



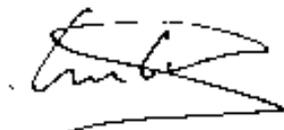
FACULTAD DE VETERINARIA  
UNIVERSIDAD AUTONOMA DE BARCELONA

ESTUDIO MEDIANTE ANIMALES TRANSGENICOS  
DEL PAPEL DE LA HORMONA DE CRECIMIENTO Y  
EL IGF-I EN EL DESARROLLO DE DIABETES  
MELLITUS

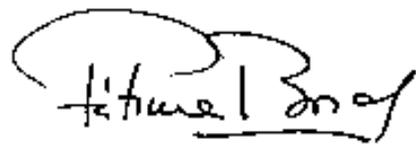
CRISTINA COSTA VALLES

Memoria presentada por la licenciada CRISTINA COSTA VALLES para optar al grado de Doctor en Veterinaria.

Esta Tesis Doctoral ha sido realizada bajo la dirección de la Dra. Fátima Bosch Tubert, en la Unidad de Veterinaria del Departamento de Bioquímica y Biología Molecular.



CRISTINA COSTA VALLES



FATIMA BOSCH TUBERT

Mayo de 1995  
BARCELONA

*A aquellos que tengo  
en gran estima*

## AGRADECIMIENTOS

En primer lugar quiero agradecer a mi directora de Tesis, la Dra. Fátima Bosch, el haberme acogido en su grupo de investigación y la tarea de dirección que ha llevado a cabo. Ella me ha introducido en los temas científicos del mayor interés en biomedicina.

Agradezco al Dr. Joaquín Ariño y Anna Bassols el permitirme utilizar sus equipos y los conocimientos que me han aportado.

Quiero agradecer especialmente a aquellas personas que han colaborado en mi formación investigadora. A la Dra. Cristina Fillat por haberme enseñado todo cuanto sabía sobre microinyección de DNA a ovocitos fecundados. Al Dr. Alfons Valera, por enseñarme a diseñar experimentos. Así como, a los Doctores Kurt Bürki de Sandoz Pharma (Basilea), Horst Blüthmann de Hoffmann-La Roche (Basilea) y Michéline Massoud del INRA (París) por ayudarme a perfeccionarme en la técnica de microinyección y aportarme nuevos conocimientos relacionados con sus líneas de investigación.

Agradezco también la ayuda aportada por diferentes miembros del grupo investigador al que pertenezco en la consecución del trabajo experimental de esta Tesis Doctoral. A Anna Pujol y Mireia Pelegrín en la obtención de ratones transgénicos. A Gemma Solanes por su colaboración en la obtención de los conejos transgénicos y en la obtención de islotes aislados de ratón. A Xavier Gregori por su ayuda en el análisis de los animales transgénicos. A la Dra. Joana Visa por la realización de los estudios anatomopatológicos. A Carles Ros y Anna Vilalta por su ayuda incondicional. Han sido más que colaboradores, han sido amigos.

También quiero agradecer a las personas del Departamento de Endocrinología y Hormonal del Hospital Clínico de Barcelona. A la Dra. Roser Casamitjana por su colaboración en la determinación de hormonas por radioinmunoensayo. A la Dra. Josefa Fernández-Alvarez por la tarea realizada en los estudios de secreción de insulina de islotes aislados, así como al Dr. Ramón Gomis por su gran interés en el proyecto de los ratones transgénicos que expresan IGF-I en las células  $\beta$ .

Agradezco la colaboración de los diferentes miembros del *Departament de Cunicultura* del IRTA por su aportación en el proyecto de obtención de conejos transgénicos. Al Doctor Oriol Rafel por hacer posible que empleáramos los conejos de raza IRTA y utilizásemos las instalaciones de la Torre Marimón.

Agradezco la ayuda que he recibido de otras personas de diferentes Departamentos y Unidades de la Facultad de Veterinaria. A T. Peña de la Unidad de Cirugía por el examen ocular de los ratones transgénicos. A M. López y J. Rutllant de la Unidad de Anatomía y Embriología, a F. Padrós de la Unidad de Biología y a P. Puig del Dpto. de Matemáticas.

La ayuda de todas estas personas ha sido imprescindible para la realización de esta Tesis Doctoral.

Finalmente quiero agradecer al resto de compañeros del Departamento de Bioquímica y Biología Molecular su compañía y amistad. A G. Asins, L. Balcells, J. Baulida, M. Camps, A. Casamayor, J. Clotet, J.C. Devedjian, T. Ferré, M. George, N. Gómez, V. Gonzalo, R. Martínez, A. Molist, D. Navarro, R. Onetti, P. Otacui, T. Padrós, F. Posas, J.E. Rodríguez-Gil, E. Riu, M. Romarís, J. Sabater y D. Serra.

## ABREVIATURAS

AC	adenilato ciclasa
ADP	adenosina-5'-difosfato
ATP	adenosina-5'-trifosfato
bp	pares de bases
bGH	hormona de crecimiento bovina
BSA	albúmina sérica bovina
CaMK	proteína quinasa dependiente de $Ca^{2+}$ /calmodulina
cAMP	adenosina 3'-5'-monofosfato
CAT	cloranfenicol acetiltransferasa
CCK	colecistoquinina
cDNA	DNA copia
CHO (dieta)	dieta alta en carbohidratos
cpm	cuentas por minuto
CRE	elemento de respuesta a cAMP
DAG	diacilglicerol
dATP	desoxiadenosina-5'-trifosfato
db/db (ratones)	cepa de ratones diabéticos
dCTP	desoxicitidina-5'-trifosfato
dGTP	desoxiguanosina-5'-trifosfato
DMEM	medio de Eagle modificado por Dulbecco
DNA	ácido desoxirribonucleico
DNasa	desoxirribonucleasa
dpm	desintegraciones por minuto
dTTP	desoxitimidina-5'-trifosfato
EDTA	etilendiaminotetracetato
FAD	flavín-adenina-dinucleótido
FDA	Food and Drug Administration
FGF	factor de crecimiento de fibroblastos
FSH	hormona folículo estimulante
x g	gravidades
GAPDH	gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa
GH	hormona de crecimiento
GHBP	proteína de unión a GH
GHR	receptor de GH
GHRH/GHRF	hormona liberadora de GH
GIP	péptido inhibidor gástrico
GK (enzima)	glucoquinasa
GK (ratas)	ratas Goto-Kakizaki
GLUT	transportador de glucosa
GLP	péptido semejante al glucagón
H4IIE	línea celular de hepatoma de rata
HCG	gonadotropina coriónica humana
HEPES	4-(2-hidroxietil)-1-piperacina etanosulfato
HepG2	línea celular de hepatoma humano
hGH	hormona de crecimiento humana
IBMX	isobutil-5'-metilxantina
IDDM	diabetes mellitus insulino dependiente
IGF	factor de crecimiento semejante a la insulina
IGFBP	proteína de unión a IGF
i.m.	intramuscular

IP <sub>3</sub>	inositol-3'-fosfato
IRE	elemento de respuesta a la insulina
IRTA	Institut de Recerca i Tecnologia Agro-alimentàries
IRS-1	substrato del receptor de la insulina
JAK	Janus quinasa
kb	kilobases
K <sub>D</sub>	constante de disociación
kDa	kilodaltons
LH	hormona luteinizante
MAPK	proteína quinasa activada por mitógenos
MHC	complejo mayor de histocompatibilidad
MODY	diabetes juvenil de aparición en la madurez
MT	metaltioneína
NAD <sup>+</sup>	nicotinamida-adenina-dinucleótido oxidado
NADH	nicotinamida-adenina-dinucleótido reducido
NIDDM	diabetes mellitus no insulino dependiente
ob/ob (ratones)	cepa de ratones obesos
p	peso
PBS	tampón fosfato-salino
PDGF	factor de crecimiento plaquetario
PEP	fosfo-enolpiruvato
PEPCK	fosfo-enolpiruvato carboxiquinasa
PGE <sub>2</sub>	prostaglandina E <sub>2</sub>
PI3'K	fosfatidilinositol 3' quinasa
PK (L-)	piruvato quinasa
PKA	proteína quinasa dependiente de cAMP
PKC	proteína quinasa dependiente de Ca <sup>2+</sup> y fosfolípidos
PLC	fosfolipasa C
PMSF	fluoruro de fenilmetilo sulfonilo
PMSG	gonadotropina sérica de yegua gestante
PP	polipéptido pancreático
P.V.	peso vivo
rGH	hormona de crecimiento de rata
RIN-5AH	células de insulinoma de rata
RIP	promotor del gen de la insulina de rata
RNA	ácido ribonucleico
RNasa	ribonucleasa
miRNA	RNA mensajero
SDS	duodecilsulfato de sodio
SS	somatostatina
SV40	virus de simio 40
TAE	tampón tris-acetato-EDTA
TAT	tirosina aminotransferasa
TCA	ácido tricloroacético
TE	tampón tris-EDTA
TG/Tg	transgénico/a
TSH	tirotropina
Tris	tris(hidroximetil)aminometano
U	unidades internacionales de actividad enzimática
U.I.	unidades internacionales
VIP	péptido intestinal vasoactivo
vol	volumen
ZDF/fa/fa (ratas)	ratas obesas diabéticas Zucker

## PRESENTACION

La diabetes mellitus es la enfermedad metabólica más frecuente en humanos. Todas las formas de diabetes mellitus se caracterizan por hiperglucemia, la falta relativa o absoluta de insulina, así como, por el desarrollo de patología microvascular en retina y glomérulo renal. La mayor parte de la población diabética se incluye en la clasificación de diabetes tipo II o diabetes no dependiente de insulina. La etiología de esta enfermedad es heterogénea. Se han identificado diversos genes cuya alteración parece ser causa de diabetes mellitus. Así, se han observado mutaciones en el gen de la glucoquinasa, GLUT-2, receptor de la insulina, etc. en pacientes de diabetes tipo II. Sin embargo, las causas que afectan a la mayoría de la población son aún desconocidas.

El trabajo experimental presentado en esta Tesis Doctoral se ha dividido en dos partes. Una centrada en el estudio del efecto de la sobreexpresión de la hormona de crecimiento (GH) en hígado de conejos transgénicos y la otra, en que se ha investigado el papel de la sobreexpresión del factor de crecimiento semejante a la insulina I (IGF-I) en células B del páncreas de ratones transgénicos. Ambos estudios tienen en común la utilización de la tecnología de animales transgénicos para el estudio del posible papel tanto de la hormona de crecimiento como del IGF-I, mediador de la acción de la hormona de crecimiento en los tejidos, en el desarrollo de diabetes mellitus. La obtención de estos modelos animales permitirá conocer los efectos a largo plazo de estas hormonas en el animal entero.

La GH ejerce efectos promotores del crecimiento en animales y por tanto, se ha considerado de interés biotecnológico en producción animal. Así, el gen de la GH se ha introducido en animales de interés ganadero (cerdos, ovejas,..) con el fin de mejorar los caracteres productivos (animales de crecimiento precoz, con menor contenido de grasa, y por tanto, más magros). Sin embargo, estos animales transgénicos de gran tamaño han presentado gran número de alteraciones (artritis, úlceras, problemas reproductivos,...). Animales transgénicos de menor tamaño, ratones, sí muestran un claro incremento del tamaño corporal y no desarrollan patologías hasta edad avanzada (más de 1 año). Estos problemas que aparecen en animales transgénicos son el resultado de la acción crónica de la hormona. Niveles crónicamente elevados de hormona de crecimiento, como en el caso de pacientes acromegálicos, tienen una marcada acción diabetogénica caracterizada por el desarrollo de un cuadro de resistencia a la insulina. Así mismo, la exposición crónica a la hormona en ratones transgénicos que expresan hormona de crecimiento provoca la aparición de un cuadro de resistencia a la insulina.

La primera parte de este trabajo experimental se centró en la obtención de conejos transgénicos que expresan hormona de crecimiento bovina (bGH) a fin de estudiar, por un

lado, su posible interés desde el punto de vista biotecnológico en la obtención de conejos de crecimiento precoz, y por otro, utilizar estos animales para estudiar los efectos diabetogénicos de la GH en una especie de mayor tamaño que el ratón. Sin embargo, estos conejos no han presentado una mejora en el crecimiento, si bien presentaban un menor contenido en grasa. Además, estos animales presentaron un claro proceso diabético, cuya evolución estaba directamente relacionada con el nivel de expresión de bGH y el tiempo de exposición a esta hormona. El estudio de los efectos diabetogénicos de la GH en estos animales era de gran interés, dado que actualmente al obtenerse GH recombinante, un incremento de su uso en clínica humana (para la mejora del crecimiento de niños o del rendimiento en atletas) podría llevar a consecuencias indeseables.

Por otro lado, la diabetes mellitus se asocia en humanos y modelos animales a una reducción en suero del factor de crecimiento semejante a la insulina-I (IGF-I). Sin embargo, se ha observado un incremento del factor en humor vítreo y tejido renal, considerándose que podría estar relacionado con el desarrollo de complicaciones secundarias microvasculares de diabetes mellitus. Por otro lado, se ha descrito que la infusión de IGF-I inhibe la secreción de insulina actuando en las células  $\beta$  a través de su propio receptor. Recientemente, se ha detectado la presencia de IGF-I inmunoreactivo en las células  $\alpha$  del páncreas. Probablemente el IGF-I producido en el islote podría regular la secreción de insulina. Con el fin de estudiar el posible papel del IGF-I en la patogenia de la diabetes, hemos obtenido ratones transgénicos que expresan IGF-I murino específicamente en las células  $\beta$  del páncreas, bajo el control del promotor de la insulina de rata I. Estos animales son hiperinsulinémicos, hiperglucémicos y presentan un test de tolerancia a la glucosa alterado. La respuesta insulínosecretora a elevadas concentraciones de glucosa es deficiente en islotes obtenidos de los ratones transgénicos. Además, los ratones transgénicos que expresan el gen quimérico RIP/IGF-I desarrollan retinopatía, glaucoma y cataratas, y constituyen el primer modelo de diabetes mellitus que desarrolla las complicaciones oculares de los pacientes humanos. Por tanto, este estudio demuestra que la sobreexpresión de IGF-I en las células  $\beta$  puede tener un papel etiológico en la patogenia de la diabetes mellitus y en el desencadenamiento de las complicaciones secundarias de la enfermedad.

## INDICE

### PARTE I. OBTENCION DE CONEJOS TRANSGENICOS QUE SOBREEXPRESAN HORMONA DE CRECIMIENTO BOVINA

#### PARTE I: INTRODUCCION

1. ANIMALES TRANSGENICOS .....	1
1.1. Antecedentes .....	1
1.2. Bases de la tecnología .....	1
1.3. Integración, expresión y regulación de la expresión del gen exógeno .....	3
1.4. Aplicaciones de la tecnología de animales transgénicos .....	5
2. HORMONA DE CRECIMIENTO .....	6
2.1. ESTRUCTURA DE LA HORMONA DE CRECIMIENTO .....	7
2.2. EL RECEPTOR DE LA HORMONA DE CRECIMIENTO .....	7
2.3. PROTEINA DE UNION A HORMONA DE CRECIMIENTO .....	8
2.4. ACCIONES BIOLÓGICAS DE LA HORMONA DE CRECIMIENTO .....	9
2.4.1. Acciones metabólicas de la hormona de crecimiento .....	9
2.4.2. Acciones promotoras del crecimiento .....	11
2.5. ANIMALES TRANSGENICOS Y CRECIMIENTO .....	12
2.5.1. Obtención de ratones transgénicos que sobreexpresan hormona de crecimiento .....	12
2.5.2. Cambios fisiológicos .....	14
2.5.3. Cambios metabólicos .....	14
2.5.4. Patologías asociadas .....	15
2.5.5. Modelos de animales transgénicos de interés en producción .....	15

#### PARTE I: HIPOTESIS Y OBJETIVOS

Hipótesis y objetivos .....	17
-----------------------------	----

#### PARTE I: RESULTADOS

1. OBTENCION DE RATONES TRANSGENICOS CON EL GEN DE LA HORMONA DE CRECIMIENTO HUMANA .....	19
1.1. CONSTRUCCION DEL GEN QUIMERICO PEPCK/bGH .....	19
1.2. EXPRESION DEL GEN QUIMERICO PEPCK/bGH EN CELULAS H4IIE Y HepG2 .....	20
1.3. OBTENCION DE RATONES TRANSGENICOS QUE EXPRESAN EL GEN QUIMERICO PEPCK/bGH .....	21

<b>2. OBTENCION DE CONEJOS TRANSGENICOS CON EL GEN DE LA HORMONA DE CRECIMIENTO BOVINA</b> .....	24
<b>2.1. PUESTA A PUNTO DE LA TECNICA DE OBTENCION DE CONEJOS TRANGENICOS</b> .....	24
2.1.1. Obtención de cigotos de conejo .....	24
2.1.2. Microinyección de ovocitos fecundados de conejo .....	25
2.1.3. Transferencia de cigotos a la hembra receptora .....	25
<b>2.2. OBTENCION DE CONEJOS TRANGENICOS QUE EXPRESAN EL GEN QUIMERICO PEPCK/bGH</b> .....	29
<b>2.3. EXPRESION DEL TRANSGEN EN DIFERENTES TEJIDOS</b> .....	31
<b>2.4. PARAMETROS SERICOS DE LOS CONEJOS TRANSGENICOS</b> .....	31
<b>2.5. CRECIMIENTO DE LOS CONEJOS TRANSGENICOS</b> .....	33
<b>2.6. FISIOLOGIA REPRODUCTIVA DE LOS CONEJOS TRANSGENICOS</b> .....	34
<b>2.7. ANALISIS ANATOMOPATOLOGICO DE LOS CONEJOS QUE EXPRESAN EL GEN QUIMERICO PEPCK/bGH</b> .....	34

**PARTE I: DISCUSION**

<b>OBTENCION DE CONEJOS TRANGENICOS QUE SOBREENPRESAN HORMONA DE CRECIMIENTO BOVINA</b> .....	38
---	----

**PARTE I: CONCLUSIONES**

Conclusiones .....	43
--------------------	----

**PARTE II. RATONES TRANSGENICOS QUE EXPRESAN IGF-I EN CELULAS  $\beta$  DEL PANCREAS**

**PARTE II: INTRODUCCION**

<b>1. ESTRUCTURA Y FUNCION DEL PANCREAS</b> .....	44
<b>1.1. FISILOGIA DE LA CELULA <math>\beta</math> DE LOS ISLOTES DE LANGERHANS</b> .....	45
1.1.1. Regulación de la biosíntesis de insulina .....	45
1.1.2. El promotor de la insulina .....	47
1.1.3. Regulación de la secreción de insulina .....	49
<b>2. DIABETES MELLITUS</b> .....	53
<b>2.1. COMPLICACIONES SECUNDARIAS DE LA DIABETES</b> .....	55
<b>2.2. ANIMALES TRANSGENICOS Y DIABETES</b> .....	56
<b>3. FACTORES DE CRECIMIENTO SEMEJANTES A LA INSULINA</b> .....	58
<b>3.1. ESTRUCTURA DE LOS FACTORES DE CRECIMIENTO SEMEJANTES A LA INSULINA</b> .....	59

3.2. RECEPTORES DE LOS IGFS Y MECANISMOS DE TRANSDUCCION DE SEÑAL . . . . .	60
3.3. PROTEINAS DE UNION A IGFS . . . . .	64
3.4. REGULACION HORMONAL DE LOS IGFS . . . . .	64
3.5. ACCIONES BIOLÓGICAS DE LOS IGFS . . . . .	66
3.5.1. Acciones semejantes a la insulina . . . . .	66
3.5.2. Acciones promotoras del crecimiento y de proliferación celular . . . . .	67
3.6. ACCIONES DEL IGF-I SOBRE LA FISIOLÓGIA DE LA CELULA $\beta$ DEL PANCREAS . . . . .	68

**PARTE II: HIPOTESIS Y OBJETIVOS**

Hipótesis y objetivos . . . . .	71
---------------------------------	----

**PARTE II: RESULTADOS**

1. RATONES TRANSGÉNICOS QUE EXPRESAN EL GEN DEL IGF-I EN CELULAS $\beta$ DEL PANCREAS . . . . .	73
1.1. OBTENCION DE RATONES TRANSGÉNICOS QUE EXPRESAN EL GEN QUIMÉRICO RIP/IGF-I . . . . .	73
1.1.1. Construcción del gen quimérico RIP/IGF-I . . . . .	73
1.1.2. Obtención de ratones transgénicos que expresan el gen quimérico RIP/IGF-I . . . . .	75
1.1.3. Análisis de la expresión del transgén . . . . .	75
1.1.4. IGF-I en islotes de Langerhans de ratones transgénicos que expresan el gen quimérico RIP/IGF-I . . . . .	75
1.1.5. Regulación de la expresión del transgén . . . . .	77
1.1.6. Análisis de expresión del gen de la insulina . . . . .	77
1.2. PARAMETROS SÉRICOS DE LOS RATONES TRANSGÉNICOS QUE EXPRESAN EL GEN QUIMÉRICO RIP/IGF-I . . . . .	78
1.2.1. IGF-I e insulina en suero . . . . .	78
1.2.2. Metabolitos en suero . . . . .	78
1.2.3. Curva de tolerancia a la glucosa . . . . .	79
1.3. PESOS Y MORFOMETRÍA DEL PANCREAS DE RATONES TRANSGÉNICOS QUE EXPRESAN EL GEN QUIMÉRICO RIP/IGF-I . . . . .	81
1.3.1. Peso corporal y de los órganos . . . . .	81
1.3.2. Morfometría del páncreas . . . . .	81
1.4. SECRECIÓN DE INSULINA DE ISLOTES PANCREÁTICOS AISLADOS DE RATONES TRANSGÉNICOS QUE EXPRESAN EL GEN QUIMÉRICO RIP/IGF-I . . . . .	83
1.4.1. Secreción de insulina a los 90 minutos . . . . .	83
1.4.2. Perifusión de islotes aislados . . . . .	84

1.4.3. Estimulación de la secreción de insulina por otros secretagogos . . . . .	85
1.4.4. Estimulación de la secreción de insulina por forskolina . . . . .	86
1.4.5. Contenido de insulina de los islotes pancreáticos . . . . .	87
1.4.6. Contenido de cAMP de los islotes incubados a altas concentraciones de glucosa . . . . .	88
<b>1.5. ESTUDIO DEL METABOLISMO HEPATICO DE CARBOHIDRATOS EN LOS RATONES TRANSGENICOS QUE EXPRESAN EL GEN QUIMERICO RIP/IGF-I . . . . .</b>	<b>89</b>
1.5.1. Expresión de IGF-I hepático . . . . .	90
1.5.2. Expresión en hígado de los genes de GLUT-2, glucoquinasa y piruvato quinasa . . . . .	91
1.5.3. Actividad hepática glucoquinasa y piruvato quinasa . . . . .	93
1.5.4. Contenido hepático de glucógeno y glucosa 6-P . . . . .	93
1.5.5. Expresión en hígado de los genes de la P-enolpiruvato carboxiquinasa y la tirosina aminotransferasa . . . . .	94
<b>1.6. ALTERACIONES OCULARES EN LOS RATONES TRANSGENICOS QUE EXPRESAN EL GEN QUIMERICO RIP/IGF-I . . . . .</b>	<b>96</b>

**PARTE II: DISCUSION**

<b>ESTUDIO DE LOS EFECTOS DE LA EXPRESION DE IGF-I EN CELULAS <math>\beta</math> DEL PANCREAS EN RATONES TRANSGENICOS . . . . .</b>	<b>99</b>
---	-----------

**PARTE II: CONCLUSIONES**

Conclusiones . . . . .	106
------------------------	-----

**MATERIALES Y METODOS**

<b>1. MATERIALES . . . . .</b>	<b>108</b>
1.1. Animales . . . . .	108
1.2. Líneas celulares . . . . .	108
1.3. Cepas bacterianas . . . . .	108
1.4. Sondas . . . . .	108
1.5. Reactivos y medios de cultivo . . . . .	109
<b>2. METODOS . . . . .</b>	<b>110</b>
<b>2.1. OBTENCION Y ANALISIS DE DNA . . . . .</b>	<b>110</b>
2.1.1. Preparación de DNA plasmídico . . . . .	110
2.1.2. Obtención de DNA genómico . . . . .	111
2.1.3. Resolución y purificación de fragmentos de DNA . . . . .	111
2.1.4. Manipulación enzimática de DNA . . . . .	112
2.1.5. Construcción de moléculas híbridas de DNA . . . . .	112
2.1.6. Marcaje radioactivo de DNA . . . . .	113

2.1.7. Análisis de DNA por Southern Blot . . . . .	113
2.2. PREPARACION Y ANALISIS DE RNA . . . . .	115
2.2.1. Preparación de RNA total . . . . .	115
2.2.2. Electroforesis del RNA en geles desnaturalizantes de agarosa/formaldehído . . . . .	115
2.2.3. Análisis de RNA por Northern Blot . . . . .	116
2.3. TECNICA DE ELECTROFORESIS DE PROTEINAS Y WESTERN BLOT . . . . .	117
2.3.1. Preparación de extractos . . . . .	117
2.3.2. Método de Bradford . . . . .	117
2.3.3. Separación electroforética, electrotransferencia e inmunodetección de proteínas . . . . .	117
2.4. EXPRESION EN CELULAS EN CULTIVO . . . . .	118
2.5. TECNICA DE OBTENCION DE RATONES TRANSGENICOS . . . . .	119
2.5.1. Preparación del DNA . . . . .	119
2.5.2. Recolección de ovocitos fecundados . . . . .	119
2.5.3. Descripción del equipo de microinyección . . . . .	120
2.5.4. Construcción de pipetas de microinyección y de sujeción . . . . .	121
2.5.5. Construcción de pipetas de transferencia . . . . .	121
2.5.6. Portaobjetos y preparación para la microinyección . . . . .	121
2.5.7. Microinyección de ovocitos fecundados . . . . .	122
2.5.8. Transferencia a la hembra receptora . . . . .	122
2.5.9. Establecimiento de las líneas de transgénicos . . . . .	123
2.6. OBTENCION DE CONEJOS TRANSGENICOS . . . . .	123
2.7. ANALISIS DE LOS ANIMALES . . . . .	124
2.8. DETERMINACION DE LOS PARAMETROS SERICOS . . . . .	124
2.8.1. Determinación de metabolitos en suero . . . . .	124
2.8.1.1. Glucosa . . . . .	124
2.8.1.2. Triglicéridos . . . . .	125
2.8.1.3. Acidos grasos no esterificados . . . . .	125
2.8.1.4. Colesterol . . . . .	125
2.8.2. Determinación de actividades enzimáticas en suero . . . . .	125
2.8.2.1. Actividad fosfatasa alcalina . . . . .	125
2.8.3. Determinación de hormonas en suero y medios de cultivo e incubación . . . . .	125
2.8.3.1. Hormona de crecimiento humana . . . . .	125
2.8.3.2. IGF-I . . . . .	126
2.8.3.1. Insulina . . . . .	126
2.9. PESO DE LOS ANIMALES Y DE LOS ORGANOS . . . . .	126
2.10. MORFOMETRIA DEL PANCREAS . . . . .	126
2.11. ESTUDIO DE FUNCIONALIDAD DE LOS ISLOTES PANCREATICOS . . . . .	127
2.11.1. Obtención de islotes aislados de ratón . . . . .	127
2.11.2. Secreción de insulina . . . . .	127
2.11.3. Incubación estática . . . . .	128
2.11.4. Perifusión . . . . .	128

2.11.5. Contenido de insulina . . . . .	128
2.11.6. Contenido de AMP cíclico . . . . .	128
2.12. ESTUDIO DE PARAMETROS METABOLICOS EN HIGADO . . . . .	129
2.12.1. Determinación de actividad glucoquinasa . . . . .	129
2.12.2. Determinación de actividad piruvato quinasa . . . . .	130
2.12.3. Determinación de actividad glucosa 6-P . . . . .	131
2.12.4. Determinación de glucógeno . . . . .	131
2.13. ANALISIS HISTOLOGICO . . . . .	132
2.14. ESTUDIOS OCULARES . . . . .	132
2.15. CALCULO ESTADISTICO . . . . .	132

## **BIBLIOGRAFIA**

BIBLIOGRAFIA . . . . .	133
------------------------	-----

## **PARTE I**

# **OBTENCION DE CONEJOS TRANSGENICOS QUE SOBREEXPRESAN HORMONA DE CRECIMIENTO BOVINA**

## PARTE I: INTRODUCCION

## 1. ANIMALES TRANSGENICOS

El término *transgénico*, introducido por Gordon y Ruddle en 1981, se refiere a aquellos animales a los cuales se les ha incorporado en su genoma un gen exógeno con el fin de mejorar o cambiar caracteres existentes, o bien introducir nuevos caracteres. Dicho gen se halla presente en todas las células del organismo y en la línea germinal, transmitiéndose de forma mendeliana a la descendencia.

### 1.1. Antecedentes

Durante la década de los años 60 se desarrollaron técnicas de manipulación de embriones que llevaron a la obtención de animales quiméricos por fusión de mórulas o inyección de células de un blastocisto en otro (Mintz, 1965; Gardner, 1968). Posteriormente, Graham y Van Der Erb (1973) consiguieron introducir DNA dentro de células animales en cultivo. En 1974, Jaenisch y Mintz obtuvieron los primeros ratones que contenían un gen exógeno integrado en su genoma mediante la inyección de DNA del virus SV40 en la cavidad del blastocisto. Sin embargo, no es hasta 1981 que se obtuvieron los primeros ratones transgénicos propiamente dichos, gracias al establecimiento de la técnica de microinyección de DNA en el pronúcleo masculino de ovocitos fecundados (Gordon y col., 1980; Brinster, 1981; Constantini y Lacy, 1981; Wagner y col. 1981; Harbers y col., 1981). Un año después, se consiguió una alteración fenotípica al obtener ratones gigantes que expresaban hormona de crecimiento de rata (Palmiter y col., 1982). En los años posteriores, se ha empleado esta técnica para la obtención de animales transgénicos de otras especies animales, como ratas (Mullins y col, 1990), peces (Brem y col., 1988), aves (Bosselman y col., 1989), cerdos, ovejas (Hammer y col., 1985) y vacas (Roshclau y col., 1989). Tanto los primeros animales transgénicos que se realizaron, como la mayoría de los modelos actuales, han seguido la aproximación experimental de ganancia de función (*gene augmentation*) (Rusconi, 1991).

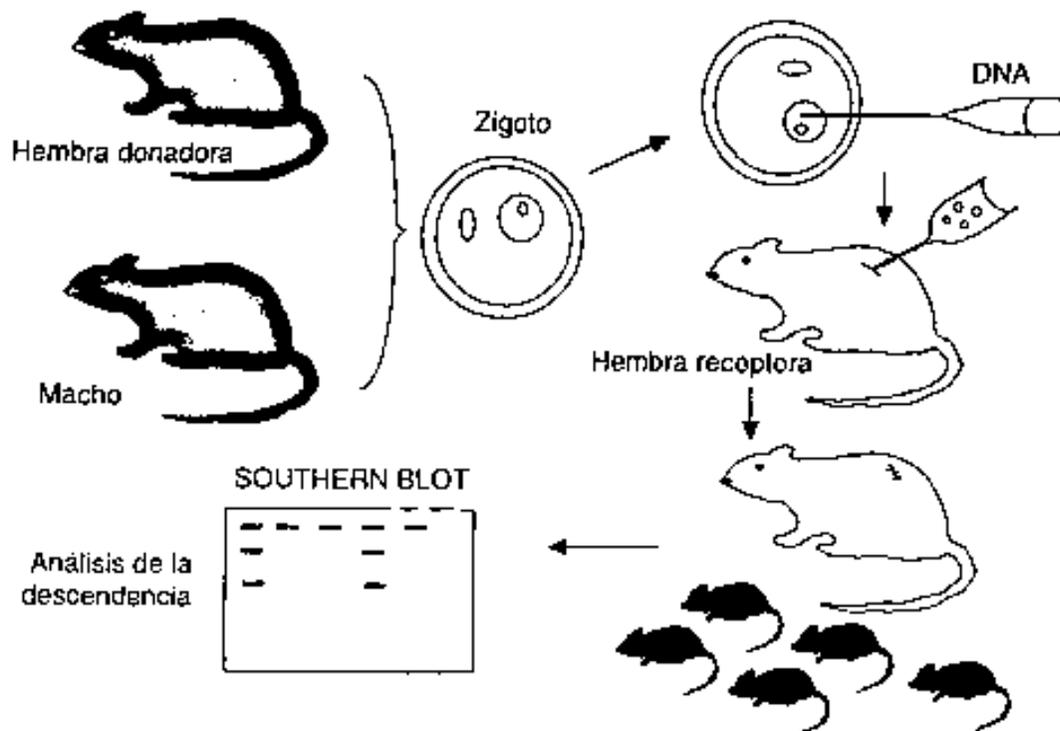
### 1.2. Bases de la tecnología

Esta técnica consiste en la microinyección de un gen exógeno en el pronúcleo masculino de un cigoto antes de que tenga lugar la fusión de los dos pronúcleos, masculino y femenino. Posteriormente, el cigoto es transferido al oviducto de una hembra receptora que llevará a cabo la gestación.

Mediante la técnica de microinyección se han introducido en el genoma de distintas especies animales una larga lista de genes. En algunos casos, se ha inyectado un gen

completo, compuesto por la secuencia codificante y la región reguladora del gen. Sin embargo, frecuentemente se suele introducir un gen quimérico, formado por la fusión del gen de interés con un promotor de un gen distinto. La elección del promotor es clave en el momento de diseñar un nuevo modelo de animal transgénico.

El ratón ha sido el animal más empleado, por las numerosas ventajas que presenta frente a otras especies. Posee un período de gestación corto, de tan sólo 21 días, y camadas numerosas, de alrededor de 10 crías. En general, nacen de un 20 a un 30% de los embriones transferidos. De estos animales nacidos, sólo de un 10 a un 20% son transgénicos. Estos porcentajes varían en gran medida dependiendo del gen inyectado, la calidad del equipo y la experiencia del técnico (Jaenisch, 1988) (Esquema I).



Esquema I. Técnica de obtención de ratones transgénicos mediante microinyección de DNA en el pronúcleo masculino de ovocitos fecundados. A partir de una hembra donadora, previamente cruzada con un macho, se obtienen los cigotos en estadio de dos pronúcleos. Estos se microinyectan con el gen de interés y se transfieren a hembras receptoras, que llevan a término la gestación. La descendencia se analiza para detectar aquellos animales que han integrado en su genoma el gen microinyectado.

Por otra parte, el conejo ha sido una especie muy poco utilizada en la obtención de animales transgénicos. La duración de la gestación y el número de crías, así como otros parámetros reproductivos, son bastante similares a los de la especie murina. El conejo puede ser utilizado tanto en los proyectos de investigación básica en que el pequeño tamaño del ratón es un factor limitante, como en proyectos de interés en producción animal (obtención de animales resistentes a enfermedades (Ernst y col., 1991, Weidle y col., 1991), animales productores de fármacos (Bühler, y col., 1990), etc.). No obstante, el coste más elevado de una experiencia con una especie animal de mayor tamaño, obliga siempre a comprobar con anterioridad el funcionamiento del gen de interés en el ratón. Sin embargo, los resultados obtenidos en diferentes especies animales no son siempre extrapolables.

### 1.3. Integración, expresión y regulación de la expresión del gen exógeno

Los mecanismos moleculares por los que se produce la integración de un gen exógeno no son bien conocidos, aunque se ha propuesto la intervención de los sistemas de reparación del DNA. Generalmente, se integran una o varias copias del transgén orientadas cabeza-cola en un único cromosoma. El lugar de integración es al azar, pudiendo interrumpir en alguna ocasión un gen endógeno y tener consecuencias indeseables. Así pues, cada animal fundador obtenido mediante microinyección presenta un lugar de integración del gen exógeno distinto al de otros animales fundadores. Otro fenómeno que se observa frecuentemente es la aparición de animales mosaico, que en algunas ocasiones puede llegar al 25% de los animales fundadores. En estos casos se produce una integración tardía, pudiendo quedar el transgén confinado a un compartimento del desarrollo o línea celular. La transmisión del carácter a la descendencia queda entonces disminuida o anulada dependiendo de si las células germinales presentan o no el transgén.

La eficiencia de obtención de animales transgénicos es variable y depende de diferentes factores, algunos de ellos no bien conocidos. Se ha observado que la integración de un gen exógeno es mucho menor cuando se inyecta el DNA circular incluido en un vector plasmídico, que cuando se inyecta en forma lineal desprovisto de las secuencias procariontas. Sin embargo, las diferencias en el porcentaje de integración que se obtienen para distintos genes parecen indicar una influencia de sus propias secuencias. Cuando se microinyectan construcciones distintas, se observan variaciones importantes de expresión. En algunos casos el porcentaje de fundadores que expresan el transgén es muy bajo o incluso nulo. Además, para una misma construcción génica los niveles de expresión son también diferentes de una línea a otra de transgénicos, influyendo el lugar de integración cromosómica y, aunque no de una forma totalmente correlacionada, el número de copias incorporadas del transgén (Rusconi, 1991).

Los mejores resultados, en cuanto a nivel y patrón de expresión, se obtienen cuando

se microinyecta la secuencia genómica completa del gen de interés, incluyendo el inicio de traducción, los intrones y la señal de poliadenilación íntegra. Sin embargo, hay ocasiones en que el gen de interés es demasiado grande o sólo se dispone del cDNA. Brinster y Palminter han descrito que la presencia de intrones en un gen quimérico es crucial para conseguir un buen nivel de expresión. Incluso la presencia de un único intrón perteneciente a otro gen no relacionado resulta muy beneficiosa (Brinster y col., 1988; Palminter y col., 1991). En el caso de genes demasiado grandes para ser microinyectados, se puede construir un minigen que comprenda una porción del DNA genómico y otra del cDNA del mismo gen. De este modo, se asemeja lo más posible el gen quimérico a un gen estructural eucariota completo (Valera y col., 1994a).

A fin de conseguir una expresión adecuada del gen de interés se han utilizado diferentes promotores que le proporcionan regulación hormonal, especificidad de tejido y un determinado patrón de expresión a lo largo del desarrollo (Dyran, 1989; Mitchell y Tjian, 1989). En algunos casos se añaden *enhancers*, elementos reguladores en *cis* que estimulan fuertemente la tasa de transcripción. Actúan independientemente de la orientación de su secuencia, posición y distancia del inicio de transcripción. Los más utilizados en estas técnicas son de origen viral, como, por ejemplo, el enhancer del virus SV40 (Brinster y col., 1984). Por otra parte, los animales transgénicos se están utilizando frecuentemente para el análisis de los promotores *in vivo*. Así, los elementos reguladores, que confieren las características propias de cada promotor, se delimitan microinyectando diferentes fragmentos del promotor en combinación con un gen marcador como el de la cloranfenicol acetiltransferasa (CAT), la  $\beta$ -galactosidasa, la luciferasa, la hormona de crecimiento, etc.

La especificidad de tejido del promotor es un criterio clave a tener en cuenta cuando se plantea su empleo en un modelo de animal transgénico. Existen promotores capaces de dirigir la expresión de manera inespecífica a prácticamente todas las células del organismo, mientras que otros son específicos de un sólo órgano o tipo celular. El promotor del gen de la metalotioneína-1 es un ejemplo del primer grupo ya que dirige la expresión de genes quiméricos a la mayor parte de células del organismo. En cambio, los promotores empleados en este trabajo, el del gen de la P-enolpiruvato carboxiquinasa (PEPCK) y el del gen de la insulina, dirigen respectivamente la expresión de genes a hígado (McGrane y col., 1988) y células  $\beta$  de los islotes pancreáticos (Selden y col., 1986a).

También es importante tener en cuenta la regulación de cada promotor a corto plazo y a lo largo del desarrollo y vida del animal. Diversas hormonas (por ejemplo glucocorticoides o insulina), factores nutricionales (glucosa/fructosa, ácidos grasos poliinsaturados, colesterol), minerales específicos (como hierro o zinc), y ácido retinoico tienen un papel regulador de la transcripción a través de los elementos del promotor (Clarke y Abraham, 1992). La elección de un promotor regulable es de gran interés cuando diseñamos un modelo de animal transgénico. Especialmente, si nos permite manipular la

expresión del gen integrado desde el exterior, estimulándola o inhibiéndola. Por ejemplo, se puede activar la expresión de genes quiméricos que contienen el promotor de la metalotioneína añadiendo metales a la dieta de animales transgénicos (Palmlinter y col., 1983). Otros promotores regulables por hormonas o factores nutricionales que se han estudiado en ratones transgénicos son el de la PEPCK (McGrane y col., 1988, 1990; Short y col., 1992; Beale y col., 1992), el de la piruvato quinasa (Cuif y col., 1992), el de la insulina (Selden y col., 1986a; Buchini y col., 1986; Dandroy-Dron y col., 1991), o el de la glucoquinasa (Liang y col., 1994).

#### 1.4. Aplicaciones de la tecnología de obtención de animales transgénicos

Se distinguen dos campos de aplicación de la tecnología de obtención de animales transgénicos. Por un lado, estos animales pueden ser utilizados para estudios de ciencias básicas empleando fundamentalmente especies de laboratorio. El abanico de aplicaciones en este campo es muy amplio, abarcando las distintas ramas de la biomedicina. Además del estudio *in vivo* de la expresión de genes y su regulación, se llevan a cabo investigaciones generando modelos de enfermedades humanas (cáncer, alteraciones metabólicas y del sistema endocrino, enfermedades hereditarias, etc.). También se están realizando estudios que exploran la función de determinadas proteínas involucradas en el sistema inmunitario, el sistema nervioso o en el desarrollo embrionario, entre otros (Jaenisch, 1988; Merlino, 1991).

Por otro lado, en relación a los animales de interés en producción animal, estas tecnologías se están aplicando en diversas ramas: a) mejora del crecimiento y mayor aprovechamiento de los alimentos en nutrición animal, b) desarrollo de resistencia a enfermedades de los animales de producción, c) adaptación de los productos animales (leche, lana, huevos, etc.) a la alimentación humana y al uso industrial, d) empleo de animales para la producción de proteínas de interés terapéutico (animales como bioreactores) y f) manipulación genética de animales donadores de órganos para su trasplante a humanos. Se trata de estudios a largo plazo, más complejos, y que requieren una inversión económica mucho mayor que los realizados en ratón. Algunos de estos proyectos han dado lugar a animales transgénicos con aplicaciones productivas. Por ejemplo, el equipo de Clark inició en Edimburgo un proyecto de obtención de ovejas transgénicas para la producción de proteínas de interés farmacéutico en la leche. Con este fin, empleó el factor IX de la coagulación y la  $\alpha$ 1-antitripsina (Wilmut y col., 1991). En la actualidad, ya se comercializa la  $\alpha$ 1-antitripsina obtenida de las ovejas transgénicas.

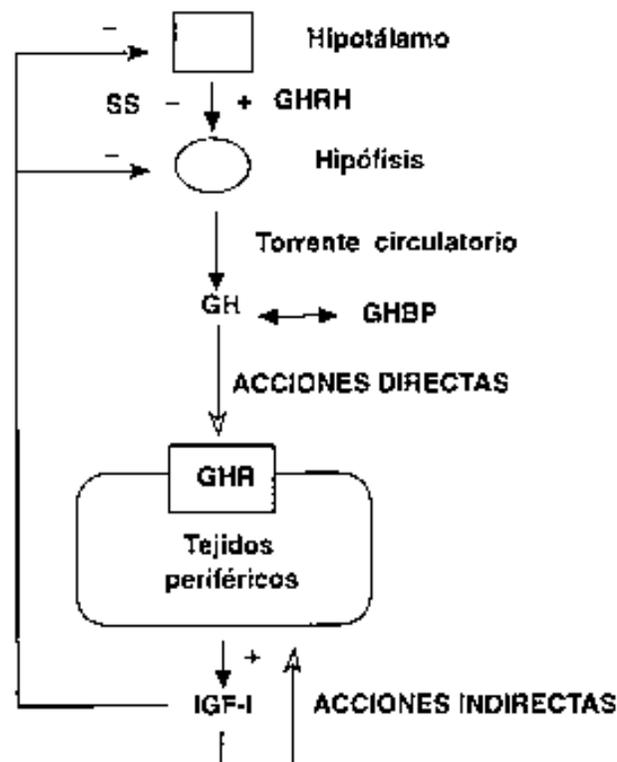
## 2. HORMONA DE CRECIMIENTO

La hormona de crecimiento (GH) pertenece a un grupo de péptidos muy relacionados evolutivamente, entre los que se incluyen la prolactina y el lactógeno placentario (Moore y col., 1982). Esta hormona se produce en la hipófisis anterior, tiene 22 kDa de peso y está compuesta por una única cadena polipeptídica de 191 aminoácidos, con dos puentes disulfuro que generan un lazo mayor y un lazo menor. Es la hormona más abundante de la hipófisis, aunque existe una forma variante de 20 kDa que se diferencia únicamente en la delección de los residuos 32 al 46 (Baumann y col., 1983). La regulación de los niveles plasmáticos de la hormona de crecimiento se produce tanto a nivel transcripcional como a nivel de secreción de la proteína. La secreción hipofisaria de la hormona depende de la acción concertada de dos péptidos hipotalámicos, el GHRH (*Growth Hormone Releasing Hormone*) y la somatostatina (SS), con acción estimuladora e inhibidora respectivamente (Rivier y col., 1982; Brazeau y col., 1973). La secreción de GH es pulsátil y sigue un patrón rítmico con variaciones a lo largo del día. Su regulación conduce a cambios en la frecuencia y amplitud de los pulsos (Müller y col., 1982).

Es bien conocido que la hormona de crecimiento de diferentes especies promueve el crecimiento (Martin, 1978; Palminter y col., 1982) y es responsable de gran variedad de efectos a nivel de metabolismo mineral, metabolismo de carbohidratos, lípidos y proteínas (Press, 1988). Se considera que su acción está mediada por factores séricos, que inicialmente recibieron el nombre de somatomedinas (Salmon y Daughaday, 1957), y que actualmente se conocen como factores de crecimiento similares a insulina (IGFs) (Phillips y Vassilopoulou-Sellin, 1980) (Esquema II).

**Esquema II.** Regulación de la secreción y acción de la hormona de crecimiento.

SS, somatostatina; GHRH, hormona liberadora de GH; GH, hormona de crecimiento; GHBP, proteína de unión a GH; GHR, receptor de GH; IGF-I, factor de crecimiento semejante a la insulina.



## 2.1. ESTRUCTURA DE LA HORMONA DE CRECIMIENTO

Se han clonado el gen y el cDNA de la GH de varias especies: humana (Goeddel y col., 1979; DeNoto y col., 1981), rata (Seeburg y col., 1977), bovina (Woychick y col., 1982) y porcina (Seeburg y col., 1983). El estudio de sus secuencias ha revelado que poseen cinco exones y cuatro intrones. Los exones están altamente conservados, pero los intrones son de longitud variable. En la región promotora se describen también importantes homologías (Woychick y col., 1982). Se han identificado elementos de respuesta a glucocorticoides, hormonas tiroideas y ácido retinoico, todos ellos estimuladores de la transcripción (Evans y col., 1982; Bedó y col., 1989).

La estructura tridimensional de la GH se ha conocido tras cristalización de la hormona porcina (Abdel-Meguib y col., 1987). El alto grado de homología de las GHs de las distintas especies mamíferas permite utilizar esta estructura cristalográfica como base para los estudios moleculares. Así, se han estudiado las diferentes regiones de la hGH involucradas en el reconocimiento de dos receptores, el receptor hepático de GH y el receptor de la prolactina (Cunningham y col., 1989a,b, 1990a,b y 1991). La hormona de crecimiento humana tiene afinidad por los dos tipos de receptores, a diferencia de la GH de otras especies como la bovina que se unen tan sólo al receptor propio de la hormona.

## 2.2. EL RECEPTOR DE LA HORMONA DE CRECIMIENTO (GHR)

Se trata de un receptor anclado en la membrana que consta de un dominio extracelular de unión a GH de 246 residuos de aminoácidos, una única región transmembrana hidrofóbica de 24 residuos y un dominio intracelular de 350 aminoácidos. Esta proteína está altamente conservada entre diferentes especies. Así, la humana y de conejo presentan un 84% de identidad (Leung y col., 1987), mientras la de rata solo presenta un 70% (Mathews y col., 1989).

El receptor de GH, junto al de la prolactina, se ha englobado recientemente dentro de una familia de receptores que presentan una estructura similar en el dominio extracelular y que incluye receptores de numerosas citoquinas (Bazan y col., 1989; Thoreau y col., 1991; Kelly y col., 1991). Del dominio intracelular se conoce que posee residuos de tirosina y serina fosforilados. Sin embargo, no tiene actividad tirosina-quinasa (Foster y col., 1988). El receptor se asocia a una tirosina proteína quinasa denominada JAK2 que inicia una cascada de fosforilaciones vía MAP quinasa (Campbell y col., 1993). Otra vía por la que parece actuar la GH es la de los fosfatidilinositoles y de la proteína quinasa C (Le Cam y Legraverend, 1993).

Prácticamente todas las células del organismo poseen receptores de hormona de crecimiento, aunque es el hígado el que presenta mayor número, seguido del tejido adiposo, corazón y riñón. En los tejidos del sistema esquelético (músculo y cartílago) también está presente (Mathwes y col., 1989, Kelly y col., 1991). Se observa una correlación entre los niveles de mRNA del receptor en los diversos órganos a lo largo del desarrollo y la velocidad de crecimiento de éstos. Los niveles de receptor están regulados por hormona de crecimiento. Una exposición prolongada a GH incrementa los niveles de receptor en hígado y adipocitos (Baxter y col., 1984; Gause y Eden, 1986; Maiter y col., 1988). Aunque, se considera que el crecimiento fetal es independiente de GH. Se ha detectado la presencia del receptor en células hepáticas, en tejido endocrino y conductos del páncreas y en epitelio tubular renal de fetos humanos (Hill y col., 1992).

### 2.3. PROTEINA DE UNIÓN A HORMONA DE CRECIMIENTO (GHBP)

En 1978 se postuló que el 80% de la hormona de crecimiento plasmática se halla unida a una proteína transportadora de 60-65 kDa (*Growth Hormone Binding Protein*, GHBP) (Ellis y col., 1978; Hadden y col., 1964; Herington y col., 1986; Baumann y col., 1986). Con la clonación de los receptores de GH en 1987, se descubrió que la secuencia aminoacídica de la GHBP sérica se corresponde con la del dominio extracelular del receptor (Leung y col., 1987). En estos últimos años se han realizado numerosos estudios que confirman su papel de transportadora de GH y abren nuevas expectativas en cuanto a su función.

Mediante estudios *in vitro* se ha comprobado que la GHBP bloquea la unión de la hormona de crecimiento al receptor. Esto sugiere una función de la proteína sérica como reguladora de la acción de la GH impidiendo la unión de la hormona a los tejidos diana *in vivo*. De este modo, incrementa la vida media de la GH en sangre, alargando el efecto de los pulsos de secreción de la hormona (Lim y col., 1990).

En numerosos casos se ha observado que el nivel de GHBP circulante se correlaciona con el de receptores en los tejidos. Así, individuos con el síndrome de Laron, con una falta total de receptor de GH, tampoco presentan GHBP en suero (Daughaday y Trivedi, 1987). Estos datos concuerdan con la hipótesis de que la proteína de unión a GH se origina por proteólisis del receptor. Únicamente, en rata y ratón se ha detectado la presencia de un mRNA de 1,2 Kb específico para GHBP. Se distingue perfectamente del transcrito de 4,5 Kb de GHR y se obtiene por procesamiento alternativo del mismo gen (Sadeghi y col., 1990).

## 2.4. ACCIONES BIOLÓGICAS DE LA HORMONA DE CRECIMIENTO

En 1910 se observó que la hipofisectomía detiene el crecimiento en perros (Crowe y col., 1910). Diez años después, se demostró que la administración de extractos salinos de hipófisis de origen bovino aceleraban el crecimiento en ratas (Evans y col., 1921). Sin embargo estos efectos no se consiguieron reproducir en humanos hasta 1957 con la purificación de la hormona (Beck y col., 1957; Raben y Hollenberg, 1959). La GH no sólo actúa en el crecimiento somático (Martin, 1978; Palminter y col., 1982), sino también sobre el metabolismo intermediario estimulando el anabolismo proteico y la lipólisis. Promueve un mayor aporte de aminoácidos y glucosa a los tejidos, facilitando los procesos de biosíntesis y disminuyendo los de catabolismo proteico (Milman y Russel, 1950; Raben y Hollenberg, 1959; Swislocki y col., 1970; Pandian y col., 1971; Goodman y col., 1986).

### 2.4.1. Acciones metabólicas de la hormona de crecimiento

Los efectos metabólicos de la hormona pueden subdividirse en dos categorías: a) acciones semejantes a la insulina y b) efectos diabotogénicos o antiinsulínicos, lo que se corresponde con sus efectos agudos o crónicos, respectivamente. Ambos efectos son intrínsecos de la molécula de la hormona de crecimiento (Kostyo y col., 1985; Ader y col., 1987). Diversas observaciones sugieren que algunos de los efectos agudos y transitorios, como la estimulación de la captación de glucosa del músculo, son mediados por la insulina (Goodman, 1968). Otros, como la estimulación de la síntesis proteica en músculo, no parecen depender de esta hormona (Kostyo, 1968).

#### a) Efectos agudos de la hormona de crecimiento

Se han descrito efectos semejantes a la insulina de la hormona de crecimiento, agudos y transitorios, sobre el metabolismo de las proteínas, los lípidos y carbohidratos. *In vitro* la hormona de crecimiento estimula la captación de aminoácidos en células musculares en 20 minutos, mientras que la insulina lo hace en 5 minutos. También estimula la síntesis de proteínas. Este segundo efecto no es debido a la mayor disponibilidad de aminoácidos, ni a un aumento en los niveles de insulina o IGF-I en plasma (Kostyo, 1968; Ahren y col., 1968). En el tejido adiposo, la hormona ejerce efectos agudos semejantes a insulina. La lipólisis es inhibida y los niveles plasmáticos de los ácidos grasos libres disminuyen muy acentuadamente (Birnbau y Goodman, 1976; Swislocki y Szego, 1965; Bjorgell y col., 1984). En cuanto al metabolismo de carbohidratos, la GH aumenta la captación de glucosa y la glucólisis en músculo de rata, riñón y tejido adiposo en 20-60 minutos (Mahler y Szabo, 1969; Goodman, 1968). En este caso, se ha sugerido que tales efectos son mediados por la insulina.

## b) Efectos crónicos de la hormona de crecimiento

Cuando la hormona es administrada de manera puntual o aguda, es relativamente fácil separar los efectos propios de la hormona de los del IGF-I u otras hormonas. Sin embargo, elevaciones crónicas de los niveles de hormona de crecimiento provocan necesariamente aumentos en los valores circulantes de IGF-I y de la propia insulina (Metcalf y col., 1981; Rizza y col., 1982). Mientras que se acepta que el IGF-I es el mediador de las propiedades de estimulación del crecimiento de la GH, el incremento de los niveles de insulina plasmáticos es crítico para poder explicar los efectos anabólicos de la GH, actuando la insulina en colaboración con el IGF-I. Se ha implicado la insulina tanto en el aumento de la retención de nitrógeno como en el efecto estimulador de la síntesis proteica de la GH (Milman y col., 1951; Manchester, 1970).

Los efectos antilipolíticos, al igual que los otros efectos semejantes a insulina, duran sólo 1-2 horas. Posteriormente se aprecia un incremento en la lipólisis *in vitro* (Fain y col., 1971) e *in vivo*, aumentando los cuerpos cetónicos y los ácidos grasos libres (Chernick y col., 1972).

Cuando se administran extractos de hipófisis a animales adultos, éstos desarrollan un cuadro similar al producido por diabetes mellitus (Altszuler y col., 1968). Los pacientes tratados con hormona de crecimiento presentan niveles elevados de insulina plasmática tanto en estado basal como postprandial (Walker y col., 1989). También pacientes con una elevación crónica de los niveles de GH plasmática muestran un incremento de la concentración de insulina y una respuesta exagerada de la insulina a la glucosa (Beck y col., 1965). La GH actúa directamente sobre las células  $\beta$  estimulando la síntesis de DNA y la replicación celular, y lo hace independientemente de la concentración de glucosa plasmática (Nielsen, 1982; Rabinovitch y col., 1983). Además de estos efectos estimuladores de la proliferación de las células  $\beta$ , la GH conduce a un aumento de la secreción de insulina en células  $\beta$  de rata en cultivo (Nielsen, 1982; Nielsen y col., 1989). De hecho, la transfección de células de la línea tumoral de islotes de rata RIN5AH con el cDNA del receptor de la hormona de crecimiento, incrementa la síntesis de insulina dependiente de GH (Moldrup y col., 1991).

Los ratones transgénicos que sobreexpresan GH son un buen modelo para el estudio de los efectos crónicos de la hormona. En estos animales se observa un aumento de la concentración de insulina sérica que no se acompaña de un descenso de la glucemia. Situación que se corresponde con un cuadro de resistencia a la insulina (Quaife y col., 1989; MacGrane y col., 1990). Los animales transgénicos PEPCK/bGH presentan resistencia a la insulina en parámetros claves de la glucólisis, gluconeogénesis y metabolismo hepático del glucógeno (Valera y col., 1993).

## 2.4.2. Acciones promotoras del crecimiento

Actualmente se admite que muchos de los efectos de la hormona de crecimiento vienen mediados por la acción del IGF-I, que es producido en el hígado y liberado al torrente circulatorio en respuesta a la hormona (Salmon y Daughaday, 1957; Daughaday y col., 1976; Froesch y col., 1985). Schoenle y col. fueron los primeros en demostrar que el tratamiento prolongado con infusiones subcutáneas de IGF-I produce crecimiento en ratas hipofisectomizadas, el cual es dependiente de la dosis empleada (Schoenle y col., 1982). Otras experiencias posteriores describen este mismo efecto en ratas normales, en ratas diabéticas y en deficientes en GH (Hizuka y col., 1986; Skottner y col., 1989).

Estudios de replicación celular con diferentes tipos celulares como células de músculo liso, condrocitos o células óseas, han demostrado que todas ellas responden al IGF-I con un aumento de la proliferación y/o un incremento en la formación de matriz. Es evidente que en estas células el IGF-I juega un papel importante en la regulación de la proliferación, la diferenciación y la síntesis de productos específicos (Froesch y col., 1985). Sin embargo, por la acción única de los IGFs no se consigue un crecimiento normal. Para ello, es necesaria la acción directa de la GH en los tejidos (Isaksson y col., 1982; Guler y col., 1988).

La hipótesis más aceptada es que la acción combinada de ambas es la que conduce al crecimiento normal y que el IGF-I juega también su papel de promotor del crecimiento a nivel paracrino (Green y col., 1985). La estimulación del crecimiento longitudinal del hueso por administración local de GH, queda completamente bloqueada cuando se añaden anticuerpos anti-IGF-I (Schlechter y col., 1986). Así mismo, la inyección de hGH en ratas hipofisectomizadas conduce a un incremento del mRNA de IGF-I distinto para cada órgano (músculo esquelético, hígado y riñón, por ejemplo), que se correlaciona fuertemente con el aumento de peso de cada uno de ellos (Murphy y col., 1987).

La comparación del fenotipo de los animales transgénicos que sobreexpresan GH con el de los que sobreexpresan IGF-I ha permitido discernir los efectos de uno u otro efector en el crecimiento de los diferentes órganos (Quaife y col., 1989).

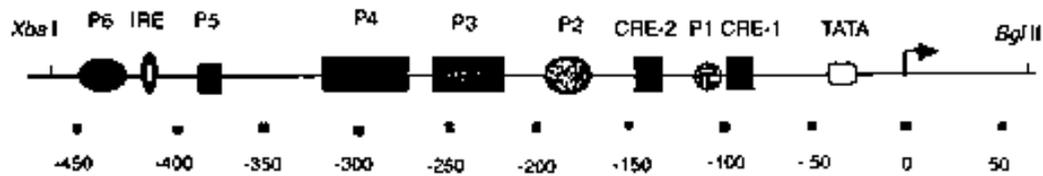
## 2.5. ANIMALES TRANSGENICOS Y CRECIMIENTO

### 2.5.1. Ratones transgénicos que sobreexpresan genes relacionados con el crecimiento

El primer ratón transgénico *gigante* se obtuvo empleando el promotor del gen de la metalotioneína I (MT-I) que dirigía la expresión de la hormona de crecimiento de rata (Palminter y col., 1982). Posteriormente, se han obtenido otras líneas de ratones transgénicos mediante microinyección de genes quiméricos formados por este mismo promotor unido a la GH humana, bovina u ovina (Palminter y col., 1983; Shea y col., 1987; Orian y col., 1989). En todos los casos los animales crecen prácticamente el doble que sus hermanos control. Así mismo, presentan una concentración plasmática de IGF-I dos veces superior a la de los controles.

Debido al efecto fenotípico que produce y a la fácil determinación de la hormona, el gen de la GH ha sido ampliamente utilizado como gen marcador para el estudio y caracterización de promotores de distintos genes en animales transgénicos. Ejemplos de estos genes son: P-enolpiruvato carboxiquinasa (PEPCK) (McGrane y col., 1988; Short y col., 1992), elastasa I (Rose y col., 1994), glucoquinasa (Jetton y col., 1994), etc. Así, los animales que sobreexpresan el gen quimérico MT/GH se caracterizan por la amplia distribución de la expresión del transgén. Además de en hígado, se detecta la presencia de transcrito de GH en páncreas, testículo, corazón, pulmón, riñón y cerebro. La máxima expresión del transgén la alcanzan cuando se añade zinc a la dieta, mostrando la misma regulación que el gen endógeno MT-I (Palminter y col., 1983).

Un modelo de ratón transgénico de gran interés es el que sobreexpresa el gen quimérico formado por el promotor de la PEPCK fusionado a la hormona de crecimiento. La región promotora reguladora (-450/+73 pb) del gen de la PEPCK es capaz de dirigir la expresión de diferentes genes estructurales cuando son introducidos en células y animales (Hatzoglou y col., 1988; McGrane y col., 1988). Al ser la PEPCK un enzima clave de la vía gluconeogénica, la expresión del gen se produce fundamentalmente en hígado y riñón, y está regulada por hormonas y cambios nutricionales. El glucagón y los glucocorticoides incrementan la expresión, mientras que la insulina la inhibe (Short y col., 1986). Los elementos regulados por estas hormonas, así como las secuencias que confieren la especificidad de tejido, están contenidos en este fragmento de la región flanqueante 5' (Wynshaw-Boris y col., 1986; Short y col., 1986; Magnuson y col., 1987; O'Brien y col., 1990) (Esquema III).



**Esquema III. Región promotora/reguladora del gen de la P-enolpiruvato carboxiquinasa de rata.** Sitios de unión a factores de transcripción. Elementos involucrados en la transcripción del gen: caja TATA, CRE-1, P1, P3 y P4. Elementos que confieren especificidad de tejido: P2 y P3. Elementos de respuesta a cAMP: CRE-1, CRE-2, P3 y P4. Elementos de respuesta a glucocorticoides: P5, IRE y P6. Elemento de respuesta a la insulina: IRE.

La regulación hormonal del promotor de la PEPCK se conserva cuando se obtienen ratones transgénicos que sobreexpresan el gen quimérico PEPCK/bGH, pudiéndose regular la expresión del transgén mediante cambios en la dieta. De esta forma, cuando el animal se somete a una dieta alta en proteínas se induce la expresión del transgén, mientras que ésta se inhibe cuando se le proporciona una dieta alta en carbohidratos (McGrane y col., 1988). En estos ratones transgénicos también se observa la especificidad de tejido propia del gen endógeno. Se ha podido comprobar que el fragmento de 450 pb del promotor de la PEPCK es capaz de dirigir la expresión de forma específica a hígado y riñón, y que dicha expresión no se produce hasta después del nacimiento. De este modo, el animal no está sometido a niveles elevados de expresión del transgén durante el desarrollo embrionario (McGrane y col., 1988).

Por otro lado, se han obtenido también modelos relacionados con la fisiología del crecimiento que emplean otros genes unidos al promotor de la metalotioneína. Así se han generado animales transgénicos que expresan el gen quimérico que contiene el factor liberador de hormona de crecimiento (MT-I/GHRH o GHRF) y animales transgénicos que sobreexpresan IGF-I (MT/IGF-I). Los primeros, que sobreexpresan el péptido hipotalámico que estimula la secreción hipofisaria de GH, presentan un incremento de peso de 1,5 veces respecto a animales control (Hammer y col., 1985). Los animales transgénicos que expresan el gen quimérico MT/IGF-I presentan un aumento de peso de 1,3 veces resultante de una organomegalia selectiva (Mathews y col., 1988).

### 2.5.2. Cambios fisiológicos

Los animales transgénicos que expresan GH son un excelente modelo para el estudio de los complejos y poco conocidos efectos reguladores de la hormona de crecimiento. Una de las consecuencias más características de la expresión del transgén es el mayor crecimiento somático de estos animales a partir de las tres semanas de edad. En el crecimiento de los diferentes componentes esqueléticos, aunque en una escala de tamaño mayor, se conserva la relación de proporciones de los ratones no transgénicos (Shea y col., 1990). Estudios anatomopatológicos indican que la hiperestimulación del crecimiento tiene lugar en todos los órganos con excepción del cerebro. Este incremento en el crecimiento es más pronunciado en hígado y corazón, al igual que ocurre en la acromegalia (Shea y col., 1987).

Por el contrario, los animales que expresan el gen quimérico MT/IGF-I no manifiestan un incremento aparente del crecimiento esquelético, aunque sí cierta inhibición de los niveles circulantes de GH e IGF-I endógenos (Mathews y col., 1988). Con unos niveles de IGF-I plasmático de 1,5 veces los de un animal control, presentan un patrón distinto de organomegalia a los transgénicos que sobreexpresan el gen quimérico MT/GH. Bazo, páncreas, cerebro y riñón son los órganos que más aumentan de peso (2, 1.8, 1.5, y 1.4 veces, respectivamente). Además, presentan un aumento de la masa muscular y/o el tejido conectivo. A diferencia de los animales que expresan el gen quimérico MT/GII, hígado y corazón no muestran más que un ligero incremento.

A diferencia de los modelos animales que expresan GH bovina, ovina o de rata, los animales que producen GH humana presentan alteraciones de la fertilidad consecuencia de la acción prolactina de la hormona humana. Las hembras presentan un fallo luteal que no permite llevar a término la gestación (Bartke y col., 1988). Mientras que los machos no dejan gestantes a las hembras, a pesar de tener suficiente producción espermática (Bartke y col., 1992). Tanto machos como hembras muestran alteraciones en la secreción hipotalámica de gonadotropinas y prolactina (Chandrashekar y Bartke, 1993). Por el contrario, los machos que expresan bGH no presentan problemas reproductivos hasta edad muy avanzada y las hembras son fértiles dependiendo de los niveles de hormona circulantes (Naar y col., 1991; Bartke y col., 1992).

### 2.5.3. Cambios metabólicos

Todos los animales que sobreexpresan genes quiméricos que contienen GH poseen unos valores séricos de insulina más elevados que los de animales control (entre 5 y 10 veces). Este incremento depende de los niveles de GH circulante, los cuales varían según la expresión del transgén. Por otro lado, se ha descrito que los animales que expresan el gen quimérico MT/bGH, a diferencia de los que expresan PEPCK/bGH, expresan el transgén en

las células  $\beta$  del páncreas. La GH producida en esta localización podría tener un efecto más directo sobre la síntesis y secreción de insulina (Welsh y col., 1986). Los cambios metabólicos de los animales que sobreexpresan GH son probablemente resultado de las acciones de la GH, la insulina y de su interacción con otras hormonas (IGF-I, glucagón, etc). Los niveles plasmáticos de IGF-I se hallan incrementados de 2 a 7 veces en estos animales. Por otra parte, los animales transgénicos que sobreexpresan el gen quimérico MT/IGF-I presentan niveles de insulina sérica inferiores a los de los controles y no desarrollan las alteraciones secundarias de los animales que sobreexpresan GH (Quaife y col., 1989).

#### 2.5.4. Patología asociadas

Los ratones transgénicos que expresan hormona de crecimiento sufren diversas alteraciones patológicas que frecuentemente afectan, entre otros órganos, al hígado. Además de la hepatomegalia que se observa macroscópicamente, suele describirse una hipertrofia hepatocelular con aumento del tamaño de células y núcleos, que presentan proliferación del retículo endoplásmico y pseudoinclusiones nucleares. Las lesiones se agravan a medida que envejecen los animales. A los cinco meses de edad se aprecian algunos megahepatocitos cuyo núcleo alcanza hasta 5 veces el contenido de DNA de un hepatocito normal. Presentan además una ligera esclerosis en hígado (Quaife y col., 1989).

La longevidad de estos animales está acortada. La mayor parte mueren en un estado caquéctico. El examen anatomopatológico post-mortem atribuye esta elevada mortalidad a fallo renal. Los riñones presentan una glomerulopatía que se caracteriza por esclerosis glomerular masiva y proliferación mesangial, además de una atrofia glomerular y tubular difusa (Quaife y col., 1989). Las lesiones renales implican un efecto directo de la GH, puesto que son compartidas por los animales MT/GRF y no por los que sobreexpresan únicamente IGF-I (Doi y col., 1990).

#### 2.5.5. Modelos de animales transgénicos de interés en producción

Genes quiméricos que contienen la hormona de crecimiento también se han introducido en el genoma de animales de interés ganadero. Los estudios se han centrado en cerdos y ovejas con la finalidad de mejorar los índices productivos. Tras la introducción del gen de la GH de diferentes especies, unido al promotor de la metalotioneína, se han obtenido cerdos que muestran una mejora significativa de la ganancia de peso diaria y del índice de transformación (kg. de pienso consumido por día/incremento de peso vivo diario) (Pursel y col., 1989). Esta mejora se asocia a un reparto distinto del destino de los nutrientes, observándose una gran reducción de la grasa subcutánea y un aumento de músculo, hueso y vísceras. Por tanto, son animales más magros, con un porcentaje mayor de músculo en la

canal que los controles. Los cerdos que expresan el gen quimérico PEPCK/bGH también presentan una mejora substancial de los parámetros de crecimiento que se acompañan de una clara reducción del grosor del tocino dorsal (Wieghart y col., 1990).

En los cerdos transgénicos que sobreexpresan hormona de crecimiento se observan las mismas modificaciones fisiológicas que en el ratón. Presentan niveles de IGF-I plasmático de 2 a 7 veces superiores (Miller y col., 1989) y en ayuno alcanzan concentraciones de insulina de hasta 20 veces las de sus hermanos control. Estos niveles se acompañan de moderada hiperglucemia, lo que sugiere la aparición de un síndrome de resistencia a la insulina. Por otro lado, sufren gran variedad de patologías asociadas al exceso de hormona de crecimiento, como artrosis, mayor susceptibilidad al estrés, úlceras gástricas, letargia, anoestro en las cerdas y falta de libido en los machos. En los cerdos que expresan el gen quimérico PEPCK/bGH estos efectos secundarios aparecen con retardo (4 a 8 meses de edad) (Wieghart y col., 1990). Sin embargo, los problemas de los animales de gran tamaño no aparecen en los ratones transgénicos que expresan en este gen quimérico hasta avanzada edad (> 12 meses) (Steger y col., 1993).

Por otra parte, las ovejas transgénicas que expresan el gen quimérico MT/bGH presentan niveles alterados de IGF-I plasmático sin modificación significativa del crecimiento o de sus parámetros productivos. Los animales muestran síntomas claros de diabetes y mueren al año de edad (Ward y col., 1989; Rexroad y col., 1989; Ward y Nancarrow, 1991).

## **PARTE I: HIPOTESIS Y OBJETIVOS**

A fin de iniciar la manipulación genética de animales, nos propusimos poner a punto la técnica de obtención de ratones y conejos transgénicos mediante microinyección de DNA a ovocitos fecundados. La puesta a punto de esta tecnología, al inicio del trabajo experimental de esta Tesis Doctoral, representaría la puesta en marcha de una nueva línea de investigación en nuestro laboratorio de aplicación en biotecnología animal y biomedicina. Los objetivos que se pretendían alcanzar en esta primera parte de la Tesis Doctoral eran los siguientes:

### **1- Obtención de ratones transgénicos que sobreexpresan el gen quimérico PEPCK/hGH.**

La sobreexpresión de hormona de crecimiento en ratones transgénicos conduce a un incremento del crecimiento (Palmiter y col., 1982; McGrane y col., 1988). Por ello, para poner a punto la técnica de microinyección de DNA a óvulos fecundados, nos propusimos en primer lugar la obtención de ratones transgénicos que sobreexpresaran hormona de crecimiento humana bajo el control del promotor de la P-enolpiruvato carboxiquinasa.

### **2- Obtención de conejos transgénicos que sobreexpresan el gen quimérico PEPCK/bGH.**

El conejo es una especie de interés productivo en los países mediterráneos. Sin embargo, actualmente la selección genética por métodos clásicos de genética cuantitativa no puede conducir a una mejora de los parámetros de crecimiento en razas selectas. La obtención de conejos transgénicos que sobreexpresaran hormona de crecimiento podría ser de utilidad en producción animal si estos animales presentaran un crecimiento precoz. Para la obtención de estos animales empleamos el gen quimérico PEPCK/bGH, que se expresa en hígado y se regula por la dieta en ratones transgénicos (McGrane y col., 1988). Estos ratones, que crecen el doble que sus hermanos control, no desarrollan alteraciones patológicas y son capaces de reproducirse hasta edad avanzada. Por tanto, conejos transgénicos que sobreexpresaran el gen quimérico PEPCK/bGH podrían ser un buen modelo de crecimiento precoz, ya que los conejos que se destinan al consumo humano se sacrifican tempranamente (2 meses de edad). Además, estos conejos podrían ser empleados como un modelo para el estudio de las acciones fisiológicas y metabólicas de la GH en especies de mayor tamaño.

Así pues, los objetivos concretos de esta parte del trabajo fueron:

- 1- Obtención de ratones transgénicos que expresen de forma regulada el gen quimérico PEPCK/hGH.
- 2- Puesta a punto de la técnica de obtención de conejos transgénicos.
- 3- Obtención de conejos transgénicos que expresen el gen quimérico PEPCK/bGH.
- 4- Estudio de los parámetros de crecimiento de los conejos transgénicos.
- 5- Estudio de los parámetros metabólicos de los conejos transgénicos que sobreexpresan el hormona de crecimiento.
- 6- Estudio anatomopatológico de las alteraciones originadas por la exposición crónica a hormona de crecimiento en los conejos transgénicos de edad avanzada.

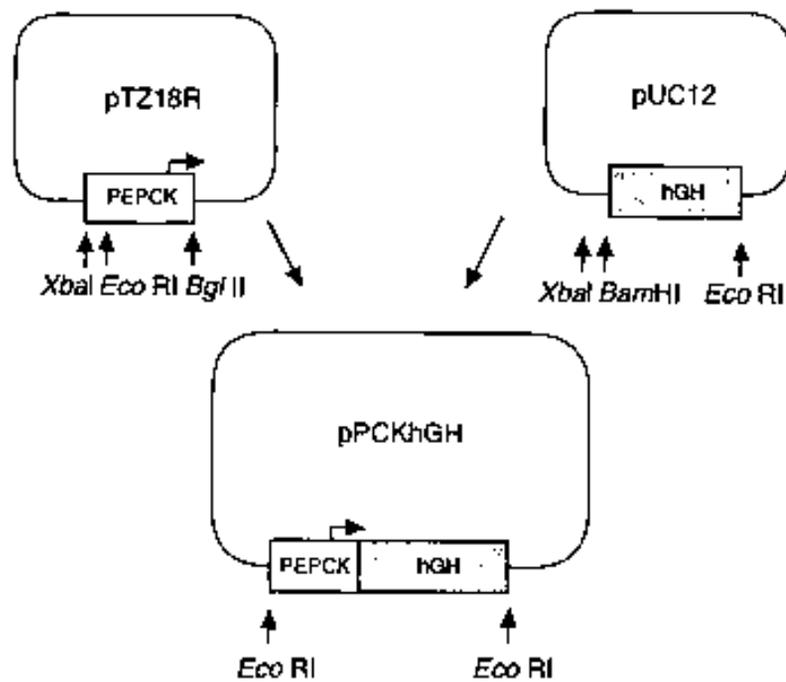
## **PARTE I: RESULTADOS**

## 1. OBTENCION DE RATONES TRANSGENICOS CON EL GEN DE LA HORMONA DE CRECIMIENTO HUMANA

Se inició el trabajo experimental con la obtención de ratones transgénicos para poner a punto la técnica de microinyección de DNA a óvulos fecundados. Escogimos para su microinyección el gen quimérico formado por la región reguladora del gen de la P-enolpiruvato carboxiquinasa (PEPCK) fusionada al gen de la hormona de crecimiento humana. El promotor del gen de la PEPCK tenía especial interés por su especificidad de tejido y su regulación por hormonas. La expresión del gen es estimulada por glucagón e inhibida por insulina. Estas características se conservan en los ratones transgénicos (McGrane y col., 1988). Por otro lado, se escogió la hormona de crecimiento para poner la técnica a punto, ya que su sobreexpresión produce una clara alteración fenotípica en ratón (Palmiter y col., 1982).

### 1.1. CONSTRUCCION DEL GEN QUIMERICO PEPCK/hGH

Este gen está formado por la fusión del fragmento *XbaI-BglII* de la región promotora del gen de la PEPCK (-460 pb a +73 pb) al fragmento *BamHI-EcoRI* de 2,2 kb que contiene el gen estructural completo de la hormona de crecimiento humana. Para su construcción, según se indica en la Fig. 1, se partió del plásmido pUC12, que contenía el gen de la hGH insertado en las dianas *BamHI* y *EcoRI* (Selden y col., 1986b). El promotor de la PEPCK se obtuvo del plásmido pTZ18R mediante restricción con los enzimas *XbaI* y *BglII* y se insertó, a continuación, delante del gen hGH en las dianas *XbaI* y *BamHI* (Fig. 1). El fragmento *EcoRI* de 2,7 kb que contenía el gen quimérico se utilizó para la obtención de animales transgénicos.

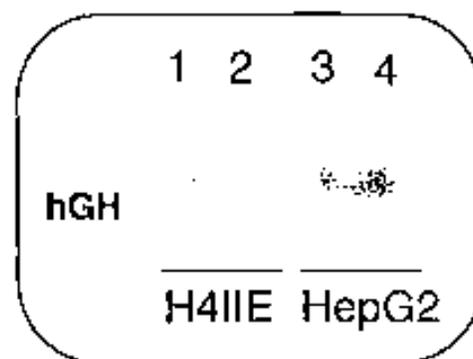


**Figura 1.** Construcción del gen quimérico PEPCK/hGH. Se partió del plásmido pUC12, que contenía el gen estructural de la hGH en las dianas de restricción *Bam*HI y *Eco*RI del polylinker. Se introdujo el fragmento *Xba*I/*Bgl*II (-460pb a +73 pb) del promotor de la PEPCK en las dianas *Xba*I y *Bam*HI del polylinker de pUC12, situadas en la región 5' inmediata al gen de la hGH.

## 1.2. EXPRESION DEL GEN QUIMERICO PEPCK/hGH EN CELULAS H4IIE y HepG2

Para comprobar la funcionalidad del gen quimérico, antes de pasar a su microinyección, se transfectaron transitoriamente mediante la técnica de precipitación con fosfato cálcico, dos líneas celulares, una línea celular de hepatoma de rata (H4IIE) y una línea celular de hepatoma humano (HepG2). La transfección se realizó con el plásmido pPCKhGH que contiene el gen quimérico PEPCK/hGH. 48 h después de la transfección, se incubaron unas placas con medio de cultivo en ausencia de suero y hormonas (control), y otras con dexametasona 0,1  $\mu$ M, durante 24 h. Posteriormente, se aisló RNA y se analizó mediante Northern Blot. Como se puede observar en la Fig. 2, las dos líneas celulares expresaban el gen de la hormona de crecimiento humana. La expresión era regulada, observándose un incremento de aproximadamente dos veces en los niveles del transcrito de la hGH tras incubar

con dexametasona. Además, en el medio de cultivo se detectó la presencia de hormona de crecimiento inmunoreactiva. En las células HepG2 control y tratadas con dexametasona los niveles fueron de 70 ng/ml y 120 ng/ml, respectivamente, mientras que en las H4IIE la concentración de GH era más baja, de 36 ng/ml en el medio de incubación de las células control y 50 ng/ml tras tratar con dexametasona. La determinación de hGH en el medio de cultivo de células transfectadas transitoriamente permitió comprobar que el gen quimérico PEPCK/hGH era funcional *in vivo*.



**Figura 2.** Expresión del gen quimérico PEPCK/hGH en células de hepatoma humano HepG2 y de hepatoma de rata H4IIE. Se aisló RNA total de células transfectadas transitoriamente con el plásmido que contenía el gen quimérico PEPCK/hGH. Las células se incubaron en medio en ausencia de suero y hormonas (carriles 2 y 3) o en presencia de dexametasona 1  $\mu$ M (carriles 1 y 4). La presencia de RNA específico para hGH se analizó por la técnica de Northern Blot e hibridación con sonda específica.

### 1.3. OBTENCION DE RATONES TRANSGENICOS QUE EXPRESAN EL GEN QUIMERICO PEPCK/hGH

Una vez observado que el gen quimérico PEPCK/hGH se expresaba en células en cultivo, se procedió a su microinyección a ovocitos fecundados para la obtención de ratones transgénicos. El fragmento de 2,7 kb que se microinyectó se obtuvo por digestión con *EcoRI*, el cual corta dentro del promotor PEPCK en la posición -450 pb y al final del gen de la GH. Los zigotos microinyectados fueron transferidos a hembras receptoras, que llevaron a cabo la gestación (apartado Materiales y Métodos 2.5.).

Para comprobar si alguno de los animales nacidos había incorporado el gen quimérico, se obtuvo DNA genómico de una porción de cola, que fue digerido con el enzima de

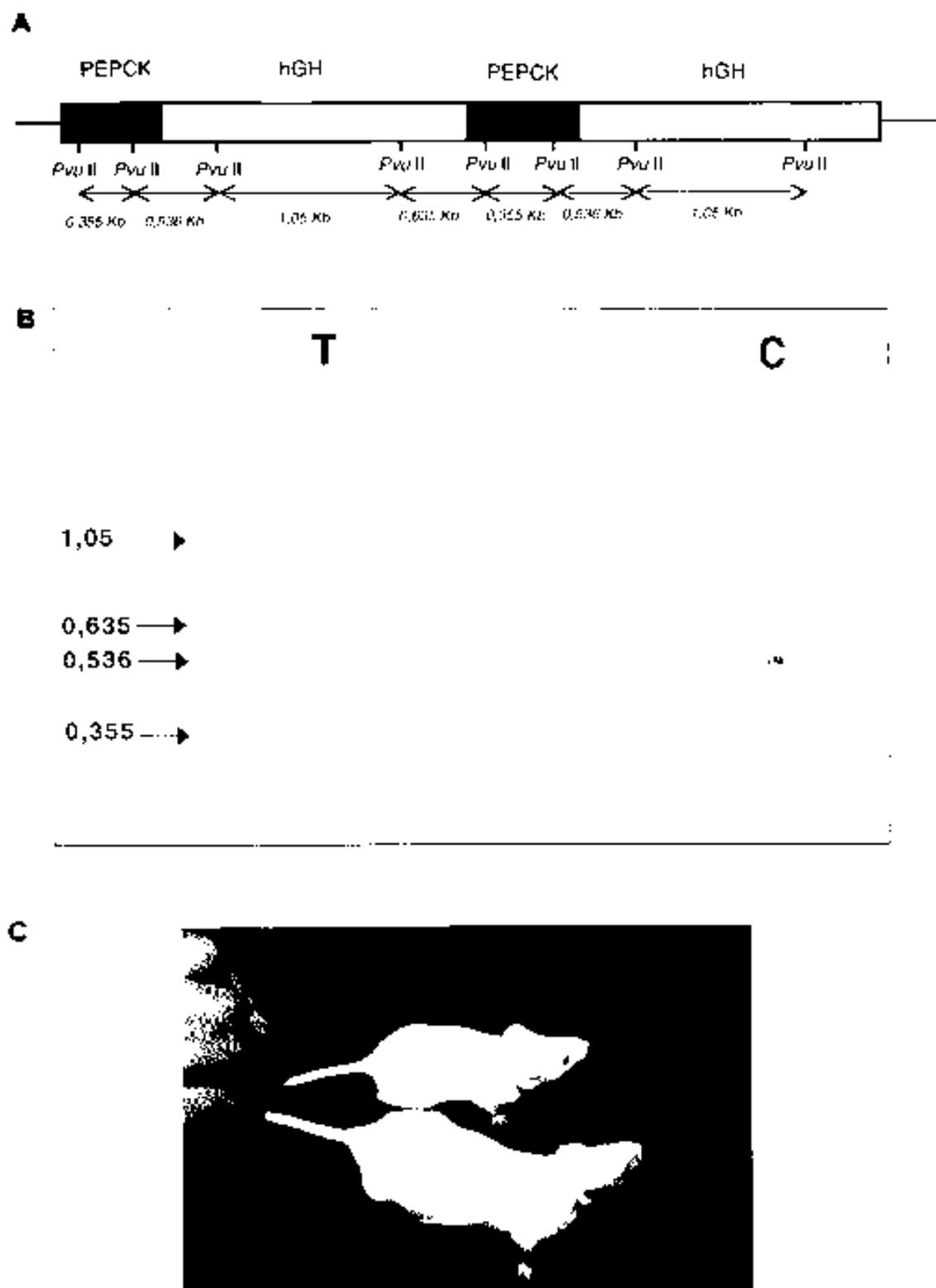
restricción *PvuII*. Este enzima tiene dos dianas en el promotor de la PEPCK y otras dos en el gen de la hGH. Por lo cual, al realizar un Southern Blot del DNA genómico de un animal transgénico, empleando como sonda la totalidad del gen quimérico, se debían observar tres bandas de 1,05, 0,536 y 0,355 kb, si únicamente se había integrado una sola copia del transgén, y una cuarta banda de 0,635 kb en caso contener más copias (Fig. 3A). En la Fig. 3B se presenta el Southern Blot en el cual se observan las cuatro bandas esperadas, tres iguales al control plasmídico, más una cuarta correspondiente al fragmento resultante de la unión cabeza-cola del transgén. Este patrón de bandas corresponde a un ratón hembra transgénico que se obtuvo de esta experiencia. Se estimó, por comparación con controles de DNA plasmídico de 2 y 5 copias, que había incorporado unas 7 copias del gen en su genoma orientadas cabeza-cola. Esta hembra a los 2 meses de edad pesaba el doble que su hermana no transgénica. En la Fig. 3C se presenta una foto de los dos animales. Se determinaron los niveles séricos de hGH en el animal transgénico alimentado con una dieta estándar de laboratorio y tras una semana de dieta alta en carbohidratos (CHO). Los resultados, recogidos en la Tabla I, indicaban que el animal transgénico presentaba niveles elevados de hGH. Sin embargo, este animal mostraba una reducción de los niveles de hormona humana tras una semana de dieta alta en carbohidratos. Por tanto, los resultados obtenidos indicaban que la expresión del transgén se regulaba de una forma similar a la del gen endógeno de la PEPCK.

En esta primera experiencia de microinyección se cumplió un primer objetivo al obtener animales transgénicos que producían la hormona según el patrón de regulación esperado. Posteriormente, se pasó a la microinyección de otros genes de interés. Este trabajo sirvió para poner en marcha en nuestro laboratorio otros proyectos que utilizan ratones transgénicos. Así mismo, representaba un paso previo imprescindible para poner a punto la técnica de obtención de conejos transgénicos.

Tabla I. Niveles séricos de hGH en el ratón transgénico que expresa el gen PEPCK/hGH

	Dieta estándar	Dieta alta CHO
Control	N.D.	N.D.
Transgénico	1,7 µg/ml	0,44 µg/ml

N.D., No detectado.



**Figura 3. Ratones transgénicos que expresan el gen quimérico PEPCK/hGH.**

A) Esquema del gen quimérico PEPCK/hGH en que se indica la situación de las dianas de restricción, *PvuII* y se simula la integración de dos copias del gen cabeza-cola. B) Southern Blot de DNA genómico de ratones obtenidos tras la microinyección de cigotos con el gen quimérico PEPCK/hGH. El DNA se aisló según se indica en el apartado de materiales y métodos y se analizó por Southern Blot e hibridación empleando como sonda la totalidad del gen quimérico. En la autorradiografía se aprecia el patrón de bandas esperado correspondiente a un animal transgénico (carril T), junto a un control de DNA plasmídico de 5 copias (carril C). C) Ratón transgénico que expresa el gen quimérico PEPCK/hGH junto a un hermano control de igual sexo y edad.

## 2. OBTENCION DE CONEJOS TRANSGENICOS CON EL GEN DE LA HORMONA DE CRECIMIENTO BOVINA

Con el fin de llevar a cabo proyectos de mayor aplicación biotecnológica y de interés veterinario nos propusimos poner a punto en nuestro laboratorio la técnica de obtención de conejos transgénicos. La hormona de crecimiento humana produce, debido a su actividad prolactina, serios problemas reproductivos en los animales transgénicos que la sobreexpresan (Bartke y col., 1988). Por tanto, a fin de obtener conejos transgénicos que sobreexpresaran GH, se empleó el gen quimérico formado por fusión del promotor de la PEPCK al gen de la hormona de crecimiento bovina (PEPCK/bGH). Se eligió este gen quimérico ya que se había observado que los ratones transgénicos no desarrollan problemas reproductivos hasta edad muy avanzada.

### 2.1. PUESTA A PUNTO DE LA TECNICA DE OBTENCION DE CONEJOS TRANSGENICOS

La técnica que desarrollamos para la obtención de conejos transgénicos se basa en la microinyección de DNA en el pronúcleo masculino de ovocitos fecundados (Ernst y col., 1991). Sin embargo, a diferencia de la técnica de obtención de ratones transgénicos, la obtención de conejos transgénicos no está estandarizada. Son pocos los laboratorios que han producido animales transgénicos de esta especie y la técnica que han utilizado no está optimizada. A continuación se presenta el protocolo puesto a punto en nuestro laboratorio.

#### 2.1.1. Obtención de cigotos de conejo

Para la obtención de los ovocitos fecundados partíamos, en cada jornada de microinyección, de cuatro o cinco hembras donadoras no superovuladas. Un día antes se escogían, a partir de un grupo mayor de animales, aquellas hembras que presentaban estro natural y se cruzaban con machos a las 15:00 h, 19 horas antes de la obtención de los cigotos. A la mañana siguiente, las hembras eran sacrificadas. De cada una de ellas, se extraían los oviductos, junto con los ovarios y una pequeña porción de los cuernos uterinos (Fig. 4A). Los oviductos extraídos se trasladaban al laboratorio de microinyección en solución tamponada PBS, donde, bajo campana de flujo laminar, se separaba y limpiaba de cada uno de ellos el mesometrio infiltrado de tejido adiposo. Se realizaba una perfusión de cada uno de ellos con 3 ml de solución tamponada PBS sobre placas de Petri de 30 mm (Fig. 4B,C). Se aislaban los óvulos bajo la lupa y, posteriormente, se repartían en gotas de cultivo de

medio Brinster (Materiales y Métodos 2.5.2.). Los óvulos se mantenían en el incubador a 37°C en atmósfera de 5% de CO<sub>2</sub> hasta el momento de su microinyección. En caso de obtenerse un número bajo de cigotos, la observación de los puntos de ovulación (estigmas foliculares) en los ovarios nos indicaba si se habían producido pérdidas en la recuperación de éstos, o si era la hembra la que no había ovulado correctamente (Fig. 4D).

Las hembras empleadas de la raza sintética IRTA fueron buenas donadoras de cigotos. Se obtuvo una media de 10 óvulos/hembra sin haber sometido éstas a tratamiento hormonal. Se planteó la posibilidad de superovular las hembras donadoras, pero se estimó más adecuado no hacerlo pues un tratamiento hormonal de PMSG/HCG produce un descenso de la calidad de los cigotos. La disponibilidad de un buen número de hembras de la granja experimental del IRTA nos permitió escoger las más receptivas en cada jornada de trabajo para acoplarlas con el macho o emplearlas como receptoras. El estricto cumplimiento del horario en la obtención de los ovocitos fecundados era esencial para el éxito de todo el proceso, pues de lo contrario los óvulos no se encontraban en el estadio de dos pronúcleos adecuado para su microinyección. Una vez obtenidos, los cigotos de conejo se desarrollaban con mayor velocidad que los de ratón, por lo que en pocas horas dejaban de ser visibles los pronúcleos.

### 2.1.2. Microinyección de los ovocitos fecundados de conejo

El proceso de microinyección que empleamos para los óvulos de conejo es muy semejante al del ratón. La principal diferencia consiste en que se trata de cigotos de mayor tamaño y de citoplasma más opaco. Sin embargo, los pronúcleos son lo suficientemente visibles como para permitir la microinyección (Fig. 5A,B). Por otro lado, poseen una zona pelúcida mucho más gruesa y recubierta de una espesa capa de mucina, que dificulta su manejo. El medio de cultivo Brinster-HEPES que empleamos rutinariamente para la microinyección de los cigotos de ratón (Materiales y Métodos 2.5.2.) no resultó adecuado para los de conejo. Estos se adherían a las pipetas de cristal impidiendo su correcta manipulación en las placas de microinyección. Probablemente la presencia de HEPES en el medio era la causante de este efecto. El empleo de alcohol polivinílico a una concentración de 1 mg/ml mejoró la manipulación, pero los cigotos presentaban peor aspecto y se descartó su utilización. Finalmente se optó por emplear el medio de cultivo de Brinster-bicarbonato, tamponado con una atmósfera de 5% CO<sub>2</sub>, realizando un recambio frecuente de éste.

### 2.1.3. Transferencia de cigotos a la hembra receptora

La transferencia de los cigotos la realizamos en la misma jornada, de una a dos horas después de finalizada la microinyección. Se utilizaban con este fin hembras en estado de pseudogestación, que habían sido sometidas a tratamiento hormonal con 100 U.I. de HCG

(i.m.) simultáneamente a la cubrición de las hembras donadoras.

Para realizar la transferencia de cigotos nos planteamos inicialmente dos tipos posibles de intervención quirúrgica, uno por laparotomía ventralmedia y un segundo por acceso lateral. Escogimos el segundo tipo, ya que evita en mayor medida que las conejas se reabran las heridas. La técnica no resultó extremadamente dificultosa, aunque era de mayor duración que la laparotomía ventralmedia. Por esta razón se realizó la transferencia a una única hembra por jornada de microinyección. Se escogió la ketamina como anestésico para obtener una buena recuperación del animal.

La coneja receptora se preparaba con un preanestésico (0,5 ml/kg de P.V. de Rompún<sup>®</sup> i.m.) y se depilaban los dos flancos del animal con una maquinilla de afeitar. Tras la anestesia (0,5 ml/Kg de P.V. Imalgene<sup>®</sup> 1000 i.m.) se preparaba el campo quirúrgico y se accedía a la cavidad abdominal por un costado. Tras realizar una incisión de unos 5 cm en piel, se cortaba el tejido subcutáneo y las tres capas musculares junto con el peritoneo. El oviducto era localizado con ayuda de la luz fría y por palpación. Una vez situado, se recogían 10 cigotos microinyectados en 10  $\mu$ l de medio de cultivo con una pipeta automática (Fig. 5C) y con esta misma se transferían al oviducto presionando ligeramente con los dedos el infundíbulo contra la punta de la pipeta para evitar el reflujo (Fig. 5D). Una vez se había llevado a cabo esta operación se colocaba de nuevo el oviducto en la cavidad abdominal y se cerraba la musculatura y el tejido subcutáneo con sutura de Catgut crómico y la piel con seda de 2/0 aplicando puntos simples en U horizontal. El mismo proceso era repetido en el otro costado. La coneja se recuperaba y se le proporcionaban los cuidados necesarios para llevar la gestación a buen término.

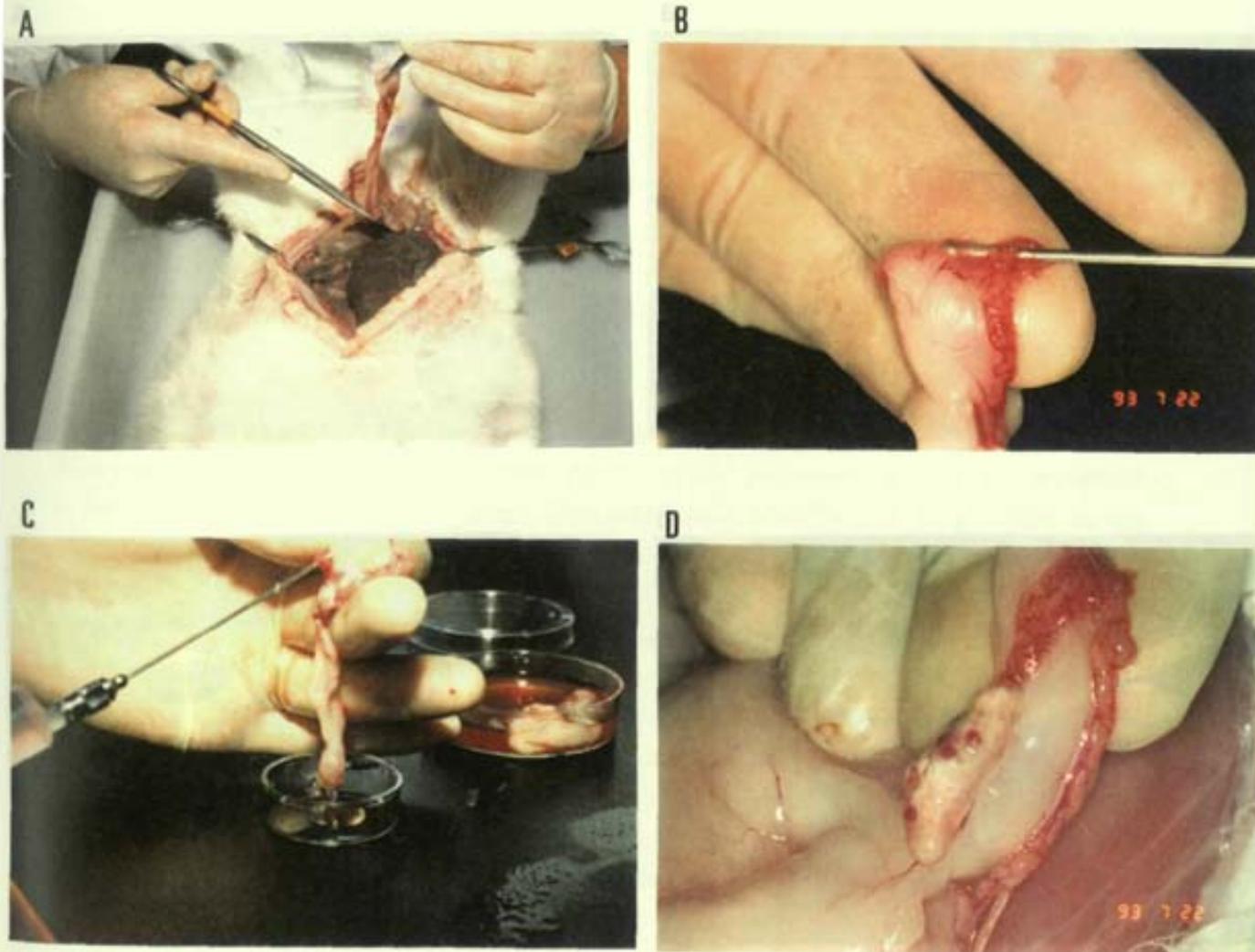


Figura 4. Obtención y manipulación de los oocitos.

**Figura 4. Obtención de ovocitos fecundados de conejo.** *Detalle de la manipulación de oocitos en:*  
A) Extracción de la hembra donadora de ovario, oviducto, junto a una pequeña porción de cuerno uterino. B) Introducción de la cánula atraumática en el infundíbulo. C) Perfusión del oviducto que permite la recolección de los ovocitos fecundados en el medio recuperado en la placa de Petri D) Detalle del ovario y oviducto extraídos. En el ovario se observan los puntos de ovulación.

## QUÍMERO (EPCK/NGH)

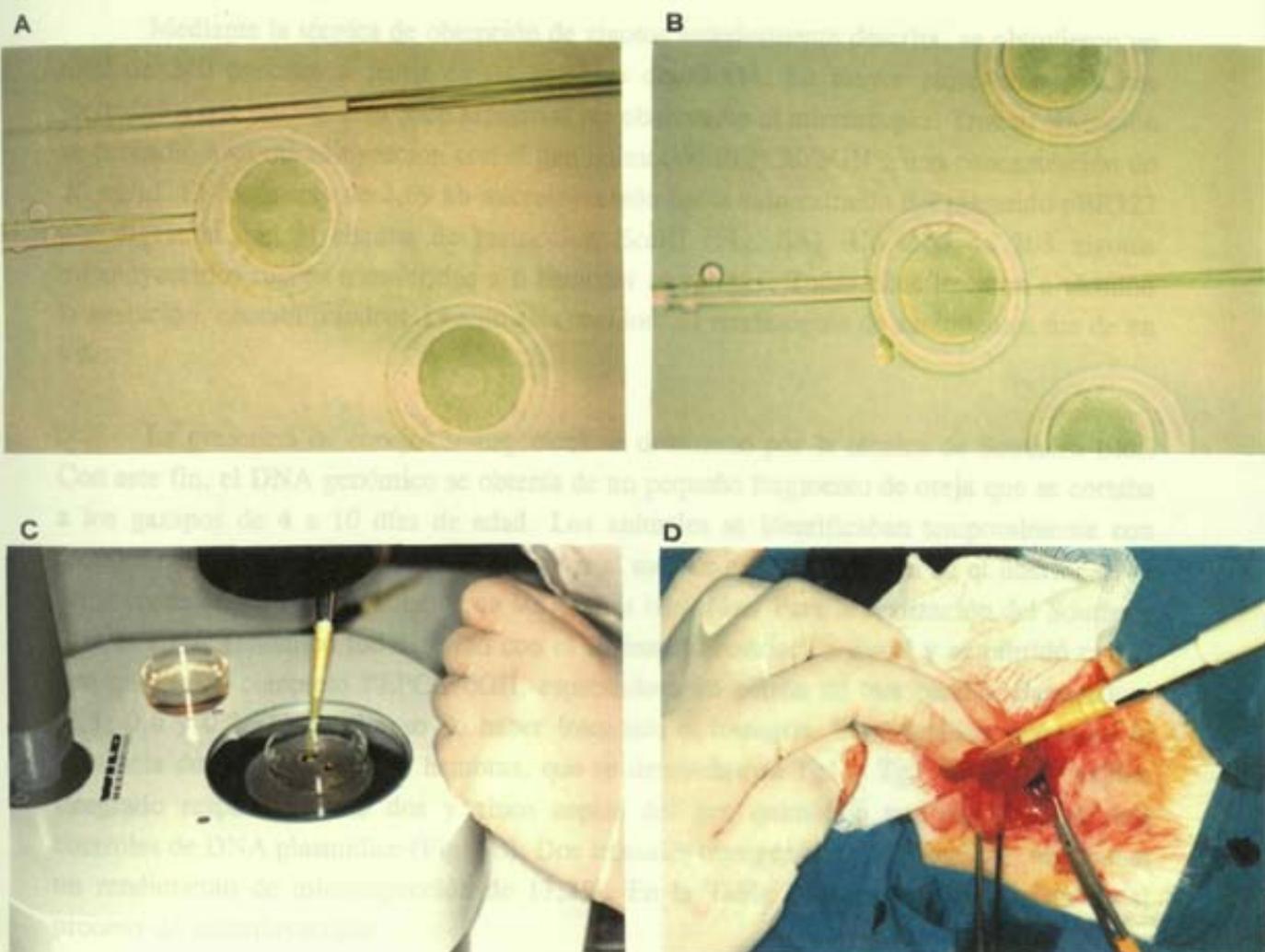


Tabla II. Eficiencia del proceso de microinyección.

**Figura 5. Microinyección y transferencia de los cigotos.**

A) Cigotos de conejo en que se visualizan los pronúcleos. Detalle de la micropipeta de inyección en que se observa el menisco de la solución de DNA. B) Microinyección en el pronúcleo. C) Recogida de los cigotos microinyectados con la pipeta automática. D) Transferencia de los cigotos al infundíbulo de la hembra receptora.

## 2.2. OBTENCION DE CONEJOS TRANSGENICOS QUE EXPRESAN EL GEN QUIMERICO PEPCK/bGH

Mediante la técnica de obtención de cigotos anteriormente descrita, se obtuvieron un total de 240 ovocitos a partir de 24 hembras donadoras. La mayor parte eran ovocitos fecundados que presentaban buen aspecto al ser observados al microscopio. Tras su obtención se procedió a su microinyección con el gen quimérico PEPCK/bGH a una concentración de 10 ng/ $\mu$ l. El fragmento de 2,69 kb microinyectado había sido extraído del plásmido pBR322 por digestión con el enzima de restricción *EcoRI* (Fig. 6A). Un total de 168 cigotos microinyectados fueron transferidos a 6 hembras receptoras. Todas ellas llevaron a término la gestación, contabilizándose 15 animales nacidos. El rendimiento de nacimientos fue de un 9%.

La presencia de conejos transgénicos se determinó por la técnica de Southern Blot. Con este fin, el DNA genómico se obtenía de un pequeño fragmento de oreja que se cortaba a los gazapos de 4 a 10 días de edad. Los animales se identificaban temporalmente con crotales numerados y cuando eran destetados al mes de edad se tatuaban en el interior de la oreja como se hace rutinariamente en las granjas cunícolas. Para la realización del Southern Blot el DNA genómico fue digerido con el enzima de restricción *PvuII* y se hibridó con el gen quimérico completo PEPCK/bGH, esperándose un patrón de tres bandas diagnósticas (1,3; 0,6 y 0,3 kb) en el caso de haber integrado el transgén. Estos análisis revelaron la presencia de dos transgénicos hembras, que se denominaron Tg1 y Tg2. Se estimó habían integrado respectivamente dos y cinco copias del gen quimérico por comparación con controles de DNA plasmídico (Fig. 6B). Dos animales transgénicos de 15 nacidos, representa un rendimiento de microinyección de 13,3%. En la Tabla II se resume la eficiencia del proceso de microinyección.

Tabla II. Eficiencia del proceso de microinyección.

Hembras donadoras	24	
Ovulos obtenidos	240	
Zigotos microinyectados	176	
Zigotos transferidos	168	95,5 % (A)
Hembras receptoras	6	
Animales nacidos	15	8,9 % (B)
Transgénicos obtenidos	2	13,3 % (C)

Se recogen los datos de los animales empleados y los cigotos manipulados en los distintos pasos del proceso. (A) % de cigotos transferidos respecto al total de óvulos microinyectados. (B) % de animales nacidos respecto a cigotos transferidos. (C) % de animales transgénicos respecto a animales analizados.

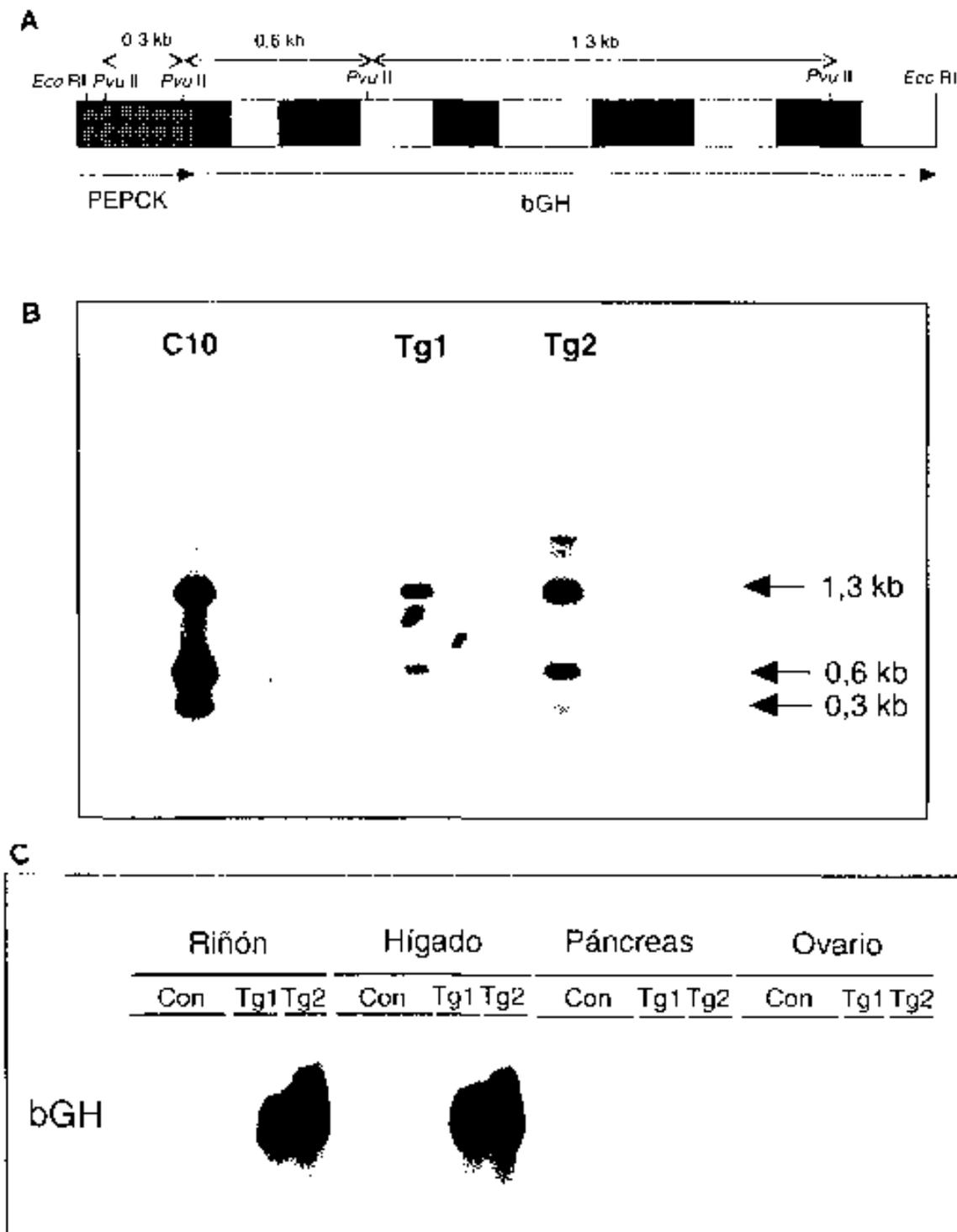


Figura 6. Análisis de la integración y expresión del gen quimérico PEPCK/bGH.

A) Gen quimérico PEPCK/bGH. Se señalan los fragmentos esperados de la digestión con el enzima de restricción *PvuII*. B) Análisis por Southern Blot, e hibridación con la sonda conteniendo el gen quimérico PEPCK/bGH, del DNA genómico de los gazapos obtenidos tras la microinyección del gen quimérico. En los carriles Tg1 y Tg2 se observa el patrón de bandas correspondiente a los dos conejos transgénicos obtenidos. En el carril C10 se muestran controles de DNA plasmídico del gen de 10 copias. C) Northern Blot e hibridación con sonda específica de bGH de RNA total obtenido de hígado, riñón, páncreas y ovario de los conejos transgénicos Tg1 y Tg2 y controles.

### 2.3. EXPRESION DEL TRANSGEN EN DIFERENTES TEJIDOS

A fin de comprobar que el gen de la bGH se estaba expresando según el patrón tisular que le correspondía a la porción de promotor del gen de la PEPCK al que estaba fusionado, se tomaron muestras de hígado, riñón, páncreas y ovario de los animales transgénicos y de controles. Posteriormente, se realizó un análisis por Northern Blot e hibridación con sonda específica para bGH. La sonda empleada consistió en el fragmento de 1 kb obtenido por digestión del gen de la bGH con el enzima de restricción PvuII. Únicamente se detectó la presencia de mRNA del transgén en hígado y riñón de los animales transgénicos (Fig. 6C).

### 2.4. PARAMETROS SERICOS DE LOS CONEJOS TRANSGENICOS

Se ha descrito que la concentración plasmática de IGF-I está aumentada en los distintos modelos de animales que sobreexpresan GH (Palminter y col., 1983; Miller y col., 1989). Para averiguar si estos animales estaban produciendo la hormona bovina y si ésta tenía un efecto fisiológico en el animal, se determinaron los niveles de IGF-I en suero. Los animales control presentaban una media de 150 ng/ml, mientras los conejos transgénicos presentaban niveles claramente superiores, 256 ng/ml el Tg1 y 700 ng/ml el Tg2 (Tabla III). Los niveles de IGF-I, como el resto de los parámetros séricos, se determinaron en los dos conejos transgénicos a los tres meses de edad.

En relación a los niveles de insulina sérica, la hembra Tg1 ya presentaba a esta edad un incremento (46%) respecto a la media de los animales control. Sin embargo, la Tg2 era claramente hiperinsulinémica, con unos niveles aproximadamente 5 veces superiores a la media de los controles. Además, los niveles de glucosa en suero de las dos conejas transgénicas a los tres meses de edad indicaban que la primera era normoglucémica y la segunda era hiperglucémica, ya que presentaba un incremento del 30% respecto a los controles. En relación a los niveles de triglicéridos, la Tg1 tampoco mostraba diferencias significativas respecto a los controles. Por el contrario, estos niveles estaban incrementados más de cuatro veces en la hembra Tg2. Así pues, estos resultados indicaban que la Tg2 ya había desarrollado claramente un proceso de resistencia a la insulina a los tres meses de edad (Tabla III).

La actividad del enzima fosfatasa alcalina en suero se observa disminuida en los ratones que expresan los genes quiméricos MT/bGH (Quaife y col., 1989) y PEPCK/bGH (Valera, 1992). En los conejos transgénicos que expresan el gen quimérico PEPCK/bGH también se detectó una disminución de la misma proporción (Tabla III).

Tabla III. Concentraciones de IGF-I, insulina, glucosa, triglicéridos y actividad fosfatasa alcalina en suero de los conejos transgénicos que expresan el gen quimérico PEPCK/bGH a los 3 meses de edad.

	CONTROL	TG1	TG2
IGF-I (ng/ml)	149 ± 18	256*	700**
INSULINA (ng/ml)	2,8 ± 0,5	4,1	13**
GLUCOSA (mg/dl)	141 ± 6	146	190*
TRIGLICERIDOS (mg/dl)	98 ± 14	75	410**
FOSF. ALC. (U/l)	168 ± 10	51*	79*

Se presenta la media de 6 controles ± SEM y los valores de Tg1 y Tg2. Los animales estaban alimentados con una dieta de producción (Corena). El análisis estadístico es un análisis de varianza. \*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,001$ . FOSC. ALC., Fosfatasa alcalina.

Se llevó a cabo una segunda determinación de los parámetros séricos de la coneja Tg1 y de animales control a los 10 meses de edad (Tabla IV). Se realizó con el fin de determinar si la exposición crónica de la Tg1 a GH provocaba las alteraciones observadas a los 3 meses en la Tg2. Los animales estaban alimentados con una dieta estándar de laboratorio (Panlab 112).

A los 10 meses de edad la Tg1 presentaba unos niveles elevados de IGF-I e insulina en suero respecto al mismo grupo control. Así mismo, la coneja Tg1 presentaba a los 10 meses de edad unos valores séricos más elevados de glucosa, triglicéridos y colesterol (Tabla IV). Estos datos indicaban que la Tg1, al haber estado expuesta de forma crónica a elevadas concentraciones de bGH, había desarrollado un proceso de resistencia a la insulina y diabetes mellitus no dependiente de insulina. Por tanto, ambas transgénicas desarrollaron las complicaciones propias de una sobreexposición a GH.

Tabla IV: concentración de IGF-I, insulina, glucosa, triglicéridos y colesterol en suero de la coneja transgénica 1 a los 10 meses de edad.

	CONTROL	TG1
IGF-I (ng/ml)	74 ± 5	191*
INSULINA (ng/ml)	2 ± 0,4	3,9*
GLUCOSA (mg/dl)	108 ± 5	187*
TRIGLICERIDOS (mg/dl)	80 ± 12	181*
COLESTEROL (mg/dl)	31 ± 4	100**

Se presenta la media de 6 controles ± SEM y los valores de Tg1. Los animales estaban alimentados con una dieta estándar de laboratorio (Panlab 112). El análisis estadístico se realizó mediante análisis de varianza. \* p<0,05, \*\* p<0,001.

## 2.5. CRECIMIENTO DE LOS CONEJOS TRANSGENICOS

Para determinar si la sobreexpresión de la hormona de crecimiento bovina afectaba el crecimiento de estos animales, se pesaron junto a hermanos control en el momento del destete (30 días de edad) y a los dos meses de edad. En este último punto se calculó el incremento de peso del período de engorde, que corresponde al período entre el destete y los 60 días de edad (Tabla V). Observamos que las dos hembras transgénicas mostraron al destete un peso vivo menor que la media de las otras crías de la misma edad resultantes de los mismos experimentos de microinyección (Fig. 7A). Sin embargo, tras el período de engorde, las hembras Tg1 y Tg2 presentaron un comportamiento distinto. En el caso de la transgénica 1 no se apreciaban diferencias significativas de peso respecto a los controles. Mientras, la transgénica 2 presentaba un peso menor.

El incremento de peso diario en la hembra Tg1 calculado para el período de engorde era ligeramente más alto que el de los animales control. Al comparar el peso adulto, que se alcanza en los conejos a los 6,5 meses de edad, el transgénico 1 no presentaba diferencias respecto a otras hembras control (4,5 Kg.), aunque sí tenía una apariencia más estilizada (Fig. 7B). Los conejos transgénicos presentaron en la necropsia reducción de la grasa de la canal con ausencia de grasa perirrenal (7D).

**Tabla V: Peso a los 30 y 60 días de edad de los conejos transgénicos que expresan el gen PEPCK/bGH e incremento de peso diario durante el período de engorde.**

	P.V. (g) 30 días	P.V. (g) 60 días	I.P.V.D. (g/día)
CONTROL	840 ± 32	2105 ± 55	44,8 ± 1,4
TG1	570*	2076	50,2
TG2	625	1808*	39,4

Se presenta la media de 6 conejos control ± SEM y los valores de las conejas transgénicas Tg1 y Tg2. Los resultados se expresan en gramos de peso vivo (P.V.) y el incremento de peso vivo diario durante el engorde (I.P.V.D.) en g/día. El análisis estadístico es un análisis de varianza. \*  $p < 0,05$ .

## 2.6. FISILOGIA REPRODUCTIVA DE LOS CONEJOS TRANSGENICOS

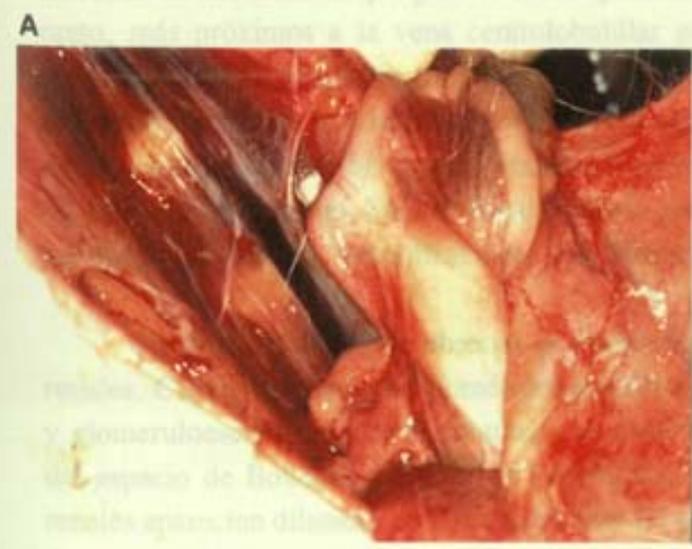
Las conejas inician su etapa reproductiva a los cuatro meses y medio de edad, que es cuando se empiezan a cubrir las hembras de reposición en las granjas cunícolas. A esta edad las hembras transgénicas que expresan el gen quimérico PEPCK/bGH no presentaron estro ni aceptaron al macho. A fin de reproducir la hembra transgénica n° 1, que no presentaba las alteraciones diabéticas de la hembra n° 2, se cambió de una dieta de producción (Corena) a una dieta de laboratorio (Panlab 112) con un contenido menor de proteínas. Ello se llevó a cabo para bloquear la expresión del transgén y disminuir así los niveles de GH. Tras estar sometida a esta dieta durante un mes y no admitir repetidamente a varios machos, de probada capacidad reproductiva, se sometió a un tratamiento hormonal. Este consistió en la inyección subcutánea de 25 UI de PMSG y la presentación al macho a las 48 y 72 horas. En ningún caso la hembra admitió la monta natural.

## 2.7. ANALISIS ANATOMOPATOLOGICO DE LOS CONEJOS QUE EXPRESAN EL GEN QUIMERICICO PEPCK/bGH

Ante la imposibilidad de reproducir este animal y observar que al año de edad desarrollaba alteraciones patológicas, se sacrificó el animal y se obtuvieron muestras de diferentes órganos para su estudio anatomopatológico. El animal presentaba una hipoplasia general del aparato reproductivo (Fig. 8A,B). En el examen macroscópico del ovario no se apreciaron puntos de ovulación ni folículos evidentes (Fig. 8B). En cambio, se observó la presencia de folículos en diferentes estados de maduración mediante análisis histológico. El estudio anatomopatológico reveló un número anormalmente elevado de folículos atrésicos,

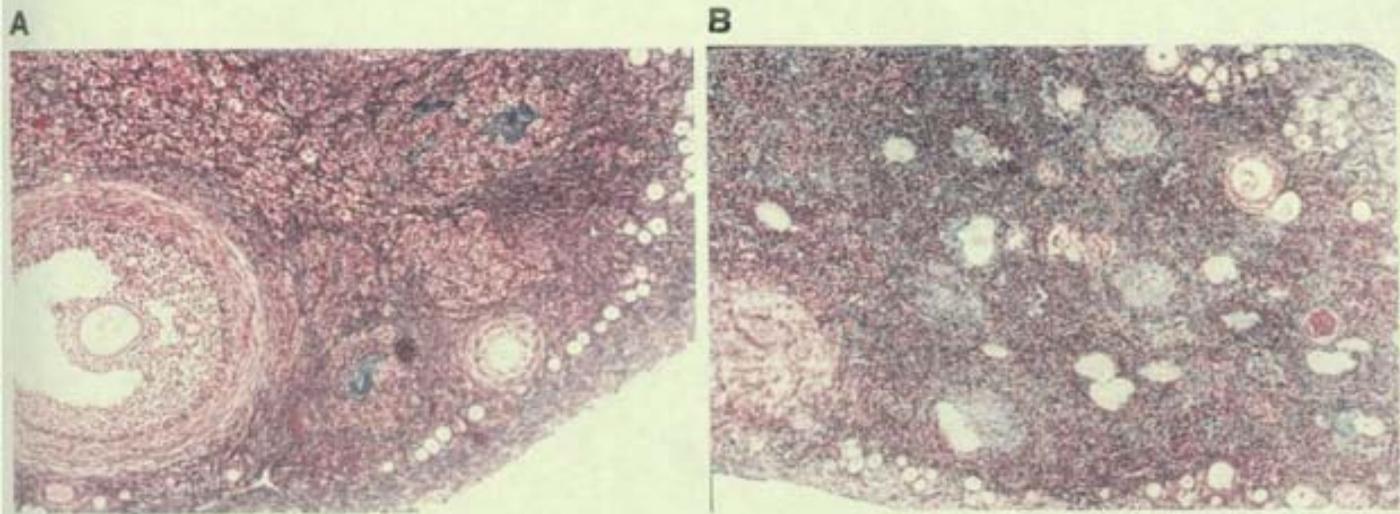


**Figura 7. Conejos transgénicos que expresan el gen quimérico PECK/bGH.** A) Hembra Tg2 a los 20 días de edad (izquierda) con una hermana de camada (derecha). B) Hembra Tg1 a los 6,5 meses de edad. C) Detalle del riñón de la Tg1 en que se aprecia la ausencia de grasa prerrenal.



**Figura 8. Aparato reproductor de la coneja transgénica 1 que expresa el gen quimérico PEPCK/bGH.** A) Aparato reproductor de la hembra Tg1 a los 12 meses de edad. B) Detalle del ovario.

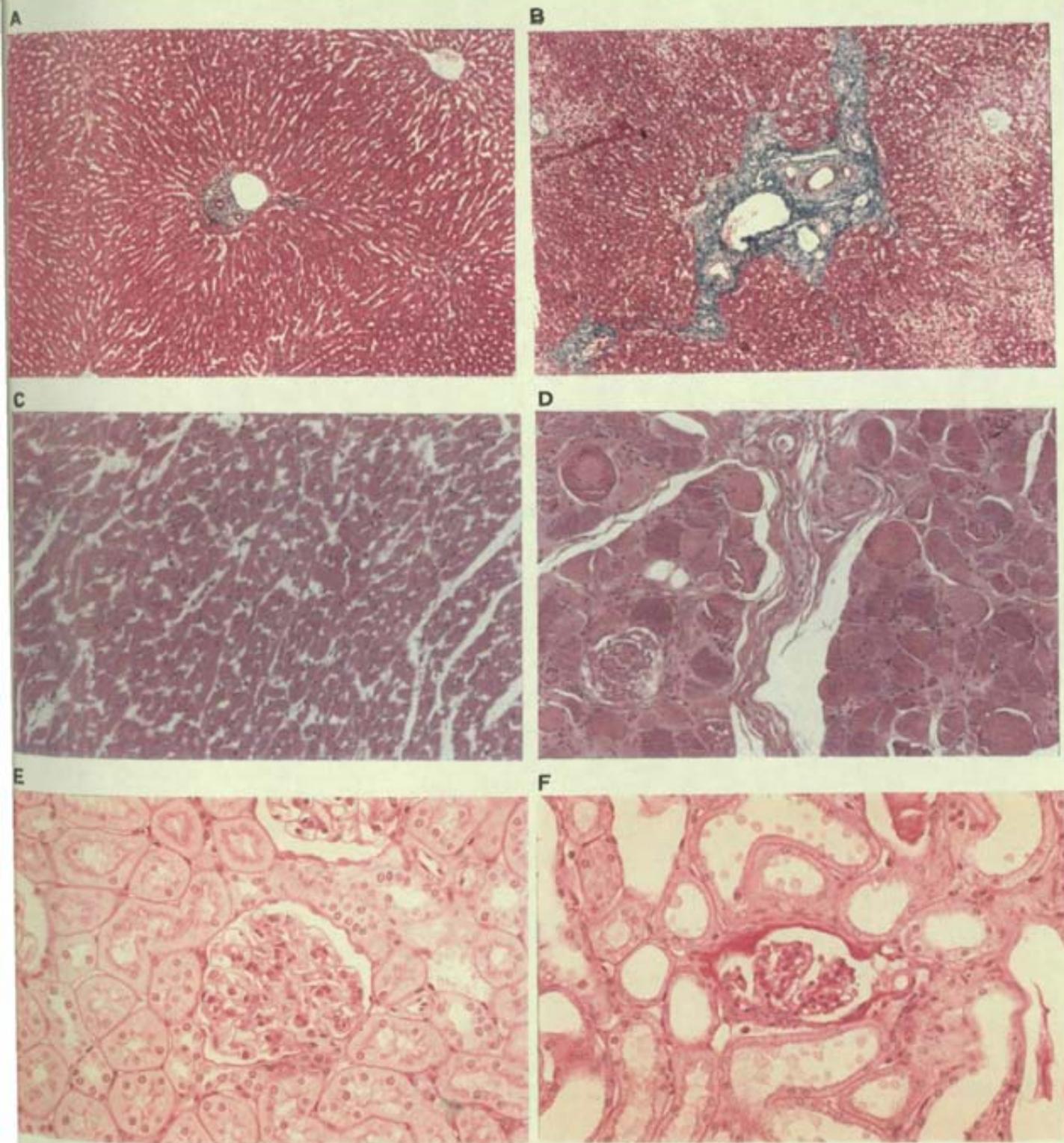
indicativo de una alteración de la maduración de los mismos. La atresia se observaba en folículos en diferentes estados de maduración, si bien, los folículos primarios y secundarios atrésicos eran los predominantes (Fig. 9A,B).



**Figura 9. Análisis anatomopatológico del ovario de la coneja transgénica que expresa el gen quimérico PEPCK/bGH.** A) Sección histológica del ovario de un animal control en el que se aprecian los folículos en diferente grado de maduración. B) Sección histológica del ovario de la hembra Tg1 en que se observa el elevado número de folículos atrésicos.

Además, en el estudio anatomopatológico del hígado se observó una esclerosis marcada de localización periportal. Los hepatocitos más distantes del espacio portal, y por tanto, más próximos a la vena centrolobulillar presentaban vacuolas intracitoplasmáticas, indicadoras de degeneración (Fig. 10A,B). Estas alteraciones no se encontraron en hígado de un conejo control de la misma edad. Un cuadro similar de esclerosis se observó en miocardio del conejo transgénico. Se observó también la presencia de abundante tejido conjuntivo entre las fibras del miocardio. Dichas fibras también presentaban alteraciones con variaciones del grosor de las mismas, vacuolizaciones y calcificaciones en algunas de ellas (Fig. 10C,D).

En riñón también se observó la presencia de zonas de esclerosis entre los túbulos renales. Cierta porcentaje de glomérulos presentaba engrosamiento de la cápsula de Bowman y glomeruloesclerosis. Por el contrario, se observaba de forma generalizada una dilatación del espacio de Bowman y en menor proporción, atrofia de los glomérulos. Los conductos renales aparecían dilatados con una reducción del grosor de las células tubulares. La presencia de material hialino en los conductos renales era indicadora de proteinuria (Fig. 10E,F).



**Figura 10. Análisis anatomopatológico de la coneja transgénica 1 que expresa el gen quimérico PEPCK/bGH.** A) Sección histológica de hígado de conejo control teñida con tinción tricrómica de Masson (parénquima hepático color magenta, tejido conectivo color verde azulado). Detalle de espacio portal a 25 aumentos. B) Sección histológica de hígado de la hembra Tg1 teñida con tinción tricrómica de Masson. Espacio portal a 25 aumentos. C) Sección histológica de miocardio de conejo control teñida con hematoxilina/eosina. 50 aumentos. D) Sección histológica de miocardio de la hembra Tg1. 200 aumentos. E) Sección histológica de corteza renal de conejo control teñida con tinción de ácido periódico de Schiff. Detalle de los glomérulos a 100 aumentos. F) Sección histológica de corteza renal de la hembra Tg1 teñida con tinción de ácido periódico de Schiff. Detalle de los glomérulos a 100 aumentos.



## OBTENCION DE CONEJOS TRANSGENICOS QUE SOBREEXPRESAN HORMONA DE CRECIMIENTO BOVINA

En nuestro laboratorio habíamos observado que los ratones transgénicos que sobreexpresan el gen quimérico PEPCK/bGH adquieren un tamaño doble al de sus hermanos control y no presentan esterilidad ni patologías derivadas de esta expresión hasta muy avanzada edad (más de 1 año). Por otro lado, los conejos destinados al consumo humano se sacrifican a los dos meses de edad. Así pues, una línea de conejos transgénicos que sobreexpresara este gen quimérico podría ser un buen modelo de crecimiento precoz. Por tanto, se llevó a cabo la obtención de conejos transgénicos que expresan el gen quimérico PEPCK/bGH, a pesar de que se había descrito que cerdos transgénicos que expresaban GH presentaban gran número de alteraciones. Se empleó el gen de la hormona de crecimiento bovina en lugar del gen humano, ya que la sobreexpresión de hGH puede provocar esterilidad en animales transgénicos. Además, la FDA (*Food and Drug Administration, USA*) ha reconocido el empleo de bGH en vacuno para mejorar la producción láctea. Dado que la bGH no tiene actividad hormonal en la especie humana, no representa un riesgo para la salud de los consumidores (Juskevich y Guyer, 1990).

Los datos que se recogen en la literatura sobre la técnica de obtención de conejos transgénicos se reducen a unos pocos trabajos. Los porcentajes de conejos transgénicos respecto al número de animales nacidos que se describen son variables. Se observan rendimientos desde 0,9% (Massoud y col., 1990) hasta 10,8% (Bühler y col., 1990). Es difícil comparar resultados a este nivel, pues las variaciones en el rendimiento de la técnica son debidas principalmente a las características del gen microinyectado, que varía en cada caso. Sin embargo, la eficiencia del 13,3% obtenida en nuestro laboratorio es buena. Este buen rendimiento se debe probablemente a la elevada concentración de DNA empleada para la microinyección (10 ng/ $\mu$ l). Habitualmente se trabaja en ratón con una concentración de 2 ng/ $\mu$ l. Sin embargo, Ernst y col. (1991) describieron que una concentración de DNA de 10 ng/ $\mu$ l puede ser empleada para la microinyección de cigotos de conejo. Así mismo, el número de nacimientos respecto a cigotos transferidos era similar al descrito por otros autores (Bühler y col., 1990; Voss y col., 1990; Massoud y col., 1990; Ernst y col., 1991). En cambio, nuestros resultados diferían en el número de cigotos transferidos por hembra receptora y en el porcentaje de hembras que resultaban gestantes tras la transferencia. La experiencia adquirida en ratón parecía indicar que un número elevado de cigotos microinyectados transferidos por hembra, sin sobrepasar los 30-32 cigotos, conduce a un mayor porcentaje de hembras gestantes y a camadas más numerosas. El bajo número de crías obtenidas de las dos primeras hembras (2 por hembra) y la mayor disponibilidad de cigotos microinyectados en los experimentos sucesivos, nos condujo a incrementar el número de cigotos transferidos por hembra receptora de 19 a una media de 32 cigotos. Este aumento se correspondió con un pequeño aumento de la media de animales nacidos por hembra (3,25 en las 4 hembras

restantes). Por otro lado, el porcentaje de hembras gestantes respecto al total de receptoras variaba según los autores desde 33% (Ernst y col., 1991), hasta 69,6% (Voss y col., 1990). El 100% de las hembras receptoras empleadas en este estudio llevaron a término la gestación. Este resultado probablemente era debido al elevado número de cigotos empleados. No podemos descartar el hecho de que las características genéticas de los animales también pudieron influir. La raza sintética IRTA, a la que pertenecían las hembras donadoras de óvulos y las receptoras, ha sido especialmente seleccionada por el carácter maternal de sus hembras (parámetro de selección: número de gazapos destetados).

Tras la obtención de un animal fundador mediante microinyección, el principal objetivo es reproducirlo para que transmita el nuevo carácter a la descendencia y crear una colonia en la que llevar a cabo los estudios. Los estudios fenotípicos se realizan en animales de primera y segunda generación. Sin embargo, en nuestro estudio fue imposible obtener descendencia de los conejos transgénicos que expresan el gen quimérico PEPCK/bGH. No obstante, se llevaron a cabo estudios metabólicos de cada uno de ellos a fin de averiguar las alteraciones que se habían producido en estos animales como consecuencia de la expresión del transgén.

La expresión de transgén se estudió en cuatro tejidos: hígado y riñón, donde se esperaba se expresara el transgén, y páncreas y ovario, donde no se expresa el gen de la PEPCK, y por tanto, no se esperaba encontrar mRNA de bGH. Estos dos últimos órganos se escogieron porque la expresión anómala de bGH en estos tejidos podía producir efectos indeseables. La expresión del transgén en páncreas podría conducir a importantes alteraciones de la secreción de insulina, mientras la expresión en ovario sería causa de disfunciones reproductivas. Los resultados obtenidos mostraron que la expresión de bGH en ambos transgénicos se correspondía con la esperada.

Ante la imposibilidad de medir bGH en suero, pues no fue posible conseguir el anticuerpo específico, se determinó el IGF-I sérico. Se ha descrito que el IGF-I aumenta en suero por acción de la hormona de crecimiento. Así ocurre en los distintos modelos de animales transgénicos que sobreexpresan GH (Palmiter y col., 1983; Quaife y col., 1989; Miller y col., 1989). Los conejos transgénicos que expresan el gen quimérico PEPCK/bGH también presentaban un incremento del IGF-I sérico. La hembra Tg2, que había incorporado un mayor número de copias del gen quimérico, era la que presentaba un incremento mayor en los niveles séricos de IGF-I. Ello indicaba que estos animales estaban expresando bGH activa biológicamente.

Por otro lado, la actividad fosfatasa alcalina sérica es un parámetro que se observa disminuido en ratones de 2 a 3 meses que sobreexpresan GH, si bien, no se conocen claramente los mecanismos que producen este efecto (Quaife y col., 1989; Valera, 1992). Los conejos transgénicos mostraron a los tres meses de edad una disminución de la actividad de

este enzima en suero similar a la descrita en los ratones (2 a 2,5 veces inferior).

La sobreexpresión de GH conduce a un incremento de la insulina en suero en diversas especies animales que se acompaña de normoglucemia (Valera y col., 1993), o ligera hiperglucemia (Miller y col., 1989; Ward y col., 1989), características éstas de un cuadro de resistencia a la insulina.

Al determinar los distintos parámetros séricos en los conejos transgénicos a los tres meses de edad, éstos mostraron diferencias entre sí. La Tg1 presentaba valores de glucemia, insulinemia y niveles de triglicéridos en suero similares a la media de los controles. Por el contrario, la Tg2, con mayor expresión de bGH, mostraba un incremento de más de cinco veces en la insulina sérica, acompañado de una ligera hiperglucemia y un marcado aumento de los triglicéridos en suero. Estos datos eran indicadores de un cuadro de resistencia a la insulina. El desarrollo de hiperinsulinemia en Tg2 era probablemente el resultado del efecto de la GH sobre la secreción de insulina en las células  $\beta$  (Beck y col., 1965; Walker y col., 1989; Nielsen, 1982). Los valores séricos de la hembra Tg1 a los 3 y 10 meses de edad indican que desarrolló más tarde un cuadro de resistencia a la insulina, muy probablemente como consecuencia de una exposición prolongada a la hormona de crecimiento. Este animal había integrado un menor número de copias del transgén que la Tg2 y presentaba una menor expresión de bGH, lo cual explicaría que la patología fuera de aparición más tardía. El marcado incremento de los triglicéridos en la Tg2, y de la Tg1 a los 10 meses de edad, era también probablemente debido al proceso de resistencia a la insulina. De manera similar, en pacientes acromegálicos, expuestos a un exceso de GH, únicamente se observa hiperlipidemia en casos de diabetes asociada (Aloia y col., 1972).

Los conejos en nuestro país son sacrificados para el consumo humano aproximadamente a los dos meses de edad. Contrariamente a lo que esperábamos, los animales transgénicos de esta edad no presentaron un peso mayor que sus hermanos. El incremento de peso de la Tg2 en el período de engorde fue menor y a los dos meses de edad este animal presentaba un peso significativamente menor que el de los controles. Estos datos indicaban que las alteraciones metabólicas habían provocado alteraciones del crecimiento. Por el contrario, la hembra Tg1, sin alteraciones metabólicas apreciables a esta edad, poseía al final del engorde aproximadamente el mismo peso corporal que los controles. Se ha descrito que los cerdos que expresan los genes quiméricos MT/bGH y PEPCK/bGH no presentan un marcado crecimiento corporal, sino una reducción de las grasas en la canal (Pursel y col., 1989; Wieghart y col., 1990). Esta reducción, sobre todo en ácidos grasos saturados y monoinsaturados, se acentúa con la edad de los animales (Solomon y col., 1994). Los conejos transgénicos presentaban una apariencia más estilizada que los animales control. En la necropsia se observó una clara reducción de la grasa en la canal ya que carecían de la grasa peritrenal presente en los conejos controles de la misma edad. Estos datos indicaban que los conejos transgénicos que expresan el gen quimérico PEPCK/bGH presentaban un fenotipo

similar al de los cerdos transgénicos que expresan esta misma hormona.

Los conejos transgénicos también padecían una alteración de su fisiología reproductiva similar a la de los cerdos transgénicos que sobreexpresan GH. Las cerdas MT/hGH y MT/bGH no muestran estro y en la necropsia los ovarios no presentan *corpora lutea* ni *corpora albicantia* (Pursel y col., 1990). Las conejas que expresan PEPCK/bGH no aceptaron en ningún momento al macho. En el estudio anatomopatológico que se realizó de éstas, se observó una hipoplasia general del aparato reproductivo. Los resultados obtenidos del examen macroscópico y microscópico del ovario, eran indicativos de una deficiencia en la maduración folicular. Probablemente ésta es debida a alteraciones producidas por la hormona de crecimiento en la producción o secreción de las hormonas FSH y LH. Alteraciones de esta índole se han descrito en ratones transgénicos que sobreexpresan GH (Steger y col., 1991, Chandrashekar y Bartke, 1993).

Así mismo, se han descrito numerosas alteraciones anatomopatológicas en ratones transgénicos de avanzada edad que sobreexpresan GH. Las mayores alteraciones son las descritas en hígado y riñón. La hepatomegalia de estos animales (más de 3 veces el peso del control) se corresponde con un aumento del tamaño de los hepatocitos. El riñón de estos animales presenta un peso doble al de los animales control y se ha descrito también un incremento del tamaño de los glomérulos (Quaife y col., 1989). La esclerosis observada en hígado de los ratones transgénicos de avanzada edad es ligera. Sin embargo, también se ha descrito fibrosis en miocardio y glomeruloesclerosis en riñón de los ratones que expresan GH (Quaife y col., 1989; Wanke y col., 1991; Loyd y col., 1992; Stewart y col., 1992). Se considera que la principal causa de muerte en estos ratones es la patología renal. Desarrollan glomeruloesclerosis severa con atrofia de las nefronas y dilatación cística masiva de los túbulos renales (Quaife y col., 1989, Wanke y col., 1991; Wolf y col., 1993).

El estudio anatomopatológico de distintos órganos del conejo transgénico 1 reveló alteraciones de esclerosis en hígado, riñón y miocardio. Sin embargo, no se apreció un incremento del tamaño de los hepatocitos cuando se comparó con un conejo control. Las lesiones esclerosantes en estos animales son debidas probablemente a la acción de la GH, bien directa o mediada por los IGFs, de estimulación de la proliferación de fibroblastos y formación de matriz extracelular y fibras de colágeno, así como de disminución de la degradación del colágeno. El desequilibrio del sistema de formación/degradación del tejido conectivo en este sentido conduce a estas lesiones. Las zonas de esclerosis, localizadas fundamentalmente alrededor de los vasos sanguíneos, pueden ser causa de degeneración del tejido parenquimatoso por deficiente irrigación e hipoxia. Así mismo, las lesiones en miocardio condujeron probablemente a la disfunción del órgano, agravando la deficiente irrigación de los órganos afectados. En el conejo transgénico no se observó un incremento del tamaño de los glomérulos respecto a los controles, ni lesiones severas en la mayor parte de los glomérulos, como las descritas en ratón. Sin embargo, las alteraciones presentes indicaban

que la función renal podía estar comprometida. Las lesiones observadas en el conejo transgénico diferían de este modo de las del ratón por una predominancia de la esclerosis frente a otro tipo de lesiones (megahepatocitos, glomeruloesclerosis), aparentemente más relacionadas con el mayor tamaño de los ratones que sobreexpresan GH.

En resumen, los resultados obtenidos en este trabajo indicaban que estos animales no tienen interés en producción animal. Sin embargo, se había puesto a punto la técnica de obtención de conejos transgénicos. Además, se había estudiado el efecto de la sobreexpresión de GH en esta especie, demostrando el papel diabetogénico de esta hormona. La puesta a punto de la técnica de obtención de conejos transgénicos en nuestro laboratorio nos permitirá en un futuro llevar a cabo nuevos proyectos de interés biotecnológico en esta especie.

PARTE I: CONCLUSIONES

- 1- Se ha puesto a punto la técnica de obtención de ratones y conejos transgénicos mediante microinyección de DNA a ovocitos fecundados.
- 2- Se han obtenido conejos transgénicos que expresan hormona de crecimiento bovina en hígado y riñón.
- 3- La sobreexpresión de hormona de crecimiento bovina en conejos transgénicos conduce a un incremento de IGF-I e insulina en suero.
- 4- Los conejos transgénicos que expresan el gen quimérico PEPCK/bGH desarrollan un cuadro de resistencia a la insulina acorde con los efectos diabetogénicos de una exposición crónica a hormona de crecimiento.
- 5- A diferencia de los ratones transgénicos que sobreexpresan hormona de crecimiento, los conejos transgénicos que expresan el gen quimérico PEPCK/bGH no presentan un crecimiento mayor que el de los conejos control.
- 6- Como consecuencia de la sobreexpresión de hormona de crecimiento, las conejas transgénicas que expresan el gen quimérico PEPCK/bGH son estériles y no llevan a cabo la ovulación.
- 7- La exposición crónica de los conejos transgénicos a hormona de crecimiento bovina conduce al desarrollo de alteraciones anatomopatológicas de tipo esclerosante en hígado, miocardio y riñón.