínas no estarían ancladas a membrana sino que serían proteínas de secreción.

La banda reactiva de 74 kDa (GHRa) observada en los EM coincide con la observada en los extractos totales, reforzando la hipótesis de la identidad de esta banda. La banda reactiva 51 kDa que se observa en los ET de hígado (tenuemente) y de larvas, y en los EM de hígado, no pudo ser detectada en EM de larvas enteras. Sin embargo, en repeticiones de este experimento se

pudo observar la presencia de dicha banda en estos extractos (información no mostrada). Esta banda podría corresponderse con alguna de las isoformas truncas de GHRa ancladas a membrana.



**Figura 38.** WB anti-exGHRa sobre extractos totales (ET) y extractos enriquecidos en membranas plasmáticas (EM). A la izquierda de la figura se muestra la tinción con Rojo Ponceau de la membrana y a la derecha el resultado del WB anti-exGHRa. Se sembraron 60  $\mu\text{g}$  de un ET de hígado y 80  $\mu\text{g}$  de un ET de larvas de 4 dpf sin vitelo, por un lado, y aproximadamente las mismas cantidades (estimadas por tinción con Coomassie) de extractos enriquecidos en membranas plasmáticas de larvas e hígado. A la derecha (flechas) se indica la posible correspondencia de las bandas reactivas: GHRa, isoformas y GHBP. Los asteriscos indican las bandas reactivas inespecíficas. A la izquierda de la 1<sup>er</sup> calle se muestran los estándares de peso molecular en kDa.

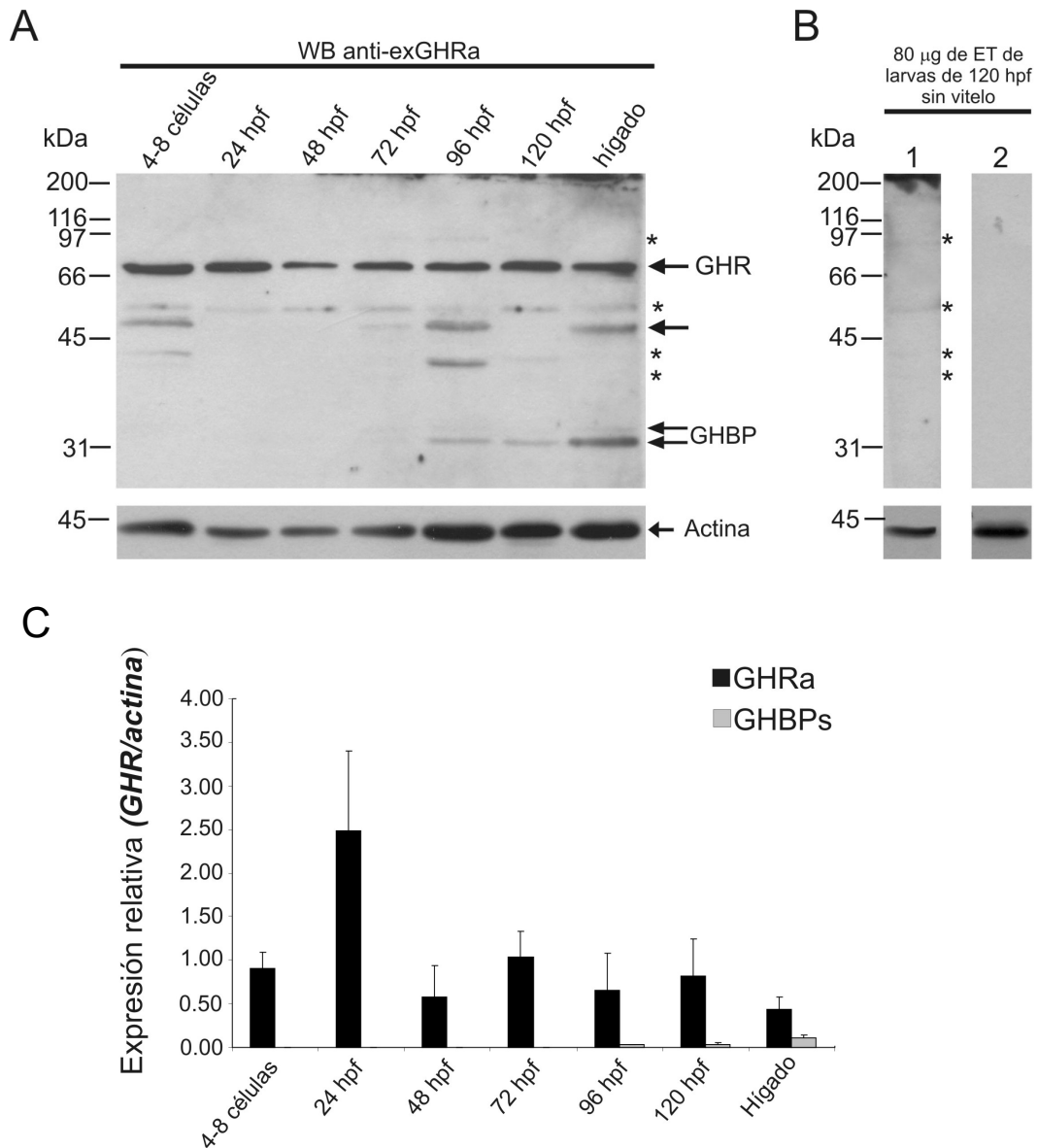
## Patrones de expresión de GHRa durante el desarrollo embrionario

### *Expresión temporal de GHRa: análisis por Western Blot*

Utilizando los anticuerpos descritos previamente, se estudiaron los patrones de expresión proteica de GHRa durante el desarrollo embrionario temprano y tardío del pez cebra. Para ello, se debió poner a punto la inmunodetección del receptor en extractos embrionarios proteicos de pez cebra, que al ser una especie de desarrollo externo se caracteriza por tener

gran cantidad de vitelo, hecho que dificulta tanto la corrida electroforética como la inmunodetección (Link et al., 2006). Una vez realizada la puesta a punto (información no mostrada), se procedió a estudiar el patrón de expresión de GHRa. Para ello, se extrajeron proteínas totales a embriones/larvas previamente desvitelinizados (ver la correspondiente sección de Materiales y Métodos) de 4-8 células, 24 hpf, 48 hpf, 72 hpf, 96 hpf y 120 hpf y se resolvieron mediante SDS-PAGE. También se resolvió un extracto proteico total de hígado que fue utilizado como control positivo. Los extractos fueron transferidos y enfrentados a los antisueros anti-exGHRa, al suero pre-inmune y al anticuerpo secundario (**Fig. 39A y B**).

Como se muestra en la **Figura 39 A**, se observó la presencia de la banda reactiva correspondiente al GHRa desde el estadio de 4-8 células en adelante. En el caso del estadio de 4-8 células, 96 hpf e hígado, también se observó la banda reactiva que podría corresponderse con una de las isoformas de GHRa. Las bandas reactivas correspondientes a GHBP, se observaron débilmente a partir de las 72 hpf en adelante. En los controles realizados con el suero pre-inmune se detectaron las bandas reactivas inespecíficas que se indican en la **Figura 39 B**. Este experimento se repitió para todos los estadios del desarrollo estudiados, observándose similares bandas reactivas inespecíficas en la mayoría de los casos (información no mostrada). El WB con el anticuerpo secundario mostró ausencia de reactividad.



**Figura 39.** Patrones de expresión de GHRa durante el desarrollo embrionario temprano y tardío del pez cebra. A) WB anti-exGHRa (imagen representativa de tres experimentos). En la parte superior de cada calle se indica el estadio del desarrollo al cual corresponden los extractos sembrados. En todos los casos se sembraron 80 µg de extractos totales de embriones ó larvas sin vitelo y 60 µg de un extracto total de hígado [control (+)]. A la derecha (flechas) se indica la posible correspondencia de las bandas reactivas: GHRa, isoformas y GHBP. Los asteriscos indican las bandas reactivas inespecíficas que fueron observadas al enfrentar los extractos al suero preinmune (B) WB utilizando el suero preinmune sobre extractos de larvas de 120 hpf sin vitelo resueltos de igual manera que en A. Como control de siembra se realizó el WB anti-actina. A la izquierda de la 1<sup>er</sup> calle se muestran los estándares de peso molecular en kDa. C) Grafica representando los valores densitométricos de las bandas de reactivas (GHRa y GHBP) normalizados con respecto a actina en los distintos estadios del desarrollo embrionario. Los datos representan la media + el desvío estándar (n=3) de los valores de densitometría de las bandas relativizadas a los valores de densitometría de actina para cada estadio.

La presencia de GHRa a partir del estadio de 4-8 células en adelante, estaría indicando que al igual que el ARNm, la proteína es de origen materno y su expresión continúa a lo largo de todo el desarrollo embrionario. Además y en función de estos resultados podría decirse que el patrón de expresión proteico de GHRa es similar al observado a nivel de ARNm, exceptuando a las 96 hpf, estadio en el cual, no pudo detectarse el ARNm de *ghra* mediante RT-PCR. Sin embargo y en función de lo observado por WB, sí estaría su producto proteico. Con respecto a este punto, es importante mencionar que los datos presentados en esta sección constituyen el primer informe acerca del receptor a nivel proteico en estadios tempranos del desarrollo embrionario en teleósteos y debido a ello, no existen antecedentes a los cuales referirse. Por otra parte, ante la presencia del GHRa materno, así como se hizo en el caso del ARNm, cabría preguntarse acerca de la presencia de la hormona (proteína) durante el desarrollo embrionario, para lo cual tampoco existen trabajos al respecto. Sin embargo, cabe mencionar algunos comentarios del trabajo de (Ozaki et al., 2006b), donde se sugiere que GH no pudo ser detectada por WB en huevos de anguila japonesa. Además, resultados no publicados de Ariel Reyes, indican que tampoco pudieron detectar GH mediante WB en extractos totales de embriones de pez cebra de 24 hpf con vitelo, utilizando anticuerpos policlonales anti-GH de carpa. Sin embargo, en este punto es importante mencionar que al realizar la puesta a punto de los WB de GHR en el desarrollo de pez cebra, ninguna banda reactiva pudo detectarse en embriones de los diferentes estadios del desarrollo no desvitelinizados. Por ende, estos casos de ausencia de detección podrían ser consecuencia del enmascaramiento de las proteínas de interés debido a las lipovitelininas y fosvitinas, que son los principales componentes del vitelo.

En mamíferos, si bien se considera que el desarrollo del embrión y el feto son independientes de GH, debido a que por ejemplo; el desarrollo de fetos anencefálicos que muestran niveles muy bajos de GH circulante, es esencialmente normal a nivel de su crecimiento (Chard, 1989), se ha encontrado que tanto las proteínas de GH como el receptor se encuentran en embriones de ratón previos a la implantación, desde el día 1 (embriones recién fecundados) hasta el día 4 (blastocisto) (Pantaleon et al., 1997).

En estos estudios de la embriogénesis y para comprender las diferencias observadas en algunos estadios, entre los niveles de ARNm y proteína, sería adecuado considerar cuestiones acerca de la dinámica de recambio del receptor, como son las modificaciones postranscripcionales (que influyen en la estabilidad del ARNm), la regulación traduccional del mensajero y la estabilidad proteica. Todos estos factores pueden influenciar la relación entre la transcripción génica y la traducción y los productos proteicos presentes en un determinado estadio del desarrollo, tejido y/o tipo celular. En ratas, por ejemplo, se observó que las velocidades de síntesis y degradación de GHR varían entre los distintos tejidos (Frick et al., 1998). Por otro lado, en células humanas en cultivo se ha observado que la velocidad de recambio de los GHRs es rápida, con un tiempo de vida media que varía entre 40 y 80 min. Sin embargo, este tiempo se modifica drásticamente por la presencia del ligando (GH) y por el estatus fisiológico del tejido (Harvey et al., 1995). Tomando todas estas cuestiones en consideración y el hecho de que no existen hasta la fecha datos sobre modificaciones postranscripcionales, estabilidad proteica e incluso, más fundamentalmente, sobre las proteínas de los GHRs en los peces, estos primeros estudios, junto con algunas observaciones hechas en el fletán del Atlántico estarían indicando patrones complejos de regulación, tanto durante el desarrollo embrionario como tejido específicos en el adulto (Hildahl et al., 2008).

*Expresión espacio-temporal de GHRa: ensayos de inmunolocalización en embriones completos*

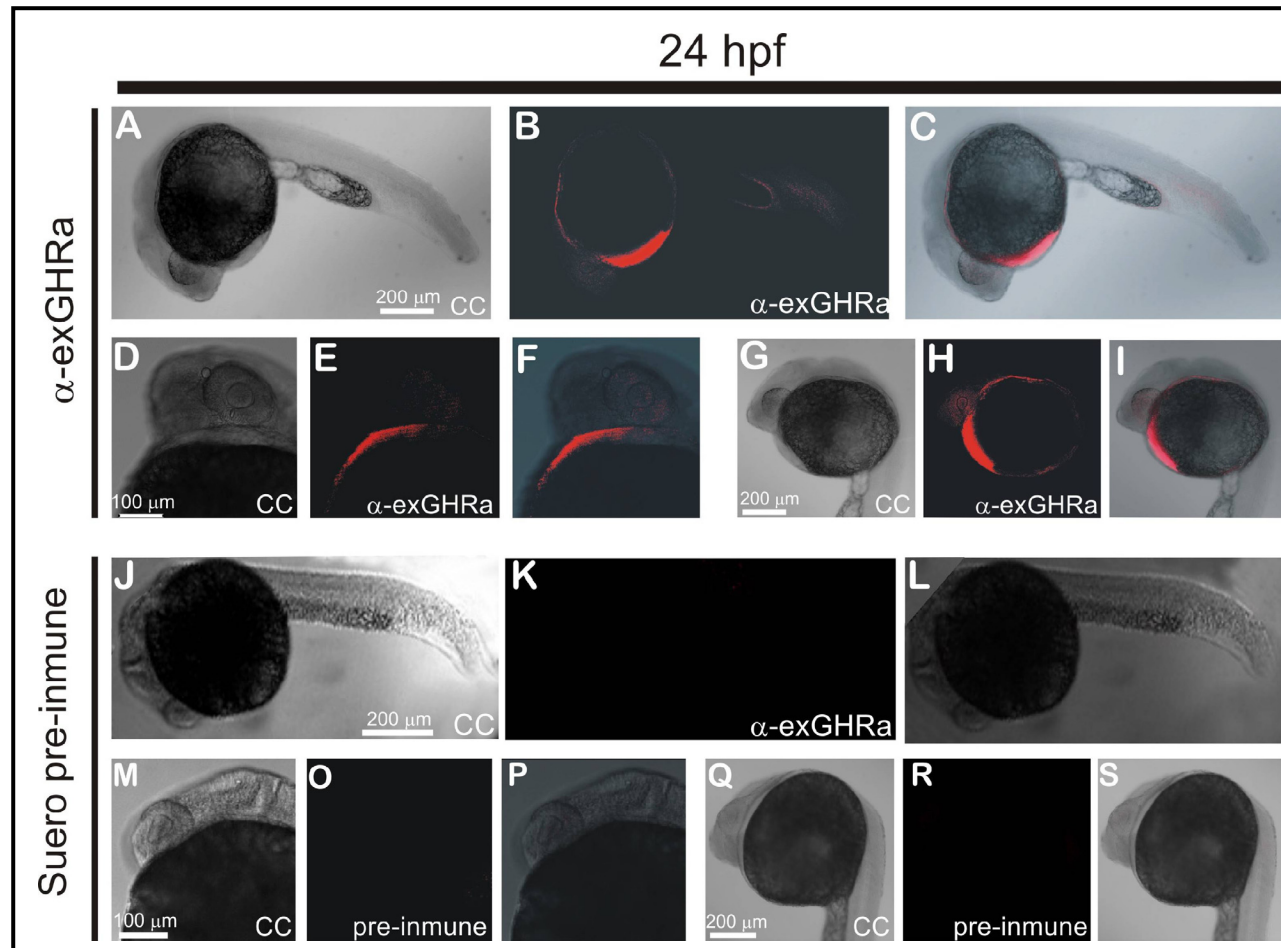
Habiéndose comprobado la presencia de la proteína de GHRa en el desarrollo embrionario y con el objetivo de determinar su localización en embriones y poder detectar así, qué tejidos y primordios de órganos expresan tempranamente el receptor; se procedió a poner a punto la técnica de inmunohistoquímica en embriones completos utilizando los anticuerpos anti-exGHRa desarrollados. Es importante mencionar que al momento de realizar el trabajo no existían antecedentes de este tipo de técnica para el caso de receptores de membrana, por lo que la puesta a punto resultó un desafío aún

mayor. Se probaron 6 protocolos diferentes de inmunohistoquímica, hasta que se logró finalmente obtener una señal definida y reproducible. Se trabajó con embriones de 24 hpf y 48 hpf, los cuales fueron tratados con el anticuerpo anti-exGHRa ó con el suero pre-inmune, en iguales condiciones. Se utilizó el anticuerpo secundario conjugado al fluoróforo Cy3 y las imágenes fueron registradas mediante microscopía confocal de fluorescencia. Los resultados se muestran en las **Figura 40 y 41**.

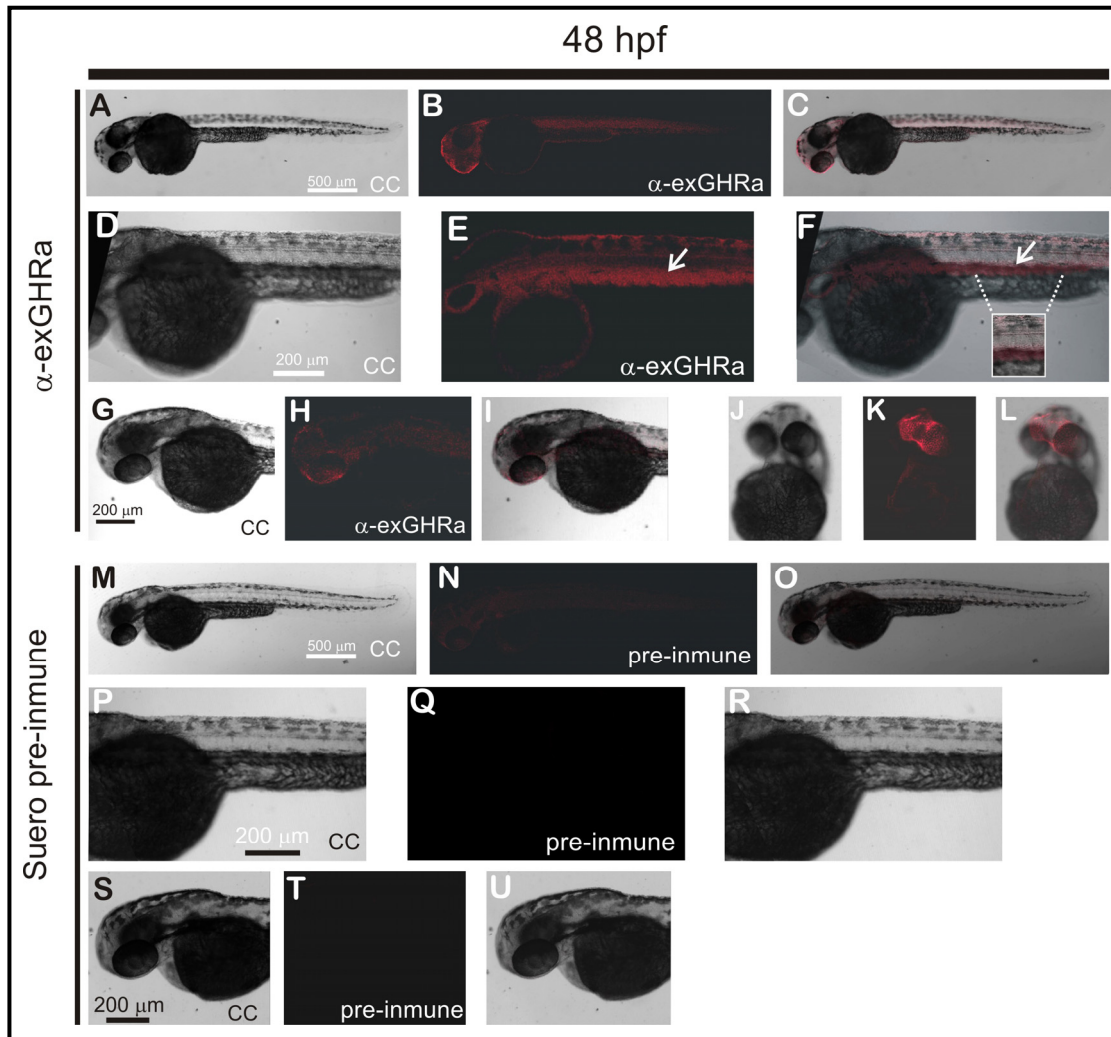
A las 24 hpf se observó expresión ubicua en todo el tronco del embrión. De forma localizada se observó mayor expresión en las regiones cefálicas y en las regiones anteriores de la célula vitelina y menor expresión en las regiones más caudales (**Fig. 40 A-I**). Bajo las mismas condiciones, no se observó expresión en ninguna región de los embriones tratados con el suero pre-inmune (**Fig. 40 J-S**). A las 48 hpf también se observó expresión ubicua en el tronco, pero predominantemente la misma se localizó en el primordio del aparato digestivo y los conductos pronéfricos (**Fig. 41 A-F**). La expresión en dichas regiones fue comprobada mediante un barrido digital realizado a lo largo del eje Z del embrión en un punto intermedio del tronco a la altura de la mitad de la extensión del saco vitelino (información no mostrada). También se observó importante expresión en las regiones cefálicas (**Fig. 41 G-I**) y expresión en la región correspondiente a los bulbos olfatorios (**Fig. 41 J-L**). Al igual que para el estadio anterior, no se observó expresión en ninguna región de los embriones tratados con el suero pre-inmune (**Fig. 41 M-U**).

Como se puede observar, la expresión de GHRa se condice con lo observado mediante hibridación *in situ*. Debido a esta correspondencia en los patrones de expresión podemos concluir que para el caso de *ghra* existe correspondencia espacio-temporal entre el ARNm y la proteína.

Por otra parte es importante mencionar que las regiones anteriores de la célula vitelina a las 24 hpf es el lugar donde se formarán los futuros primordios tanto hepáticos como del aparato digestivo.



**Figura 40.** Inmunolocalización de GHRa en embriones de 24 hpf de pez cebra. En el costado izquierdo de cada grupo de imágenes se encuentra indicado el anticuerpo o suero utilizado en cada caso. Cada hilera horizontal de micrografías confocales está compuesta por la siguiente secuencia (izquierda a derecha): micrografía de campo claro (CC), de fluorescencia cofocal y la superposición de las dos anteriores. A-S vistas laterales. A-I micrografías correspondientes a embriones de 24 hpf tratados con el anti ( $\alpha$ ) exGHRa. J-S micrografías correspondientes a embriones tratados con el suero pre-inmune. Las barras de escala se indican para el CC y son idénticas para el resto de las micrografías de la secuencia.



**Figura 41.** Inmunolocalización de GHRa en embriones de 48 hpf de pez cebra. En el costado izquierdo de cada grupo de imágenes se encuentra indicado el anticuerpo o suero utilizado en cada caso. Cada hilera horizontal de micrografías cofocales está compuesta por la siguiente secuencia (izquierda a derecha): micrografía de campo claro (CC), de fluorescencia confocal y la superposición de las dos anteriores. A-F y M-R, vistas laterales; G-I y S-U, vistas dorsales; J-L, vistas ventrales. A-L micrografías correspondientes a embriones de 24 hpf tratados con el anti ( $\alpha$ ) exGHRa. M-U micrografías correspondientes a embriones tratados con el suero pre-inmune. En F se puede observar un recuadro conteniendo una imagen ampliada de la zona indicada. E y F las flechas indican la región del intestino y los conductos pronefros. Las barras de escala se indican para el CC y son idénticas para el resto de las micrografías de la secuencia.

A lo largo del presente capítulo se ha estudiado tanto el ARNm de los receptores como su producto proteico (para el caso de GHRa), haciendo hincapié principalmente en el desarrollo embrionario, intentando no sólo realizar caracterizaciones, sino también, y en función de lo observado, realizar inferencias acerca de su funcionalidad. Si bien mucho queda por delante, sobre todo en lo que respecta a la proteína GHRb, y quizás también realizar una caracterización más precisa de las bandas reactivas, mediante técnicas de identificación como la espectrometría de masas, varios enfoques nunca antes abordados se han desarrollado en el presente trabajo.

La desambiguación de los receptores respecto a su función en la unión a GH o SL o ambos y su rol en estadios tempranos del desarrollo, previos a la formación del eje somatotrófico, son interrogantes que se destacan del resto de una hipotética lista que se podría plantear sobre todo para los teleósteos. Su conocimiento tiene múltiples implicancias, no sólo para los interesados en el conocimiento de la biología de los teleósteos, sino también para profundizar acerca de los mecanismos que controlan el crecimiento durante una de las etapas críticas en los cultivos de peces, pero también para aportar luz a períodos del desarrollo, que en especies de desarrollo embrionario interno como los mamíferos, resulta sumamente complejo de abordar.

# CAPÍTULO III



### ***CAPÍTULO III: Estudios funcionales de los receptores durante el desarrollo embrionario temprano y tardío.***

#### INTRODUCCIÓN

El crecimiento, la ontogenia y la adición de nuevas y mejoradas competencias fisiológicas en un organismo siguen una secuencia bien definida y genéticamente programada, en la que la regulación hormonal es fundamental. Sin embargo, es sorprendente que la mayor parte del desarrollo embrionario se produzca sin tejidos endocrinos maduros y/o ejes endócrinos funcionales. En realidad, es probable que el desarrollo y la maduración de los diferentes sistemas endocrinos estén bajo el control de factores sintetizados fuera una glándula endocrina específica (Helvik et al., 2009). Si bien existen numerosos estudios acerca del rol de GH y sus efectores en el crecimiento postnatal, y su importancia en el mismo para todas las especies de vertebrados estudiadas hasta el momento, ha sido bien documentada (Le Roith et al., 2001; Reinecke et al., 2005), pocos estudios se han realizado acerca del rol de estas hormonas en el desarrollo embrionario. Esto se debe principalmente debido a las limitaciones asociadas al estudio del desarrollo embrionario de organismos vivíparos como son los mamíferos, en los que se han llevado adelante la mayoría de las investigaciones. Es por esto, que para este tipo de estudios, los organismos ovíparos representan una ventaja, y dentro de ellos, los peces en particular debido a que poseen una cubierta protectora (corion) transparente, lo que permite monitorear su desarrollo.

La transgénesis es una herramienta utilizada en una amplia variedad de aplicaciones de investigación que van desde el estudio de la expresión génica hasta la creación de modelos animales de enfermedades humanas, siendo poderosa para estudiar fenotipos asociados a la disrupción o sobreexpresión de un gen individual (Johnston et al., 2011).

Para el caso de los **mamíferos**, esta herramienta ha sido ampliamente en utilizada en múltiples áreas de investigación y dentro de ellas, podemos mencionar el caso particular del estudio del eje somatotrófico. Muchos de los avances acerca de las funciones relativas de GH e IGF-I se han logrado gracias a ratones transgénicos sobreexpresantes de GH o de IGF-I o en

ejemplares que poseen una inactivación específica permanente de un gen particular, comúnmente conocidos por el término sajón “*knockouts*” (Le Roith et al., 2001).

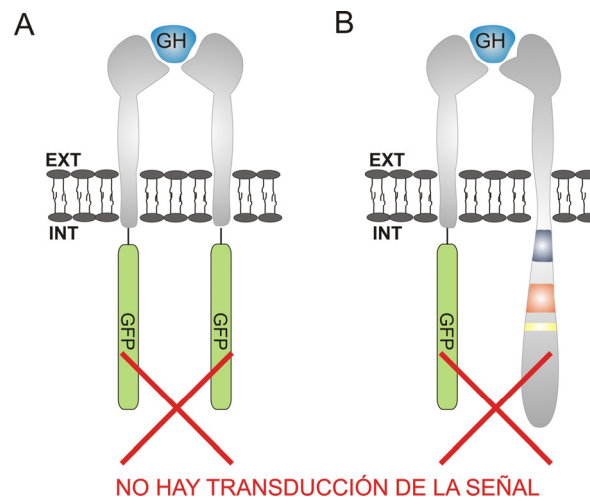
En general, los mecanismos de transgénesis en peces se han utilizado para sobreexpresar; o bien un gen endógeno ó bien un transgen (gen de otra especie), y a diferencia de lo que sucede en mamíferos, en estos organismos no es posible mediante técnicas de ADN recombinante la producción de organismos “*knockouts*” (poseen inactivado uno o ambos alelos de un gen en particular). Por otra parte, el pez cebra es particularmente adecuado para las aplicaciones de transgénesis, debido a que los adultos son fáciles de criar y mantener y el desarrollo embrionario procede rápidamente desde el huevo fecundado hasta el embrión, conteniendo la mayor parte de los órganos dentro del los dos días de desarrollo. Además, la velocidad de este proceso y la transparencia de los embriones, constituyen dos de las mayores ventajas para el análisis de la función de genes de vertebrados en este organismo (Suster et al., 2009).

En relación al eje somatotrófico y en lo que respecta a la técnica sobreexpresión por transgénesis, la misma ha sido ampliamente utilizada para la sobreexpresión de GH, sobre todo en peces de importancia comercial, con el fin de obtener mejoras a nivel del crecimiento (Dunham, 2004). Para el caso particular del pez cebra, existen organismos transgénicos sobreexpresantes de una GH heteróloga (transgén de *Odonthestes argentinensis*), de ambas isoformas de SL homólogas y también de la GH homóloga (de Azevedo Figueiredo et al., 2007; Wan & Chan, 2010). En el primero de los casos (GH heteróloga), aunque si se observaron diferencias en el crecimiento para el caso de los ejemplares hemicigotas para la construcción sobreexpresante de GH; para los homocigotas (como se ha observado ya para otras especies), se vió en cambio, que no presentaban un crecimiento diferencial con respecto a los silvestres. Por otra parte, estos últimos, tenían aumentadas las tasas metabólicas y la generación de especies reactivas del oxígeno; y los niveles de IGF-I estaban disminuídos respecto a los peces no transgénicos. Esto habla de un control estricto del eje en este punto, y un mecanismo de resistencia a la sobreexpresión de GH (de Azevedo Figueiredo et al., 2007; Rosa et al., 2008). Para el caso de la sobreexpresión de los genes de  $SL\alpha$  y  $SL\beta$ , no se

observaron diferencias en la velocidad de crecimiento o en el tamaño (longitud) en estos peces transgénicos fundadores (F0) respecto a los controles, aunque si en su peso corporal. Aunque si se observó un aumento en la expresión de los componentes del sistema IGF en estos organismos respecto a los salvajes, no fue así en el caso de los transgénicos para la GH homóloga. Estos aumentos se observaron tanto para IGF-I como las dos isoformas de IGF-II de pez cebra, lo que indicaría que ambas SLs actuarían, al igual que GH, a través de la vía de los IGFs (Wan & Chan, 2010).

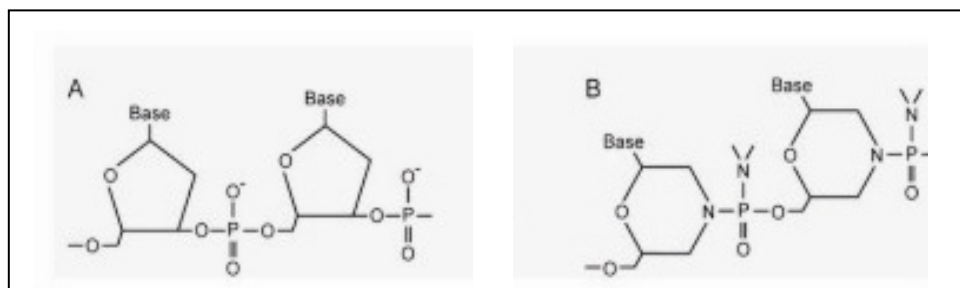
Como se mencionó anteriormente, debido a que no es posible la generación de “*knockout*” en peces, se suelen utilizar otros abordajes a la hora de silenciar la expresión de un gen en particular para estudiar el efecto de su ausencia en el organismo. Por un lado, se pueden utilizar técnicas de silenciamiento transitorias, como son los ARN interferencia (siRNA) o los oligonucleótidos morfolinos (descritos más adelante en esta sección), que actuarán sobre el ARNm del gen de interés durante un período de tiempo particular. Por otro lado, se pueden utilizar técnicas de silenciamiento estables, como la sobreexpresión de un miRNA específico del gen en estudio ó para el caso particular de los receptores que actúan como dímeros, mediante la sobreexpresión de una forma particular del receptor también se pueden obtener efectos sobre la función del producto génico. En estos casos, al sobreexpresar un receptor truncado, es decir, que carece de la región intracelular, se formarán o bien heterodímeros, entre el truncado y el receptor normal, o bien homodímeros del receptor truncado; ambos complejos incapaces de transducir la señal. Como se mencionó en la introducción general, GHR actúa en forma de dímeros, los cuales se encuentran pre-formados en la superficie celular y al unir la hormona, se produce un cambio conformacional en los mismos que desencadena la respuesta celular (van den Eijnden et al., 2006). De esta manera, al sobreexpresar un GHR truncado (que carece de la región intracelular completa) se podrían lograr obtener organismos que no poseen la capacidad de transducir la señal de GH, y por ende, no pueden responder a esta hormona. Si sumado a esto, en lugar de la región intracelular se fusiona la proteína verde fluorescente o GFP (del inglés *Green Fluorescent Protein*), la expresión de esta construcción puede ser monitoreada observando la expresión de GFP (**Fig. 42**). Existen varios antecedentes de este tipo de

estrategias en el pez cebra. Como ejemplo se puede citar el caso del IGF1R del pez cebra fusionado a GFP (Schlueter et al., 2007a).



**Figura 42.** Representación esquemática de los posibles dímeros de GHR que se podrán formar en la membrana plasmática. Tanto en el caso del heterodímero (A) como en del homodímero (B), los complejos serán incapaces de transducir la señal al interior celular.

Los morfolinos (**MOs**) son oligonucleótidos antisentido en cuya estructura molecular el anillo de azúcar se ha sustituido por un anillo de morfolina, para conferirles más estabilidad (**Fig. 43**). Su secuencia es complementaria a la de un mRNA al que se puede unir bloqueando su traducción o su procesamiento “*splicing*”. Por lo tanto, el uso de morfolinos permite bloquear la expresión de un gen particular a nivel del bloqueo de la traducción de su mRNA o a nivel del bloqueo de su *splicing* correcto (Bill et al., 2009; Ekker & Larson, 2001).



**Figura 43.** Esquemas mostrando las diferentes estructuras de los oligonucleótidos mencionados. A) Oligonucleótido convencional B) Oligonucleótido Morfolino. Adaptado de (Eisen & Smith, 2008).

Para el caso particular del pez cebra y de los estudios de los componentes del eje ST, los MOs se han utilizado para disminuir la expresión de los miembros de la familia de GH (GH, PRL, SL $\alpha$  y SL $\beta$ ) (Zhu et al., 2007). Sin embargo, llamativamente solo se observaron efectos para el caso de PRL y las SLs, sobre todo a nivel del inflado de la vejiga natatoria. Esto podría estar hablando de una redundancia funcional en los miembros de la familia. Los MOs también se han utilizado en estudios con los IGFs y sus receptores (Schlueter et al., 2007a; Schlueter et al., 2006; Schlueter et al., 2007b; White et al., 2009) y los mismos han demostraron la importancia de los IGFs en el desarrollo y crecimiento embrionario. Sin embargo, hasta la fecha no se han realizado estudios acerca de la disminución de los GHRs utilizando MO, y si bien existe un estudio con una construcción dominante negativa para GHRA, en la que se vió afectada la expresión de IGF-I, no se han realizados descripciones fenotípicas profundas acerca de estos ejemplares ni estudios a largo plazo (Ahmed et al., 2011).

En función de los antecedentes descriptos, en el presente capítulo se describe el estudio funcional de los GHRs, haciendo énfasis en los efectos de su disrupción en el desarrollo temprano. El mismo se abordó empleando la técnica de sobreexpresión de dominantes negativos y mediante la utilización de oligonucleótidos MOs. Sin bien ambos constituyen enfoques relativamente diferentes, a través de ellos se intenta obtener respuestas o bien complementarias o bien solapadas, acerca del rol de los receptores en el desarrollo embrionario e inferir conclusiones acerca de sus posibles ligandos y el rol de éstos.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### *Obtención de peces transgénicos sobreexpresantes de receptores dominantes negativos fusionados a la proteína verde fluorescente o GFP*

Una de las aproximaciones para realizar los estudios funcionales consistió en la obtención de peces transgénicos integrales que sobreexpresen receptores dominantes negativos (dnGHR) fusionados a GFP (**Fig. 42**). Para la obtención de los mismos se empleó el mecanismo de transposición

(Kawakami, 2004; Kawakami, 2005), descrito en la correspondiente sección de Materiales y Métodos que consta de dos vectores plasmídicos; el **pCS-TP**, con la secuencia del ARNm de la transposasa, cuyo producto proteico mediará la inserción genómica del transgén, y el vector **pT2AL200R150G**, donde se clona el fragmento que se desea sobreexpresar. Mediante este sistema no sólo se puede estudiar transgénesis estable, sino también transiente, es decir, observar los efectos de la sobreexpresión del transgén en estudio desde que es transcrito a partir del plásmido microinyectado. La expresión se considera transiente debido a que la fluorescencia en el embrión puede deberse a la proteína de fusión producto de un ARNm transcrito a partir del vector y/o de la secuencia que ha sido transpuesta en el genoma.

#### Estudios para *ghra*

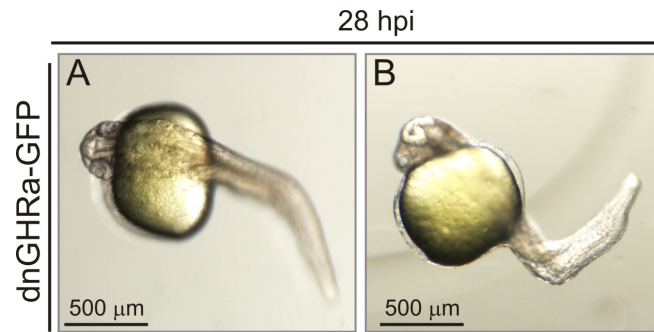
Para el caso de *ghra*, primero se debió generar el constructo dominante negativo. Para ello, a partir de un plásmido que posee el ADNc completo de *ghra* se amplificó por PCR el fragmento de interés, el cual contenía sólo la región extracelular y transmembrana de *ghra* (información no mostrada). Una vez obtenido el fragmento, se clonó en el vector pGEMT-easy® (Promega, Madison WI, USA) y posteriormente, se liberó de dicho vector por digestión enzimática. El fragmento liberado, se ligó al vector **pT2AL200R150G**, previamente digerido con las mismas enzimas, lo que permitió a su vez la eliminación del intrón de la  $\beta$ -globina (Ver Materiales y Métodos), para obtener finalmente la construcción del dominante negativo: **pT2AL-dnGHRa-GFP** (ver M y M). La misma, se secuenció para constatar que ninguna de las secuencias de interés (ORF del dnGHRa ó de GFP) hubiese sufrido mutaciones durante todo el procedimiento (información no mostrada). Una vez constatado el vector, se procedió a realizar las microinyecciones.

Se inyectaron embriones **controles**, es decir con el plásmido pT2AL200R150G que expresa GFP solamente (**pT2AL-GFP**) y embriones con la construcción dominante negativa **pT2AL-dnGHRa-GFP (dnGHRa)** que expresa el dominio extracelular y transmembrana de GHRa (región aminoterminal) fusionado a GFP. En paralelo, se dejaron desarrollar embriones

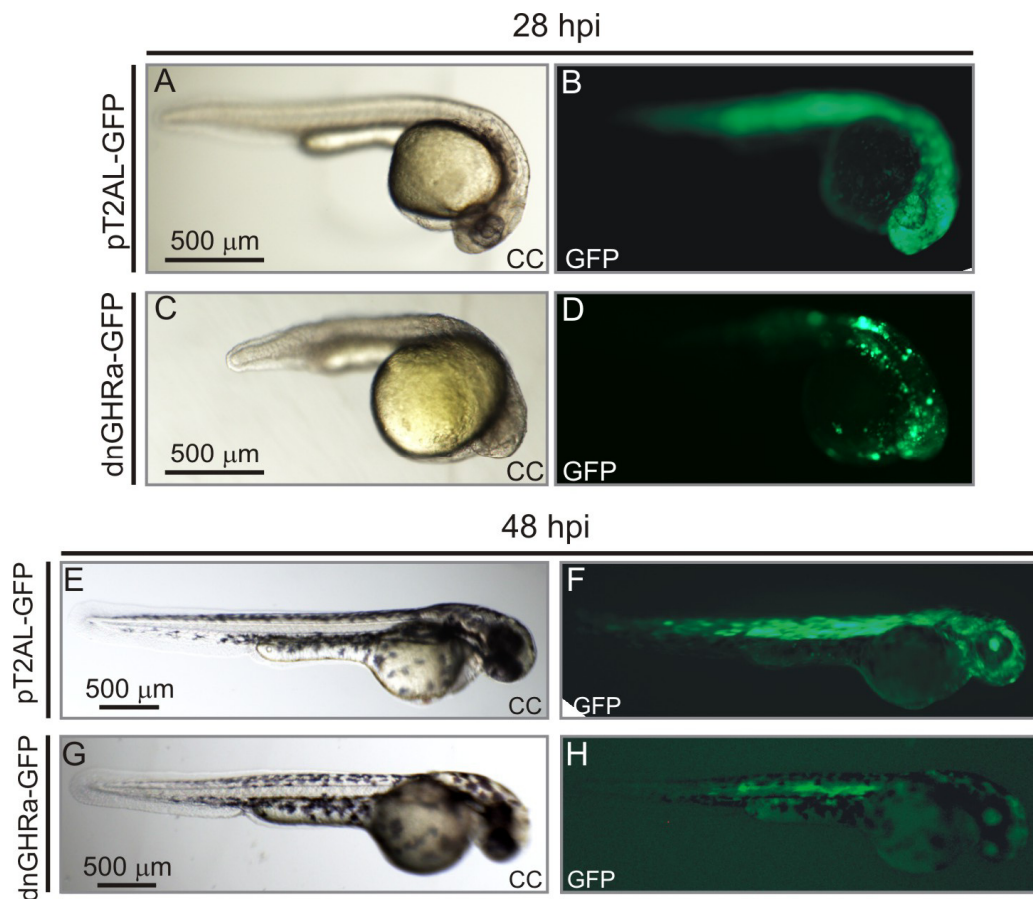
sin inyectar (denominados WT, del *inglés Wild Type* o salvajes). El experimento se repitió 4 veces y en la **Tabla 4** se muestran los resultados obtenidos al observarlos bajo lupa estereoscópica de fluorescencia a las 24 horas post inyección (**hpi**). En cada uno de los experimentos se inyectaron, en promedio, 250 embriones con cada uno de los vectores mencionados. En la tabla se muestran valores promedio de los % de mortalidad, % de ejemplares fluorescentes y % de ejemplares fluorescentes con malformaciones. Las malformaciones observadas incluyen un único fenotipo que se repitió en todos los ensayos realizados: acortamiento del tronco y/o quiebre a nivel cefálico/tronco, principalmente en los dnGHRa, y edemas, tanto en los controles como en los dnGHRa (**Fig. 44**). Como se observa en la tabla, existe una diferencia significativa entre el porcentaje de malformaciones observadas para los dnGHRa respecto a los controles. Todos los ejemplares con malformaciones fueron sacrificados y se siguió el desarrollo de aquellos ejemplares que poseían fenotipo salvaje “aparente”. En la **Figura 45** se muestran micrografías de campo claro y de fluorescencia (GFP) de embriones con el fenotipo salvaje “aparente” a las 24 hpi (horas post-inyección) y 48 hpi, (transgénesis transiente).

n=4	Mortalidad promedio a las 24 hpi (%)	% de embriones fluorescentes	Malformaciones (%)
WT sin inyectar	18 ± 2.5	-----	-----
pT2AL-GFP	38.9 ± 9.6	87.5 ± 13.2	5.8 ± 3.0 <sup>a</sup>
dnGHRa	21.3 ± 12.2	33.3 ± 11	17 ± 5.5 <sup>b</sup>

**Tabla 4.** Parámetros observados en los experimentos de microinyección para el dnGHRa, su respectivo control (pT2AL-GFP) y los embriones salvajes (WT) sin inyectar. Se indican los valores promedio ± el desvío estandar (n=4). Las malformaciones fueron evaluadas en los embriones que presentaron fluorescencia a las 24 hpi. El asterisco indica que existe una diferencia significativa entre ambos grupos  $P < 0.05$  (*t-Student*).



**Figura 44.** Malformaciones observadas en los dnGHRa a las 24 hpi. A y B Micrografías de campo claro de embriones microinyectados con la construcción dnGHRa y para los que se observó fluorescencia. En las imágenes se muestra un ejemplar representativo de los experimentos realizados (n=4).



**Figura 45.** Transgénesis transiente (Fo) del dnGHRa y el control (pT2AL-GFP) a las 24 hpi y 48 hpi. A, C, E y G). Micrografías de campo claro (CC). B, D, F y H) Micrografías de fluorescencia para GFP. A la izquierda de cada panel se indica el constructo microinyectado. En las imágenes se muestra un ejemplar representativo de los experimentos realizados (n=4), que no presentó malformaciones. La barra de escala se indica para las micrografías de CC y es la misma para las correspondientes imágenes de fluorescencia.

Los ejemplares fluorescentes sin malformaciones (**Fig. 45**) se dejaron crecer con el objetivo de que alcancen la madurez sexual, para poder luego cruzarlos y obtener los transgénicos estables (F1). Para ello, se siguió su desarrollo con observaciones periódicas bajo microscopio estereoscópico hasta los 10 -12 dpf, momento en que la larva agota sus reservas de vitelo y la nutrición de la misma depende enteramente de la alimentación exógena (período exotrófico). Al realizar los **dos primeros** experimentos de microinyección, para el caso de las larvas control (**pT2AL-GFP**), se observó un crecimiento y una progresión normal de los ejemplares durante el desarrollo, con un % de supervivencia del 60 % en promedio. Sin embargo, para el caso de los **dnGHRA**, se observó un % de supervivencia significativamente menor al anterior (10 % de supervivencia), observándose alta mortalidad entre los 8 dpf y los 10 dpf. Esto nos permitió concluir que la sobreexpresión del receptor dominante negativo de GHRA produce defectos en el desarrollo embrionario que llevan a la muerte de las larvas, es decir, la expresión del transgén fue letal para la larva. Debido a esto, de los 4 experimentos de microinyección realizados, sólo fue posible obtener 8 ejemplares transgénicos **dnGHRA** adultos de la F0. Al cruzar estos adultos con ejemplares WT y buscar descendencia fluorescente (F1) para evidenciar la presencia del transgén, o bien no se obtuvieron embriones que fueran fluorescentes (bajo microscopio estereoscópico de fluorescencia) o bien, los ejemplares no presentaron compartimento reproductivo. Debido a estos resultados, se decidió estudiar los embriones que presentaban expresión transiente (F0 fluorescente), haciendo un seguimiento minucioso del desarrollo larvario, para intentar detectar malformaciones asociadas a la mortalidad.

#### *Estudio del efecto del dnGHRA por expresión transiente*

Los estudios del efecto de la expresión transiente en larvas se realizaron en dos experimentos de microinyección subsiguientes, en los cuales se contaron los embriones con malformaciones a las 24 hpi y se retiraron, y se siguió el desarrollo del resto de los embriones hasta los 8 dpf. En estos experimentos se observó que en los primeros 4 días del desarrollo embrionario los embriones/larvas inyectados con la construcción **dnGHRA** no presentaron

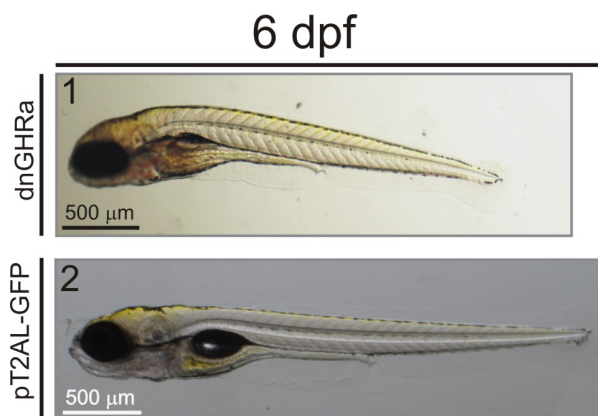
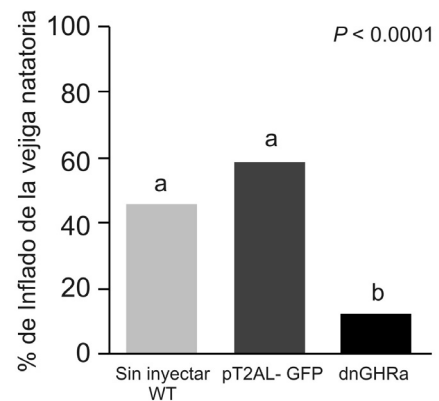
diferencias fenotípicas aparentes respecto a los controles (exceptuando para el caso de los embriones malformados que fueron sacrificados), salvo una aparente disminución de la longitud (**Fig. 46 B**). Al 5<sup>to</sup> día del desarrollo (5 dpf), un % estadísticamente significativo de las larvas inyectadas con el **dnGHRa** no inflaron la vejiga natatoria. Los datos se registraron al 8° dpf, de forma de asegurarnos que larvas dnGHRa no presentaran un retraso en el proceso de inflado, el cual normalmente ocurre a los 5 dpf. Estos datos e imágenes representativas se muestran en la **Figura 46**. Es importante destacar que la vejiga natatoria (VN) es un órgano involucrado no sólo en funciones de flotabilidad sino también, en el caso de los ciprínidos como es el pez cebra, está involucrada en el proceso de audición. Además, este organismo es un pez del tipo fisóstomo, es decir que la vejiga natatoria mantiene su conexión con el tracto digestivo, aún en el adulto (Finney et al., 2006).

Como se muestra en el gráfico de la **Figura 46 C**, se observaron diferencias significativas en el porcentaje de inflado de la vejiga de los dnGHRa respecto a los controles y a los WT, no así entre estos últimos. Debido a que el inflado de la VN es fundamental para la supervivencia larvaria, los peces incapaces de inflarla mueren, principalmente porque no pueden mantenerse estables en la columna de agua para obtener el alimento en suspensión. Esto nos permitió concluir que la expresión transiente de dnGHRa es letal para las larvas y que está asociada a la imposibilidad de inflar la vejiga natatoria. Por esta razón fue imposible obtener organismos transgénicos estables dnGHRa adultos. Probablemente los 8 ejemplares obtenidos lograron llegar a la adultez debido a un alto mosaicismo en la expresión del transgén, que llevó a una muy baja expresión del mismo.

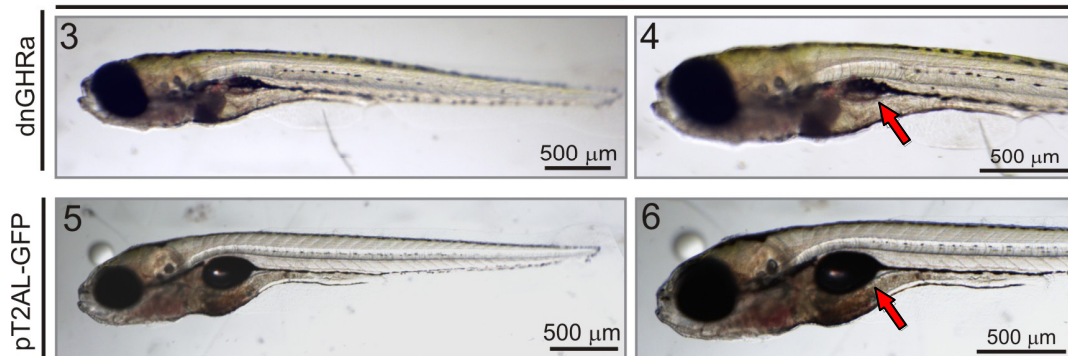
Como conclusión de este experimento podemos decir que GHRa estaría involucrado en un proceso fundamental para la supervivencia de la larva como es el inflado de la vejiga natatoria, pudiendo estar asociado al desarrollo del órgano o al proceso de inflado en sí. Experimentos de sobreexpresión pero utilizando un promotor inducible permitirían profundizar acerca de los mecanismos subyacentes de este proceso. Por otra parte, podría estar directamente relacionado con la proliferación celular a nivel de las regiones cefálicas y del tronco ya que la disminución produce un acortamiento del tronco y la disminución del encéfalo.

**A**

Fenotipo observado	N° de ejemplares de 8 dpf		
	WT sin inyectar	pT2AL-GFP	dnGHRA
No inflaron la vejiga natatoria	45	27	78
Si inflaron la vejiga natatoria	38	38	11
Total	83	65	89
% ejemplares que inflaron la VN	45,8	58,5	12,35

**B****C**

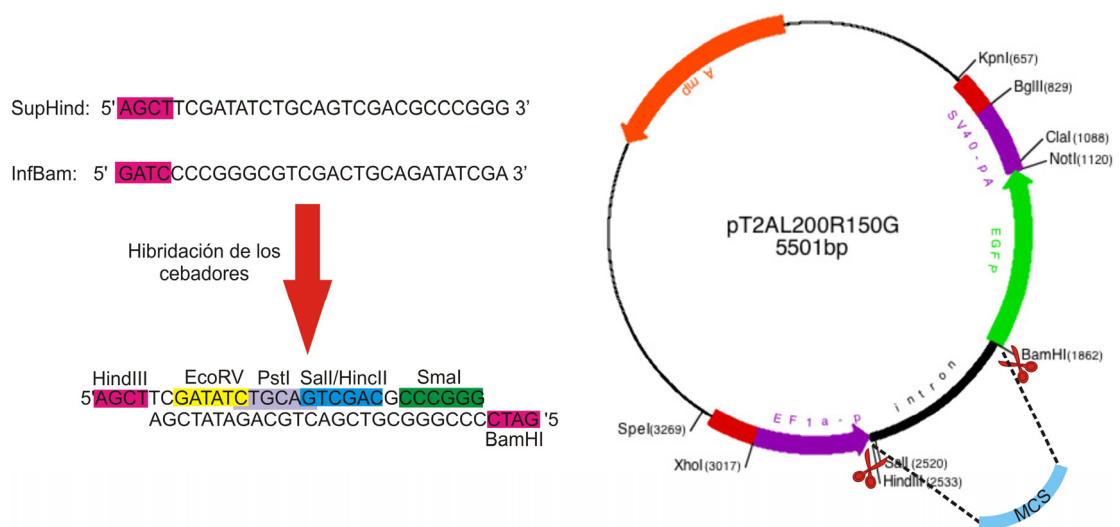
10 dpf



**Figura 46.** Análisis del fenotipo observado en los dnGHRA respecto al inflado de la vejiga natatoria. A) Tabla de contingencia conteniendo los datos que se representan en el gráfico del ítem C. B) Micrografías de campo claro mostrando vistas dorsales de ejemplares representativos de larvas de 6 dpf y 10 dpf microinyectadas con el plásmido control y con la construcción dnGHRA. Estos ejemplares habían mostrado fluorescencia a las 24 hpi. Se puede observar claramente la ausencia de la vejiga natatoria (flecha roja) en el caso del ejemplar microinyectado con el dnGHRA (1, 3 y 4). C) Porcentajes de larvas que inflaron la vejiga natatoria a los 8 dpf, según los valores de la tabla mostrada en A. Se observaron diferencias significativas entre los dnGHRA respecto a los controles y a los WT, no así entre estos últimos  $P < 0.0001$  (Basada en prueba estadística de chi-cuadrado y posterior realización de una partición de la tabla de contingencia). Abreviaturas: vejiga natatoria (VN).

Estudios para *ghrb*

Para el caso de GHRb, la estrategia de construcción del vector **pT2AL200R150G-dnGHRb** no pudo llevarse adelante por simple digestión enzimática, como en el caso de GHRa, debido a que la secuencia del fragmento de interés de *ghrb*, poseía sitios internos de reconocimiento para la enzima BamHI. Es por eso que se diseñó una estrategia alternativa para la obtención de las construcciones. La misma consistió en generar un vector **pT2AL200R150G** que contenga un sitio de múltiple clonado (MCS del inglés *Multiple Cloning site*), incluyendo enzimas que no se encuentren en la secuencia de *ghrb*. Para ello se diseñaron dos cebadores que contienen en sus extremos las secuencias que sobresalen luego de haberse realizado una digestión con BamHI y con HindIII, y en la región interna, poseen sitios de reconocimiento para diferentes enzimas de restricción (MCS). Ambos cebadores son complementarios entre sí, de manera de poder mediante una hibridación, lograr una secuencia doble hebra para ligar al vector **pT2AL200R150G** (Fig. 47).



**Figura 47.** Esquema mostrando la estrategia utilizada para la obtención del vector **pT2AL200R150G** con el sitio de múltiple clonado (**pT2AL200R150G-MCS**). A) Los cebadores diseñados son sometidos a hibridación. B) Una vez hibridados, el fragmento doble hebra obtenido es ligado al vector **pT2AL200R150G** previamente digerido con HindIII y BamHI.

El vector incluyendo MCS ha sido obtenido de forma satisfactoria y queda aún por realizarse el clonado de la secuencia dnGHRb y los posteriores ensayos de microinyección. Los pasos a seguir para el clonado del transgen son los mismos que los mencionados para GHRa, con el objeto de intentar obtener peces transgénicos integrales dnGHRb. Los estudios con este gen permitirán aportar mucha información, sobre todos en lo referente a si existe redundancia en las funciones entre ambos receptores.

*Ensayos de disminución específica de la expresión o “knockdown” utilizando oligonucleótidos morfolinos*

Los estudios de “knockdown” utilizando MOs se realizaron sólo para GHRa, aunque se planea realizarlos también para el caso de GHRb. Es importante mencionar que, según estudios previos, los MOs actuarían hasta aproximadamente las 72 hpf, por lo que si se observan efectos fenotípicos posteriores a este estadio del desarrollo puede decirse que el gen cuya traducción o *splicing* ha sido bloqueado está involucrado en eventos tempranos en el desarrollo (Eisen & Smith, 2008; Ekker, 2000; Ekker & Larson, 2001).

Para el caso de *ghra* se diseñaron dos oligonucleótidos MOs diferentes: uno de ellos que bloquea la traducción de la proteína; **tMO-ghra** (del inglés *translation Morpholino*) y el otro que evita el *splicing* del ARNm de *ghr*; **sMO-ghra** (*splice junction Morpholino*). Como control, en los experimentos se microinyectó un **MO Control** el cual está diseñado para bloquear la traducción del ARNm de la  $\beta$ -globina humana, gen que se encuentra ausente en el genoma de pez cebra. La hipótesis de trabajo fue la siguiente: debido a que el **tMO-ghra** provocaría efectos sobre el mRNA materno y cigótico y el **sMO-ghra** sólo provocaría efectos sobre mRNA cigótico, los efectos del tMO deberían ser mayores que los del sMO, ya que éste afecta a dos de los posibles generadores de GHRa; tanto el mRNA materno como el cigótico. Sin embargo se debe tener en cuenta que como **GHRa** es materna, se podrá observar presencia de proteína materna (al menos en algunos estadios del desarrollo, sobre todo los tempranos), pudiendo la misma estar supliendo la carencia de proteína cigótica. Hasta cuál estadio se observe proteína de origen materno dependerá de cuál sea el tiempo de vida media de la proteína.

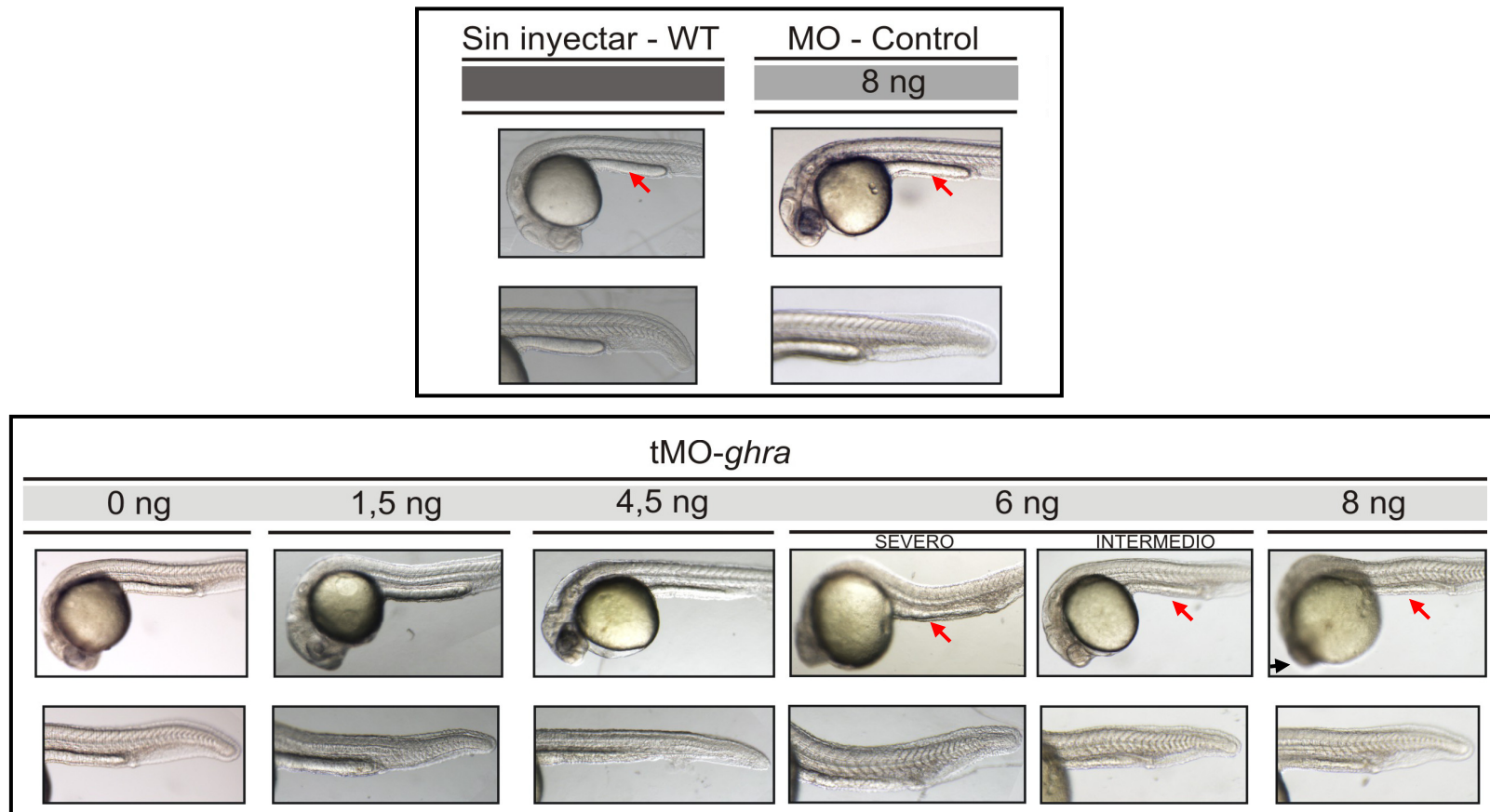
## Estudios con el tMO-ghra

## Curva de calibración del tMO-ghra

A fin de determinar la dosis efectiva de trabajo de este MO se realizó una curva de calibración (dosis-respuesta) que consiste en microinyectar diferentes cantidades (ng) del MO de interés e ir observando los efectos dosis dependiente. La dosis de trabajo del MO será la menor cantidad a la cual se observen efectos fenotípicos claros respecto a los controles. En el caso de **tMO-ghra** se ensayaron 6 dosis diferentes, y el MO control (**MO-Ctrl**) fue inyectado a las mayores dosis. La curva se realizó variando las soluciones de microinyección, colocando diferentes cantidades (ng) de tMO-ghra en cada una de ellas y manteniendo constante el volumen de microinyección. En función de distintas experiencias previas (información no mostrada) el volumen de microinyección se fijó en 5 nl por embrión. Este volumen fue determinado como se describe en la correspondiente sección de materiales y métodos. Los resultados de la microinyección para las distintas dosis del tMO-ghra y su respectivo control se resumen en la **Tabla 5** y en la **Figura 48**.

	tMO- ghra					MO- Ctrl		No Inyectados WT
	ng de MO inyectados							
	0	1,5	4,5	6	8	6	8	
N° de ejemplares								234
Microinyectados	54	56	50	58	78	71	60	-
Muertos a las 6 hpi/hpf	4	1	3	0	5	5	2	5
% de Mortalidad	7.41	1.79	6	0	6.41	7.04	3.33	2.14
<b>24 hpf/ hpi</b>								
Muertos	7	2	2	6	6	8	7	2
% Mortalidad	14	4.9	4.3	16.2	14.3	12.1	12.1	1.0
<b>FENOTIPOS</b>								
Fenotipo Severo (A)	0	0	0	3	6	0	0	0
% Fenotipo A	0	0	0	9.7	17.6	0	0	0
Fenotipo Intermedio (B)	0	0	5	8	8	0	0	0
% Fenotipo B	0	0	11.9	25.8	23.5	0	0	0
Fenotipo Leve (C)	0	0	12	10	15	0	0	0
% Fenotipo C	0	0	28.6	32.3	44.1	0	0	0
% Total de ejemplares con fenotipo A, B y C	0	0	40.5	67.7	85.3	0	0	0

**Tabla 5.** Curva de calibración para el tMO-ghra. En la tabla se muestran: el N° de ejemplares microinyectados, de ejemplares muertos a las 6 y 24 hpi u hpf (para el caso de los WT) y el % de mortalidad para cada una de las cantidades (ng totales) de MO microinyecctadas. También se muestra la cantidad de ejemplares observados para los tres fenotipos principales observados, Severo (A), Intermedio (B) y Leve (C), ver texto para su descripción.



**Figura 48.** Curva de calibración del tMO-ghra. En los paneles se muestran micrografías obtenidas con lupa estereoscópica para embriones de entre 24 y 28 hpf/hpi, según corresponda. Para cada condición en el panel superior se muestra una micrografía de la región anterior y media del embrión y en el inferior una micrografía correspondiente a la región posterior ampliada. En todos los casos se trata de vistas laterales. Para el caso de los embriones controles, solo se muestran micrografías de los inyectados con la mayor dosis del **MO-Ctrol** (8 ng). Las flechas rojas indican la extensión del saco vitelino, cuya reducción es el efecto fenotípico más evidente observado como consecuencia del **tMO-ghra** (6 ng y 8 ng). La flecha negra, para el caso del embrión inyectado con los 8 ng de **tMO-ghra** indica la mortalidad celular observada en las regiones anteriores para el caso de esta dosis de MO.

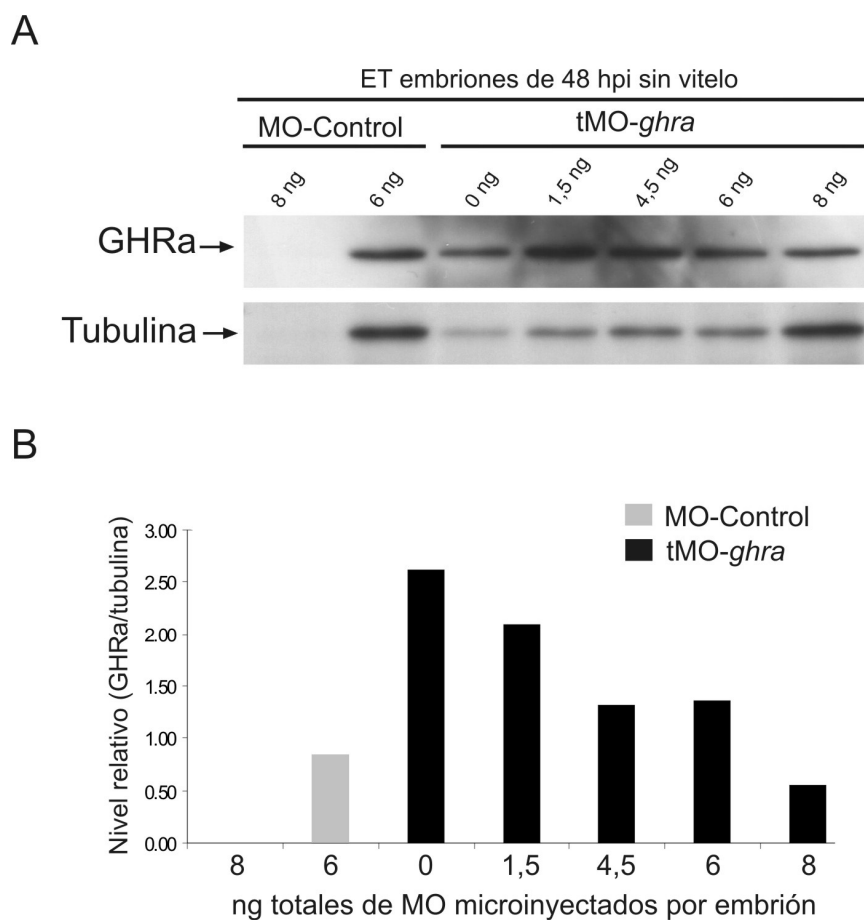
Como se menciona en la **Tabla 6**, a las mayores dosis del **tMO-ghra** (6 y 8 ng) se observaron 3 fenotipos distintivos respecto a los controles y a los WT, cuyas características se describen en el siguiente cuadro y pueden también observarse en la **Figura 48**.

FENOTIPO severo (A)	FENOTIPO intermedio (B)	FENOTIPO leve (C)
Leve edema cardíaco	Leve edema cardíaco	Leve edema cardíaco
Tamaño del cuerpo reducido.	Tamaño del cuerpo reducido	Tamaño del cuerpo reducido.
Extensión del saco vitelino angosta o ausente.	Extensión del saco vitelino angosta.	—
Tronco Doblado	Tronco recto	Tronco recto

Para el caso del **tMO-ghra** a partir de la dosis de 4,5 ng (**Fig. 48 y Tabla 5**) comenzaron a verse efectos fenotípicos respecto a los embriones WT y a los controles, sin embargo el porcentaje de incidencia del fenotipo en el total de inyectados es menor que respecto a las dosis de 6 y 8 ng. La presencia de un leve edema cardíaco también pudo observarse en el caso de algunos controles y a bajas concentraciones del **tMO-ghra** (datos no mostrados), por lo que podría asociarse al proceso de microinyección en general. No se observó efecto fenotípico alguno sobre los embriones al microinyector el **MO-Control** a las mayores dosis de trabajo (6 y 8 ng) (**Fig. 48 y Tabla 5**) (**MO-Control** 6 ng imágenes no mostradas).

Los embriones microinyectados fueron monitoreados hasta las 72 hpi de forma de observar la prevalencia de los fenotipos y sus características a lo largo del desarrollo (información no mostrada). En todos los casos no se observó mortalidad alguna, ni en los embriones microinyectados con las distintas dosis del **tMO-ghra** ni en los embriones controles. Para el caso de la dosis de 4,5 ng del **tMO-ghra**, a las 48 hpi no se observó ningún ejemplar con los fenotipos descritos a las 24 hpi, por lo que hubo un 100 % de recuperación del fenotipo WT. Para el caso de las dosis de 6 ng y 8 ng los % de incidencia de los fenotipos se mantuvieron constantes e iguales a los mencionados en la **Tabla 6** hasta las 72 hpi.

De forma de determinar cuantitativamente la efectividad del tMO-*ghra*, se estudió la expresión de GHRa por WB. Entre 15 y 20 embriones microinyectados con las distintas dosis de MO (**Control y tMO-*ghra***) fueron procesados (extracción del vitelo) y luego se los utilizó para obtener extractos proteicos totales (ET). Sobre estos extractos se realizó la inmunodetección de GHRa, de forma de poder evaluar el efecto dosis-respuesta sobre el blanco indirecto del tMO-*ghra*: GHRa (**Fig. 49**). Debido a que el tMO-*ghra* inhibe la traducción del mensajero de *ghra*, sería esperable observar una disminución de GHRa a medida que se incrementase la cantidad de tMO-*ghra* inyectado.



**Figura 49.** Western Blot anti-exGHRa de la curva dosis-respuesta del tMO-*ghra*. A) ET de embriones de 48 hpi sin vitelo (para cada condición) fueron obtenidos y resueltos por SDS-PAGE al 10 % y sometidos a WB utilizando los anticuerpos anti-exGHRa. En la figura se muestra sólo la banda inmunoreactiva correspondiente a GHRa. Como control de carga se muestra el WB de tubulina realizado sobre las mismas membranas luego del “striping”. B) Los niveles de GHRa y tubulina para cada condición de microinyección se cuantificaron por densitometría y se graficaron los valores relativos de GHRa respecto a tubulina (unidades arbitrarias) para cada una de las cantidades de MO inyectadas.

Como se observa en el gráfico de la **Fig.49 B**, a medida que aumenta la dosis del **tMO-ghra** microinyectada, disminuye la cantidad reactiva de GHRa. No se observó una desaparición completa de la proteína a las mayores dosis de MO, como podría esperarse para una efectividad del 100% en la inhibición de la traducción. En este punto podrían plantearse dos posibles explicaciones; por un lado, podría estar sucediendo que como GHRa es una proteína materna, como se demostró anteriormente en este trabajo, en este estadio podría aún haber remanentes de proteína materna. Otra de las explicaciones sería que, como cabe la posibilidad de reacción cruzada de los anti-exGHRa con GHRb, las bandas reactivas fuesen una mezcla de ambos receptores, y entonces la inmunoreactividad observada a altas dosis del tMO-ghra podría ser el componente de GHRb.

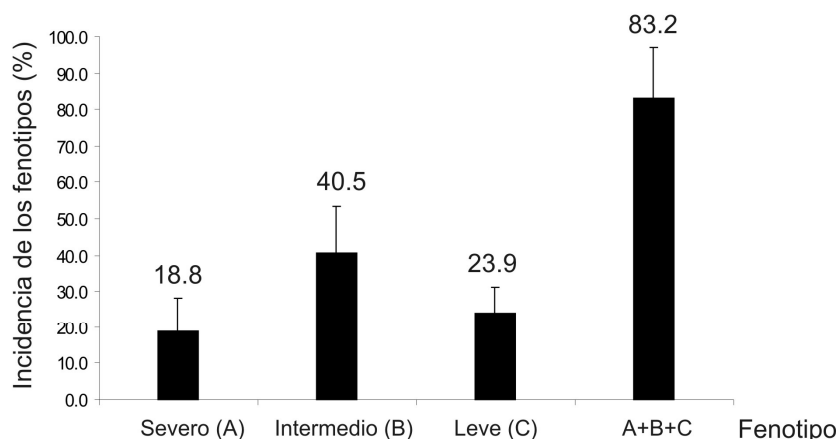
Con respecto a los controles, para el caso de la dosis de 8 ng de MO-Control, debido a que no se observaron bandas reactivas correspondientes ni a GHRa ni a tubulina, podríamos estar ante un problema de degradación del extracto proteico. Este hecho es muy frecuente en el estadio de 48 hpf, ya que en este estadio la glándula de eclosión (que le permitirá a la larva degradar y romper el corion para poder eclosionar a las 72 hpf) está casi completamente cargada de las enzimas degradativas activas (Inohaya et al., 1997) y las mismas son liberadas al realizar el proceso de desvitelinizado. Por ello, los extractos de este estadio suelen ser altamente sensibles a la degradación por estas enzimas. Si bien se tomaron precauciones para evitarlo, debido a varias experiencias previas, en muchos casos suele resultar un proceso sumamente rápido. Para el caso de la dosis de 6 ng del MO-Control, el nivel relativo de GHRa detectado es menor a los niveles observados para el caso de los embriones tratados con el tMO-ghra (**Fig. 49 B**), sin embargo, no se observó ningún tipo de efecto fenotípico al inyectar esta dosis o la de 8 ng (**Fig. 48**). Si bien estos resultados son contradictorios, en este estadio los resultados muchas veces no suelen ser consistentes debido a la elevada actividad de las enzimas hidrolíticas en este estadio. Podría estar sucediendo que algunas proteínas sean más sensibles a la degradación que otras y por ende por ejemplo si bien tubulina no se vea afectada si lo haga GHRa y por eso al relativizar los valores se no vean altos niveles relativos de GHRa. Debido a estos resultados y al hecho de que estudios recientes realizados acerca de la

técnica con MOs indican que dosis mayores a 6 ng de un MO suelen resultar en efectos inespecíficos, sobre todo debido a la activación de p53 (Bill et al., 2009; Eisen & Smith, 2008), se determinó como dosis final a microinyectar la de 6 ng de tMO-*ghra*.

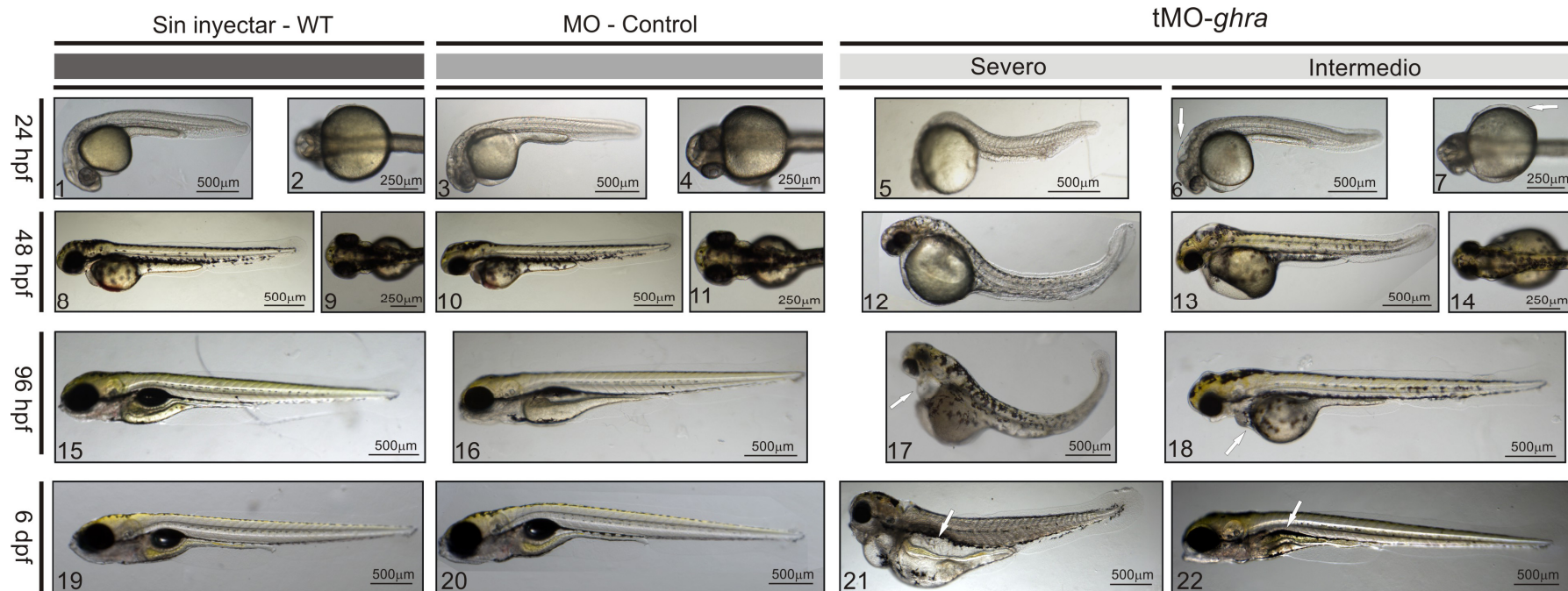
#### *Análisis del efecto de la disminución específica de GHRa mediante el tMO-ghra*

Habiéndose puesto a punto la dosis del MO, se procedió a repetir los experimentos de microinyección utilizando la dosis de 6 ng de MO (tMO-*ghra* y MO-Control), y evaluando en este caso a los ejemplares microinyectados hasta estadios más avanzados del desarrollo, de forma de hacer una descripción más minuciosa de los fenotipos observados. El seguimiento de los ejemplares microinyectados se realizó hasta los 6 dpf (registro fotográfico) **Fig. 51** y hasta los 8 dpf (registro descriptivo).

En primer lugar se realizó un análisis de la incidencia de los fenotipos descritos anteriormente (**Fig. 50**). Al igual que en el caso de la curva, no se observó la presencia de los fenotipos mencionados ni en los embriones salvajes (WT) no inyectados, ni en los embriones microinyectados con el MO-Ctrol. Para el caso de los tMO-*ghra*, en promedio, se observó la presencia del fenotipo severo en un 18.8 % de los ejemplares, del intermedio en un 40.5 % y leve en un 23.9 % (**Fig. 50**). Solo un 16.8 % de los ejemplares microinyectados mostró ausencia de fenotipo.



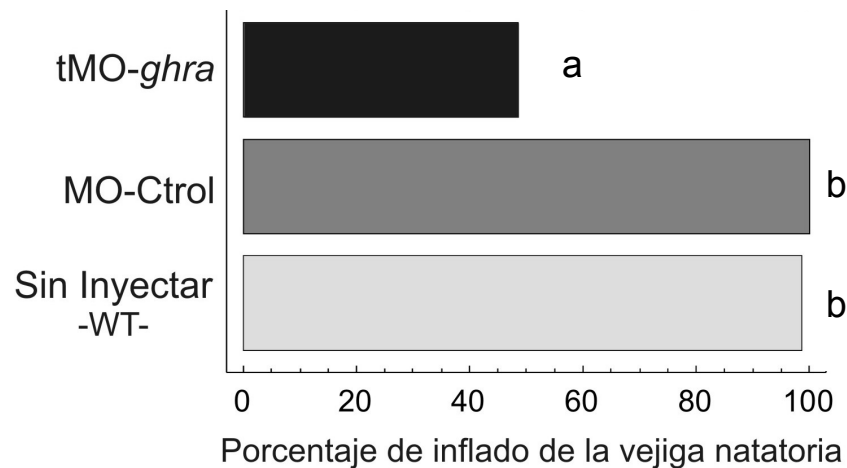
**Figura 50.** Incidencia de los fenotipos en los morfantes para *ghra*. Los embriones microinyectados con el tMO-*ghra* fueron observados a las 24 hpi, clasificados y separados de acuerdo a los fenotipos descritos anteriormente. En el gráfico se muestran los valores promedio de tres repeticiones independientes del experimento.



**Figura 51.** Fenotipos observados al microinyectar el tMO-*ghra*. En la figura se muestran micrografías de campo claro de ejemplares representativos salvajes (WT) que no fueron inyectados; de ejemplares inyectados con 6 ng del MO-Ctrol y ejemplares inyectados con 6 ng del tMO-*ghra* que mostraban fenotipo severo e intermedio. 1, 3, 5, 6, 8, 10, 12, 13, 15-22 vistas laterales; 2, 4, 7, 9, 11, 14, vistas dorsales de la región anterior. A la izquierda de cada hilera de figuras se indica el estadio del desarrollo en el cual fueron obtenidas las imágenes. La flecha en el panel 6 indica los edemas observados en la región del cerebro posterior y en el panel 7 los edemas ventrales. En el panel 17 y 18 ambas flechas señalan los edemas cardíacos. En las figuras 21 y 22 se puede observar claramente la ausencia de vejiga natatoria inflada (flechas).

Al estudiar la progresión de los fenotipos a los largo del desarrollo se observó una alta recuperación del fenotipo WT a partir de las 72 hpf en adelante para aquellos embriones que habían mostrado un fenotipo Intermedio (B) a las 24 hpi (**Fig. 51** panel 18 y 22). Una particularidad, no mencionada anteriormente, es que para muchos de los ejemplares morfantes para GHRa, que mostraron tanto fenotipo severo como intermedio, se observó a las 24 hpi la presencia de múltiples edemas (no solo cardíacos) sobre todo en las regiones ventrales y en las regiones correspondientes al cerebro posterior. Por otra parte, para el caso de los embriones con fenotipo severo, no se observó recuperación, y se observó en cambio, un aumento de los edemas a lo largo de distintas regiones del cuerpo así como también una compactación de las estructuras de las regiones anteriores, como son los ojos. También se observó un subdesarrollo y/o ausencia de las estructuras mandibulares anteriores (**Fig. 51 Panel 12 y 17**).

Debido a que las larvas fueron monitoreadas hasta estadios avanzados, a los 6 dpf se decidió evaluar el inflado de la vejiga natatoria en estos organismos, ya que este evento es fundamental para la supervivencia de los mismos y por otra parte, el mismo se observó en las larvas inyectadas con la construcción dominante negativa (dnGHRa), como se analizó anteriormente. Al realizar el estudio, en dos repeticiones independientes del mismo se observó que el porcentaje de larvas microinyectadas con el tMO-*ghra* que eran capaces de inflar la vejiga natatoria era significativamente menor ( $P < 0.00001$ ) en comparación con los ejemplares MO-Ctrol y WT (**Fig. 52**), observándose este hecho mayoritariamente en el caso de las larvas de fenotipo severo e intermedio (**Fig. 51**).



**Figura 52.** Análisis del inflado de la vejiga natatoria. En el gráfico se muestran los % promedio de inflado de la vejiga natatoria de ejemplares de 6 dpi/dpf teniendo en cuenta los resultados de dos experimentos independientes de microinyección con la dosis de 6 ng de MO y un promedio de 60 ejemplares analizados por tratamiento. Los datos de cada experimento fueron analizados por separado mediante la prueba estadística de chi-cuadrado y en ambos se concluyó que la frecuencia de inflado de la vejiga natatoria es significativamente menor en los tMO-ghra respecto a los MO-Ctrol y a los WT ( $P < 0.00001$ )

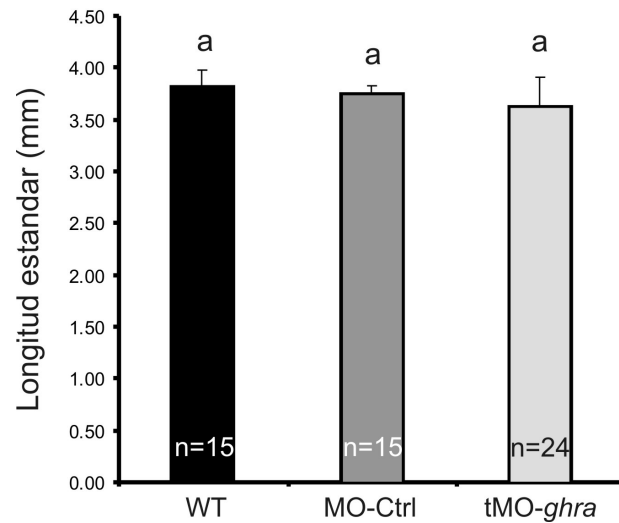
En función de lo observado en los morfantes de GHRa de fenotipo severo, aparentemente el mecanismo inicial de inflado de la vejiga natatoria no estaría desregulado ya que la larva carece de la estructura que daría origen a la vejiga natatoria, pero es capaz de llenar de aire el espacio que debería estar ocupado por dicha estructura (**Fig. 51 Panel 21**). Sin embargo, en función de lo observado en las larvas de fenotipo intermedio, ese no sería el caso, ya que estos ejemplares carecen de una región llena de aire o líquido en donde debería normalmente estar la vejiga natatoria. Es decir, que podríamos estar ante la presencia de dos posibles anormalidades causadas por la disminución de GHRa: ausencia de la estructura (fenotipo severo) o anomalías en ella que interfieran en el mecanismo de inflado de la misma (fenotipo intermedio). Teniendo en cuenta que el pez cebra es un pez fisóstomo, y por ende, la vejiga gaseosa mantiene su conexión embrionaria con el tubo digestivo a través de un conducto neumático (Finney et al., 2006), las anormalidades podrían deberse también a defectos a nivel del tubo digestivo. Por otra parte, en los morfantes de fenotipo severo, es más evidente además, una disminución global de su tamaño. También es importante mencionar que el abultamiento observado en

estas larvas morfantes en la región anterior y ventral a los 6 dpf (**Fig. 51 Panel 21**) consiste probablemente en los edemas mencionados anteriormente, cuyo tamaño aumentó con el curso del desarrollo. Estos edemas podrían ser producto de deficiencias a nivel osmoregulatorio. Si bien SL no ha sido asociada a funciones osmoregulatorias, sólo al balance ácido-base (Fukamachi et al., 2004; Fukamachi et al., 2006), se ha asociado a GH a estas funciones (Reinecke et al., 2005).

El hecho de que tengan un menor tamaño podría deberse no sólo a una dificultad en la alimentación, consecuencia de la ausencia de la vejiga natatoria que le permite mantenerse en la columna de agua para poder alimentarse, sino también, debido un mayor consumo energético por parte de estos organismos, invertido en nadar para mantenerse en posición vertical (Robertson et al., 2007).

En este punto es importante destacar que las anomalías observadas tanto en lo referente al tamaño como al inflado de la vejiga natatoria se han detectado en estadios avanzados del desarrollo larvario, donde aparentemente el efecto del MO ya no es relevante (el MO empieza a diluirse a partir de las 72 hpf (Nasevicius & Ekker, 2000). Por ende, habría un efecto temprano en el desarrollo, quizás sobre estructuras proliferativas fundamentales, cuyas fallas tempranas tendrían repercusiones bien avanzado el desarrollo.

Debido a que las larvas morfantes para GHRa tienen un tamaño reducido del cuerpo en comparación con sus contrapartes controles y WT, se decidió, además de evaluar el inflado de la vejiga natatoria, medir la longitud estándar de un n° determinado de larvas de 6 dpf de los distintos tratamientos para evidenciar si existían diferencias significativas entre cada uno de ellos. Para el caso de los ejemplares morfantes para GHRa se tomaron ejemplares de los tres fenotipos para realizar las mediciones de forma de comparar sólo los tratamientos. No se obtuvieron diferencias significativas entre la longitud estándar de los morfantes para GHRa respecto a los WT y controles, ni entre estos últimos dos grupos (Prueba estadística de Kruskal-Wallis) (**Fig. 53** ).

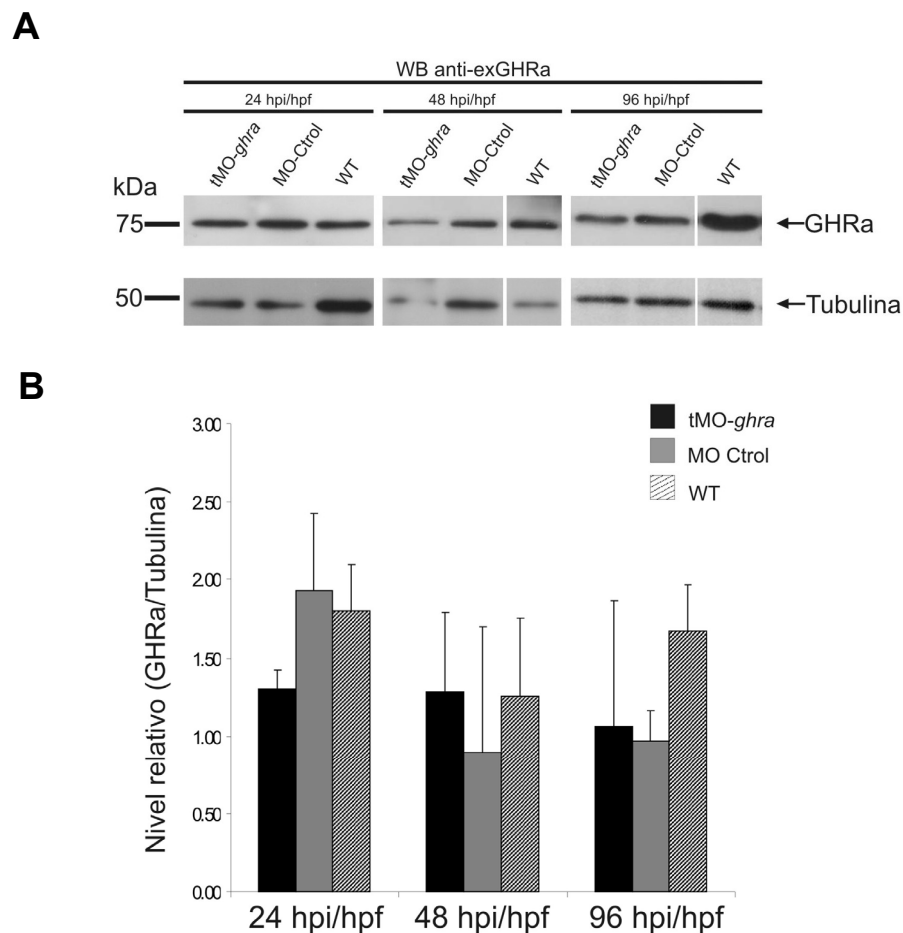


**Figura 53.** Efecto del tMO-*ghra* sobre la longitud estandar de larvas de 6 dpf/dpi. En el gráfico se encuentran representados los valores promedio de longitud estandar (mm) de larvas de 6 dpi/dpf + el desvío estándar. Estos datos fueron obtenidos de un único experimento y el nº de ejemplares analizados para cada caso se indica en cada columna. No se observaron diferencias significativas entre los morfantes para GHRa respecto a los controles y a los WT, ni entre estos dos últimos (Prueba estadística de Kruskal-Wallis y posterior Método de Dunn).

Si bien estos resultados indican que no existe una influencia de la disminución de GHRa sobre la longitud de las larvas, sería importante repetirlos, quizás aumentando el nº de ejemplares estudiados, ya que el rango de los datos para los morfantes suele ser muy amplio, y por ende, el desvío estándar es muy grande, lo que podría estar influenciando la significancia de los resultados. También los experimentos podrían repetirse tomando en cuenta otros parámetros, quizás por ejemplo, longitud total o tamaño del ojo, frecuentemente utilizados en estudios con larvas. Por otra parte es importante tener en cuenta que el crecimiento es un fenómeno que tiene lugar durante un periodo prolongado de tiempo, mucho mayor al comprendido por este estudio. Es por ello que cabe la posibilidad de que, desaparecido el efecto del morfolino, las larvas con expresión disminuida sean capaces de recuperar las cantidades normales de receptor y tengan un crecimiento compensatorio, lo que es diferente al efecto sobre la formación de nuevas estructuras embrionarias.

Por último, y al igual que para el caso de la curva dosis-respuesta, se realizaron ensayos de WB para la detección de GHRa en los ejemplares

microinyectados con el MO-Control, el tMO-*ghra*, así como también para los ejemplares WT crecidos en paralelo. Los estudios se realizaron sobre extractos totales de embriones/larvas de 24 hpi/hpf, 48 hpi/hpf y 96 hpi/hpf. Este último punto se tomó en cuenta para observar la recuperación de la expresión del receptor en los tMO-*ghra*, ya que se considera que a partir de las 72 hfi el MO se diluye y sus efectos comienzan a disminuir (Nasevicius & Ekker, 2000). En la **Figura 54 A** se observa un gel representativo de uno de los ensayos realizados, y en el gráfico (B) los valores promedio de los niveles relativos de GHRa respecto a tubulina obtenidos por densitometría de las bandas reactivas, para dos repeticiones del experimento.



**Figura 54.** Variación de los niveles de GHRa a lo largo del desarrollo en morfantes para GHRa. A) Imagen representativa mostrando los resultados de un ensayo de WB sobre extractos totales de embriones/larvas sin vitelo de los distintos tratamientos. En la figura se muestra solo la banda inmunoreactiva correspondiente a GHRa. Como control de carga se muestra el WB de tubulina realizado sobre las mismas membranas luego del “*striping*”. B) Los datos representan la media + el desvío estándar (n=2) de los valores de densitometría las bandas relativizados a los valores de densitometría de tubulina para cada condición.

Si bien estos resultados requerirían como mínimo de una repetición extra de los experimentos, para tener un  $n=3$ , y poder así aplicarles una prueba estadística de forma de evaluar si existen o no diferencias significativas entre los tratamientos; de manera preliminar podría decirse que, si bien se observan efectos fenotípicos evidentes en los morfantes para GHRa, que se perpetúan a lo largo del desarrollo, sólo pudo observarse una disminución de GHRa a las 24 hpi en relación al MO-Control y al WT. Es posible que la disminución de la proteína GHRa dispare una respuesta compensatoria que lleve a la sobreexpresión de *ghra* que neutralizaría los niveles del tMO-*ghra*, el cual no estaría siendo suficiente para mantener esa disminución y por ello, los niveles relativos de GHRa son mayores en los morfantes que en los controles a las 48 hpi. Si se tiene en cuenta el WB de la curva de calibración, realizado sobre extractos proteicos de embriones a las 48 hpi, la tendencia observada es similar, con niveles relativos de GHRa menores para el control que para el tMO-*ghra*. No obstante, como se tuvo en cuenta en ese punto, se debe considerar también la posibilidad de un efecto degradativo actuando de forma diferencial sobre las distintas proteínas de la célula. Por otra parte, es necesario tener en cuenta la importancia de un receptor para una hormona como GH en un proceso tan importante como es el desarrollo, en el cual se requiere de la proliferación celular para la formación de múltiples estructuras, y para el cual es posible que existan mecanismos de compensación alternativos en estos organismos.

Por cuestiones de tiempo, los experimentos con el sMO-*ghra* no fueron aún realizados. Los mismos permitirán validar la especificidad del fenotipo observado, ya que una redundancia en el fenotipo, obtenido mediante dos MO de secuencia blanco diferente, refuerza el hecho de que el efecto es debido a la disminución de un blanco específico. Sin embargo, se deberá tener en cuenta que los mecanismos de acción de ambos MO son diferentes; y mientras que el tMO-*ghra* es capaz de inhibir la traducción, y por ende afectará tanto el ARNm materno como el cigótico; el sMO-*ghra* solo afectará el ARNm cigótico y por ende, puede que su efecto sea menor que el observado para el tMO-*ghra*.

Los resultados de este último capítulo muestran que mediante dos enfoques diferentes empleados en el estudio de GHRa (transgénesis transiente y MOs) pudo observarse un mismo efecto fenotípico: anomalías en el proceso de inflado de la vejiga natatoria. Esto permite reforzar la hipótesis de que GHRa estaría asociado o bien al desarrollo normal de dicha estructura o a su correcto funcionamiento. Tomando en consideración los antecedentes mencionados inicialmente, en lo referente a que al utilizar MOs específicos para PRL, SL $\beta$  y en menor medida de SL $\alpha$ , se observaba que las larvas eran incapaces de inflar la vejiga natatoria (Zhu et al., 2007), y teniendo en cuenta que GHRa, agrupa dentro del clado de los SLR y posee todas las características de un SLR, podríamos estar ante una evidencia funcional para clasificar a GHRa como un SLR. Por otra parte, de estas evidencias también se desprende que, un único evento, como es el inflado de la vejiga natatoria, pero que a la vez es de vida o muerte para el organismo, parece estar regulado por múltiples factores, algunos de los cuales (SLs y PRL) tengan quizás funciones redundantes.

La vejiga natatoria del pez cebra es un órgano compuesto por dos cámaras, y una de ellas, retiene a través de un ducto neumático una conexión con el aparato digestivo, recibiendo por ello la denominación de pez fisóstomo. Además, no solo está involucrada en funciones relacionadas a la flotabilidad, sino que actuaría contribuyendo en la audición, amplificando las ondas sonoras gracias a las vértebras modificadas conocidas como osículos Weberianos (Finney et al., 2006; McCune & Carlson, 2004; Winata et al., 2009). Por otro lado, en función de sus características, análisis evolutivo, desarrollo y control génico de su desarrollo, ha sido postulada como el homólogo a los pulmones de los tetrápodos (Perry & Sander, 2004). Estudios recientes en pez cebra han indicado que varios componentes de la familia *Hedgehog* (*Hh*) estarían involucrados en el desarrollo de esta estructura de forma similar a como lo están en el desarrollo de los pulmones (Winata et al., 2009). La familia de proteínas *Hh* desempeña funciones esenciales principalmente durante el desarrollo embrionario. Son moléculas de señalización intercelular que tienen la capacidad de señalar a larga distancia (múltiples diámetros celulares) y de una manera dependiente de concentración. De los tres genes de la familia *Hh*, dos de ellos Sonic hedgehog (*Shh*), Indian hedgehog (*Ihha*) se expresan durante el desarrollo de la vejiga natatoria en el pez cebra (Winata et al., 2009).

Por otra parte, ratones mutantes compuestos *Gli2*<sup>-/-</sup> *Gli3*<sup>-/-</sup> el primordio de los pulmones está totalmente ausente (Motoyama et al., 1998), siendo los factores de transcripción *Ci*/*Gli* los componentes finales de la vía de transducción de la señal de los factores *Hh*. Además, ejemplares de pez cebra morfantos para *ihha* muestran un tamaño reducido de la vejiga y mutantes para otros componentes de la vía *Hh*, muestran subdesarrollo o ausencia de las estructuras que componen a este órgano.

Recordando el análisis de las regiones flanqueantes 5' de los *ghrs*, realizado en el capítulo uno de esta tesis, cabe destacar que para el caso particular de *ghra* se observó la presencia particular de sitios de unión para los factores de transcripción GLIS (2 y 3) del inglés *Gli* – *similar 2 ó 3*. Éstos son una subfamilia (tres miembros) de proteínas de dedos de zinc del tipo Krüppel, que actúan como factores de transcripción y han sido descubiertos recientemente. La mayor parte de los estudios se han realizado en mamíferos, y su patrón de expresión espacio-temporal durante el desarrollo embrionario sugiere que tendrían roles preponderantes en el mismo. En ratones se ha observado que los tres miembros de la familia GLIs se expresan mayoritariamente en los riñones, y por ende estarían involucrados en su desarrollo. Además, para el caso particular de GLIS2, en ratón se ha observado expresión en regiones craneales y en el tubo neural y para el caso de GLIS3 en los pulmones, testículos y el durante la neurulación. Sumado a esto, varios estudios sugieren que GLIS2 sería esencial para mantener las funciones renales normales (Kang et al., 2010). En el pez cebra existen ortólogos para los genes GLIS, aunque no existen estudios relacionados a estos genes hasta la fecha. Tomando toda esta información en consideración y el hecho de que *ghra* se expresa diferencialmente en los conductos pronéfricos, podríamos estar ante la presencia de un miembro corriente arriba de la vía de señalización de los miembros de la familia GLIS y por otro lado *ghra* podría ser a su vez ser uno de los efectores por debajo de la cascada de *Hh*. La existencia de relación entre la vía *Hh* y los factores de transcripción de la familia GLIS aún no ha sido confirmada, pero debido a su similitud con los factores *Gli* podría ser probable la misma.

# CONCLUSIONES



## CONCLUSIONES

Los resultados presentados en el presente trabajo de tesis aportan datos significativos para comprender el rol en el desarrollo embrionario temprano y tardío de algunos de los componentes del eje endocrinológico, como son los GHRs.

Comenzando con las moléculas, cuya secuencia era desconocida hasta el momento de comenzar el presente trabajo, podemos decir que se han caracterizado satisfactoriamente los ADNc completos de *ghra* y *ghrb* del pez cebra. Dicha caracterización nos permitió observar que si bien ambas secuencias poseen las características distintivas de los GHRs de peces, cada una de ellas posee particularidades (localización de residuos de cisteína o de residuos de tirosina) que podrían ser especie-específicas. Por otra parte, al realizar un análisis de sus productos proteicos y teniendo en cuenta la información sobre los mecanismos de transducción de señal estudiados en mamíferos (Tiulpakov et al., 2005), podemos decir que estas diferencias podrían no estar afectando significativamente su funcionalidad y que a pesar de las diferencias observadas en la región intracelular entre *ghra* y *ghrb* a nivel de residuos de tirosinas sólo uno de ellos podría representar diferencias a nivel funcional.

Por otra parte, el análisis filogenético de los receptores demostró que cada uno de ellos agrupa en uno de los dos clados conocidos para los GHRs de peces; el GHRa en el clado de los GHRI/SLR y el GHRb en el de los GHRII. Este estudio también nos permitió evidenciar que el GHRb es el primer GHR de un ciprínido caracterizado hasta la fecha y que GHRa estaría distanciado filogenéticamente del resto de los GHR de tipo I de ciprínidos.

La deducción de su organización génica mostró que existe correspondencia en la organización exón-intrón entre ambos genes, lo que refuerza la hipótesis de que los mismos son parálogos producto de la duplicación de un GHR ancestral ocurrida durante la duplicación completa del genoma (FSGD) ocurrida hace 450 millones de años (Fukamachi & Meyer, 2007; Volff, 2005). Por otro lado, llamativamente la organización génica de los *zghrs* difiere mucho de lo

informado en otras especies de peces (Nakao et al., 2004; Pérez-Sánchez et al., 2002), y es más similar a lo observado en vertebrados superiores como el ratón y el hombre, lo que estaría hablando de mayores similitudes entre el pez cebra y los vertebrados superiores que para con sus contrapartes acuáticos.

El análisis *in silico* de las regiones flanqueantes 5' de los *zghrs* y sus putativas regiones promotoras también evidenció la existencia de mayor similitud entre el pez cebra y los vertebrados superiores como el hombre y el ratón, y no así con las especies de peces estudiadas hasta el momento. Por otra parte este análisis permitió concluir que podríamos estar ante la presencia de un sistema regulatorio complejo tejido específico, estadio del desarrollo específico y probablemente también dependiente del estatus fisiológico del animal. Además, podrían existir como se ha observado para el caso del hombre o el ratón, múltiples sitios de inicio de la transcripción, generándose diversas isoformas del transcrito de *ghr* diferencial a nivel de su región 5' UTR.

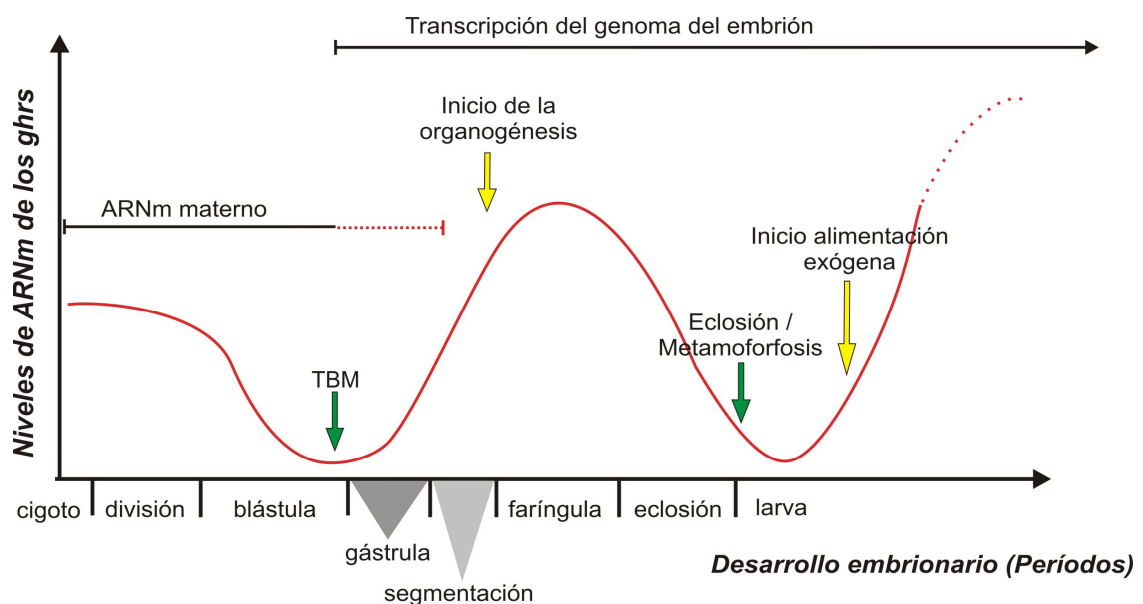
Con respecto a los estudios de expresión génica, podemos concluir que los tejidos donde se observó expresión en el caso de ambos receptores están en concordancia con lo observado en la mayoría de las especies de peces estudiadas hasta la fecha, sin embargo no así el hecho de que la misma suele ser ubicua. Sin embargo, la ausencia de expresión de en ciertos tejidos podría tener fundamento en el hecho de que según estudios recientes (Gomez-Requeni et al., 2010) el pez cebra no estaría creciendo más allá de los 65 dpf y como para la realización de los estudios los tejidos fueron extraídos de peces de un año de edad podría estar influenciando este factor.

Por otra parte la identificación y caracterización de isoformas para *ghra* y *ghrb* estaría indicando la presencia de complejos mecanismos regulatorios en lo que respecta a sus roles dentro del eje somatotrófico. Además la existencia para *ghrb* de isoformas truncas similares a las existentes en mamíferos refuerza el hecho muchas veces hipotetizado de que los GHRII serían los verdaderos receptores de GH y los parálogos más similares al gen ancestral que sufrió la duplicación específica.

Con respecto a la expresión de los *ghrs* en el desarrollo embrionario, su presencia desde estadios tempranos del desarrollo, sumado al hecho de que en función de las evidencias se trata de transcritos de origen materno, estaría hablando de una importancia crucial de los mismos en eventos trascendentes

para el desarrollo embrionario, que probablemente difieran de su rol en los peces adultos.

Tomando en consideración toda la información existente hasta el momento en peces, junto a lo estudiado para el caso del pez cebra, podría decirse que durante el desarrollo embrionario temprano y tardío ocurrirían dos grandes disminuciones en los niveles de expresión de los GHRs (**Fig. 55**). En principio, habría una primera disminución asociada al agotamiento o degradación de los ARNm de origen materno, previo al comienzo de la transcripción del genoma del cigoto. Luego, producto de la transcripción cigótica, los ARNm de los *ghrs* volverían a acumularse hasta alcanzar altos niveles de expresión (mayores que los maternos), ocurriendo un pico previo al inicio de la metamorfosis (en peces que sufren metamorfosis) o previo a la eclosión, donde volverían a caer para luego volver gradualmente a aumentar.



**Figura 55.** Diagrama representando la variación en los niveles de ARNm para los *ghrs* observadas en peces. La altura de los picos no tiene una significancia cuantitativa exacta. Han sido diagramados empleando los datos de todas las especies de peces estudiadas hasta el momento. En el eje de abscisas se encuentran indicados los períodos del desarrollo embrionario temprano de acuerdo a (Kimmel et al., 1995).

Los estudios realizados a nivel proteico para GHRa en el desarrollo embrionario representan los primeros de este tipo hechos en peces. De ello también se desprende que GHRa es una proteína de origen materno, reforzando la hipótesis de que poseería un rol preponderante en las etapas más tempranas del desarrollo embrionario. Esto contrastaría con la idea (influenciada por estudios de mamíferos) de que el desarrollo embrionario sería independiente de las hormonas.

La concordancia espacio-temporal de ARNm y proteína (*in situs* e inmunolocalizaciones) estaría hablando de un rol funcional real en las estructuras observadas.

Finalmente, la consecuencia fenotípica evidente (no inflado de la vejiga natatoria) del bloqueo de la señalización de GHRa o de la disminución de la proteína, está hablando en primer lugar de un rol preponderante de este receptor, y también de la vía GH/SL en el desarrollo y/o correcto funcionamiento de este órgano. Por otro lado, sugiere que dicha vía es funcional quizás tardíamente en el desarrollo o quizás hay un efecto compensatorio de GHRb, debido a funciones redundantes entre estos receptores, ya que para el caso de los dominantes negativos no se ven efectos en el desarrollo temprano sino más tardíamente.

Teniendo en cuenta estos resultados acerca de la funcionalidad de GHRa en el proceso de inflado de la vejiga natatoria, los estudios realizados con MOs donde la disminución de las SLs está asociada a la incapacidad de las larvas de inflar la vejiga natatoria (Zhu et al., 2007) y al hecho de que GHRa agrupa dentro del clado de los SLR y posee todas las características de un SLR, podríamos estar ante una evidencia funcional para clasificar a GHRa como un SLR.

## RESUMEN

Dado que el crecimiento de organismos acuáticos es el aspecto más importante en el desarrollo de las actividades tendientes a su aprovechamiento, tener conocimientos suficientes sobre este proceso es fundamental, sobre todo en las etapas tempranas de la vida de los organismos, ya que suelen ser las menos estudiadas y las más problemáticas a nivel productivo. En los vertebrados, el eje somatotrópico, con la hormona de crecimiento (GH) como pieza central, regula el crecimiento integrando los múltiples factores que lo influyen. Sin embargo, en los peces, GH está implicada en múltiples funciones fisiológicas, además del crecimiento, lo que hace al sistema relativamente más complejo. Sus acciones son iniciadas por su unión al receptor (GHR), localizado en la membrana celular de los tejidos diana. En el presente trabajo de tesis, trabajando con el organismo modelo *Danio rerio*, se caracterizaron dos tipos de *ghrs*, denominados *ghra* y *ghrb*, que se corresponden con los GHR de tipo I y de tipo II caracterizados en peces hasta el momento. Al estudiar sus patrones de expresión temporal en los tejidos adultos, la misma se observó en hígado, al igual que en el resto de las especies estudiadas, aunque también se observó expresión en otros tejidos, corroborando las funciones pleiotrópicas de GH. Los estudios de expresión temporal y espacio-temporal de los *ghrs* durante el desarrollo embrionario mostraron que ambos son de origen materno y continúan expresándose a lo largo del desarrollo temprano, inicialmente de forma ubicua y luego se van localizando en estructuras específicas del embrión, con posible relevancia funcional. Utilizando anticuerpos policlonales contra el dominio extracelular GHRa, desarrollados en nuestro laboratorio, se determinó, por primera vez, que esta proteína es de origen materno y su expresión se mantiene durante todo el desarrollo embrionario temprano y tardío, lo que sugiere un rol importante para este receptor en la vida temprana del pez. Estudios de la expresión espacio-temporal de GHRa mostraron que la proteína coexistiría espacialmente y temporalmente con su ARNm. Mediante la utilización de técnicas de transgénesis y de silenciamiento génico temporal, se observó que GHRa estaría implicada en el desarrollo y/o funcionamiento de la vejiga natatoria.

Estudios más profundos sobre las cascadas de expresión de genes en los diferentes órganos o tejidos en los que se expresa durante el desarrollo embrionario permitirán dilucidar su función en los mismos.

# BIBLIOGRAFÍA



---

**BIBLIOGRAFÍA**

- Abir, R., Garor, R., Felz, C., Nitke, S., Krissi, H., and Fisch, B. (2008). Growth hormone and its receptor in human ovaries from fetuses and adults. *Fertil Steril* *90*, 1333-1339.
- Agarwal, S. K., Cogburn, L. A., and Burnside, J. (1994). Dysfunctional growth hormone receptor in a strain of sex-linked dwarf chicken: evidence for a mutation in the intracellular domain. *J Endocrinol* *142*, 427-434.
- Ahmed, A. S., Xiong, F., Pang, S. C., He, M. D., Waters, M. J., Zhu, Z. Y., and Sun, Y. H. (2011). Activation of GH signaling and GH-independent stimulation of growth in zebrafish by introduction of a constitutively activated GHR construct. *Transgenic Res* *20*, 557-567.
- Albalat, A., Gomez-Requeni, P., Rojas, P., Medale, F., Kaushik, S., Vianen, G. J., Van den Thillart, G., Gutierrez, J., Perez-Sanchez, J., and Navarro, I. (2005). Nutritional and hormonal control of lipolysis in isolated gilthead seabream (*Sparus aurata*) adipocytes. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* *289*, R259-265.
- Amit, T., Bergman, T., Dastot, F., Youdim, M. B., Amselem, S., and Hochberg, Z. (1997). A membrane-fixed, truncated isoform of the human growth hormone receptor. *J Clin Endocrinol Metab* *82*, 3813-3817.
- Ayson, F. G., Kaneko, T., Hasegawa, S., and Hirano, T. (1994). Differential expression of two prolactin and growth hormone genes during early development of tilapia (*Oreochromis mossambicus*) in fresh water and seawater: implications for possible involvement in osmoregulation during early life stages. *Gen Comp Endocrinol* *95*, 143-152.
- Babin, P. J., Thisse, C., Durliat, M., Andre, M., Akimenko, M. A., and Thisse, B. (1997). Both apolipoprotein E and A-I genes are present in a nonmammalian vertebrate and are highly expressed during embryonic development. *Proc Natl Acad Sci U S A* *94*, 8622-8627.
- Banchio, C., Schang, L. M., and Vance, D. E. (2004). Phosphorylation of Sp1 by cyclin-dependent kinase 2 modulates the role of Sp1 in CTP:phosphocholine cytidyltransferase alpha regulation during the S phase of the cell cycle. *J Biol Chem* *279*, 40220-40226.
- Bass, S. H., Mulkerrin, M. G., and Wells, J. A. (1991). A systematic mutational analysis of hormone-binding determinants in the human growth hormone receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A* *88*, 4498-4502.
- Baumann, G. (1995). Growth hormone binding protein--errant receptor or active player? *Endocrinology* *136*, 377-378.
- Baumann, G. (2002). Growth hormone binding protein. The soluble growth hormone receptor. *Minerva Endocrinol* *27*, 265-276.
- Bendtsen, J. D., Nielsen, H., von Heijne, G., and Brunak, S. (2004). Improved prediction of signal peptides: SignalP 3.0. *J Mol Biol* *340*, 783-795.
- Benedet, S., Johansson, V., Sweeney, G., Galay-Burgos, M., and Björnsson, B. (2005). Cloning of two Atlantic salmon growth hormone receptor isoforms and *in vitro* ligand-binding response. *Fish Physiology and Biochemistry* *31*, 315-329.
- Biga, P. R., and Goetz, F. W. (2006). Zebrafish and giant danio as models for muscle growth: determinate vs. indeterminate growth as determined by morphometric analysis. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* *291*, R1327-1337.

- 
- Bill, B. R., Petzold, A. M., Clark, K. J., Schimmenti, L. A., and Ekker, S. C. (2009). A primer for morpholino use in zebrafish. *Zebrafish* 6, 69-77.
- Björnsson, B., Johansson, V., Benedet, S., Einarsdottir, I., Hildahl, J., Agustsson, T., and Jónsson, E. (2002). Growth Hormone Endocrinology of Salmonids: Regulatory Mechanisms and Mode of Action. *Fish Physiology and Biochemistry* 27, 227-242.
- Blom, N., Gammeltoft, S., and Brunak, S. (1999). Sequence and structure-based prediction of eukaryotic protein phosphorylation sites. *J Mol Biol* 294, 1351-1362.
- Briggs, J. P. (2002). The zebrafish: a new model organism for integrative physiology. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 282, R3-9.
- Calduch-Giner, J., Duval, H., Chesnel, F., Boeuf, G., Perez-Sanchez, J., and Boujard, D. (2001). Fish growth hormone receptor: molecular characterization of two membrane-anchored forms. *Endocrinology* 142, 3269-3273.
- Calduch-Giner, J. A., Mingarro, M., Vega-Rubin de Celis, S., Boujard, D., and Perez-Sanchez, J. (2003). Molecular cloning and characterization of gilthead sea bream (*Sparus aurata*) growth hormone receptor (GHR). Assessment of alternative splicing. *Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol* 136, 1-13.
- Calduch-Giner, J. A., Pendon, C., Valdivia, M. M., and Perez-Sanchez, J. (1998). Recombinant somatolactin as a stable and bioactive protein in a cell culture bioassay: development and validation of a sensitive and reproducible radioimmunoassay. *J Endocrinol* 156, 441-447.
- Calduch-Giner, J. A., Sitja-Bobadilla, A., Alvarez-Pellitero, P., and Perez-Sanchez, J. (1995). Evidence for a direct action of GH on haemopoietic cells of a marine fish, the gilthead sea bream (*Sparus aurata*). *J Endocrinol* 146, 459-467.
- Calduch-Giner, J. A., Sitja-Bobadilla, A., Alvarez-Pellitero, P., and Perez-Sanchez, J. (1997). Growth hormone as an in vitro phagocyte-activating factor in the gilthead sea bream (*Sparus aurata*). *Cell Tissue Res* 287, 535-540.
- Canepa, M. M., Zhu, Y., Fossati, M., Stiller, J. W., and Vissio, P. G. (2012). Cloning, phylogenetic analysis and expression of somatolactin and its receptor in *Cichlasoma dimerus*: Their role in long-term background color acclimation. *Gen Comp Endocrinol* 176, 52-61.
- Canosa, L. F., Chang, J. P., and Peter, R. E. (2007). Neuroendocrine control of growth hormone in fish. *Gen Comp Endocrinol* 151, 1-26.
- Cerio, R. J., Xing, F., Fatula, R. J., Keith, D. E., Yang, X., Talamantes, F., Southard, J. N., and Southard, J. N. (2002). Structurally distinct membrane-associated and soluble forms of GH-binding protein in the mouse. *J Endocrinol* 172, 321-331.
- Company, R., Calduch-Giner, J. A., Kaushik, S., and Perez-Sanchez, J. (1999). Growth performance and adiposity in gilthead seabream (*Sparus aurata*): risks and benefits of high energy diets. *Aquaculture* 171, 279-292.
- Chapman, S. C., Sawitzke, A. L., Campbell, D. S., and Schoenwolf, G. C. (2005). A three-dimensional atlas of pituitary gland development in the zebrafish. *J Comp Neurol* 487, 428-440.
- Chard, T. (1989). Hormonal control of growth in the human fetus. *J Endocrinol* 123, 3-9.
- Chu, J., and Sadler, K. C. (2009). New school in liver development: lessons from zebrafish. *Hepatology* 50, 1656-1663.
- Dastot, F., Sobrier, M. L., Duquesnoy, P., Duriez, B., Goossens, M., and Amselem, S. (1996). Alternatively spliced forms in the cytoplasmic domain of the human growth hormone (GH)

---

receptor regulate its ability to generate a soluble GH-binding protein. *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**, 10723-10728.

de Azevedo Figueiredo, M., Lanes, C. F., Almeida, D. V., Proietti, M. C., and Marins, L. F. (2007). The effect of GH overexpression on GHR and IGF-I gene regulation in different genotypes of GH-transgenic zebrafish. *Comp Biochem Physiol Part D Genomics Proteomics* **2**, 228-233.

de Vos, A. M., Ultsch, M., and Kossiakoff, A. A. (1992). Human growth hormone and extracellular domain of its receptor: crystal structure of the complex. *Science* **255**, 306-312.

Devlin, R. H., Yesaki, T. Y., Biagi, C. A., Donaldson, E. M., Swanson, P., and Chan, W.-K. (1994). Extraordinary salmon growth. *Nature* **371**, 209-210.

Dunham, R. A. (2004). Chapter 10: Gene-transfer Technology, In *Aquaculture and fisheries biotechnology : genetic approaches* CABI Pub. Wallingford, Oxfordshire, UK ; Cambridge, MA, USA. pp. xi, 372 p.

Edens, A., and Talamantes, F. (1998). Alternative processing of growth hormone receptor transcripts. *Endocr Rev* **19**, 559-582.

Eisen, J. S., and Smith, J. C. (2008). Controlling morpholino experiments: don't stop making antisense. *Development* **135**, 1735-1743.

Ekker, S. C. (2000). Morphants: a new systematic vertebrate functional genomics approach. *Yeast* **17**, 302-306.

Ekker, S. C., and Larson, J. D. (2001). Morphant technology in model developmental systems. *Genesis* **30**, 89-93.

Filby, A. L., and Tyler, C. R. (2007). Cloning and characterization of cDNAs for hormones and/or receptors of growth hormone, insulin-like growth factor-I, thyroid hormone, and corticosteroid and the gender-, tissue-, and developmental-specific expression of their mRNA transcripts in fathead minnow (*Pimephales promelas*). *Gen Comp Endocrinol* **150**, 151-163.

Finney, J. L., Robertson, G. N., McGee, C. A., Smith, F. M., and Croll, R. P. (2006). Structure and autonomic innervation of the swim bladder in the zebrafish (*Danio rerio*). *J Comp Neurol* **495**, 587-606.

Florini, J. R., Ewton, D. Z., and Coolican, S. A. (1996). Growth hormone and the insulin-like growth factor system in myogenesis. *Endocr Rev* **17**, 481-517.

Frick, G. P., Tai, L. R., Baumbach, W. R., and Goodman, H. M. (1998). Tissue distribution, turnover, and glycosylation of the long and short growth hormone receptor isoforms in rat tissues. *Endocrinology* **139**, 2824-2830.

Frohman, M. A. (1994). On beyond classic RACE (rapid amplification of cDNA ends). *PCR Methods Appl* **4**, S40-58.

Fuentes, E., Poblete, E., Reyes, A. E., Vera, M. I., Alvarez, M., and Molina, A. (2008). Dynamic expression pattern of the growth hormone receptor during early development of the Chilean flounder. *Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol* **150**, 93-102.

Fuentes, E. N., Bjornsson, B. T., Valdes, J. A., Einarsdottir, I. E., Lorca, B., Alvarez, M., and Molina, A. (2011). IGF-I/PI3K/Akt and IGF-I/MAPK/ERK pathways in vivo in skeletal muscle are regulated by nutrition and contribute to somatic growth in the fine flounder. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* **300**, R1532-1542.

Fuentes, E. N., Einarsdottir, I. E., Valdes, J. A., Alvarez, M., Molina, A., and Bjornsson, B. T. (2012). Inherent growth hormone resistance in the skeletal muscle of the fine flounder is

---

modulated by nutritional status and is characterized by high contents of truncated GHR, impairment in the JAK2/STAT5 signaling pathway, and low IGF-I expression. *Endocrinology* **153**, 283-294.

Fukada, H., Ozaki, Y., Pierce, A. L., Adachi, S., Yamauchi, K., Hara, A., Swanson, P., and Dickhoff, W. W. (2004). Salmon growth hormone receptor: molecular cloning, ligand specificity, and response to fasting. *Gen Comp Endocrinol* **139**, 61-71.

Fukada, H., Ozaki, Y., Pierce, A. L., Adachi, S., Yamauchi, K., Hara, A., Swanson, P., and Dickhoff, W. W. (2005). Identification of the salmon somatolactin receptor, a new member of the cytokine receptor family. *Endocrinology* **146**, 2354-2361.

Fukamachi, S., and Meyer, A. (2007). Evolution of receptors for growth hormone and somatolactin in fish and land vertebrates: lessons from the lungfish and sturgeon orthologues. *J Mol Evol* **65**, 359-372.

Fukamachi, S., Sugimoto, M., Mitani, H., and Shima, A. (2004). Somatolactin selectively regulates proliferation and morphogenesis of neural-crest derived pigment cells in medaka. *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**, 10661-10666.

Fukamachi, S., Wakamatsu, Y., and Mitani, H. (2006). Medaka double mutants for color interfere and leucophore free: characterization of the xanthophore-somatolactin relationship using the leucophore free gene. *Dev Genes Evol* **216**, 152-157.

Fukamachi, S., Yada, T., and Mitani, H. (2005). Medaka receptors for somatolactin and growth hormone: phylogenetic paradox among fish growth hormone receptors. *Genetics* **171**, 1875-1883.

Gabillard, J. C., Yao, K., Vandeputte, M., Gutierrez, J., and Le Bail, P. Y. (2006). Differential expression of two GH receptor mRNAs following temperature change in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *J Endocrinol* **190**, 29-37.

Gasteiger, E., Hoogland, C., Gattiker, A., Duvaud, S., Wilkins, M. R., Appel, R. D., and Bairoch, A. (2005). Protein Identification and Analysis Tools on the ExPASy Server, In *The Proteomics Protocols Handbook*, J. M. Walker, ed. Humana Press Totowa, NJ. pp. 571-607.

Godowski, P. J., Leung, D. W., Meacham, L. R., Galgani, J. P., Hellmiss, R., Keret, R., Rotwein, P. S., Parks, J. S., Laron, Z., and Wood, W. I. (1989). Characterization of the human growth hormone receptor gene and demonstration of a partial gene deletion in two patients with Laron-type dwarfism. *Proc Natl Acad Sci U S A* **86**, 8083-8087.

Goh, E. L., Pircher, T. J., Wood, T. J., Norstedt, G., Graichen, R., and Lobie, P. E. (1997). Growth hormone-induced reorganization of the actin cytoskeleton is not required for STAT5 (signal transducer and activator of transcription-5)-mediated transcription. *Endocrinology* **138**, 3207-3215.

Gomez-Requeni, P., Conceicao, L. E., Olderbakk Jordal, A. E., and Ronnestad, I. (2010). A reference growth curve for nutritional experiments in zebrafish (*Danio rerio*) and changes in whole body proteome during development. *Fish Physiol Biochem* **36**, 1199-1215.

Gomez, J. M., Loir, M., and Le Gac, F. (1998). Growth hormone receptors in testis and liver during the spermatogenic cycle in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Biol Reprod* **58**, 483-491.

Gomez, J. M., Mourot, B., Fostier, A., and Le Gac, F. (1999). Growth hormone receptors in ovary and liver during gametogenesis in female rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *J Reprod Fertil* **115**, 275-285.

Gonzalez, L., Curto, L. M., Miquet, J. G., Bartke, A., Turyn, D., and Sotelo, A. I. (2007). Differential regulation of membrane associated-growth hormone binding protein (MA-GHBP)

- and growth hormone receptor (GHR) expression by growth hormone (GH) in mouse liver. *Growth Horm IGF Res* 17, 104-112.
- Goodyer, C. G., Zogopoulos, G., Schwartzbauer, G., Zheng, H., Hendy, G. N., and Menon, R. K. (2001). Organization and evolution of the human growth hormone receptor gene 5'-flanking region. *Endocrinology* 142, 1923-1934.
- Govers, R., van Kerkhof, P., Schwartz, A. L., and Strous, G. J. (1997). Linkage of the ubiquitin-conjugating system and the endocytic pathway in ligand-induced internalization of the growth hormone receptor. *Embo J* 16, 4851-4858.
- Gray, E. S., and Tsai, R. W. (1994). Characterization of striped bass growth hormone receptors by disulfide-bond reduction and cross-linking studies. *J Exp Zool* 268, 428-435.
- Guille, M. (1999). *Molecular methods in developmental biology : Xenopus and zebrafish*. Humana Press Totowa, N.J.
- Guner, B., Ozacar, A. T., Thomas, J. E., and Karlstrom, R. O. (2008). Graded hedgehog and fibroblast growth factor signaling independently regulate pituitary cell fates and help establish the pars distalis and pars intermedia of the zebrafish adenohypophysis. *Endocrinology* 149, 4435-4451.
- Hadden, D. R., and Prout, T. E. (1964). A Growth Hormone Binding Protein in Normal Human Serum. *Nature* 202, 1342-1343.
- Haffter, P., Granato, M., Brand, M., Mullins, M. C., Hammerschmidt, M., Kane, D. A., Odenthal, J., van Eeden, F. J., Jiang, Y. J., Heisenberg, C. P., *et al.* (1996). The identification of genes with unique and essential functions in the development of the zebrafish, *Danio rerio*. *Development* 123, 1-36.
- Hamilton, F. (1822). *An account of the fishes found in the river Ganges and its branches*. Printed for A. Constable and company; [etc. Edinburgh,.
- Harding, R. L., Howley, S., Baker, L. J., Murphy, T. R., Archer, W. E., Wistow, G., Hyde, D. R., and Vihtelic, T. S. (2008). Lengsin expression and function during zebrafish lens formation. *Exp Eye Res* 86, 807-818.
- Harvey, S. (2010). Extrapituitary growth hormone. *Endocrine* 38, 335-359.
- Harvey, S., Scanes, C. G., and Daughaday, W. H. (1995). *Growth hormone*. CRC Press Boca Raton.
- Helvik, J. V., Hamre, K., Terje van der Meeren, I. H., Ressem, H., Schartl, M., Tveiten, H., Tromsø, N., and Øie, G. (2009). *The fish larva: a transitional life form, the foundation for aquaculture and fisheries*. The Research Council of Norway. Oslo.
- Herrero-Turrion, M. J., Rodriguez, R. E., Velasco, A., Aijon, J., and Lara, J. M. (2003a). Differential expression and cellular localization of somatolactin-1 and -2 during early development in the gilthead sea bream. *Gen Comp Endocrinol* 132, 77-87.
- Herrero-Turrion, M. J., Rodriguez, R. E., Velasco, A., Gonzalez-Sarmiento, R., Aijon, J., and Lara, J. M. (2003b). Growth hormone expression in ontogenic development in gilthead sea bream. *Cell Tissue Res* 313, 81-91.
- Herzog, W., Zeng, X., Lele, Z., Sonntag, C., Ting, J. W., Chang, C. Y., and Hammerschmidt, M. (2003). Adenohypophysis formation in the zebrafish and its dependence on sonic hedgehog. *Dev Biol* 254, 36-49.
- Hildahl, J., Galay-Burgos, M., Sweeney, G., Einarsdottir, I. E., and Bjornsson, B. T. (2007). Identification of two isoforms of Atlantic halibut insulin-like growth factor-I receptor genes and

---

quantitative gene expression during metamorphosis. *Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol* 147, 395-401.

Hildahl, J., Power, D. M., Björnsson, B. T., and Einarsdóttir, I. E. (2008). Involvement of growth hormone-insulin-like growth factor I system in cranial remodeling during halibut metamorphosis as indicated by tissue- and stage-specific receptor gene expression and the presence of growth hormone receptor protein. *Cell Tissue Res* 332, 211-225.

Inohaya, K., Yasumasu, S., Araki, K., Naruse, K., Yamazaki, K., Yasumasu, I., Iuchi, I., and Yamagami, K. (1997). Species-dependent migration of fish hatching gland cells that express astacin-like proteases in common [corrected]. *Dev Growth Differ* 39, 191-197.

Jiao, B., Huang, X., Chan, C. B., Zhang, L., Wang, D., and Cheng, C. H. (2006). The co-existence of two growth hormone receptors in teleost fish and their differential signal transduction, tissue distribution and hormonal regulation of expression in seabream. *J Mol Endocrinol* 36, 23-40.

Johnston, I. A., Bower, N. I., and Macqueen, D. J. (2011). Growth and the regulation of myotomal muscle mass in teleost fish. *J Exp Biol* 214, 1617-1628.

Jowett, T., and Lettice, L. (1994). Whole-mount in situ hybridizations on zebrafish embryos using a mixture of digoxigenin- and fluorescein-labelled probes. *Trends Genet* 10, 73-74.

Kane, D. A., and Kimmel, C. B. (1993). The zebrafish midblastula transition. *Development* 119, 447-456.

Kang, H. S., ZeRuth, G., Lichti-Kaiser, K., Vasanth, S., Yin, Z., Kim, Y. S., and Jetten, A. M. (2010). Gli-similar (Glis) Kruppel-like zinc finger proteins: insights into their physiological functions and critical roles in neonatal diabetes and cystic renal disease. *Histol Histopathol* 25, 1481-1496.

Kaplan, S. A., and Cohen, P. (2007). The somatomedin hypothesis 2007: 50 years later. *J Clin Endocrinol Metab* 92, 4529-4535.

Kardong, K. (2006). *Vertebrados: anatomía comparada, función y evolución* 4a Ed edn. McGraw-Hill / Interamericana de España, S.A. Madrid.

Kawakami, K. (2004). Transgenesis and gene trap methods in zebrafish by using the Tol2 transposable element. *Methods Cell Biol* 77, 201-222.

Kawakami, K. (2005). Transposon tools and methods in zebrafish. *Dev Dyn* 234, 244-254.

Kawakami, K. (2007). Tol2: a versatile gene transfer vector in vertebrates. *Genome Biol* 8 *Suppl* 1, S7.

Kawauchi, H., and Sower, S. A. (2006). The dawn and evolution of hormones in the adenyohypophysis. *Gen Comp Endocrinol* 148, 3-14.

Kent, G., Mergelas, J. A., and Goodyer, C. G. (2008). Developmental changes in the human GH receptor and its signal transduction pathways. *J Endocrinol* 198, 71-82.

Kimmel, C. B., Ballard, W. W., Kimmel, S. R., Ullmann, B., and Schilling, T. F. (1995). Stages of embryonic development of the zebrafish. *Dev Dyn* 203, 253-310.

Kopchick, J. J., and Andry, J. M. (2000). Growth hormone (GH), GH receptor, and signal transduction. *Mol Genet Metab* 71, 293-314.

Kumar, S., Tamura, K., and Nei, M. (2004). MEGA3: Integrated software for Molecular Evolutionary Genetics Analysis and sequence alignment. *Brief Bioinform* 5, 150-163.

- 
- Laemmli, U. K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227, 680-685.
- Lai, Z., Roos, P., Zhai, O., Olsson, Y., Fohlenhag, K., Larsson, C., and Nyberg, F. (1993). Age-related reduction of human growth hormone-binding sites in the human brain. *Brain Res* 621, 260-266.
- Lanning, N. J., and Carter-Su, C. (2006). Recent advances in growth hormone signaling. *Rev Endocr Metab Disord* 7, 225-235.
- Larkin, M. A., Blackshields, G., Brown, N. P., Chenna, R., McGettigan, P. A., McWilliam, H., Valentin, F., Wallace, I. M., Wilm, A., Lopez, R., *et al.* (2007). Clustal W and Clustal X version 2.0. *Bioinformatics* 23, 2947-2948.
- Le Roith, D., Bondy, C., Yakar, S., Liu, J. L., and Butler, A. (2001). The somatomedin hypothesis: 2001. *Endocr Rev* 22, 53-74.
- Lee, L. T., Nong, G., Chan, Y. H., Tse, D. L., and Cheng, C. H. (2001). Molecular cloning of a teleost growth hormone receptor and its functional interaction with human growth hormone. *Gene* 270, 121-129.
- Leung, D. W., Spencer, S. A., Cachianes, G., Hammonds, R. G., Collins, C., Henzel, W. J., Barnard, R., Waters, M. J., and Wood, W. I. (1987). Growth hormone receptor and serum binding protein: purification, cloning and expression. *Nature* 330, 537-543.
- Li, M., Greenaway, J., Raine, J., Petrik, J., Hahnel, A., and Leatherland, J. (2006). Growth hormone and insulin-like growth factor gene expression prior to the development of the pituitary gland in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) embryos reared at two temperatures. *Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol* 143, 514-522.
- Li, M., Raine, J. C., and Leatherland, J. F. (2007). Expression profiles of growth-related genes during the very early development of rainbow trout embryos reared at two incubation temperatures. *Gen Comp Endocrinol* 153, 302-310.
- Liao, Z. Y., and Zhu, S. Q. (2004). Identification and characterization of GH receptor and serum GH-binding protein in Chinese sturgeon (*Acipenser sinensis*). *Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai)* 36, 811-816.
- Link, V., Shevchenko, A., and Heisenberg, C. P. (2006). Proteomics of early zebrafish embryos. *BMC Dev Biol* 6, 1.
- Lobie, P. E., Allevato, G., Nielsen, J. H., Norstedt, G., and Billestrup, N. (1995). Requirement of tyrosine residues 333 and 338 of the growth hormone (GH) receptor for selected GH-stimulated function. *J Biol Chem* 270, 21745-21750.
- Lobie, P. E., Breipohl, W., Aragon, J. G., and Waters, M. J. (1990). Cellular localization of the growth hormone receptor/binding protein in the male and female reproductive systems. *Endocrinology* 126, 2214-2221.
- Lodish, H. F. (2000). *Molecular cell biology*, 4th edn. W.H. Freeman New York.
- Lopez, M., Nica, G., Motte, P., Martial, J. A., Hammerschmidt, M., and Muller, M. (2006). Expression of the somatolactin beta gene during zebrafish embryonic development. *Gene Expr Patterns* 6, 156-161.
- Ma, X., Liu, X., Zhang, Y., Zhu, P., Ye, W., and Lin, H. (2007). Two growth hormone receptors in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*): molecular characterization, tissue distribution and expression profiles in the gonad during the reproductive cycle. *Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol* 147, 325-339.

- 
- Mantovani, R. (1999). The molecular biology of the CCAAT-binding factor NF-Y. *Gene* 239, 15-27.
- Marti-Palanca, H., and Perez-Sanchez, J. (1994). Developmental regulation of growth hormone binding in the gilthead sea bream, *Sparus aurata*. *Growth Regul* 4, 14-19.
- Martínez-Porchas, M., Martínez-Córdova, L. R., and Ramos-Enríquez, R. (2009). Dinámica del crecimiento de peces y crustáceos. *REDVET* 10.
- Maures, T., Chan, S. J., Xu, B., Sun, H., Ding, J., and Duan, C. (2002). Structural, biochemical, and expression analysis of two distinct insulin-like growth factor I receptors and their ligands in zebrafish. *Endocrinology* 143, 1858-1871.
- Maures, T. J., and Duan, C. (2002). Structure, developmental expression, and physiological regulation of zebrafish IGF binding protein-1. *Endocrinology* 143, 2722-2731.
- McCune, A. R., and Carlson, R. L. (2004). Twenty ways to lose your bladder: common natural mutants in zebrafish and widespread convergence of swim bladder loss among teleost fishes. *Evol Dev* 6, 246-259.
- Mingarro, M., Vega-Rubin de Celis, S., Astola, A., Pendon, C., Valdivia, M. M., and Perez-Sanchez, J. (2002). Endocrine mediators of seasonal growth in gilthead sea bream (*Sparus aurata*): the growth hormone and somatolactin paradigm. *Gen Comp Endocrinol* 128, 102-111.
- Moffat, J. G., Edens, A., and Talamantes, F. (1999). Structure and expression of the mouse growth hormone receptor/growth hormone binding protein gene. *J Mol Endocrinol* 23, 33-44.
- Mommsen, T. P. (2001). Paradigms of growth in fish. *Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol* 129, 207-219.
- Motoyama, J., Liu, J., Mo, R., Ding, Q., Post, M., and Hui, C. C. (1998). Essential function of Gli2 and Gli3 in the formation of lung, trachea and oesophagus. *Nat Genet* 20, 54-57.
- Mudumana, S. P., Wan, H., Singh, M., Korzh, V., and Gong, Z. (2004). Expression analyses of zebrafish transferrin, ifabp, and elastaseB mRNAs as differentiation markers for the three major endodermal organs: liver, intestine, and exocrine pancreas. *Dev Dyn* 230, 165-173.
- Nakao, N., Higashimoto, Y., Ohkubo, T., Yoshizato, H., Nakai, N., Nakashima, K., and Tanaka, M. (2004). Characterization of structure and expression of the growth hormone receptor gene of the Japanese flounder (*Paralichthys olivaceus*). *J Endocrinol* 182, 157-164.
- Nakatani, Y., Takeda, H., Kohara, Y., and Morishita, S. (2007). Reconstruction of the vertebrate ancestral genome reveals dynamic genome reorganization in early vertebrates. *Genome Res* 17, 1254-1265.
- Nasevicius, A., and Ekker, S. C. (2000). Effective targeted gene 'knockdown' in zebrafish. *Nat Genet* 26, 216-220.
- Nelson, J. S. (2006). *Fishes of the World.*, 4th edn. John Wiley & Sons. Hoboken, New Jersey.
- Niall, H. D., Hogan, M. L., Sauer, R., Rosenblum, I. Y., and Greenwood, F. C. (1971). Sequences of pituitary and placental lactogenic and growth hormones: evolution from a primordial peptide by gene reduplication. *Proc Natl Acad Sci U S A* 68, 866-870.
- Nusslein-Volhard, C. (1994). Of flies and fishes. *Science* 266, 572-574.
- Ono, M., Takayama, Y., Rand-Weaver, M., Sakata, S., Yasunaga, T., Noso, T., and Kawauchi, H. (1990). cDNA cloning of somatolactin, a pituitary protein related to growth hormone and prolactin. *Proc Natl Acad Sci U S A* 87, 4330-4334.

- 
- Orlovskii, I. V., Sverdlova, P. S., and Rubtsov, P. M. (2004). [Fine structure, expression and polymorphism of the human growth hormone receptor gene]. *Mol Biol (Mosk)* 38, 29-39.
- Ozaki, Y., Fukada, H., Kazeto, Y., Adachi, S., Hara, A., and Yamauchi, K. (2006a). Molecular cloning and characterization of growth hormone receptor and its homologue in the Japanese eel (*Anguilla japonica*). *Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol* 143, 422-431.
- Ozaki, Y., Fukada, H., Tanaka, H., Kagawa, H., Ohta, H., Adachi, S., Hara, A., and Yamauchi, K. (2006b). Expression of growth hormone family and growth hormone receptor during early development in the Japanese eel (*Anguilla japonica*). *Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol* 145, 27-34.
- Pantaleon, M., Whiteside, E. J., Harvey, M. B., Barnard, R. T., Waters, M. J., and Kaye, P. L. (1997). Functional growth hormone (GH) receptors and GH are expressed by preimplantation mouse embryos: a role for GH in early embryogenesis? *Proc Natl Acad Sci U S A* 94, 5125-5130.
- Parker, G. A. (1992). The evolution of sexual size dimorphism in fish\*. *Journal of Fish Biology* 41, 1-20.
- Pérez-Sánchez, J., Caldusch-Giner, J. A., Mingarro, M., Vega-Rubín de Celis, S., Gómez-Requeni, P., Saera-Vila, A., Astola, A., and Valdivia, M. M. (2002). Overview of Fish Growth Hormone Family. *New Insights in Genomic Organization and Heterogeneity of Growth Hormone Receptors. Fish Physiology and Biochemistry* 27, 243-258.
- Perez Sanchez, J., Smal, J., and Le Bail, P. Y. (1991). Location and characterization of growth hormone binding sites in the central nervous system of a teleost fish (*Oncorhynchus mykiss*). *Growth Regul* 1, 145-152.
- Perry, S. F. (2010). *Zebrafish*, 1st edn. Academic Press/Elsevier Amsterdam ; London.
- Perry, S. F., and Sander, M. (2004). Reconstructing the evolution of the respiratory apparatus in tetrapods. *Respir Physiol Neurobiol* 144, 125-139.
- Pierce, A. L., Fox, B. K., Davis, L. K., Visitacion, N., Kitahashi, T., Hirano, T., and Grau, E. G. (2007). Prolactin receptor, growth hormone receptor, and putative somatolactin receptor in Mozambique tilapia: tissue specific expression and differential regulation by salinity and fasting. *Gen Comp Endocrinol* 154, 31-40.
- Poupard, G., Andre, M., Durliat, M., Ballagny, C., Boeuf, G., and Babin, P. J. (2000). Apolipoprotein E gene expression correlates with endogenous lipid nutrition and yolk syncytial layer lipoprotein synthesis during fish development. *Cell Tissue Res* 300, 251-261.
- Rand-Weaver, M., Noso, T., Muramoto, K., and Kawauchi, H. (1991). Isolation and characterization of somatolactin, a new protein related to growth hormone and prolactin from Atlantic cod (*Gadus morhua*) pituitary glands. *Biochemistry* 30, 1509-1515.
- Reinecke, M. (2009). *Insulin-like Growth Factors and Fish Reproduction. Biol Reprod.*
- Reinecke, M., Bjornsson, B. T., Dickhoff, W. W., McCormick, S. D., Navarro, I., Power, D. M., and Gutierrez, J. (2005). Growth hormone and insulin-like growth factors in fish: where we are and where to go. *Gen Comp Endocrinol* 142, 20-24.
- Rhee, J. S., Kim, B. M., Seo, J. S., Kim, I. C., Lee, Y. M., and Lee, J. S. (2012). Cloning of growth hormone, somatolactin, and their receptor mRNAs, their expression in organs, during development, and on salinity stress in the hermaphroditic fish, *Kryptolebias marmoratus*. *Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol* 161, 436-442.

- Robertson, G. N., McGee, C. A., Dumbarton, T. C., Croll, R. P., and Smith, F. M. (2007). Development of the swimbladder and its innervation in the zebrafish, *Danio rerio*. *J Morphol* **268**, 967-985.
- Rosa, C. E., Figueiredo, M. A., Lanes, C. F., Almeida, D. V., Monserrat, J. M., and Marins, L. F. (2008). Metabolic rate and reactive oxygen species production in different genotypes of GH-transgenic zebrafish. *Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol* **149**, 209-214.
- Ross, R. J., Esposito, N., Shen, X. Y., Von Laue, S., Chew, S. L., Dobson, P. R., Postel-Vinay, M. C., and Finidori, J. (1997). A short isoform of the human growth hormone receptor functions as a dominant negative inhibitor of the full-length receptor and generates large amounts of binding protein. *Mol Endocrinol* **11**, 265-273.
- Rowland, J. E., Lichanska, A. M., Kerr, L. M., White, M., d'Aniello, E. M., Maher, S. L., Brown, R., Teasdale, R. D., Noakes, P. G., and Waters, M. J. (2005). In vivo analysis of growth hormone receptor signaling domains and their associated transcripts. *Mol Cell Biol* **25**, 66-77.
- Rowlerson, A., Radaelli, G., Mascarello, F., and Veggetti, A. (1997). Regeneration of skeletal muscle in two teleost fish: *Sparus aurata* and *Brachydanio rerio*. *Cell Tissue Res* **289**, 311-322.
- Rubinstein, A. L. (2003). Zebrafish: from disease modeling to drug discovery. *Curr Opin Drug Discov Devel* **6**, 218-223.
- Saera-Vila, A. (2009) Duplicación, organización genómica y regulación transcripcional de los receptores de la hormona del crecimiento de peces. Aspectos básicos y aplicados en dorada *Sparus aurata*, Tesis Doctoral. Universitat de València, València, España.
- Saera-Vila, A., Calduch-Giner, J. A., Navarro, I., and Perez-Sanchez, J. (2007a). Tumour necrosis factor (TNF)alpha as a regulator of fat tissue mass in the Mediterranean gilthead sea bream (*Sparus aurata* L.). *Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol* **146**, 338-345.
- Saera-Vila, A., Calduch-Giner, J. A., and Perez-Sanchez, J. (2005). Duplication of growth hormone receptor (GHR) in fish genome: gene organization and transcriptional regulation of GHR type I and II in gilthead sea bream (*Sparus aurata*). *Gen Comp Endocrinol* **142**, 193-203.
- Saera-Vila, A., Calduch-Giner, J. A., and Perez-Sanchez, J. (2007b). Co-expression of IGFs and GH receptors (GHRs) in gilthead sea bream (*Sparus aurata* L.): sequence analysis of the GHR-flanking region. *J Endocrinol* **194**, 361-372.
- Sakamoto, T., and Hirano, T. (1991). Growth hormone receptors in the liver and osmoregulatory organs of rainbow trout: characterization and dynamics during adaptation to seawater. *J Endocrinol* **130**, 425-433.
- Sambrook, J., and Russell, D. W. (2001). *Molecular cloning : a laboratory manual*, 3rd edn. Cold Spring Harbor Laboratory Press Cold Spring Harbor, N.Y.
- Schier, A. F. (2001). Axis formation and patterning in zebrafish. *Curr Opin Genet Dev* **11**, 393-404.
- Schlueter, P. J., Peng, G., Westerfield, M., and Duan, C. (2007a). Insulin-like growth factor signaling regulates zebrafish embryonic growth and development by promoting cell survival and cell cycle progression. *Cell Death Differ* **14**, 1095-1105.
- Schlueter, P. J., Royer, T., Farah, M. H., Laser, B., Chan, S. J., Steiner, D. F., and Duan, C. (2006). Gene duplication and functional divergence of the zebrafish insulin-like growth factor 1 receptors. *Faseb J* **20**, 1230-1232.
- Schlueter, P. J., Sang, X., Duan, C., and Wood, A. W. (2007b). Insulin-like growth factor receptor 1b is required for zebrafish primordial germ cell migration and survival. *Dev Biol* **305**, 377-387.

- Shrader, E. A., Henry, T. R., Greeley, M. S., Jr., and Bradley, B. P. (2003). Proteomics in zebrafish exposed to endocrine disrupting chemicals. *Ecotoxicology* *12*, 485-488.
- Small, B. C., Murdock, C. A., Waldbieser, G. C., and Peterson, B. C. (2006). Reduction in channel catfish hepatic growth hormone receptor expression in response to food deprivation and exogenous cortisol. *Domest Anim Endocrinol* *31*, 340-356.
- Sohm, F., Manfroid, I., Pezet, A., Rentier-Delrue, F., Rand-Weaver, M., Kelly, P. A., Boeuf, G., Postel-Vinay, M. C., de Luze, A., and Edery, M. (1998). Identification and modulation of a growth hormone-binding protein in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) plasma during seawater adaptation. *Gen Comp Endocrinol* *111*, 216-224.
- Storer, N. Y., and Zon, L. I. (2010). Zebrafish models of p53 functions. *Cold Spring Harb Perspect Biol* *2*, a001123.
- Sun, X., Zhu, S., Chan, S. S., Toresson, G., and Cheng, C. H. (1997). Identification and characterization of growth hormone receptors in snakehead fish (*Ophiocephalus argus cantor*) liver. *Gen Comp Endocrinol* *108*, 374-385.
- Suster, M. L., Kikuta, H., Urasaki, A., Asakawa, K., and Kawakami, K. (2009). Transgenesis in zebrafish with the tol2 transposon system. *Methods Mol Biol* *561*, 41-63.
- Thurman, H. V., and Webber, H. H. (1984). *Marine Biology*. Charles E. Merrill Publishing C.A Bell and Howell Co. Columbus, Ohio.
- Tiulpakov, A., Rubtsov, P., Dedov, I., Peterkova, V., Bezlepkina, O., Chrousos, G. P., and Hochberg, Z. (2005). A novel C-terminal growth hormone receptor (GHR) mutation results in impaired GHR-STAT5 but normal STAT-3 signaling. *J Clin Endocrinol Metab* *90*, 542-547.
- Tse, D. L., Tse, M. C., Chan, C. B., Deng, L., Zhang, W. M., Lin, H. R., and Cheng, C. H. (2003). Seabream growth hormone receptor: molecular cloning and functional studies of the full-length cDNA, and tissue expression of two alternatively spliced forms. *Biochim Biophys Acta* *1625*, 64-76.
- van den Eijnden, M. J., Lahaye, L. L., and Strous, G. J. (2006). Disulfide bonds determine growth hormone receptor folding, dimerisation and ligand binding. *J Cell Sci* *119*, 3078-3086.
- Vega-Rubin de Celis, S., Gomez, P., Calduch-Giner, J. A., Medale, F., and Perez-Sanchez, J. (2003). Expression and characterization of European sea bass (*Dicentrarchus labrax*) somatolactin: assessment of in vivo metabolic effects. *Mar Biotechnol (NY)* *5*, 92-101.
- Very, N. M., Kittilson, J. D., Norbeck, L. A., and Sheridan, M. A. (2005). Isolation, characterization, and distribution of two cDNAs encoding for growth hormone receptor in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol* *140*, 615-628.
- Volff, J. N. (2005). Genome evolution and biodiversity in teleost fish. *Heredity* *94*, 280-294.
- Wallace, K. N., Akhter, S., Smith, E. M., Lorent, K., and Pack, M. (2005). Intestinal growth and differentiation in zebrafish. *Mech Dev* *122*, 157-173.
- Wan, G., and Chan, K. M. (2010). A study of somatolactin actions by ectopic expression in transgenic zebrafish larvae. *J Mol Endocrinol* *45*, 301-315.
- Wang, X., Darus, C. J., Xu, B. C., and Kopchick, J. J. (1996). Identification of growth hormone receptor (GHR) tyrosine residues required for GHR phosphorylation and JAK2 and STAT5 activation. *Mol Endocrinol* *10*, 1249-1260.
- Waters, M. J., Hoang, H. N., Fairlie, D. P., Pelekanos, R. A., and Brown, R. J. (2006). New insights into growth hormone action. *J Mol Endocrinol* *36*, 1-7.

- 
- Westerfield, M., and ZFIN. (2000). The zebrafish book a guide for the laboratory use of zebrafish *Danio (Brachydanio) rerio*. ZFIN. [Eugene, Or.].
- White, Y. A., Kyle, J. T., and Wood, A. W. (2009). Targeted gene knockdown in zebrafish reveals distinct intraembryonic functions for insulin-like growth factor II signaling. *Endocrinology* *150*, 4366-4375.
- Winata, C. L., Korzh, S., Kondrychyn, I., Zheng, W., Korzh, V., and Gong, Z. (2009). Development of zebrafish swimbladder: The requirement of Hedgehog signaling in specification and organization of the three tissue layers. *Dev Biol* *331*, 222-236.
- Wong, A. O., Zhou, H., Jiang, Y., and Ko, W. K. (2006). Feedback regulation of growth hormone synthesis and secretion in fish and the emerging concept of intrapituitary feedback loop. *Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol* *144*, 284-305.
- Wright, K. L., Moore, T. L., Vilen, B. J., Brown, A. M., and Ting, J. P. (1995). Major histocompatibility complex class II-associated invariant chain gene expression is up-regulated by cooperative interactions of Sp1 and NF- $\kappa$ B. *J Biol Chem* *270*, 20978-20986.
- Yada, T. (2007). Growth hormone and fish immune system. *Gen Comp Endocrinol* *152*, 353-358.
- Yada, T., Nagae, M., Moriyama, S., and Azuma, T. (1999). Effects of prolactin and growth hormone on plasma immunoglobulin M levels of hypophysectomized rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. *Gen Comp Endocrinol* *115*, 46-52.
- Yada, T., and Nakanishi, T. (2002). Interaction between endocrine and immune systems in fish. *Int Rev Cytol* *220*, 35-92.
- Yang, B. Y., Greene, M., and Chen, T. T. (1999). Early embryonic expression of the growth hormone family protein genes in the developing rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. *Mol Reprod Dev* *53*, 127-134.
- Yao, K., and Le Bail, P. Y. (1999). Biochemical characterization of growth hormone receptor in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) before and after purification. *Fish Physiology and Biochemistry* *21*, 111-120.
- Zhang, Y., and Marchant, T. A. (1999). Identification of serum GH-binding proteins in the goldfish (*Carassius auratus*) and comparison with mammalian GH-binding proteins. *J Endocrinol* *161*, 255-262.
- Zhu, T., Goh, E. L., Graichen, R., Ling, L., and Lobie, P. E. (2001). Signal transduction via the growth hormone receptor. *Cell Signal* *13*, 599-616.
- Zhu, Y., Song, D., Tran, N. T., and Nguyen, N. (2007). The effects of the members of growth hormone family knockdown in zebrafish development. *Gen Comp Endocrinol* *150*, 395-404.
- Zhu, Y., Stiller, J. W., Shaner, M. P., Baldini, A., Scemama, J. L., and Capehart, A. A. (2004). Cloning of somatolactin alpha and beta cDNAs in zebrafish and phylogenetic analysis of two distinct somatolactin subtypes in fish. *J Endocrinol* *182*, 509-518.
- Zhu, Y., and Thomas, P. (1996). Elevations of somatolactin in plasma and pituitaries and increased alpha-MSH cell activity in red drum exposed to black background and decreased illumination. *Gen Comp Endocrinol* *101*, 21-31.
- Zhu, Y., and Thomas, P. (1998). Effects of light on plasma somatolactin levels in red drum (*Sciaenops ocellatus*). *Gen Comp Endocrinol* *111*, 76-82.
- Zou, L., Burmeister, L. A., and Sperling, M. A. (1997). Isolation of a liver-specific promoter for human growth hormone receptor gene. *Endocrinology* *138*, 1771-1774.