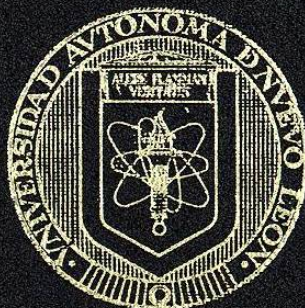


UNIVERSIDAD AUTONOMA DE NUEVO LEON
FACULTAD DE MEDICINA



Obtención de los genes de la hormona del crecimiento en el mono verde (*Cercopithecus aethiopsis*), especie representativa de los monos del viejo mundo.

POR:

Q.F.B. Angélica María López Rodríguez

Como requisito para obtener el Grado de
MAESTRO EN CIENCIAS
Con Especialidad en Biología Molecular
e Ingeniería Genética

Diciembre de 2002

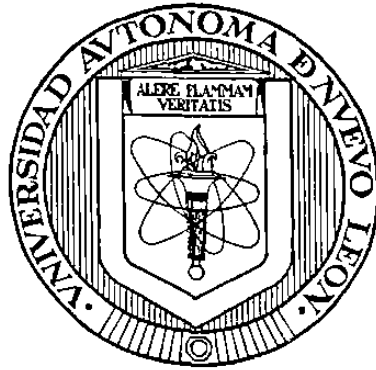
TM
Z6658
FM
2002
.L6

Q.F.B. Angélica María López Rodríguez



1020149048

**UNIVERSIDAD AUTONOMA DE NUEVO LEÓN
FACULTAD DE MEDICINA**



Obtención de los genes de la hormona del crecimiento en el mono verde (*Cercopithecus aethiopsis*), especie representativa de los monos del viejo mundo.

Por
Q.F.B Angélica María López Rodríguez

Como requisito para obtener el Grado de
MAESTRO EN CIENCIAS
Con Especialidad en Biología Molecular e Ingeniería Genética


Diciembre de 2002



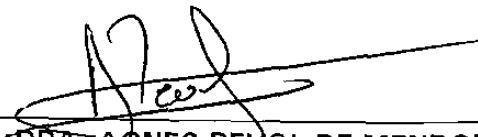
FONDO
TESIS

OBTENCIÓN DE LOS GENES DE LA FAMILIA DE LA HORMONA DEL
CRECIMIENTO EN EL MONO VERDE (*Cercopithecus aethiopsis*), ESPECIE
REPRESENTATIVA DE LOS MONOS DEL VIEJO MUNDO

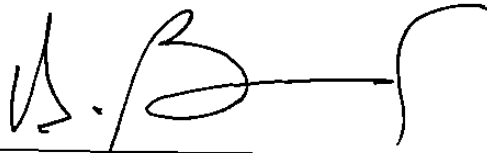
Aprobación de la Tesis:



M.C. DOLORES CARMEN ESQUIVEL ESCOBEDO
Director de Tesis



DRA. AGNES REVOL DE MENDOZA
Co-Director de Tesis



DR. HUGO ALBERTO BARRERA SALDAÑA
Co-Director de Tesis



DR. DIONICIO A. GALARZA DELGADO
Subdirector
de Investigación y Estudios de Posgrado



El presente trabajo se realizó en el Laboratorio de Biología Molecular de la Unidad de Laboratorios de Ingeniería y Expresión Genética (ULIEG) del Departamento de Bioquímica, bajo la asesoría de la M.C. Dolores C. Esquivel Escobedo y la co-asesoría de la Dra. Agnès Revol de Mendoza y el Dr. Hugo A. Barrera Saldaña.

AGRADECIMIENTOS

A Dios y a mi Padre porque desde el cielo iluminan mi camino.

Al consejo Nacional de Ciencia y Tecnología, por el apoyo económico brindado.

A *Lolita* por su dedicación y compañía durante este proyecto.

A la *Dra. Agnès* por permitirme aprender de ella y por su disposición incondicional en todo momento.

Al *Dr. Barrera* por darme la oportunidad de disfrutar del mundo de la investigación.

A los compañeros de generación: *Adrián, Ariana, Blanca, Graciela, Marcela, Lorena, Luis Miguel, y Teresa*, porque me enseñaron que unidos era más fácil.

A los Compañeros de laboratorio: *Gloria, Igor, Marisol, Rafael y Victor* por ayudarme a crecer personal y profesionalmente.

A los que coincidimos en la ULIEG: *Iram, Irma, Ivan, Jorge, Naika, Olivia, Polo, Prisco y Virgilio*, por hacer mi estancia placentera.

A mi gran Familia:

Mis hermanos: *Ramiro, Rosy, Ricardo, Reyna, Romelia, Raquel, Rubén, Mauro, Ross, Rey, René y Rocío* porque día a día me demuestran el valor de la palabra familia.

A mi otra Familia:

Balbina, Carlos, Chuy, Manuel, Humberto, Pepe y Ramón, porque existen y juntos hemos disfrutado lo mejor de vivir.

DEDICATORIAS

A mi Madre por ser mi ejemplo de fortaleza.

A la *Familia Arato Peña* por dejarme formar parte de sus vidas y porque siempre confiaron en mí.

INDICE

CONTENIDO	PAGINA
LISTA DE TABLAS	i
LISTA DE FIGURAS	ii
NOMENCLATURA	iv
RESUMEN	v
CAPITULO 1. INTRODUCCION.	
1.1 Evolución por duplicación génica e intercambio de exones.	1
1.1.1 Duplicación génica.	2
1.1.2 Intercambio de exones o “Exon shuffling”.	3
1.1.3 Otras teorías evolutivas.	3
1.2 Familia génica de la hormona del crecimiento: estructura y función.	4
1.3 Regulación de la expresión génica de la familia GH-PL.	5
1.4 Evolución de la familia génica GH-PL-Prl.	8
1.4.1 Especificidad del receptor GH.	10
1.4.2 Evolución del complejo GH-PL en primates.	10
1.5 El locus GH-PL humano.	13
1.6 Genes relacionados a GH reportados para primates.	14
1.7 Justificación.	17
CAPITULO II. OBJETIVOS.	
2.1 Objetivo general.	18
2.2 Objetivos específicos.	18
CAPITULO III. MATERIAL Y METODOS.	
3.1 Origen de los reactivos.	19
3.2 Material biológico.	20
3.3 Equipo.	20
3.4 Métodos.	22
3.4.1 Estrategia general.	22
3.4.2 Propagación de las células Cos 7.	23
3.4.3 Extracción del DNA.	23
3.4.3.1 Obtención de DNA genómico.	23
3.4.3.2 Obtención de DNA plasmídico.	24
3.4.4 Análisis electroforético y cuantificación del DNA.	25

3.4.4.1	Determinación del tamaño de las bandas.	25
3.4.4.2	Cuantificación del DNA.	25
3.4.5	Amplificación de los genes GH-PL	26
3.4.5.1	Diseño del iniciador.	27
3.4.5.2	Optimización de las condiciones de amplificación.	27
3.4.6	Caracterización enzimática de los productos amplificados.	31
3.4.7	Clonación de los productos amplificados.	31
3.4.7.1	Construcción del vector recombinante.	32
3.4.7.2	Transformación de las células por electroporación.	33
3.4.7.3	Caracterización de las clonas recombinantes obtenidas.	33
3.4.7.4	Conservación de las clonas de interés.	34
3.4.8	Determinación y análisis de las secuencias de las clonas recombinantes.	34
3.4.8.1	Secuenciación cíclica de las clonas recombinantes.	34
3.4.8.2	Análisis de las secuencias.	35
CAPITULO IV. RESULTADOS.		
4.1	Obtención del DNA de mono verde.	36
4.2	Diseño de un iniciador 3'.	37
4.3	Obtención de los genes de GH del mono verde.	39
4.3.1	Caracterización enzimática.	39
4.3.2	Clonación de los productos amplificados.	44
4.4	Análisis de las secuencias nucleotídicas.	45
4.5	Análisis de las secuencias aminoacídicas.	48
4.6	Análisis de los promotores proximales de los genes relacionados a GH.	53
CAPITULO V. DISCUSIÓN.		
5.1	Obtención de los genes del complejo GH-PL en el mono verde y comparación.	57
5.2	Análisis filogenético de las secuencias GH-PL.	58
5.3	Análisis de los promotores proximales.	59
CAPITULO VI. CONCLUSIONES.		
CAPITULO VII. BIBLIOGRAFÍA.		
ANEXO 1. TAXONOMÍA DE PRIMATES.		
ANEXO 2. ANÁLISIS PREDICTORIO DE LA ESTRUCTURA SECUNDARIA.		
ANEXO 3. SECUENCIAS RELACIONADAS A GH DE MONO VERDE.		

LISTA DE TABLAS	PÁGINA
Tabla 1. Secuencia de los iniciadores.	20
Tabla 2. Condiciones de PCR normal para obtener los genes GH del mono verde.	28
Tabla 3. Condiciones de PCR semi-larga para obtener los genes GH del mono verde.	29
Tabla 4. Condiciones de PCR larga para obtener los genes GH del mono verde.	30
Tabla 5. Mezcla de reacción usada durante la preparación del inserto A.	32
Tabla 6. Diferenciación enzimática de los productos amplificados.	43
Tabla 7. Porcentaje de similitud entre los genes GH-PL del mono verde y hGH-N y hPL-3.	45
Tabla 8. Divergencia aminoacídica de GH en sitios funcionalmente importantes.	51

LISTA DE FIGURAS	PÁGINA
Figura 1.- Evolución de la familia GH, PL y PRL en primates.	9
Figura 2.- Taxonomía de primates.	11
Figura 3.- Divergencia aminoacídica de GH en sitios funcionalmente importantes.	12
Figura 4.- Evolución de los genes que codifican para la GH, PRL y PL.	14
Figura 5.- Reporte de genes relacionados a GH en prosimios y simios.	15
Figura 6.- Estrategia general.	22
Figura 7.- Posición de los iniciadores utilizados.	26
Figura 8.- Estrategia seguida para clonar los genes de GH en el mono verde.	32
Figura 9.- Esquematación del sitio de unión de los iniciadores usados durante la secuenciación.	34
Figura 10.- Análisis del DNA genómico.	36
Figura 11.- Estrategia para diseñar un iniciador 3'.	37
Figura 12.- Diseño del iniciador 3'.	38
Figura 13.- Amplificación de los genes GH-PL del mono verde.	39
Figura 14.- Caracterización de los productos amplificados con <i>Bam</i> HI.	40
Figura 15.- Caracterización de los productos amplificados con <i>Bgl</i> II.	41
Figura 16.- Caracterización enzimática de los promotores de los productos amplificados.	42
Figura 17.- Selección de las clonas.	44
Figura 18.- Identificación de las clonas recombinantes.	45
Figura 19.- Alineamiento de las secuencias nucleotídicas de los genes relacionados a GH del mono verde contra las secuencias génicas reportadas para otros primates.	46
Figura 20.- Análisis filogenético de las secuencias nucleotídicas.	47
Figura 21.- Alineamiento de las secuencias aminoacídicas de los genes GH-PL de primates.	49
Figura 22.- Análisis filogenético de las secuencias aminoacídicas.	50
Figura 23.- Estructura tridimensional de GH.	52

Figura 24.- Comparación de los promotores proximales.	54
Figura 25.- Análisis filogenético de los promotores proximales.	55
Figura 26.- Organización parcial del locus GH-PL del mono verde.	60

NOMENCLATURA

μg	Microgramo
μl	Microlitro
μM	Concentración micromolar
DNA	Ácido desoxirribonucleico
dATP	Desoxiadenosina trifosfato
dNTPs	Desoxiribonucleósido trifosfato
h	Horas
min	Minutos
ml	Mililitros
ng	Nanogramos
pb	Pares de bases
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
pH	-log [H ⁺]
s	Segundos
Taq	DNA polimerasa de <i>Thermus aquaticus</i>
X	Veces la concentración
UV	Luz Ultravioleta
EDTA	Ácido etilendiaminotetra-acético
rpm	Revoluciones por minuto
V	Voltios
GH	Hormona del crecimiento
PL	Lactógeno placentario
U	Unidades de enzima
cbp	Cuanto baste para
nm	Nanometro
M	Concentración molar
mg	Miligramo
ml	Mililitro
cDNA	Ácido desoxirribonucleico complementario al RNA
aa	Aminoácido
°C	Grados centígrados
rTth	<i>Thermus thermophilus</i> recombinante, DNA polimerasa
NaOH	Hidroxido de sodio
SDS	Dodecilsulfato de sodio
mM	Milimolar
v/v	Volumen-volumen
L	Litro
HCl	Acido clorhídrico
D-MEM	Medio mínimo esencial-D galactopiranosido
BSA	Albumina sérica bovina
Na ₂ HPO ₄	Fosfato de sodio
KCl	Cloruro de potasio
K ₂ HPO ₄	Fosfato de potasio
CO ₂	Bióxido de carbono
PBS	Amortiguador salino de fosfatos
RNA _r	Ácido ribonucleico ribosomal
RNA _m	Ácido ribonucleico mensajero
T _m	Temperatura de fusión

RESUMEN

Facultad de medicina de la U.A.N.L.

Q.F.B. Angélica María López Rodríguez.

Título del proyecto: OBTENCIÓN DE LOS GENES DE LA FAMILIA DE LA HORMONA DEL CRECIMIENTO EN EL MONO VERDE (*Cercopithecus aethiops*), ESPECIE REPRESENTATIVA DE LOS MONOS DEL VIEJO MUNDO.

Candidata para el grado de Maestría en Ciencias con especialidad en Biología Molecular e Ingeniería Genética.


Área de estudio: Biología Molecular.

Introducción: La familia multigénica de la hormona del crecimiento (GH) y del lactógeno placentario (PL) constituye un excelente modelo para estudiar los mecanismos de la regulación de la expresión génica, los eventos de duplicación y en general la evolución del genoma en primates. Las GHs en los antropoideos presentan características únicas y diferentes a las de otros ordenes de mamíferos, que se atribuyen a cambios específicos en sus secuencias aminoacídicas. En los tres grupos de simios: grandes monos, monos del viejo mundo y monos del nuevo mundo, se han evidenciado eventos de duplicación génica, contrastando con los prosimios, donde ha sido reportado un solo gen GH.

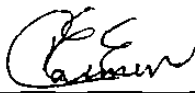
El periodo de aceleración en las sustituciones aminoacídicas y los sucesivos fenómenos de duplicación, parecen haber ocurrido entre la divergencia de los prosimios y la de los monos del nuevo mundo, llevando al surgimiento de una familia de seis genes relacionados a GH en el mono araña (*Ateles geoffroyi*), un mono del nuevo mundo y de cinco genes en el caso del humano (dos GHs: normal y variante y tres PLs). Para los monos del viejo mundo se han reportado cinco DNAs del macaco (*Macaca mulatta*), sin embargo para macaco y mono verde (*Cercopithecus aethiops*) se han evidenciado cinco regiones intergénicas.

Objetivo y metodología: Este trabajo se enfocó en obtener mediante PCR, los genes de la familia de GH en el mono verde, especie representativa de los monos del viejo mundo. Una vez caracterizados los productos mediante enzimas diagnósticas que permitieron diferenciar y conocer el número de genes obtenidos en cada reacción, se clonaron y secuenciaron; la identidad génica se dedujo del análisis comparativo de las secuencias obtenidas con las previamente reportadas para otros primates.

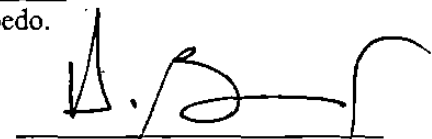
Contribuciones y conclusiones: Se obtuvieron seis genes relacionados a la familia de la hormona del crecimiento en el mono verde. El análisis de las secuencias predijo que todos son funcionales, correspondiendo uno a GH y cinco a PLs. En su forma madura, cuatro de las proteínas deducidas de los codones de los genes están constituidas de 191 aa y dos de 192 aa. El análisis de las secuencias corroboró que los PLs de los monos del viejo mundo y los grandes monos provinieron de un ancestro común, semejante en su secuencia a caGH-N. Además, este trabajo evidenció que los miembros del locus GH-PL en una misma especie de primates, no presentaron una evolución independiente debido a mecanismos de convergencia génica.



Dra. Agnès Revol de Mendoza
Coasesor.



M.C. Dolores C. Esquivel Escobedo.
Asesor.



Dr. Hugo A. Barrera Saldaña.
Coasesor.

CAPITULO I

INTRODUCCIÓN

Los genomas de los organismos son estructuras complejas que resultan de constantes cambios que se acumularon durante millones de años. Procesos tales como duplicaciones génicas, recombinaciones, sustituciones nucleotídicas, transposiciones y conversiones génicas contribuyeron a la formación y evolución de los genomas dejando en sus secuencias múltiples marcas. El propósito de la evolución molecular es tratar de descifrar estas marcas, ordenar la información y entender su significado.

Mediante las técnicas de biología molecular, tales como: hibridación, clonación génica y secuenciación, es posible rastrear esta evolución, encontrando el genoma estático: experimentando poco cambio durante largos períodos de tiempo ó fluido: cambiando dramáticamente, durante cortos episodios.

Además, la comparación de los genomas permite clasificar los organismos vivos en base a datos filogenéticos apoyándose en los campos tradicionales de estudios evolutivos, tales como anatomía comparada, morfología y paleontología, entre otros; reconstruyendo así árboles filogenéticos gigantescos conectando vertebrados, insectos, plantas, hongos y bacterias.

1.1 Evolución por duplicación génica e intercambio de exones.

Grupos de genes que provienen de un mismo ancestro en el genoma y comparten una similitud de al menos el 50%, constituyen *familias génicas o familias multigénicas* (Singer y Berg, 1991). Los miembros de una familia multigénica pueden permanecer juntos integrando un locus o dispersarse a diferentes cromosomas (o una combinación de ambos). Por ejemplo en el humano, el gen de la prolactina se encuentra en el cromosoma 6, mientras que los genes que codifican para la hormona del crecimiento (GH) y el lactógeno placentario (PL), están en el cromosoma 17 (Harper y cols., 1982).

Dos genes son parálogos si se derivan de un evento de duplicación (por ejemplo las GHs y PLs) pero son ortólogos si se derivan de un evento de especiación como por ejemplo GH humano y porcino) (Singer y Berg, 1991).

Los miembros de una familia multigénica pueden sufrir a su vez nuevas duplicaciones génicas y generar nuevos genes recombinantes. Por ejemplo, un simple entrecruzamiento desigual podría generar deleciones, duplicaciones y genes recíprocos o recombinantes. El impacto de tales eventos se ha observado en la evolución de loci como los de los genes HOX (Ruddle y cols., 1994), amilasas (Gumucio y cols., 1988), globinas (Collins y Weissman, 1984), complejo mayor de histocompatibilidad (MHC) (Hughes, 1996) e inmunoglobulinas (Ig), entre otros (Matsuda y Honjo, 1996).

Las principales teorías evolutivas que permiten explicar el surgimiento de las familias multigénicas son: la duplicación génica y el intercambio de exones.

1.1.1 Duplicación génica

De manera muy ocasional, se produce una duplicación del genoma que permite que parte de la secuencia del DNA, que contiene un determinado gen se copie dos veces. Inicialmente, la única consecuencia de esta duplicación es que los descendientes del organismo poseen dos copias del mismo gen. Esto podría ser ventajoso si la proteína se requiere en cantidades elevadas, pues se incrementaría la eficiencia de su producción. En este caso presiones selectivas mantendrían dos o incluso más copias del mismo gen, como en el caso de los genes del RNAr o de las histonas. (Mathews, 1988; Van Holde y cols., 1974, 1996).

También se puede dar el caso de que una copia continúe expresando la proteína que cumple con su función original, mientras la otra acumule mutaciones hasta dar origen a una proteína diferente con una nueva función; un fenómeno de este tipo parece haber ocasionado el surgimiento de las hormonas de crecimiento y de las prolactinas (Ohno y cols., 1970; Wallis, 1981; Wagner, 1998).

Ocasionalmente, una de las copias puede inactivarse debido a deleciones o mutaciones como es el caso del gen hPL-1 el cual se considera un pseudogen, pues contiene una mutación en el segundo intrón (en el sitio donador de "splicing") que evita el procesamiento correcto de su transcrito primario (Resendez y cols., 1990).

1.1.2 Intercambio de Exones o “*Exon shuffling*”

Muchas de las proteínas eucariotas son codificadas por genes con dos o más exones separados por intrones. Los intrones son eliminados del RNAm antes de la traducción. Como estas regiones no se utilizan para la codificación, representan posiciones en las que los genes pueden cortarse y recombinarse sin peligro durante el proceso de recombinación génica. De tal manera que la presencia de los intrones pudo haber facilitado la evolución de las proteínas por eventos de recombinación entre exones, este fenómeno es conocido como: intercambio de exones o “*exon shuffling*” (Gilbert y cols., 1997, Patthy y Nikolics, 1994). Se distinguen dos tipos de intercambio de exones: la duplicación de exones y la inserción de exones.

La duplicación de exones puede ocurrir cuando dos cromosomas homólogos sufren un desalineamiento y después un entrecruzamiento por recombinación de pequeñas secuencias homólogas. La presencia de secuencias repetitivas en el genoma facilita estos “errores” y contribuyen por lo tanto a la diversidad génica. Muchas proteínas eucariotas como el plasminógeno, la urocinasa, y el factor de crecimiento epidermal (EGF) entre otras, están integradas por regiones de las proteínas referidas como dominios que son similares y debieron originarse por duplicación exónica (Alberts y cols., 1997).

La inserción de exones o intrones puede ocurrir cuando dos elementos repetitivos del mismo tipo se encuentran cerca uno del otro, de tal manera que el mecanismo de recombinación pueda ocasionalmente usar los finales de estos dos elementos y movilizar el DNA cromosómico que quede entre ellos a un nuevo sitio, permitiendo el alargamiento de exones o intrones; estos fenómenos de inserción ocurrieron en la β globina por recombinación entre secuencias Alu (Lewins, 2001; Alberts y cols., 1997).

1.1.3 Otras teorías evolutivas

Adicionalmente a la duplicación génica y el “*exon shuffling*” existen otros mecanismos para producir nuevos polipéptidos a partir de la misma secuencia de DNA. Por ejemplo, el *splicing alternativo* es un importante mecanismo que contribuye con la diversidad proteica. Para que éste ocurra, es necesaria la selección de las secuencias de DNA (elemento *cis*-actuantes) por proteínas (elementos *trans*-actuantes), algunas de las cuales pueden ser específicas de tejido (Vandenbroucke y cols., 2002).

En el traslape de genes una misma secuencia de DNA puede codificar para diferentes proteínas dependiendo del marco de lectura utilizado; también se ha propuesto el fenómeno del gen compartido o “*gen sharing*”, en el cual un solo gen codifica una proteína que tiene dos funciones adquiriendo una función adicional a la función original (Hughes y cols., 1994).

La organización del conjunto de genes en una familia es clave para dilucidar la serie de eventos que la originaron e inferir sobre la historia de los genomas. Cada familia multigénica es distinta y frecuentemente sus características varían de un grupo de especies a otro, algunos ejemplos de familias multigénicas son: los genes de la actina, los de las globinas y los de las GHs, entre otros (Otha, 1991). En este trabajo nos concretaremos a tomar como ejemplo ésta última.

1.2 Familia génica de la hormona del crecimiento: estructura y función.

Dentro del genoma de los vertebrados, destaca la familia de la GH y del PL que también incluye otras proteínas como la prolactina (Prl). En general, son proteínas con estructura terciaria similar, además comparten el mecanismo de unión a su receptor específico. Esta familia multigénica constituye un buen modelo para estudiar la evolución molecular de los genomas.

Las GHs en el humano son en su forma madura, polipéptidos de 191 aminoácidos (aproximadamente 22 kDa), producidos y secretados por los somatotrofos de la hipófisis anterior (Daughady y cols., 1981).

Las GHs tienen diversas funciones: en los vertebrados impulsan el crecimiento lineal, son promotores de la síntesis de proteínas, DNA y RNA, y muestran actividades diabetogénicas al tener funciones antagónicas a la insulina. Además, en el humano presentan acciones lactogénicas y mamotróficas (Li y cols., 1945; Philips, 1988; Edwards y cols., 1988).

En el humano se ha descrito una variante de la HGH (HGH-V) que se expresa únicamente en la placenta. Aunque la función como promotora del crecimiento de la HGH hipofisiaria ha sido mantenida durante la evolución de los vertebrados, la función de la HGH-V no está muy clara (Hill y cols., 1992). La HGH-V difiere de la hipofisiaria en 13

residuos aminoacídicos (Masuda y cols., 1988) y presenta una alta afinidad por los receptores somatogénicos hepáticos (Mac Leod y cols., 1991); en ningún momento durante el embarazo esta hormona ha sido detectada en el suero fetal, lo que indica que sus efectos sobre el metabolismo fetal o crecimiento deben ser mediados al estimular la síntesis del factor de crecimiento parecido a la insulina (IGF-1) (Frankenne y cols., 1988). El aumento en los niveles de IGF-1 probablemente induce el crecimiento de los tejidos maternos incluyendo útero, senos y glándula tiroidea y sus efectos sobre corazón y riñón pueden incrementar el volumen de sangre materna (Mac Leod y cols., 1991).

El HPL es cadena polipeptídica de aproximadamente 22 kDa, compuesta de 191 aminoácidos con dos puentes disulfuro (Li, 1972), y carece de residuos de carbohidratos. La hormona madura se deriva de un precursor de 25,000 Da que incluye una secuencia señal de 26 aminoácidos en su extremo amino terminal. En humanos, durante el embarazo el HPL favorece la absorción de la glucosa por el feto gracias a sus actividades diabetogénicas y lipolíticas, además de presentar actividades mamotrófica y luteotrófica que estimulan la producción de progesterona en el cuerpo lúteo (Walter y cols., 1991).

La prolactina humana (HPrl) es un péptido sencillo de aproximadamente 23 kDa, producido y secretado por los lactótrofos de la hipófisis anterior y por la decidua. Interviene en el inicio y mantenimiento de la lactación en los mamíferos. En roedores, es capaz de mantener el cuerpo lúteo y se le conoce como hormona luteotrófica, mientras que en peces participa en la osmoregulación (Tyson, 1982)

1.3 Regulación de la expresión génica de la familia GH-PL.

La iniciación de la transcripción es uno de los puntos de control más importantes de la regulación de la expresión génica, siendo el principal en procariotes. Esta regulación está dada principalmente por interacciones entre secuencias específicas del DNA que pueden localizarse a distancias variables del sitio de iniciación (elementos *cis*) y una colección de proteínas (factores de transcripción), muchas de las cuales se unen a estas secuencias y actúan en *trans* induciendo o reprimiendo la expresión (Alberts y cols., 1997).

El aparato transcripcional basal reconoce en el promotor un gran número de genes, un elemento *cis* llamado “caja TATA”, que se localiza río arriba (o 5') del sitio de inicio de

la transcripción (posición: -30 pb) (Theill y Karin, 1993). Adicionalmente, casi todos los genes tienen secuencias de DNA regulatorias que son necesarias para prender y/o apagar el gen, o modular los niveles de transcripción.

A pesar de que los genes de la familia hGH-hPL tienen una región reguladora muy similar, esta similitud disminuye río arriba a partir del sitio de inicio de la transcripción en la región conocida como promotor proximal, ya que existen cambios sutiles en dicha región, los cuales podrían ser los responsables de las diferencias de expresión observadas entre los genes (Oury y cols., 1997). El promotor proximal es una región de aproximadamente 500 pb localizada antes del inicio de la unidad transcripcional, dicha región tiene una similitud en la secuencia del 90%, y es suficiente para dirigir la expresión del gen hGH-N en los somatótrofos de la pituitaria anterior. Esta es dirigida por el factor transcripcional Pit-1/GHF1 (Frankenne y cols., 1988). Pit-1/GHF1 presenta dos dominios conservados entre los factores de transcripción específico de tejido: un dominio homeobox (HB), y un dominio POU, ambos están ubicados en el extremo carboxilo terminal de la proteína e intervienen en la unión al DNA. Pit-1 se une al promotor en dos sitios: uno proximal localizado entre -92 a -65 pb en hGH-N, -97 a -61 pb para hPLs; (Nachtigal y cols., 1989) y otro distal que se encuentra entre -130 a -105 pb en hGH-N, -140 a -107 en hGH-V y -145 a -118 en hPL-2. Esta proteína que se produce en la hipófisis le confiere especificidad tisular al gen hGH-N y esta característica está dada en parte por el reconocimiento combinado de su promotor por varios factores que actúan en trans (Nickel y cols., 1990; Lefevre y cols., 1987).

Existe una región: secuencia P (entre 1,500 y 2000 pb del sitio de inicio de la transcripción según el gen), a la cual se unen proteínas que inhiben la unión de Pit-1 a los genes hPLs y hGH-V, impidiendo la expresión de estos genes placentarios en la hipófisis. (Nachtigal y cols., 1992).

Otros factores han sido involucrados en la regulación de la expresión del gen hGH-N en la hipófisis, potenciando la acción de Pit-1 como el caso AP-2 (Lefevre y cols., 1987) y NF1 (Stephanou y Handwerger, 1995) estos factores se unen al promotor en la región de 290 a 255 río arriba del inicio de la transcripción. Otros factores relacionados con Pit-1 son Zn-15 (descrito en rata) que funciona como potenciador (Lipkin y cols., 1993) y un

elemento de respuesta negativa (NRE3), el cual probablemente representa un sitio de unión para el factor transcripcional YY1 (Park y Roe, 1996).

Los genes GHs y PLs también están bajo el control de mensajeros como hormonas (T3, glucocorticoides), morfógenos, (ácido retinoico) y segundos mensajeros (AMPc), entre otros.

Existen elementos de respuesta a AMPc 82 pb río arriba del sitio de inicio de la transcripción del gen hGH-N y la regulación de este gen por la hormona liberadora de la hormona del crecimiento (GHRH) involucra la interacción entre un elemento tejido específico y un elemento que responde a AMPc (Dana y Karin, 1989).

Se han localizado tres regiones que responden a triyodotironina y ácido retinoico en el promotor de hPL, las cuales están entre -550 a -523, -611 a -558 y además entre -978 a -954; también se ha localizado un sitio de respuesta a triyodotironina en el promotor de hPL-2 entre -67 a -41 pb. Estas hormonas favorecen el incremento de la expresión de los genes hPLs (Stephanou y Handwerger 1995). En células de tumor de pituitaria de rata los niveles de los RNAm de GH se incrementan en respuesta a las concentraciones fisiológicas de triyodotironina (Dobner y cols., 1981); pero al contrario del gen GH de rata, el promotor de hGH-N es regulado de manera negativa por triyodotironina (Cattini y cols., 1986). También se ha demostrado en líneas celulares de hipófisis de rata que el ácido retinoico no incrementa la transcripción del gen hGH-N (Bedo y cols., 1989).

Además de la caja TATA, se ha descrito un elemento iniciador (InrE) que determina el sitio donde empezar correctamente la transcripción. Éste ya ha sido descrito para los genes hPL y la secuencia nucleotídica de unión a la proteína correspondiente (el iniciador) está ubicada justo antes del sitio de inicio de la transcripción (Jiang y cols., 1995)

Muchas de las diferencias nucleotídicas en los genes de la familia pueden estar en las regiones de unión a los co-activadores de la transcripción en el promotor proximal, otros a veces tan alejadas como a cientos de pb en el promotor distal y otras más incluso en la unidad transcripcional, como en el caso de hGH-N que en el primer intrón tiene una secuencia de respuesta a glucocorticoides (+ 86 a +115, 5'TGTCCT-3') que influyen en los niveles de expresión en la pituitaria. Este elemento está conservado en los demás genes placentarios pero no se sabe si tiene efecto en los niveles de transcripción de estos genes (Slater y cols., 1985, Theill y Karin 1993; Krawczak y cols., 1999).

Debe señalarse que la expresión de los genes hGH-hPL no se restringe a los tejidos señalados, pues recientemente se ha descrito su expresión en otros tejidos como ovarios, donde se ha demostrado la producción de RNAm de hGH-N, hPL-2, hPL-3 y sus correspondientes proteínas (Schwärzler y cols., 1997). También se han encontrado RNAs con diferentes procesamientos derivados de hGH-N en líneas celulares de linfocitos y de mielomonocitos y mediante análisis de RT-PCR se han determinado transcritos de hGH-N en fibroblastos de la dermis (Palmetshofer y cols., 1995). Este descubrimiento fundamenta la importancia de la HGH en el desarrollo del sistema inmune y sugiere un posible lazo regulatorio autocrino/paracrino en el tejido de la piel. Se ha logrado detectar RNAm del gen hGH-V con diferentes procesamientos en testículos, los cuales codifican para las proteínas de 22 kDa, 26 kDa y una proteína de 25 kDa de longitud, desconociéndose a la fecha la especificidad tisular y la función del producto de HGH-V en la fisiología testicular (Untergasser y cols., 1998).

1.4 Evolución de la familia génica GH-PL-Prl.

El complejo GH divergió de Prl hace aproximadamente 450 millones de años, cuando un gen ancestral parecido a la prolactina se duplicó originando el surgimiento de dos precursores separados uno para GH y otro para Prl.

La GH muestra una marcada especificidad de especie (Nicoll y cols., 1986; Wallis y Wallis, 1989). En particular, la GH de mamíferos no primates no tiene actividad en el hombre. La especificidad biológica es consecuencia de las marcadas diferencias en las secuencias aminoacídicas de las GHs de primates y no primates (Wallis, 2000). El patrón evolutivo de la GH fue muy particular en los mamíferos, donde generalmente se observa una alta conservación en las secuencias aminoacídicas (por ejemplo las GHs de cerdo y perro son idénticas); sin embargo, hubo una aceleración en dos órdenes: los rumiantes y los primates (Wallis 1981, 1994 y 1996; Otha, 1993) (Figura 1).

La aceleración fue mayor en el caso de los primates (62 cambios/191 aminoácidos). Después del período de aceleración, vino un período de desaceleración en las sustituciones aminoacídicas, de manera que en estudios realizados se ha encontrado que el 82 % de los cambios aminoacídicos ha ocurrido durante el período de aceleración evolutiva (Wallis,

2000). Este patrón evolutivo se ha presentado en otras hormonas proteicas y en citocinas (Wallis, 2001), incluyendo la interleucina-2 (Zelus y col 2000) y la prolactina (Wallis, 1981, 2000, Beintema y Campagne, 1987). Durante la evolución de esta última, también se ha observado una velocidad evolutiva basal con un incremento en las sustituciones aminoacídicas en cuatro ocasiones: durante la divergencia euteriana, de artiodáctilos, de primates y de roedores.

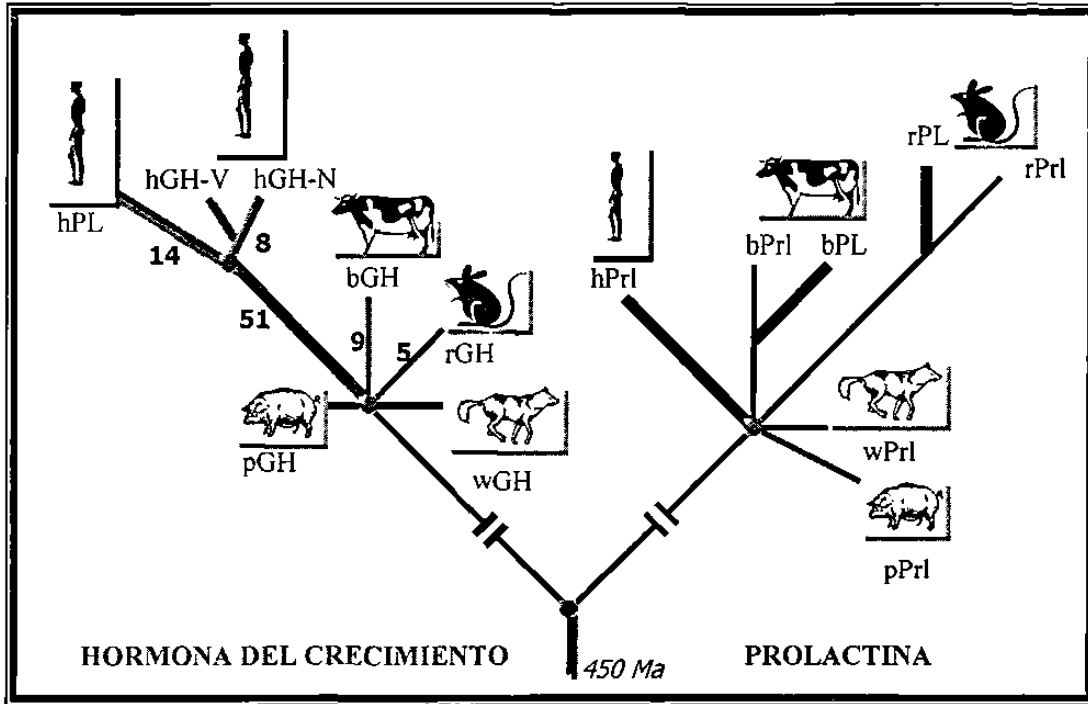


Figura 1.- Evolución de la familia GH, PL y PRL en primates. Los números indican las sustituciones aminoacídicas entre especies. Las líneas gruesas indican períodos de aceleración de cambios nucleotídicos.

Después del período de aceleración de los genes GH y Prl, ocurrieron fenómenos de duplicación génica que en primates, artiodáctilos y roedores, permitieron el surgimiento de los genes parecidos a PL muchos de los cuales son expresados en placenta (Figura 1); así todas las proteínas PL-like expresadas por el locus GH son más similares a la GH humana que a los GHs de no primates (Chen y cols., 1989; Wallis, 1996). Estas duplicaciones han permitido el surgimiento del locus GH en primates. No hay evidencia de duplicación de GH en mamíferos con excepción de la GH caprina en rumiantes (Valinski y Sahani, 1990; Wallis 1998).

En rumiantes artiodáctilos y roedores, la familia también se expandió por duplicación de la PRL, generando 17 genes relacionados: PL y Prl like (Wallis, 1981, 2000).

1.4.1 Especificidad del receptor de GH

Los cambios ocurridos en GH y Prl son asociados con cambios en la especificidad del receptor y en sus acciones fisiológicas, pero no con la pérdida de actividad.

El receptor de la GH (GHR) es una proteína integral de membrana que en el humano contiene 638 residuos aminoacídicos (incluyendo un péptido señal de membrana de 18 residuos); éste consiste de un dominio de unión a la hormona de 246 aminoácidos, un dominio transmembranal y otro citoplásmico de 350 residuos (Leung y cols., 1987). Para unirse a GH, el GHR forma homodímeros (De Vos y cols., 1992) que son esenciales para la activación del receptor (Fuh y cols., 1992; Duquesnoy y cols., 1994).

Las secuencias aminoacídicas de GH están disponibles para algunos mamíferos, incluyendo roedores, artiodáctilos (ovejas, vacas), carnívoros y primates; de estas secuencias un consenso o secuencia ancestral puede ser inferida (Wallis 1994). Muchas GHs de mamíferos difieren de su consenso por 0-4 sustituciones. En contraste, la GH de humanos y el macaco difiere del consenso de 62 a 64 sustituciones, respectivamente. Estos valores son tres veces más altos que los observados en artiodáctilos, el segundo grupo más divergente, y este incrementado número de sustituciones nucleotídicas se correlaciona con un cambio de la hormona con el GHR (Liu y cols., 2001; Wallis y cols., 2001).

El GHR en primates dirige la especificidad de especie, es decir éste puede interactuar únicamente con la GH humana, no con las GHs de no primates. Esta especificidad del GHR se debe a un cambio de Leu a Arg en la posición 43, y las hipótesis sugieren que este cambio precedió un cambio de posición de His a Asp en la posición 171 de GH (Behncken y cols., 1977; Adkins y cols., 2001). Cerca de 24 aminoácidos han sido implicados de manera importante en la interacción GH-RGH (Cunningham y cols., 1989 y 1993). Además de unirse a GHR, la GH humana se une al receptor de la prolactina (RPRL) (Somers y cols., 1994), siendo 19 aminoácidos los implicados en la unión GH-RPRL.

1.4.2 Evolución del complejo GH-PL en primates

Según datos paleontológicos, los primates proceden de un grupo de mamíferos insectívoros parecidos a la musaraña, que tras la extinción de los dinosaurios en el período Cretácico-Terciario, o punto KT, tuvieron la oportunidad de ocupar nuevos habitats (radiación evolutiva). De esta forma y a través de distintas adaptaciones y especializaciones

han evolucionado hasta sus formas actuales. La taxonomía actual de los primates (<http://www.adi.uam.es/~burmann/primatologia/primatutor/taxonomi.htm>) los clasifica en dos grandes grupos: los prosimios que incluyen a los lemures, los lorises y los tarsiers y los antropoides o simios que incluyen tres grupos principales, *Ceboidea*, o monos del nuevo mundo, *Cercopithecoidea*, o monos del viejo mundo y finalmente *Hominoidea*, que incluye al hombre y a los grandes monos (Figura 2). Lo anterior se relaciona con los datos obtenidos mediante técnicas de biología molecular en estudios realizados con la familia de la hormona del crecimiento entre otras proteínas (Anexo 1).

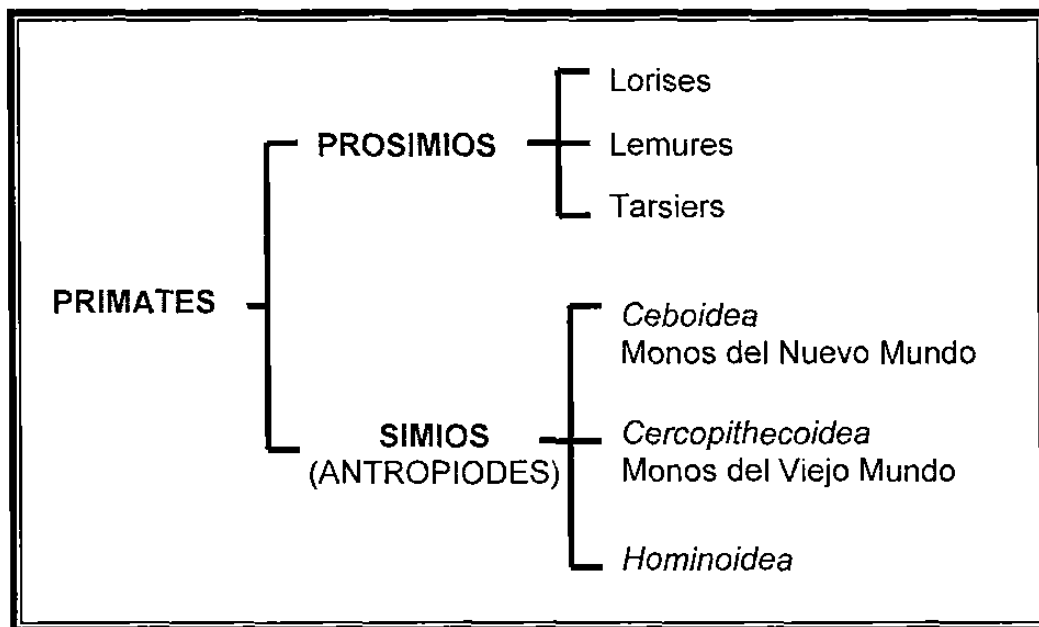


Figura 2.- Taxonomía de primates. Taxonomía actual obtenida de acuerdo a los estudios paleontológicos.

El mayor número de cambios en GH de primates ocurrió después de la divergencia de los prosimios loris lento (*Nycticebus coucang*), el Bushbaby (*Otolemur crasicaudatus*) y los prosimios relacionados (Anexo 1); en estos grupos un solo gen de GH ha sido evidenciado y su secuencia aminoacídica es muy similar a la reportada para mamíferos no primates (Adkins y cols., 2001; Wallis y cols., 2001).

Estudios de la divergencia aminoacídica en sitios funcionalmente importantes en relación a la interacción de la hormona con su receptor, han demostrado que tomando como consenso una secuencia no primate (cerdo), dos prosimios los lemures y los tarsiers, presentan pocas sustituciones aminoacídicas; en cambio, después de la divergencia de los

simios (los monos del nuevo mundo (MNM), los monos del viejo mundo (MVM) y el humano), éstos parecen haber pasado por una acelerada etapa evolutiva que probablemente fue seguida por una desaceleración durante la divergencia de estos grupos entre sí, pues entre ellos se observan pocos cambios aminoacídicos, específicamente en MVM y humano se observa un cambio aminoacídico exclusivo de estas especies (Liu y cols., 2001; Wallis y cols., 2001). (Figura 3).

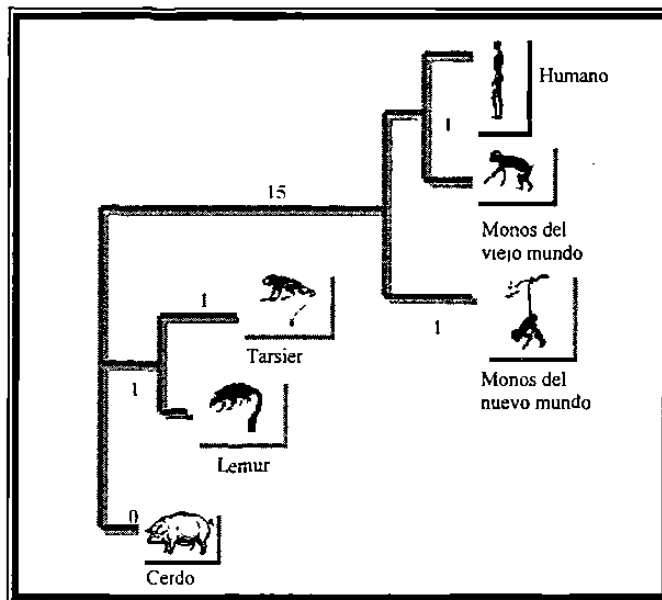


Figura 3.- Divergencia aminoacídica de GH en sitios funcionalmente importantes. Los números representan las sustituciones aminoacídicas entre grupos de primates.

El episodio de rápidos cambios observados en la evolución de GH en primates parece ser específico para la secuencia codificante de la proteína madura; así, cuando se analizan solo los intrones, el incremento en las sustituciones no es evidente, indicando esto que los cambios ocurrieron en respuesta a una selección. Numerosos cambios aminoacídicos ocurrieron en el corto período que separó la divergencia de los prosimios y de los antropoideos afectando sitios importantes para la unión de la hormona a su receptor y confiriendo a la GH de primates propiedades únicas. A la par, el receptor de GH sufrió una coevolución, dándole una alta especificidad de especie, ya que la GH de mamíferos no primates no interactúa con el receptor humano (Wallis y cols., 2001).

Las mayores diferencias en las funciones fisiológicas de GH en primates y no primates son no aparentes, sin embargo, la GH humana muestra más incremento en la

actividad lactogénica (genes parecidos a prolactina) que las GHs de mamíferos no primates, además de las diferencias en la afinidad del receptor-hormona. (Cadman y Wallis, 1981; Amit y cols., 1992)

1.5 El locus GH-PL humano.

Los cinco genes del locus hGH-hPL comparten una similitud de 91-95% (Hirt y cols., 1987). Dos de éstos codifican para hormonas del crecimiento: el gen hGH-N (Normal) con expresión específica en los somatotrofos de la pituitaria y el gen hGH-V que codifica para una proteína variante placentaria (Owerbach y cols., 1980). Dos genes, hPL-2 y hPL-3 codifican para la misma hormona lactogénica placentaria (Barrera-Saldaña y cols., 1982) y el gen hPL-1 se considera un pseudogen (Reséndez, 1990).

Los cinco genes están separados por cuatro regiones intergénicas: dos de aproximadamente 6,000 pb y dos de alrededor de 13,000 pb (Chen y cols., 1989). Se conoce la secuencia nucleotídica de cada una, y se han identificado tanto elementos repetitivos como elementos que participan en la regulación de la expresión de los genes.

Se ha propuesto que la familia GH-PL en el humano surgió como tal, hace aproximadamente 10-15 millones de años por eventos de duplicación incluyendo fenómenos de recombinación (Barsh y cols., 1983, Chen y cols., 1989). De los 66 kilobases (Kb) del complejo GH-PL humano, el 21% de las secuencias consiste de 48 copias de 300 pb de secuencias repetitivas tipo *Alu* (Chen y cols., 1989). La alta homología en las secuencias del DNA puede predisponer a un desalineamiento del cromosoma propiciando eventos de recombinación desigual.

El primer evento pudo haber sido la duplicación de un simple gen originando los ancestros GH-Prl a partir de la GH; en humanos parece haber ocurrido una segunda duplicación de la que emergieron los PLs; una posterior duplicación probablemente genero dos GHs y dos PLs, finalmente ocurrió la duplicación de un PL, generando el locus humano (Chen y cols., 1989; Walter, 1991) (Figura 4).

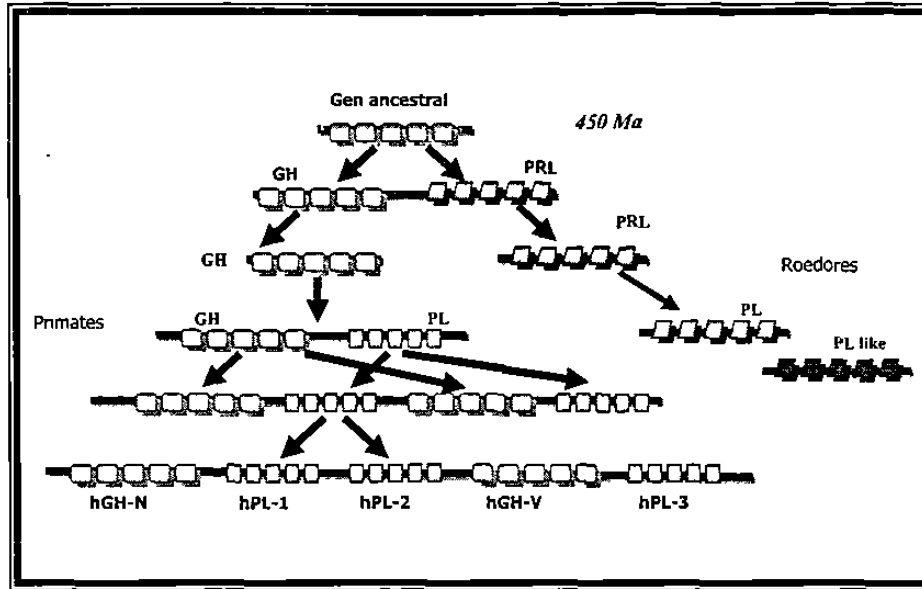


Figura 4.- Evolución de los genes que codifican para la GH, PRL y PL. Se ejemplifica la duplicación del gen ancestral y el origen hipotético del locus del complejo multigénico en el humano (Chen y cols., 1989).

1.6 Genes relacionados a GH reportados para primates

Como el humano, los simios: grandes monos, monos del viejo mundo y monos del nuevo mundo muestran aspectos únicos de esta hormona; en estos grupos de primates se ha evidenciado la duplicación de los genes de GH y el surgimiento de los PLs a partir de los monos del viejo mundo, a diferencia de los prosimios en los que solo ha sido reportado un gen (Figura 5) (Wallis, 2002).

Grandes monos (GM):

En el Laboratorio de Biología Molecular de la ULIEG recientemente se han clonado y secuenciado seis genes relacionados a GH del chimpancé (*Pan troglodytes*), los cuales corresponden a dos GHs, 4 PLs y se han evidenciado cuatro regiones intergénicas, siendo éstas de 13,000, 9,000, 6,000 y 5,000 pb; pero aún se desconoce la organización del locus. En el 2001, Revol y cols. reportaron la secuencia completa de GH-N y GH-V del chimpancé.

Monos del viejo mundo (MVM):

Corrales Felix en el 2000 evidenció cinco regiones intergénicas en macaco (*Macaca mulatta*) y mono verde (*Cercopithecus aethiopsis*) sugiriendo así la presencia de al menos

seis genes; sin embargo, Golos y cols. en 1993 habían reportado únicamente las secuencias codificantes de cinco genes de macaco: cuatro genes con expresión placentaria, tres PLs, una GH-V y el DNAC de GH-N (de expresión hipofisiaria), además de la secuencia completa de GH-V.

Monos del nuevo mundo (MNM):

Esquivel Escobedo en 1999, evidenció 5 regiones intergénicas todas del mismo tamaño, 3000 pb y 3 genes tipo GH en el mono araña (*Ateles geoffroyi*) y la falta de tres secuencias génicas no ha permitido determinar la organización del locus en esta familia. Recientemente, para el Marmoset, otra especie perteneciente a los monos del viejo mundo han sido reportadas siete regiones intergénicas y 8 genes relacionados a GH, de los cuales 3 son funcionales y los 5 cinco restantes se consideran pseudogenes (Wallis y Wallis, 2002).

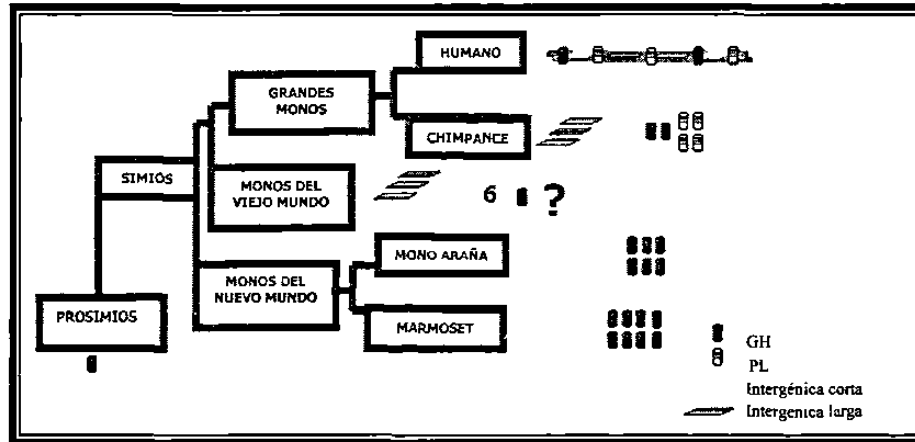


Figura 5.- Reporte de genes completos relacionados a GH en prosimios y simios. Se esquematiza el número y tipo de genes y de regiones intergénicas reportados para los diferentes grupos de primates.

A la fecha, la sucesión de los eventos de duplicación de los cuales surgieron los loci GH-PL no ha sido esclarecida. Inicialmente, se propuso que emergió hace aproximadamente 15 millones de años (Millar y Ederhardt, 1983; Chen y cols., 1989). Sin embargo, la descripción de varios genes GH-V y PL en los monos del nuevo y viejo mundo, indican que la formación del locus empezó antes de la divergencia de los monos del nuevo mundo hace aproximadamente 45 millones de años (Kumar y Hedges, 1998).

Además, al comparar las secuencias génicas obtenidas para los primates se encontró que los eventos de duplicación que originaron el segundo gen de GH (GH-V) fueron independientes en los tres grupos (Revol y cols., 2001).

De estas características únicas de la evolución de los primates surgen muchas cuestiones, por ejemplo: (1) ¿Cuándo surgió la duplicación de los genes relacionados a GH durante la evolución de los primates? (2) ¿Cómo se llevaron a cabo los fenómenos de duplicación génica en los diferentes grupos? (3) ¿Qué diferencias hay entre los loci GH de los grandes mono, monos del viejo mundo y monos del nuevo mundo? (4) ¿Está el complejo de la hormona del crecimiento en los monos del viejo mundo integrado por 6 genes?

Con la respuesta a estas incógnitas, entre otras, podríamos tratar de entender como ha evolucionado el locus de la GH en los primates.

1.7 JUSTIFICACIÓN

El locus GH-PL es una región muy dinámica dentro del genoma de los primates, por tanto constituye un excelente modelo para estudios evolutivos. Los monos del viejo mundo divergieron después de los del nuevo mundo y antes de los grandes monos, ocupando una posición estratégica que permite inferir acerca de los eventos ocurridos en este corto periodo evolutivo.

CAPITULO II

OBJETIVOS

2.1 Objetivo general

Obtener y caracterizar los genes de la familia multigénica GH-PL en el mono verde (*Cercopithecus aethiops*).

2.2 Objetivos específicos

- 2.2.1 Amplificar por medio de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), los genes de la familia GH-PL del mono verde a partir de DNA genómico.
- 2.2.2 Identificar, caracterizar y clonar los productos amplificados.
- 2.2.3 Obtener la secuencia de los productos clonados.
- 2.2.4 Asociar los promotores proximales con las regiones intergénicas previamente reportadas por Corrales (2000).
- 2.2.5 Comparar las secuencias obtenidas con las de otros primates, para inferir la evolución del complejo GH-PL en los primates.

CAPITULO III

MATERIAL Y METODOS

3.1 Origen de los reactivos

Las enzimas de restricción y la DNA ligasa de T4 fueron adquiridas de Gibco-Bethesda Research Laboratories (Gibco-BRL, Gaithersburg, MD, EUA) y de New England Biolabs (NEB, Beverly, MA, EUA).

La enzima *Taq* DNA polimerasa al igual que los dNTPs y los reactivos necesarios para realizar la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) provinieron de Promega (Madison, WI, EUA). El Kit de PCR-Larga fue adquirido de Perkin Elmer Cetus (Norwalk, CT, EUA). Para la secuenciación se utilizó el kit de terminadores (ddNTPs) marcados con un fluorocromo: IRDye-800 de LI-COR, NEN Life Science Products, Inc (Lincon, NE, EUA) y la secuencia de USB (Cleveland, OH, EUA).

Los reactivos para elaborar las soluciones, amortiguadoras, medios de cultivo, geles, etc., necesarios para realizar este trabajo se obtuvieron de las compañías Sigma Chemical (St. Louis, Missouri, EUA), Merck (Monterrey, México), Aldrich Chemical Company (Milwaukee, WI, EUA), DIFCO Laboratories (Detroit, MI, EUA) y United States Biochemical, el medio de cultivo DMEM se adquirió de Gibco- BRL.

La secuencia de los iniciadores que se utilizaron para PCR, PCR-Larga y secuenciación se muestran en la tabla 1. Los iniciadores para PCR y secuenciación, fueron diseñados en el Departamento de Bioquímica y sintetizados por Biomol (Monterrey, México). Los iniciadores M13forward y reversa provinieron de la compañía RocheDiagnostics, (Indianapolis, In EUA).

Tabla 1.- Secuencia de los iniciadores.

Nombre	Secuencia
IGP IV	aac gta gac ccg cac cgc atc tcc ctg c
IGP II	gca gga gca agg atg tcc ggg agc ctg
AGN3	tct gcc tct gca ctt aat agc c
5Ed2	ctg agg tag ctc atg caa tca gtc tct ctg a
D10	gaa gca gga gag cag ccc gta gtt
D11	ggg gtc tcg agg act ggc tat c
970826-139	ggc act aga gtg gca ctt tcc agg
960130-87	cac gac tgg atg agc agc agc gag a
Prim	gac tag ttc ggg gag ttg ggc ctt ggg at
403	ccg aat tcc agg aga ggc act ggg ga
402	ggg cat cct gtg gac agc tca cct a
MV5	cac ctg ggc agt tag aag cca c
960130-85	ctg cac cag ctg gct gct gac ac
ExIII	aca ccc agg ctt cct tct gct tc
960130-88	ctg ctg ctc atc cag tca tgg
M13Fw	ctg gcc gtc gtt tac a
M13Rv	cag gaa aca gct atg a

3.2 Material biológico

Las células de riñón de mono verde (Cos 7) fueron proporcionadas por el laboratorio de Biología Celular de la ULIEG.

El vector utilizado para la clonación (pCR topo) y la cepa bacteriana TOP 10 de *Escherichia coli* empleada en los ensayos de transformación y propagación de los plásmidos recombinantes, provenían del kit PCR topo cloning de Invitrogen (Carlsbad, California, EUA).

3.3 Equipo

Durante este trabajo se utilizaron: un horno de microondas LG modelo MS-70IC, microcentrífuga Eppendorf modelo 5415, fuentes de poder EC600 (E-C, St. Petersburg, Florida), ISCO494 (ISCO, Nebraska USA) y BRL250 (Gibco-BRL), una centrífuga Beckman allegra™ 21R, modelo 367570, un agitador de tubos Barnsted Termolyne modelo Maxi Mix (Bubuque, IOWA, EUA), una placa agitadora con control de temperatura marca

Corning modelo PC320, un secuenciador automático LI-COR (Michigan Technology University, USA), una placa agitadora con control de temperatura marca Corning PC320 (N.Y., EUA), un termomixer 5436 (Eppendorf), una incubadora Shell Lab modelo 1525, una campana de luz ultra violeta modelo p-036'02 (CBS Scientific Co). El material y los reactivos se almacenaron en un congelador a -20°C marca Toro-Rey (Mty, Mex), o en un ultracongelador a -70°C marca So-Low Enviromental Equipment (Cincinnati, Corporation (K.C., Missouri, EUA).

Los termocicladores empleados fueron: Robocycler 96 versión 4.0 (Stratagene, la Joya Ca. EUA), el Hybaid PCR Express; y uno de Perkin Elmer, modelo 2400 para PCR larga.

La balanza analítica fue de la marca OHAUS modelo AP110S, y la balanza granataria digital de la marca Sartorius modelo 1206MP (Göttingen, Alemania).

El procesamiento de los datos fue realizado en las computadoras Macintosh modelos LCIII, Classic, Power PC y PC portátil Satellite serie 3000 Toshiba (Apple Computer, Inc., Cupertino California, EUA, Irving, California EUA). El digitalizador de imágenes de cama plana UMAX data System Inc., modelo UC630 MaxColor (Industrial Park Hsinchu Taiwan, R.O.I.).

Los procesadores de textos utilizados fueron: *Microsoft Word XP* (© 1985-2001 Microsoft Corporation), procesadores de gráficos de *Microsoft Power Point Version XP* (© 2001 Microsoft Corporation), *Adobe Photoshop Limited Edition 6.0* (© 2001 Adobe Systems Incorporated), y UMAX Scan (© 1990-1991 UMAX Scanner Driver, Impact Resaerch Inc.), para la secuenciacion se utilizó el programa *e-Seq Release 1.1*. (1999, LI-COR, Michigan Tecnology University).

Los programas de análisis en Biología Molecular fueron: Amplify Versión 1.2 b (Bill Engels © 1992 University of Wisconsin Genetics M, Madison, WI, EUA), DNA Strider™ 1.3 (© Ch. Merck and C.E.A 1989 Service de Biochimie-Département de Biologie-Institut de Recherche Fondamentale-CEA-FRANCE), OLIGO Version 4.0 (© 1992, Plymouth, Mn, EUA), DNAMAN version 5.0 (bio soft 1994-2001, Lynnon Corporation, Quebec, Canada)

Para la cuantificación del DNA y la determinación de los tamaños se utilizó un aparato para la digitalización de imágenes Gel Doc 1000 de Bio-Rad (Hercules CA).

3.4 Métodos

3.4.1 Estrategia general

Para el desarrollo del presente trabajo se siguió la estrategia general presentada en la figura 6, la cual incluyó los siguientes pasos.

- Extracción de DNA a partir de células cos 7 provenientes de riñón de mono verde.
- Análisis de los iniciadores existentes en la oligoteca de la ULIEG que permitieron la amplificación de los genes de la hormona del crecimiento y diseño de un iniciador 3'.
- Obtención de los genes de la familia GH por PCR a partir del DNA genómico.
- Caracterización enzimática de los productos amplificados.
- Clonación y secuenciación de los genes.
- Análisis de los promotores proximales de los genes obtenidos y asociación de éstos con los promotores proximales de las regiones intergénicas de mono verde previamente reportadas por Corrales Felix (2000).
- Comparación de las secuencias obtenidas con las de GH y PL reportadas para otros primates.

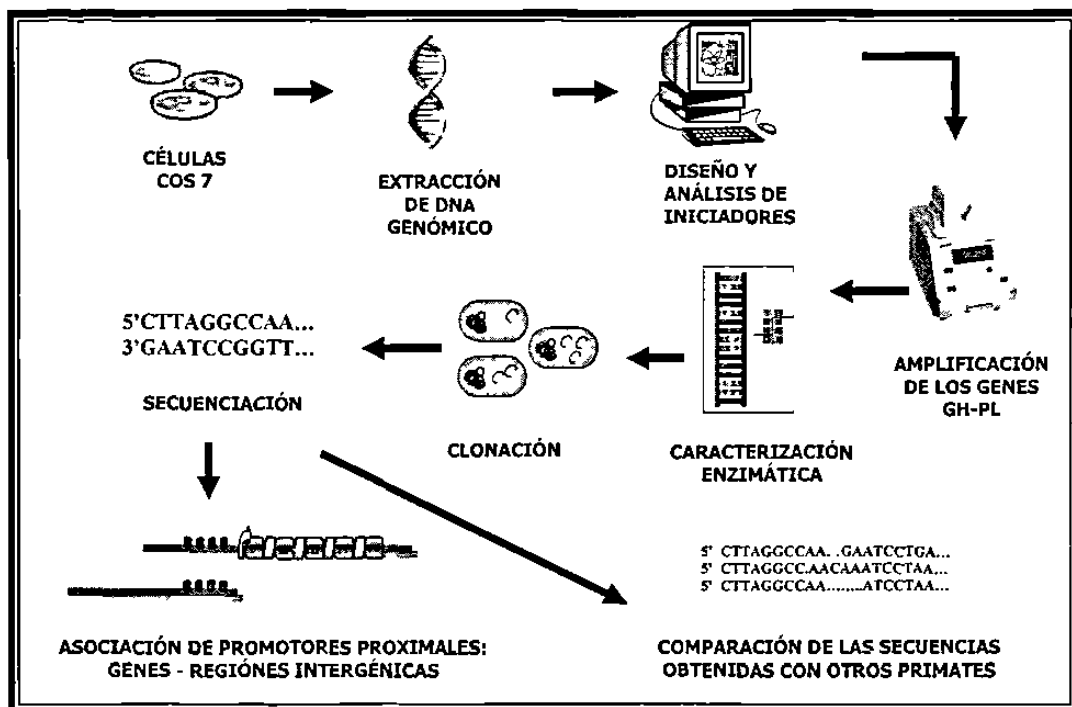


Figura 6.- Estrategia General. Para la obtención de los genes relacionados a la GH en el mono verde, se siguieron los pasos aquí indicados.

3.4.2 Propagación de las células Cos 7

A una caja de cultivo con una confluencia de aproximadamente 75%, se le eliminó el medio de cultivo mediante succión por vacío. Se agregaron 2 ml de tripsina-EDTA 1X (tripsina 0.025 %, rojo fenol 1%, EDTA 0.02 %) en TD 1X estéril (NaCl 0.14 M, KCl 0.05 M, Na₂HPO₄ 0.0006M, Trizma base 0.24, pH 7.4) por una botella de 25 cm² y se incubó a 37°C por 5 a 10 min o el tiempo necesario para que las células se desprendan del sustrato (la tripsina debe tener una temperatura de 37°C).

Las células despegadas se colectaron en un tubo Falcon de 15 ml y se centrifugaron por 3 min a 3000 rpm, el sobrenadante se eliminó con una pipeta Pasteur y el botón de células se lavó con PBS 1X (NaCl 0.136 M, KCl 2.68 M, Na₂HPO₄ 0.01 M, K₂HPO₄ 0.0017 M pH 7.4). Después de centrifugar por 3 min a 3000 rpm, el sobrenadante fue eliminado y el botón de células se resuspendió suavemente en 3 ml de medio D-MEM completo; y se repartió 1 ml por caja en 3 cajas en las que se añadieron 4 ml más de medio.

Además, se agregaron también 4 ml de medio a la caja inicial de la cual partió la propagación. Se incubaron las cajas a 37°C, en atmósfera húmeda con 10% de CO₂, sin cerrar completamente la tapa para facilitar que se equilibrara el pH del medio con el CO₂ de la incubadora.

3.4.3 Extracción del DNA

3.4.3.1 Obtención de DNA genómico

La extracción del DNA genómico se realizó a partir de células cos 7 con una confluencia de 75%, por la técnica del TSNT (Martínez Soriano, 1993), descrita a continuación.

A una caja de células se le eliminó el medio de cultivo mediante succión por vacío después se hicieron 3 lavados con 1 ml de PBS. Se agregó 1 ml de buffer de lisis TSNT (2% tritón 100X, 1% SDS, 100 mM NaCl, 10 mM Tris-HCl pH=8, 1 mM EDTA disódico) directamente a la caja de cultivo y se incubó 2 min mezclando ligeramente hasta desprender la monocapa de células. Después la suspensión se colocó en un tubo Falcon de 15 ml y se lavo dos veces la caja con 500 µl de buffer de lisis.

Los ácidos nucleicos se extrajeron con 5 ml de fenol, 1 ml de SEVAG (cloroformo:alcohol isoamílico 29:1) y 2 ml de TE (Tris-HCl 10 mM, EDTA 1 mM, pH 8),

mezclando por inversión después de agregar cada uno de los reactivos y finalmente 5 min en el vortex. Posteriormente, el tubo se centrifugó por 15 min a 5,000 rpm.

La fase acuosa se transfirió a un tubo Falcon nuevo de 15 ml, y el DNA se precipitó con 0.1 volúmen de acetato de sodio 3 M pH 5.3 y 2 volúmenes de etanol al 100% mezclando por inversión e incubando durante 1 hora a -70°C . Después de centrifugar por 20 min a 5,000 rpm, la pastilla obtenida se lavó con 1 volumen de etanol al 70% y el tubo se centrifugó nuevamente. El sobrenadante se eliminó con una micropipeta para en seguida dejar secar al aire la pastilla, ésta se resuspendió finalmente en 200 μl de H_2O miliQ y se conservó a -20°C .

3.4.3.2 Obtención de DNA plasmídico

Las clonas recombinantes obtenidas fueron procesadas para la obtención del DNA plasmídico utilizando la técnica de lisis alcalina a partir del cultivo (Sambrook y cols., 1989).

Se hizo crecer una colonia en 4 ml de medio LB (bactotripton 10 g/L, extracto de levaduras 5 g/L, cloruro de sodio 10 g/L, pH 6.5-7.0) con 50 $\mu\text{g/ml}$ de kanamicina, incubando a 37°C con agitación vigorosa toda la noche. Después se centrifugaron 1.5 ml de medio durante 2 min a 14,000 rpm; el sobrenadante se descartó completamente, y la pastilla se resuspendió en 100 μl de solución I (glucosa 50 mM, Tris-Cl 25 mM, pH 8.0, EDTA 10 mM, pH 8.0). Se agitó vigorosamente en el vortex hasta que la pastilla se disolviera completamente, y se incubó 5 min en hielo. Posteriormente, se adicionaron 200 μl de solución II (0.2 ml de NaOH 10 N, 1.0 ml de SDS 10% y 8.8 ml de agua), se mezcló por inversión, se incubó 5 min en hielo, después se agregaron 150 μl de solución III (60 ml de acetato de potasio 5 M, 11.5 ml de ácido acético concentrado, 28.5 ml de agua), se agitó en un vortex y se incubó 5 min en hielo. El tubo se centrifugó 5 min a 14,000 rpm, el sobrenadante se colocó en un tubo nuevo, se agregó un volumen de fenol saturado y un volumen de SEVAG, se mezcló al vortex 5 min, se centrifugó 15 min a 14,000 rpm; el sobrenadante se transfirió a un tubo nuevo y se agregaron 2 volúmenes de etanol al 100% dejándose incubar 1 hora a -70°C , se repitió el paso de centrifugación y se descartó el sobrenadante, se lavó la pastilla con etanol al 70% frío y después de centrifugar, se removió completamente el sobrenadante dejando secar la pastilla; y ésta fue resuspendida en 50 μl de H_2O miliQ.

3.4.4 Análisis electroforético y cuantificación del DNA

Las muestras de DNA se analizaron por electroforesis en geles de agarosa a concentraciones variables, dependiendo del tamaño del fragmento y de la resolución requerida.

Los geles se prepararon al porcentaje requerido de agarosa, en buffer TBE (Tris-borato 0.089 M, ácido bórico 0.089 M). Una vez solidificados, se depositaron en una cámara de electroforesis y se cubrieron con el mismo buffer. Las muestras a analizar se depositaron en el gel preparado, mezclándose con jugo azul 6X (azul de bromofenol al 0.25%, xilencianol al 0.25% y glicerol al 30%), en una relación 5:1 (v/v). La electroforesis se llevó a cabo a 100 V; concluida ésta, el gel se colocó en una solución de bromuro de etidio a 5µg/ml por 5 min y posteriormente se lavó varias veces con agua para quitar el exceso de bromuro y así proceder a su observación y análisis, utilizando el programa computacional *Molecular Analyst del Gel Doc*.

3.4.4.1 Determinación del tamaño de las bandas

Durante la electroforesis, la distancia que recorren los fragmentos lineales de DNA es proporcional al logaritmo de su tamaño (logPM). A partir de un marcador, del cual se conoce el tamaño exacto de cada una de sus bandas, se estableció la curva de calibración [distancia = f(logPM)], y se calculó así el tamaño de los fragmentos de interés, utilizando el programa computacional *Molecular Analyst del Gel Doc*.

3.4.4.2 Cuantificación del DNA

Una vez extraído, el DNA se cuantificó por electroforesis y análisis densitométrico de la intensidad de la banda teñida con bromuro de etidio. Al intercalarse entre las bandas del DNA, el bromuro de etidio emite una fluorescencia al ser excitado por la luz UV. La fluorescencia emitida es proporcional a la cantidad de bromuro de etidio intercalado, dependiendo así de la cantidad de DNA y de la longitud del fragmento. Utilizando una curva de calibración realizada a partir de concentraciones variables de DNA de fago λ comercial, se puede determinar la concentración del DNA de la muestra en estudio. Para este caso se hicieron diluciones a partir de un DNA concentrado de 500 ng/µl: 1:2 (250 ng/µl), 1:4 (125 ng/µl), 1:8 (62.5 ng/µl), y 1:16 (31.25 ng/µl).

3.4.5 Amplificación de los genes GH-PL

Utilizando iniciadores consenso, se obtuvieron por PCR tanto la unidad transcripcional como la región promotora de los genes GH-PL.

Los iniciadores 5' usados fueron: d11 y 5Ed2 y los iniciadores 3': d10, Mv5, 139, 403 y AGN (Tabla 1); el tamaño aproximado de los productos obtenidos se muestra en la figura 7. Los iniciadores 5' son muy específicos: d11 se une al inicio del promotor proximal y 5Ed2 dentro de la región intergénica como a 1000 pb antes del inicio del promotor proximal. En cuanto a los iniciadores 3': d10 se une antes del final del exón 5, amplificando un gen incompleto, 139 y 403 cerca del sitio de poliadenilación y AGN fue diseñado específicamente para obtener PL. Estos iniciadores fueron probados virtualmente sobre la secuencia de GH-V de macaca y los genes del locus GH-PL humano y experimentalmente con el DNA genómico del mono verde, después de determinar las condiciones de PCR óptimas.

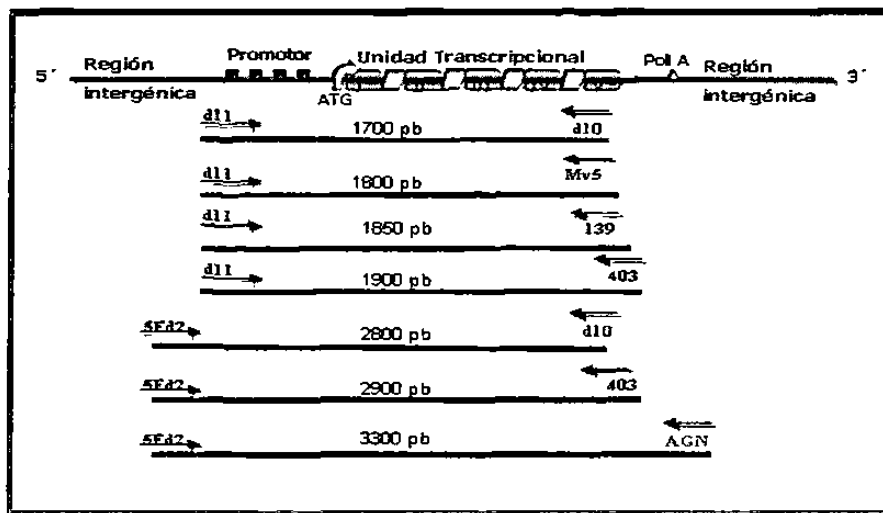


Figura 7.- Posición de los iniciadores utilizados. Se muestra la posición donde se unen los iniciadores utilizados para la obtención de los genes de GH así como el tamaño aproximado del producto obtenido por PCR usando como template las secuencias de los genes de la familia GH-PL en el humano.

3.4.5.1 Diseño del iniciador.

Para el diseño de un nuevo iniciador 3' (MV5) se utilizaron los programas computacionales Amplify y Oligo, tomando en cuenta los siguientes parámetros: fuerza de apareamiento, estabilidad del apareamiento, T_m , formación de estructuras secundarias y formación de "hairpin". El diseño se hizo utilizando como secuencias blanco los DNAs de los genes GH y PL reportados en primates: humano, macaco, chimpancé, mono araña y *Callithrix*.

3.4.5.2 Optimación de las condiciones de amplificación.

Tomando como base las condiciones de amplificación establecidas para el DNA humano y mono araña, se uso el DNA a una concentración de 120 ng/ μ l y se estandarizaron las condiciones para obtener los genes de GH del mono verde.

Se realizaron tres tipos de reacciones de amplificación (PCR). Al primer tipo de reacción de amplificación lo llamamos *PCR normal*. Para la obtención de los genes se utilizaron como iniciador 5' a d11 y como iniciadores 3' a d10, MV5 y 139. Estas condiciones sirvieron también para amplificar a los exones IV y V utilizando los iniciadores IGPIV y 403, así como las regiones promotoras. Para amplificar los promotores proximales se usaron los iniciadores d11 y Prim (se une antes del codón de inicio), estas reacciones se realizaron en el termociclador RoboCycler 96 versión 4.0.

Las condiciones de amplificación se describen en la tabla 2.

Tabla 2.- Condiciones de PCR normal para obtener los genes GH del mono verde.

Mezcla de reacción:

Reactivos	Concentración final
Buffer 10 X	1.0 X
MgCl ₂ 25 mM	1.5 mM
dNTPs, 10 mM	0.3 mM
Iniciador 5', 5 μM	0.5 μM
Iniciador 3', 5 μM	0.5 μM
H ₂ O miliQ	cbp 25μl
Taq DNA pol. 5 U/μl	0.1 U/μl
DNA 120 ng/μl	7.2 ng/μl
Aceite mineral	1 gota

Condiciones de amplificación:

Temperatura	Tiempo	No. de ciclos
93°C	5 min	1
93°C	1 min	30
58°C	1 min	
70°C	1 min	
70°C	7 min	1

En el segundo tipo de PCR para obtener los genes de GH: *PCR semi-larga* se usó como iniciador 5' a 5Ed2 y como iniciador 3' a d10, 403 y AGN, estas reacciones se realizaron también en el termociclador RoboCycler 96 versión 4.0.

Las condiciones de amplificación se describen en la tabla 3.

Tabla 3.- Condiciones de PCR semi-larga para obtener los genes GH del mono verde.

Mezcla de reacción:

Primera fase:

Reactivos	Concentración final
Buffer II XL 3.3X	1.0 X
Mg(OAc) ₂ 25mM	1.5 mM
dNTPs, 10 mM	0.2 mM
Iniciador 5', 5 µM	0.4 µM
Iniciador 3', 5 µM	0.4 µM
H ₂ O miliQ	Cbp20 µl

Se agregó una gota de aceite y se incubó a 80°C durante 5 min (Hot Start)

Segunda fase:

Reactivos	Concentración final
Buffer II XL 3.3X	1.0 X
Agua miliQ	cbp 30 µl
rTth, 2 U/µl	0.06 U/µl
DNAg 120 ng/µl	6.0 ng/µl

Condiciones de amplificación:

Temperatura	Tiempo	No. de ciclos
93°C	30 s	1
93°C	30 s	16
60°C	1 min	
72°C	1 min	12
93°C	1 min	
60°C	1.10 min	
72°C	5 min	

Al tercer tipo de reacción de amplificación se le llamó PCR larga y se utilizó para obtener las regiones intergénicas de mono verde, esta reacción se realizó en el termociclador Perkin Elmer modelo 2400.

Las condiciones de amplificación se describen en la tabla 4.

Tabla 4.- Condiciones de PCR larga para obtener las regiones intergénicas de GH del mono verde.

Mezcla de reacción:

Primera fase:

Reactivos	Concentración final
Buffer II XL 3.3X	1.0 X
Mg(OAc) ₂ 25mM	1.5 mM
dNTPs, 10 mM	0.2 mM
IGPII, 5 µM	0.4 µM
IGPIV, 5 µM	0.4 µM
H ₂ O miliQ	cbp 20 µl

Se agregó una perla de cera y se incubó a 80°C durante 5 min (Hot Start)

Segunda fase:

Reactivos	Concentración final
Buffer II XL 3.3X	1.0 X
H ₂ O miliQ	cbp 30 µl
rTtH, 2 U/µl	0.06 U/µl
DNAg 120 ng/µl	6.0 ng/µl

Condiciones de amplificación:

Temperatura	Tiempo	No. de ciclos
94°C	30 s	1
94°C 66°C	30 s 10 min	12
94°C 64°C	30 s 10 min	16 Incrementos de 15 s/ciclo
72°C	15 min	1

En todas las reacciones de amplificación se utilizó el DNA genómico humano como control positivo y además se agregó un control negativo, en el que se sustituyó el DNA por agua.

Los productos de las amplificaciones fueron analizados en un gel de agarosa al 0.8%, utilizando como marcador de tamaño el DNA del bacteriófago lambda cortado con *Pst* I ó un marcador comercial Ladder (GIBCO-BRL).

3.4.6 Caracterización enzimática de los productos amplificados.

Los fragmentos derivados de la amplificación de los genes, intergénicas y de los promotores proximales se caracterizaron por digestión enzimática. Se utilizaron diferentes enzimas, como: *Eco* RI, *Eco* RV, *Pst* I, *Bgl* II, *Bam* HI, *Hind* III.

Las condiciones de digestión se establecieron en base a las recomendaciones del proveedor. Las incubaciones se realizaron en la mayoría de los casos a 37°C, por 4 h. Posteriormente, los productos derivados de la digestión de los genes e intergénicas se resolvieron en geles de agarosa al 0.8% y para observar la digestión de los promotores proximales se usaron geles de agarosa al 3.0%.

3.4.7 Clonación de los productos amplificados.

Se uso el kit de clonación: Topo[®] XL PCR Cloning Kit Versión I, 041002, 25-0199 de Invitrogen Life Technologies.

El protocolo utilizado fue el de la casa comercial y consto de los siguientes pasos. (Figura. 8).

- Adición de residuos de adeninas al producto amplificado.
- Purificación del inserto A.
- Ligación del inserto A y el vector T por acción de la topoisomerasa para formar el vector recombinante.
- Transformación en células Top10 electrocompetentes.
- Extracción de DNA plasmídico.
- Identificación y caracterización de las clonas.

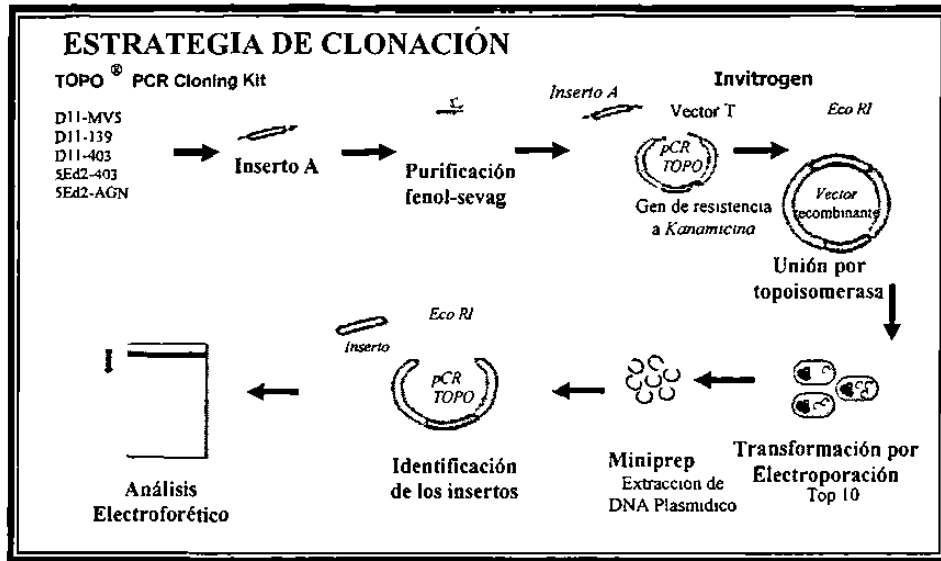


Figura 8.- Estrategia seguida para clonar los genes de GH en el mono verde. Durante la clonación de los productos amplificados se siguieron las indicaciones de la casa comercial (TOPO[®] PCR Cloning kit) con las modificaciones aquí señaladas.

3.4.7.1 Construcción del vector recombinante.

En una mismo tubo se juntaron más de 200 ng de cada uno de los productos de interés para clonar; y se precipitaron agregando 0.1% de acetato de sodio 3 M pH 5.2 más 2 volúmenes de etanol 100%. Después de 1 hora a -70°C, el tubo se centrifugó a 14000 rpm 15 min se descartó el sobrenadante y se agregó un volumen de etanol al 70% para lavar la pastilla. Se centrifugó a 14000 rpm durante 15 min; el sobrenadante fue eliminado y se puso a secar la pastilla mediante vacío. Después, la pastilla se resuspendió en 24.8 µl de H₂O MiliQ y se procedió a añadir residuos de adenilatos a la mezcla de productos de amplificación de la siguiente manera:

Tabla 5.- Mezcla de reacción usada durante la preparación del inserto A

Reactivos	Concentración final
Buffer 10X	1.0 X
MgCl ₂ , 25 mM	1.5 mM
dATPs, 10 mM	0.3 mM
Taq DNA pol. 5 U µl	0.16 U µl
Producto Amplificado	500 ng/ µl
H ₂ O miliQ	Cbp 45 µl

Se incubó a 72°C durante 2 horas en el termociclador Perkin Elmer.

Se añadió un volumen de fenol saturado más un volumen de Sevag, se mezcló gentilmente y se centrifugó a 14000 rpm durante 15 min, después se separó la fase acuosa y los ácidos nucleicos se precipitaron como se describió anteriormente. La pastilla obtenida fue resuspendida en 10 μ l de H₂O miliQ.

Para los productos que contenían dos bandas como es el caso de 5Ed2-403, primero se hizo la adición de residuos de adenilato y después se procedió a hacer una purificación de las bandas de interés según lo indicado en el kit de clonación pCR Topo.

Se tomaron 4 μ l de la preparación del inserto A previamente purificado y se agregó 1 μ l de pCR-XL-Topo vector, se mezcló gentilmente y se incubó 5 min a temperatura ambiente, después se agregó 1 μ l de 6X TOPO Cloning Stop Solution y se mezcló por algunos segundos a temperatura ambiente. Se colocó el tubo en hielo.

3.4.7.2 Transformación de las células por electroporación.

Se encendió el electroporador en las siguientes condiciones: 2.5 KVolts, 25 microfaradios. Se adicionaron 2 μ l de la mezcla anterior (DNA-vector) a un vial de células electrocompetentes y se mezcló gentilmente agitando con la puntilla. En una celdilla para electroporar previamente enfriada se colocó toda la mezcla de células cuidando de que ésta quedará entre sus dos paredes de metal, se puso la celdilla en el electroporador y se aplicó la descarga eléctrica. Inmediatamente se recuperó la mezcla de células y se colocó en un tubo Eppendorf de 1.5 ml que contenía 450 μ l de medio SOC, se incubó a 37°C durante una hora con agitación, después se sembraron 50 μ l de las células en una placa que contenía medio LB con kanamicina (50 μ g/ml). Se dejó incubando toda la noche a 37°C y las colonias se levantaron individualmente para ser inoculadas en tubos conteniendo medio LB más kanamicina; se volvió a incubar toda la noche a 37°C y se procedió a hacer la extracción de DNA plasmídico.

3.4.7.3 Caracterización de las clonas recombinantes obtenidas

El vector recombinante (vector pCR) tiene dos sitios de corte *Eco* RI, los cuales flanquean el inserto, por lo que las clonas fueron caracterizadas después de digerir el vector

recombinante con esta enzima, observando el patrón de migración de los insertos liberados en un gel de agrosa al 0.8%, los productos de d11-MV5, d11-139, d11-403 se diferenciaron entre sí después de ser secuenciados, porque el inserto liberado era de tamaño similar.

3.4.7.4 Conservación de las clonas de interés

Las clonas de interés fueron almacenadas a -70°C, con 30% de glicerol (Sambrook y cols, 1989).

3.4.8 Determinación y análisis de las secuencias de las clonas recombinantes

3.4.8.1 Secuenciación cíclica de las clonas recombinantes

La técnica utilizada para la secuenciación es una adaptación de la descrita por Sanger y cols en 1977. La secuenciación enzimática se realizó siguiendo las especificaciones del Kit LI-COR, el cual utiliza los terminadores ddNTPs marcados con un fluorocromo: IRDye-800. Los productos de secuenciación generados se resolvieron en un gel de electroforesis de acrilamida al 3.7% - urea 50%. La lectura de la secuencia se realizó con un programa específico de secuenciación (e-Seq).

Para determinar la secuencia nucleotídica se empleó la técnica “walking primer” y se secuenciaron al menos dos clonas independientes de cada producto amplificado. Se utilizaron iniciadores (Figura 9) que se aparean tanto en el vector (M13 Forward y M13 Reversa) como en el propio inserto (d11, AGN, 403, prim, 88, 85, 402, d10, 139, IGPII, IGPIV, ExIII). Se hizo el traslape de las secuencias obtenidas con los diversos iniciadores para obtener la integridad del gen.

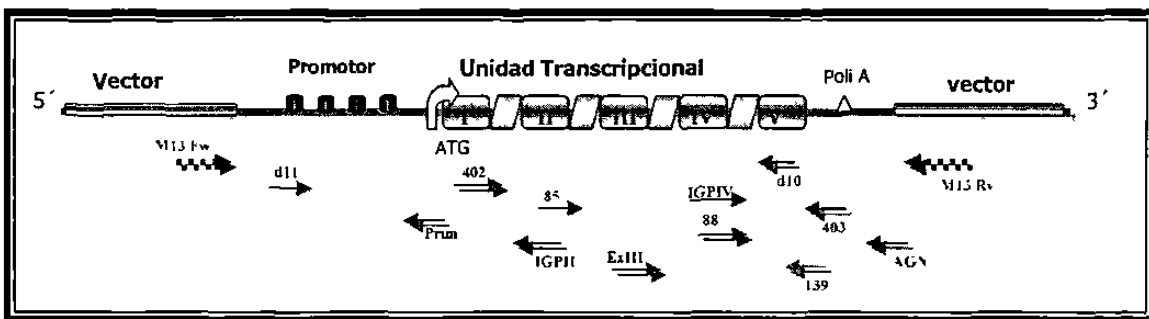


Figura 9.- Esquemático del sitio de unión de los iniciadores usados durante la secuenciación. Se representa la unión de los iniciadores (5' y 3') tomando como modelo a la GH-V de macaco.

3.4.8.2 Análisis de las secuencias.

Las seis secuencias génicas del mono verde fueron comparadas con las siguientes secuencias previamente reportadas para primates en el GenBank: humano (*Homo sapiens* J030071), macaco (*Macaca mulatta* LI6552-6 y UO2293), loris (*Nycticebus pygmaeus* AJ297562), marmoset (*Callithrix jacchus*, AJ297563), chimpancé (*Pan troglodytes* AF374232, AF74233) y mono araña (*Ateles geoffroyi* AF374234, AF374235) y se usó como grupo fuera a la cabra (*Capra hircus* D00476). El alineamiento de las secuencias se llevó a cabo usando los programas computacionales DNAMAN y CLUSTAL W, además fueron verificadas manualmente, para asegurar el mejor alineamiento. El análisis filogenético se realizó utilizando el método de la máxima parsimonia (con los programas Dnapars y Protpars), del programa PHYLIP. Los árboles filogenéticos fueron construidos usando el método de Fitch y Margoliash del mismo programa, usando las matrices de distancia calculadas por el método de Kimura mediante el método Protdist del mismo programa.

CAPITULO IV

RESULTADOS

4.1 Obtención del DNA de mono verde.

Se obtuvo el DNA de células Cos 7 y se cuantificó, llevándolo a una concentración de 120 ng/ μ l. Como se puede apreciar en la figura 10, el DNA genómico fue de buena calidad.

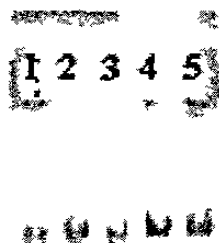


Figura 10.-Análisis del DNA genómico. El producto de la extracción de DNA de células Cos 7 se resolvió en un gel de agarosa al 0.8%.

4.2 Diseño de un iniciador 3'

Entre los iniciadores de la oligoteca de la ULIEG, para amplificar los genes de interés existían como 3': el 403, 139 y AGN; pero el 403 producía por sí mismo una banda, el 139 fue diseñado tomando como consenso las secuencias de artiodáctilos y rumiantes y no sobre las secuencias génicas de primates como los demás y el AGN fue exclusivamente diseñado para obtener PLs. Por otro lado, los iniciadores 5' eran muy específicos: uniéndose d11 y 5Ed2 al promotor proximal y distal, respectivamente. Por lo tanto, se procedió a diseñar un nuevo iniciador 3' que permitiera la obtención de nuevos genes. Para que este iniciador fuera más específico para los genes del mono verde, se decidió obtener secuencias adicionales del extremo 3' de la unidad transcripcional amplificando las regiones intergénicas.

En la figura 11 se muestra la estrategia utilizada, la cual se describe a continuación:

- A partir de DNA genómico se realizó una PCR larga usando los iniciadores IGPII e IGPIV para amplificar las regiones intergénicas.
- Mediante PCR normal y usando los iniciadores IGPIV y 403 se hizo una reamplificación del producto anterior obteniendo los exones IV y V.
- El producto obtenido se secuenció.
- La secuencia obtenida se comparó con las secuencias relacionadas a GH reportadas para primates para obtener un consenso que permitió el diseño de un nuevo iniciador 3': MV5.

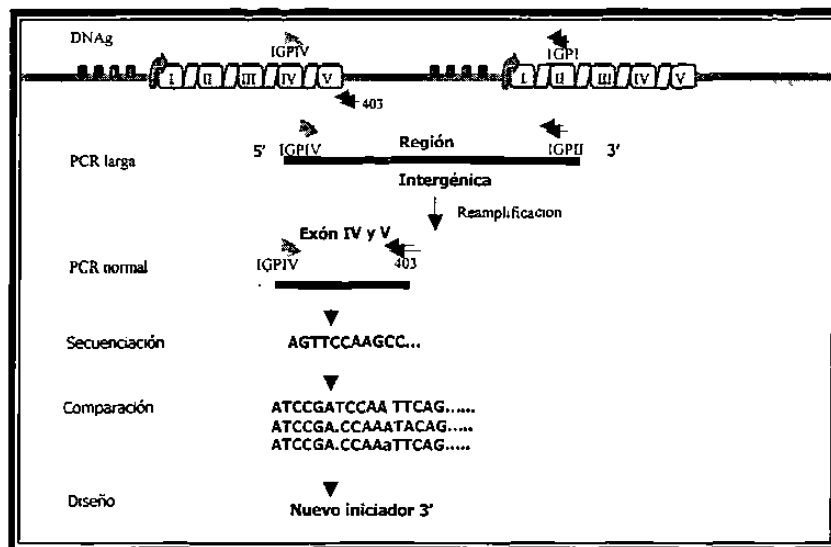
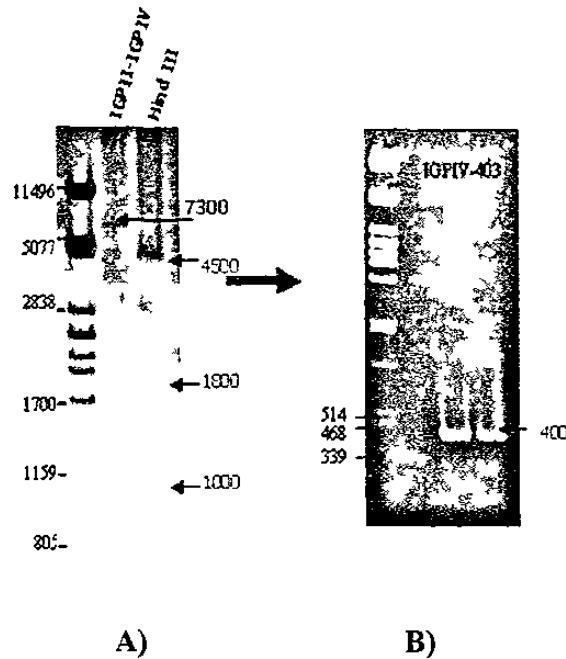


Figura 11.- Estrategia para diseñar un iniciador 3'. Se esquematiza el procedimiento para obtener un nuevo iniciador 3' que permitiera amplificar los genes relacionados a GH en el mono verde.

La amplificación con los iniciadores IGPII e IGPIV funcionó permitiendo obtener solo una región intergénica (Figura 12), como se evidenció al cortar con la enzima *Hind* III, ya que esta enzima permite distinguir entre las dos regiones intergénicas cortas obtenidas para el mono verde (Corrales, 2000). Además la suma del tamaño de los productos digeridos por dicha enzima es igual al tamaño del producto inicial (sugiriendo una región intergénica). Después al reamplificar con los iniciadores IGPIV-403, se obtuvo una banda de aproximadamente 400 pb la cual se secuenció. La secuencia permitió el diseño del iniciador MV5, el cual se une al final de la unidad transcripcional, justo sobre el codón de terminación.



Secuencia: Exón V
 acagcaagcgtctatgaactcctaaaggacctagaggaaggcatccaaacgctgatgcagGGCTGGAAGATGGCAGCCCCT
 GGACTGGGCAGATCTTCAAGCAGACCTACAGCAAGTTCGACACAAACTCACACAACGATGACGCCTACTCAAGAACTACG
 GGCTGCTCTACTGCTTCAGGAAGGACATGGACAAGTTCGAGACATTCCTGCGCATCGTGCACTGCCGCTCTGTGGAGGGCA
 GCTGTGGCTTCTA*gctgccccgggtggcatccctgtgacccctcccagtgccctctcctggaatccgg*
 3' CACCGAAGATTGACGGGTCCAC 5' :MV5

C)

Figura 12.- Diseño del iniciador 3'. A) Se muestra el producto amplificado con los iniciadores IGPII-IGPIV y el mismo digerido con *Hind* III en un gel de agarosa al 0.8%. B) Gel de agarosa al 0.8% cuyos carriles de izquierda a derecha son: marcador λ + *Pst* I, control negativo y dos productos amplificados obtenidos con IGPIV-403 a partir del producto de IGPII-IGPIV. C) Se muestra la secuencia obtenida indicando con letras minúsculas las regiones no codificantes, con mayúsculas la región codificante (exón V) y con itálicas el codón de terminación. El cuadro señala la posición donde se alinea el iniciador MV5.

4.3 Obtención de los genes de GH del mono verde.

Utilizando diferentes combinaciones de iniciadores, se realizaron varias reacciones de PCR. Una vez estandarizadas las condiciones, cinco combinaciones de iniciadores permitieron obtener los productos amplificados mostrados en la figura 13.

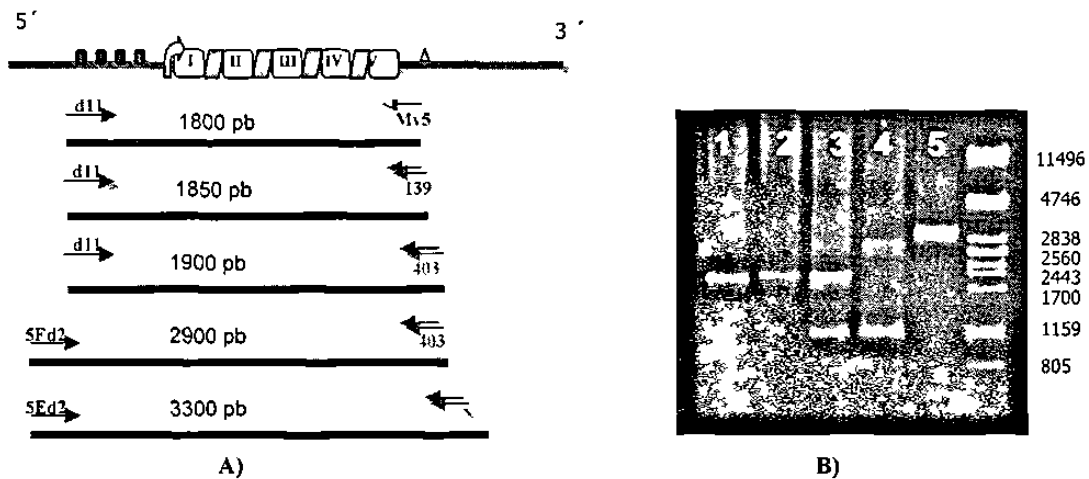


Figura 13.- Amplificación de los genes GH-PL del mono verde. A) Se esquematizan los sitios de alineamiento de los iniciadores, así como los productos amplificados derivados utilizando el gen GH-V del macaco como secuencia blanco. B) Los productos amplificados con las diferentes combinaciones de iniciadores, se analizaron en un gel de agarosa al 0.8% (1: d11-MV5, 2: d11-139, 3: d11-403, 4: 5Ed2-403, 5: 5Ed2-AGN). Con el iniciador 403 se obtiene una banda adicional de aproximadamente 1000 pb.

4.3.1 Caracterización enzimática

Los productos amplificados fueron caracterizados enzimáticamente con la finalidad de conocer el número probable de genes amplificados.

Se sabía que en el promotor proximal de la mayoría de los genes GHs reportados para primates se encuentra un sitio *Bam* HI, a excepción de un PL de macaco. Por lo tanto, se hizo una digestión de los productos amplificados con esta enzima y se encontró que efectivamente cortó todos los productos; pero se observó que el producto dll-139 estaba integrado por dos genes: uno que corta y otro que no corta (Figura 14). Además, se observó que los dos productos obtenidos con 5Ed2 incluyen un sitio de corte *Bam* HI dentro de la unidad transcripcional, pues de no ser así se esperaría para 5Ed2-403 una banda de aproximadamente 1500 pb y para el 5Ed2-AGN una banda un poco mayor, mismas bandas que no se obtuvieron (Figura 14).

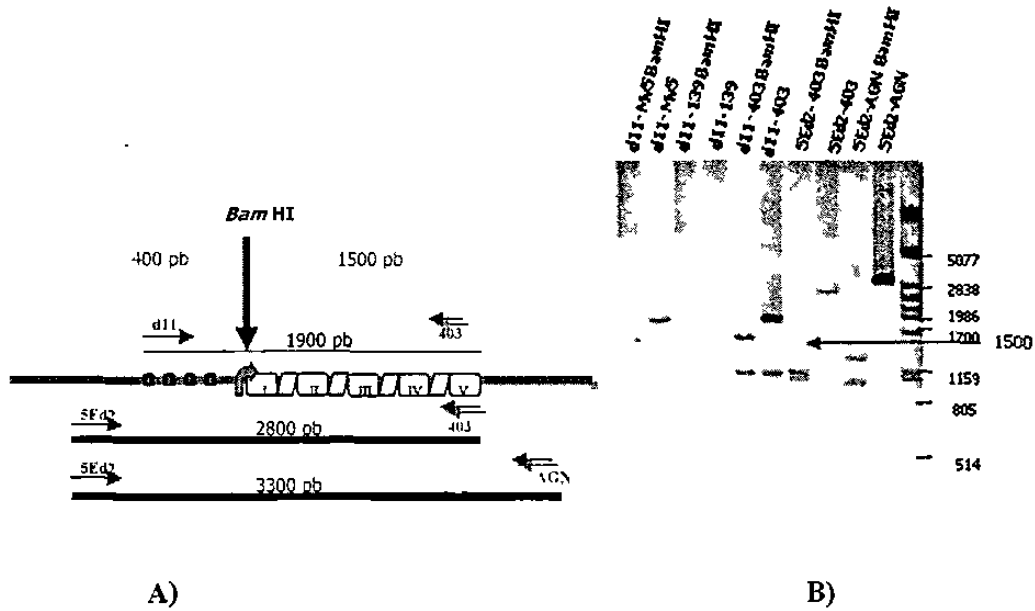
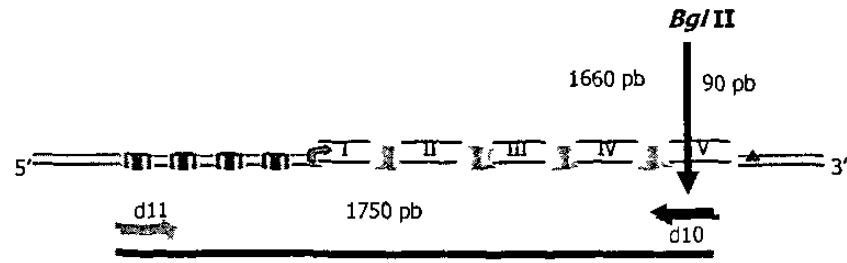
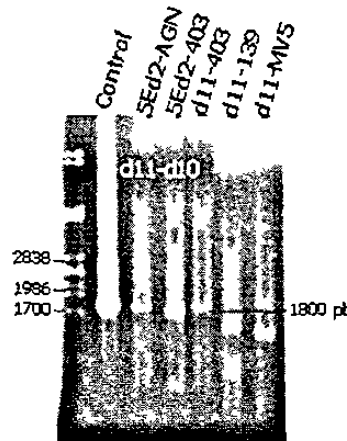


Figura 14.- Caracterización de los productos amplificados con *Bam* HI. A) Esquema representativo de un gen de GH, las flechas pequeñas muestran los iniciadores utilizados y las líneas representan el tamaño de los productos amplificados, mientras que la flecha gruesa muestra el sitio de corte *Bam* HI, y a sus lados se indica el tamaño de los dos productos generados por la digestión con esta enzima, si no hubiera sitio de corte en la unidad transcripcional amplificado con 5Ed2-403 se generaría la misma banda de 1500 pb y una banda un poco mayor en el caso de 5Ed2-AGN. **B)** Gel de agarosa al 0.8 % mostrando el producto de la digestión de los productos amplificados además del marcador $\lambda + Pst$ I (la flecha remarca la banda de 1500 pb esperada).

En los genes de la familia GH-PL reportados para primates hasta el momento, se ha observado que la enzima *Bgl* II solo corta los genes de GH y no los PLs, por lo tanto se caracterizaron los productos amplificados con esta enzima. Con la finalidad de hacer una caracterización más uniforme de los productos amplificados, éstos se reamplificaron con los iniciadores d11-d10 y se digirieron con la enzima *Bgl* II. Esta enzima solo cortó los productos d11-139 y d11-MV5 (Figura 15).



A)



B)

Figura 15.- Caracterización de los productos amplificados con *Bgl* II. A) Esquema representativo de un gen de GH, las flechas pequeñas muestran los iniciadores utilizados y las líneas representan el tamaño de los productos amplificados, la flecha gruesa muestra el sitio de corte *Bgl* II y a ambos lados los tamaños de los productos generados. B) Los productos se resolvieron en un gel de agarosa al 0.8%. Se uso como control el producto d11-d10 sin digerir y como marcador $\lambda + Pst$ I.

Con la finalidad de diferenciar entre sí los productos amplificados y al mismo tiempo tratar de relacionarlos con las regiones intergénicas previamente reportadas por Corrales (2000), se procedió a hacer una amplificación virtual usando los iniciadores d11-prim, de los promotores proximales de las regiones intergénicas de macaco y mono verde, para buscar enzimas diagnósticas que permitieran diferenciarlas.

La enzima *Eco* RV cortó solo el producto 5Ed2-403 y este patrón correspondió sólo a la región intergénica larga CaI-L2; mientras con la enzima *Hae* III se digirió sólo el producto 5Ed2-AGN y este mismo patrón se observó en la región intergénica larga CaI-L3. En la figura 16 se observa el resultado de la digestión.

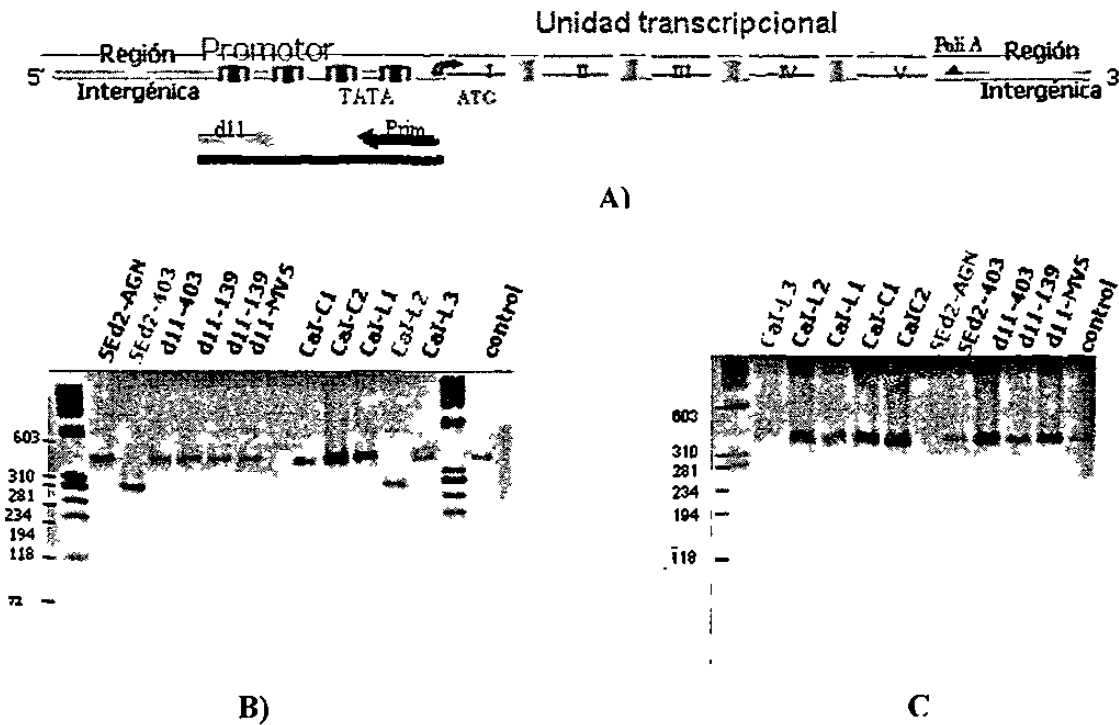


Figura 16.-Caracterización enzimática de los promotores de los productos amplificados. A) El esquema muestra una representación de la anatomía típica de un gen de GH, las flechas indican los sitios de apareamiento de los iniciadores utilizados para obtener el promotor proximal. Los productos amplificados de los promotores derivados de los genes amplificados y de las clonas obtenidas de las regiones intergénicas por Corrales, fueron caracterizados con *EcoRV* (B) y *HaeIII* (C) El control representa el producto amplificado sin digerir y los marcadores utilizados fueron Φ X174RF y $\lambda + PstI$, respectivamente.

Cinco productos amplificados se diferenciaron enzimáticamente (Tabla 6). Los productos d11-Mv5 y d11-139 con sitio de corte *Bam* HI, fueron diferenciados durante la secuenciación. La tabla 6 resume las principales características enzimáticas que permitieron diferenciar los productos amplificados.

Tabla 6.- Diferenciación enzimática de los productos amplificados.

	D11-Mv5	D11-139		D11-403	5Ed2-403	5Ed2-AGN
<i>Bam</i> HI en el promotor proximal	SI	SI	NO	SI	SI	SI
<i>Bam</i> HI en la unidad transcripcional	NO	NO	NO	NO	SI	SI
<i>Eco</i> RV en el promotor proximal	NO	NO	NO	NO	SI	NO
<i>Bgl</i> II en la unidad transcripcional	SI	SI	SI	NO	NO	NO

4.3.2 Clonación de los productos amplificados.

Los productos amplificados se clonaron usando el kit de topoisomerasa. De las clonas que crecieron se realizó la extracción del DNA plasmídico. La selección de las clonas se hizo al observar el retraso en la migración del DNA, al haber adquirido el inserto. Se observaron dos patrones de retraso en la migración del DNA, diferentes al del DNA plasmídico sin inserto, como se muestra en la figura 17.

Las clonas que mostraron retraso durante la electroforesis se caracterizaron más detalladamente y fueron secuenciadas.



Figura 17.- Selección de las clonas. Los DNAs plasmídicos extraídos de las clonas recombinantes se analizaron en un gel de agarosa al 0.8%. Los números del 1 al 18 indican diferentes extracciones de DNA plasmídico y la C el plásmido sin inserto.

Al digerir con la enzima *Eco* RI, se liberan los insertos de los vectores recombinantes. Esta caracterización permitió comprobar que se habían obtenido clonas recombinantes de todos los productos amplificados.

En la figura 18 se muestra a la izquierda los productos amplificados digeridos con *Eco* RI. Solo los productos que incluyen parte de la región intergénica (5Ed2-403, 5Ed2-AGN) fueron digeridos con esta enzima, los productos de tamaño similar (d11-MV5, d11-139, d11-403) fueron diferenciados según el retraso de la migración del inserto liberado.

Al menos dos clonas independientes de cada producto amplificado fueron secuenciadas. La secuencia nucleotídica se obtuvo alineando las secuencias parciales leídas con los diferentes iniciadores.

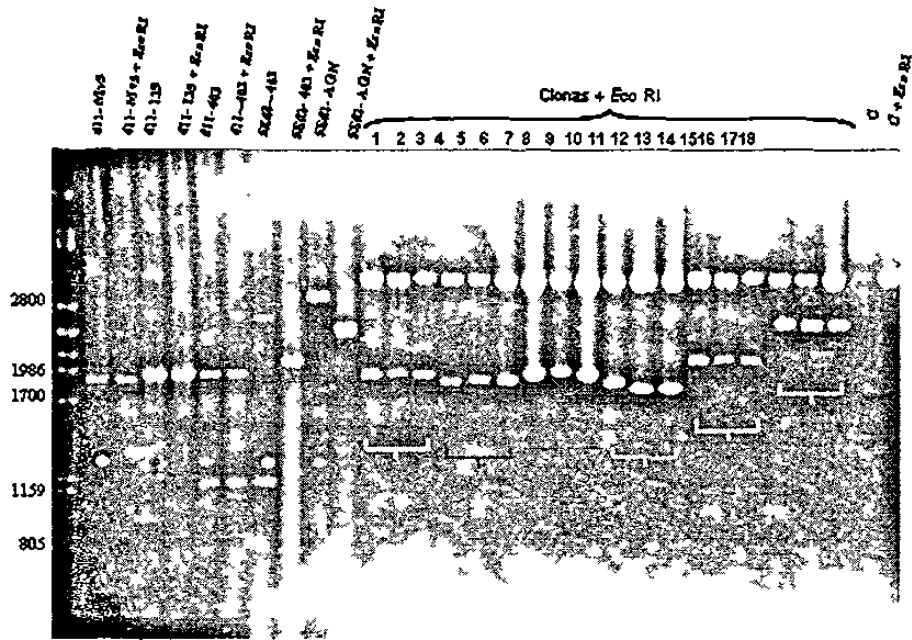


Figura 18.- Identificación de las clonas recombinantes. La digestión con la enzima *Eco* RI de los productos amplificados y de las clonas seleccionadas por su retraso en la migración del DNA, se analizó en un gel de agarosa al 0.8%. El marcador usado fue $\lambda + Pst$ I y como controles se uso un vector sin inserto digerido y sin digerir.

4.3 Análisis de las secuencias nucleotídicas.

Para realizar el alineamiento de las secuencias nucleotídicas de los genes obtenidos, éstas se cortaron en un mismo sitio tanto 5' como 3' (sitios donde se alinean los iniciadores d11 y d10 respectivamente) y se analizaron mediante el programa computacional CLUSTAL-W. Por ser estos genes miembros de una misma familia conservan una gran similitud entre sí y con los genes de GH y PL de primates. La tabla 7 muestra el porcentaje de similitud de los genes obtenidos en relación a hGH-N y hPL-3.

Tabla 7.- Porcentaje de similitud entre los genes GH y PL del mono verde y hGH-N y hPL-3.

Gen	% hGH-N	% PL-3
caGH-N	94	92
caPL-1	90	91
caPL-2	91	92
caPL-3	90	91
caPL-4	90	91
caPL-5	90	91

Se obtuvo solo uno que comparte mayor porcentaje de similitud con GHs por esto y otras características típicas que se mencionarán después se le nombró caGH-N; los cinco genes restantes presentaron solo 1% más similitud a PLs; de tal manera que por observar en sus secuencias características típicas de PLs se les llamó: caPL-1, caPL-2, caPL-3, caPL-4 y caPL-5; el nombre se relaciona con las iniciales de la especie, el tipo de gen al que se parecen y el orden en el que fueron obtenidos.

En la figura 19, se presenta el alineamiento de las secuencias nucleotídicas (GH-PL) de los genes del mono verde y de otros primates.

Durante el alineamiento, se evidenciaron mecanismos de convergencia (sustituciones que afectan específicamente los genes de una misma especie) además se observó que los sitios de “splicing” están conservados. Para los genes caPL 1, 2, 3, 4 y 5 se observa en el final del intrón II una inserción característica de PLs (Figura 19 A).

Específicamente en dos secuencias de PLs (caPL-3 y 4) ocurrió la inserción de un codón en la secuencia codificante (exón IV) (Figura 19 B).

Intrón II		Exón IV	
ca11	A----- --CCTTGGTGGGGGCTCCTTCTCCTAGGAAGAAG	Ca11	CAACAGCCTATTG - TATGGTGCTC
	A----- --TCCTGGTGGGTGGTCTTCTCCTAGGAAGAAG		CAACAACCTGGTG---TATGACACCTC
	AGACCAGCAGTACCTCTTGGTGGGGGCTCCTTCTCCTAGGAAGAAG		CAACAACCTGGTG---CATGACACCTC
	AGACCAGCAGTACCTCTTGGTGGGGGCTCCTTCTCCTAGGAAGAAG		CAACAACCTGGTG---TATGGCACCTC
	AAACCAGCGTACTTCTTGGTGGGGGCTCCTTCTCCTAGGAAGAAG		CAACAACCTGGTG---TATGGCACCTC
	AGACCAGCAGTACCTCTTGGTGGGGGCTCCTTCTCCTAGGAAGAAG		CAACAACCTGGTG---TATGGCACCTC
	AGACCAGCAGTACCTCTTGGTGGGGGCTCCTTCTCCTAGGAAGAAG		CAACAACCTGGTG---CATGACACCTC
mGH-V	A----- --CCTTGGTGGGTGGTCTTCTCCTAGGAAGAAG	mGHv	CAACAACCTGGTG---CATGACCACTC
maGHa	A --- --CCTTGGTGGGGGCTCCTTCTCCTAGGAAGAAG	maGHa	CAACAACCTATTG -TATGGCGTCTC
maGHb	A----- --CCTTGGTGGGTGGTCTTCTCCTAGGAAGAAG	maGHb	CAACAACCTGGTG---CATGACATCTC
hPL 3	AAACCAGCAGTACCTCTTGGTGGGGGCTCCTTCTCCTAGGAAGAAG	hPL-3	CAACAACCTGGTG---TATGACACCTC
cPLa	AAACCAGCAGTACCTCTTGGTGGGGGCTCCTTCTCCTAGGAAGAAG	hPL-2	CAACAACCTGGTG---TATGACACCTC
hEL 2	AAACCAGCAGTACCTCTTGGTGGGGGCTCCTTCTCCTAGGAAGAAG	cPLd	CAACAACCTGGTG---TATGACACCTC
FLd	AAACCAGCAGTACCTCTTGGTGGGGGCTCCTTCTCCTAGGAAGAAG	cPLb	CAACAACCTGGTG---TATGACACCTC
FLb	AAACCAGCAGTACCTCTTGGTGGGGGCTCCTTCTCCTAGGAAGAAG	hPL-1	CAACAACCTGGTG---TATGACACCTC
hPL 1	AAACCAGTGGTACCTCTTGGTGGGGGCTCCTTCTCCTAGGAAGAAG	cPLc	CAACAACCTGGTG---TATGACACCTC
hGH N	A - --- CCTTGGTGGGGGCTCCTTCTCCTAGGAAGAAG	hGH-N	CAACAACCTGGTG TACGGCGCTC
cGH-N	A----- --CCTTGGTGGGGGCTCCTTCTCCTAGGAAGAAG	cGH-N	CAACAACCTGGTG---TATGGCGCTC
cGH-V	A----- --CCTTGGTGGGGGCTCCTTCTCCTAGGAAGAAG	cGH-V	CAACAACCTGGTG---TATGGAGCTC
hGH-V	A----- --CCTTGGTGGGGGCTCCTTCTCCTAGGAAGAAG	hGH-V	CAACAACCTGGTG---TATGGCGCTC

A)

B)

Figura 19.- Alineamiento de las secuencias nucleotídicas de los genes relacionados a GH del mono verde contra las secuencias génicas reportadas para otros primates. A) Se resaltan los fenómenos de convergencia (A→G, C→A) y los sitios splicing (final del intrón, inicio del exón) conservados. B) Se observa la inserción del mismo codón en el exón IV de los genes caPL3 y 4.

Durante el análisis filogenético, las secuencias se asociaron por grupo. En la figura 20 podemos observar la asociación de los genes de GH reportados para los monos del nuevo mundo en una rama (mono araña y *Callithrix*), las secuencias de GH de grandes monos (chimpancé y humano) en otra, además se observa de este mismo grupo una ramificación que incluye a los PLs.

Los genes de los monos del viejo mundo (caGH-N, caPLs y mGH-N) se agruparon en una misma ramificación, compartiendo los genes relacionados a PL del mono verde mayor similitud entre sí y a la vez siendo más parecidos a GH-V de macaco que a caGH-N. Aunque todos los PLs se agrupan juntos compartiendo el mismo ancestro, evolucionaron de manera independiente en los monos del viejo mundo y los grandes monos, como lo muestra el agrupamiento de las secuencias.

El gen caGH-N quedó muy cercano al ancestro que también dió surgimiento a los PLs en chimpancé y humano.

En las secuencias génicas amplificadas del mono verde, no hubo un gen ortólogo para mGH-V.

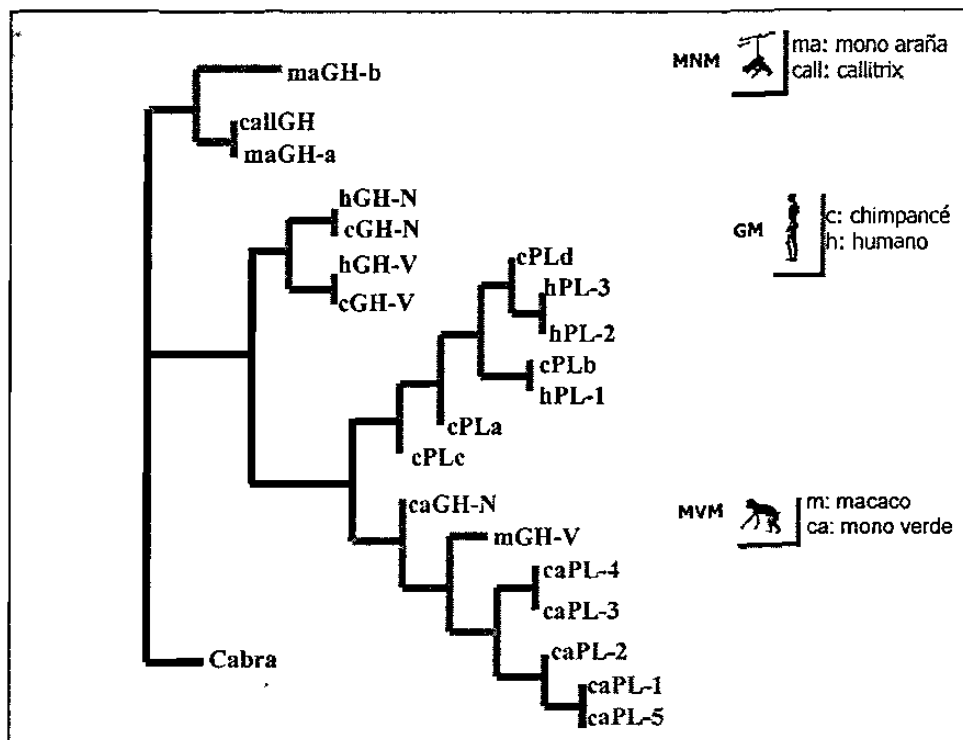


Figura 20.- Análisis filogenético de las secuencias nucleotídicas. Árbol filogenético de las secuencias de los genes GH-PL de mono verde y las secuencias reportadas para otros primates.

4.5 Análisis de las secuencias aminoacídicas

Una vez localizadas las secuencias codificantes (exones), se eliminaron las secuencias no codificantes (intrones) y la secuencia codificante restante se tradujo a aminoácidos mediante el programa computacional DNAMAN.

Se obtuvieron tres proteínas de 217 aminoácidos (incluyendo el péptido señal) y dos de 218 aminoácidos. En ninguna proteína se observaron características que indicaran la presencia de pseudogenes.

Al analizar el alineamiento de las secuencias aminoacídicas se pudo deducir una secuencia ancestral para GH y PL (Figura 21). La versión ancestral PL difiere por 14 sustituciones aminoacídicas de la de GH y está muy relacionada con CAGH-N (con solamente 9 sustituciones) y entre HGH-N y CAGH-N sólo hay cinco sustituciones aminoacídicas.

El exón 2 de CAPL-3 presenta mucha semejanza con HPL-3 (T₃, L₁₅, A₂₀) y podría ser la más parecida a la versión ancestral común de PL.

Cabe señalar la inserción de un residuo aminoacídico de valina (V) en dos de los PLs del mono verde (CAPL-3 y 4) en la posición 102 de la proteína madura. En las proteínas CAPL-3 y 4 ocurrió la sustitución de un aspartato (D₁₁₇) por una serina (S₁₆₄), en la proteína CAPL-3 se observa además la sustitución de una serina por una valina.

	80	70	60	50	40	30	20	10	E2	E1
AN	MAA	EQ Y	FLQNFQTSJ	F F	IP P	NPEFTQQ	KCN	ELL	L	L
MA H-N	MAA	EQ Y	FLQNFQTSJ	F F	IP P	NPEFTQQ	KCN	ELL	L	L
CAGH N	MAA	EQ Y	FLQNFQTSJ	F F	IP P	NPEFTQQ	KCN	ELL	L	L
H L N	MAA	EQ Y	FLQNFQTSJ	F F	IP P	NPEFTQQ	KCN	ELL	L	L
MP H-V	MAA	EQ Y	FLQNFQTSJ	F F	IP P	NPEFTQQ	KCN	ELL	L	L
Mjt	MAA	EQ Y	FLQNFQTSJ	F F	IP P	NPEFTQQ	KCN	ELL	L	L
H V	MAA	EQ Y	FLQNFQTSJ	F F	IP P	NPEFTQQ	KCN	ELL	L	L
H H-	MAA	EQ Y	FLQNFQTSJ	F F	IP P	NPEFTQQ	KCN	ELL	L	L
M I 1	MAA	EQ Y	FLQNFQTSJ	F F	IP P	NPEFTQQ	KCN	ELL	L	L
MEL	MAA	EQ Y	FLQNFQTSJ	F F	IP P	NPEFTQQ	KCN	ELL	L	L
M L-	MAA	EQ Y	FLQNFQTSJ	F F	IP P	NPEFTQQ	KCN	ELL	L	L
CAPL-5	MAA	EQ Y	FLQNFQTSJ	F F	IP P	NPEFTQQ	KCN	ELL	L	L
APL-1	MAA	EQ Y	FLQNFQTSJ	F F	IP P	NPEFTQQ	KCN	ELL	L	L
CAPL-2	MAA	EQ Y	FLQNFQTSJ	F F	IP P	NPEFTQQ	KCN	ELL	L	L
APL-4	MAA	EQ Y	FLQNFQTSJ	F F	IP P	NPEFTQQ	KCN	ELL	L	L
CAPL-3	MAA	EQ Y	FLQNFQTSJ	F F	IP P	NPEFTQQ	KCN	ELL	L	L
FA	MAA	EQ Y	FLQNFQTSJ	F F	IP P	NPEFTQQ	KCN	ELL	L	L
PL	MAA	EQ Y	FLQNFQTSJ	F F	IP P	NPEFTQQ	KCN	ELL	L	L
H -1	MAA	EQ Y	FLQNFQTSJ	F F	IP P	NPEFTQQ	KCN	ELL	L	L
H -3	MAA	EQ Y	FLQNFQTSJ	F F	IP P	NPEFTQQ	KCN	ELL	L	L
HP -	MAA	EQ Y	FLQNFQTSJ	F F	IP P	NPEFTQQ	KCN	ELL	L	L
N -1	MAA	EQ Y	FLQNFQTSJ	F F	IP P	NPEFTQQ	KCN	ELL	L	L
AN	SR	QIFAGTYSKFL	NSHN	DA	LKNYJL	YCFKDMDK	ETFLRIVZCP	EG	Γ	Γ
H	SR	QIFAGTYSKFL	NSHN	DA	LKNYJL	YCFKDMDK	ETFLRIVZCP	EG	Γ	Γ
MA -	SR	QIFAGTYSKFL	NSHN	DA	LKNYJL	YCFKDMDK	ETFLRIVZCP	EG	Γ	Γ
M -	SR	QIFAGTYSKFL	NSHN	DA	LKNYJL	YCFKDMDK	ETFLRIVZCP	EG	Γ	Γ
CAGH-N	SR	QIFAGTYSKFL	NSHN	DA	LKNYJL	YCFKDMDK	ETFLRIVZCP	EG	Γ	Γ
H	SR	QIFAGTYSKFL	NSHN	DA	LKNYJL	YCFKDMDK	ETFLRIVZCP	EG	Γ	Γ
MA L-V	SR	QIFAGTYSKFL	NSHN	DA	LKNYJL	YCFKDMDK	ETFLRIVZCP	EG	Γ	Γ
M H-V	SR	QIFAGTYSKFL	NSHN	DA	LKNYJL	YCFKDMDK	ETFLRIVZCP	EG	Γ	Γ
CH-V	SR	QIFAGTYSKFL	NSHN	DA	LKNYJL	YCFKDMDK	ETFLRIVZCP	EG	Γ	Γ
L	SR	QIFAGTYSKFL	NSHN	DA	LKNYJL	YCFKDMDK	ETFLRIVZCP	EG	Γ	Γ
MPL-	SR	QIFAGTYSKFL	NSHN	DA	LKNYJL	YCFKDMDK	ETFLRIVZCP	EG	Γ	Γ
M -	SR	QIFAGTYSKFL	NSHN	DA	LKNYJL	YCFKDMDK	ETFLRIVZCP	EG	Γ	Γ
M I-	SR	QIFAGTYSKFL	NSHN	DA	LKNYJL	YCFKDMDK	ETFLRIVZCP	EG	Γ	Γ
CAPL-5	SR	QIFAGTYSKFL	NSHN	DA	LKNYJL	YCFKDMDK	ETFLRIVZCP	EG	Γ	Γ
CAPL-1	SR	QIFAGTYSKFL	NSHN	DA	LKNYJL	YCFKDMDK	ETFLRIVZCP	EG	Γ	Γ
CAPL-2	SR	QIFAGTYSKFL	NSHN	DA	LKNYJL	YCFKDMDK	ETFLRIVZCP	EG	Γ	Γ
CAPL-4	SR	QIFAGTYSKFL	NSHN	DA	LKNYJL	YCFKDMDK	ETFLRIVZCP	EG	Γ	Γ
APL-3	SR	QIFAGTYSKFL	NSHN	DA	LKNYJL	YCFKDMDK	ETFLRIVZCP	EG	Γ	Γ
ELF	SR	QIFAGTYSKFL	NSHN	DA	LKNYJL	YCFKDMDK	ETFLRIVZCP	EG	Γ	Γ
B	SR	QIFAGTYSKFL	NSHN	DA	LKNYJL	YCFKDMDK	ETFLRIVZCP	EG	Γ	Γ
L	SR	QIFAGTYSKFL	NSHN	DA	LKNYJL	YCFKDMDK	ETFLRIVZCP	EG	Γ	Γ
H L-1	SR	QIFAGTYSKFL	NSHN	DA	LKNYJL	YCFKDMDK	ETFLRIVZCP	EG	Γ	Γ
H -3	SR	QIFAGTYSKFL	NSHN	DA	LKNYJL	YCFKDMDK	ETFLRIVZCP	EG	Γ	Γ
HP -	SR	QIFAGTYSKFL	NSHN	DA	LKNYJL	YCFKDMDK	ETFLRIVZCP	EG	Γ	Γ
N E-TR	SR	QIFAGTYSKFL	NSHN	DA	LKNYJL	YCFKDMDK	ETFLRIVZCP	EG	Γ	Γ

Figura 21.- Alineamiento de las secuencias aminoácidas de los genes GH-PL de primates. El cuadro gris indica el péptido señal, E1, E2, E3, E4, E5 limitan los exones, los números indican la posición. En amarillo se marcan los genes de mono verde, las letras rojas muestran los fenómenos de convergencias en monos del viejo mundo, las letras azules muestran las sustituciones específicas de PLs y las letras verdes muestran los cambios específicos para mono verde

El análisis filogenético de las secuencias aminoacídicas GH-PL de primates evidenció dos grupos distintos (Figura 22): las GHs y los PLs; además confirmó que CAGH-N corresponde a la hormona del crecimiento y que las GHs de los monos de viejo mundo: mono verde (CAGH-N) y macaco (MGH-N y MGH-V), están más relacionadas con la versión ancestral que dió también surgimiento a los PLs. Los cinco genes restantes se asocian a PL, siendo la proteína CAPL-3 la más parecida a dicho ancestro. Además, los PLs de MVM y GM surgieron por fenómenos de duplicación independientes.

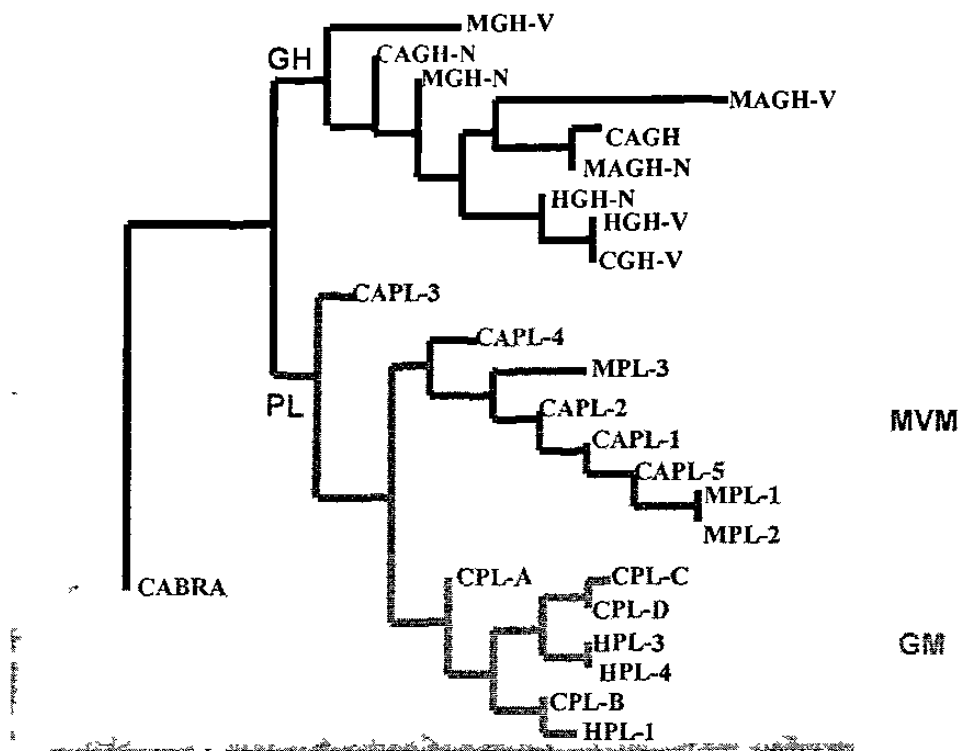


Figura 22.- Análisis filogenético de las secuencias aminoacídicas. Árbol filogenético de las secuencias de las proteínas GH-PL de mono verde y las proteínas reportadas para otros primates.

Se analizó la composición aminoacídica de los sitios funcionalmente importantes en relación de la hormona con su receptor (Liu y cols., 2001) para los siguientes primates: mono araña (MNM), macaco, mono verde (MVM) y humano, contra un prosimio (*Nycticebus*) y el cerdo, considerado virtualmente similar a la secuencia ancestral de GHs de mamíferos (Wallis, 1994). Se observaron 16 sustituciones aminoacídicas entre mono araña y la secuencia ancestral, el periodo de cambios se estabilizó durante la divergencia de las GHs de MVM y el humano, encontrando 15 sustituciones en relación a la secuencia ancestral y ningún cambio entre estas hormonas. Entre prosimios y el cerdo solo se observa un cambio aminoacídico (Tabla 8).

Tabla 8.- Divergencia de GH en sitios funcionalmente importantes.

Sitio	Cerdo	Nyct	Mono araña	Macaco	Mono verde	Humano	PLs
10 ^a	F	F	<i>L</i>	F	F	F	F
12 ^{a,13,126}	N	N	N	N	N	N	H/E
16 ⁴⁴	R	R	R	R	R	R	Q
18 ^{ab}	Q	Q	<i>H</i>	H	H	H	H
19 ¹⁶⁶	H	H	<i>R</i>	R	R	R	R
21 ^b	H	-	-	-	-	-	-
25 ^{ab}	A	A	<i>F</i>	F	F	F	I/F
29 ^a	K	K	<i>Q</i>	Q	Q	Q	E/Q
41 ^{127,a,c}	R	R	<i>K</i>	K	K	K	K
45 ^a	*	*	<i>L</i>	L	L	L	M/L
46 ^{120,c}	Q	Q	<i>Q</i>	Q	Q	Q	E/R/G/H
48 ^a	A	A	<i>P</i>	P	P	P	S/P
51 ^c	A	A	<i>S</i>	S	S	S	S
54 ^a	F	-	-	-	-	-	-
56 ^a	E	E	<i>E</i>	E	E	E	D/E
58 ^{ab}	I	-	-	-	-	-	-
61 ^{103,a,c}	P	P	<i>P</i>	P	P	P	S/P
62 ^{b,c}	T	T	<i>A</i>	S	S	S	S
63 ^b	G	G	<i>S</i>	N	N	N	N
64 ^a	K	K	<i>K</i>	R	R	R	L/M/R
65 ^a	D	D	<i>K</i>	E	E	E	E
68 ^a	Q	-	-	-	-	-	-
164 ^c	S	S	<i>Y</i>	Y	Y	Y	H/Y
167 ^{127,b,c}	K	R	<i>R</i>	R	R	R	R
168 ^{104,b,c}	K	-	-	-	-	-	-
171 ^{43,a,c}	H	D	<i>D</i>	D	D	D	N/D
172 ^{ab}	K	K	<i>K</i>	K	K	K	M/K
174 ^{ab}	E	-	-	-	-	-	-
175 ^{43,a,c}	T	-	-	-	-	-	-
176 ^{ab}	Y	Y	<i>F</i>	F	F	F	F
178 ^{163,a,c}	R	-	-	-	-	-	-
179 ^a	V	V	<i>I</i>	I	I	I	M
182 ^a	C	-	-	-	-	-	-
183 ^a	R	-	-	-	-	-	-
185 ^a	V	-	-	-	-	-	-

NOTA: Los aminoácidos cambiados en primates en comparación con la secuencia ancestral y el prosimio (*Nycticebus*) están en negritas, los cambios específicos de mono araña están en itálicas, los números pequeños indican el sitio de unión hormona- receptor, el * indica una delección mientras que - indica similitud a la secuencia ancestral (Liu, 2001).

^a Residuos importantes para la interacción GH-GHR (Cunningham y Wells 1989, 1993).

^b Residuos importantes para la interacción GH-PrIR (Cunningham y Wells, 1991).

^c Residuos de GH que se unen a PRLR humano (Somers, 1994).

Al realizar la predicción de la estructura tridimensional de las proteínas mediante el programa DNAMAN, se observó que la formación de la cuarta hélice podría verse alterada en la proteína CAPL-3, debido a las sustituciones aminoacídicas ocurridas en dicha proteína. En la figura 23 se representa la estructura tridimensional de una proteína típica relacionada a GH y el anexo 2 presenta la predicción virtual de la estructura tridimensional de CAPL-3 y HGH-N; mostrando en gris la formación de las cuatro hélices propuestas según los estudios de cristalografía realizados por De Vos (1992). Cabe recalcar que la exactitud de la predicción virtual fue solamente del 68.11% y esto podría influir en las diferencias observadas en la formación de las hélices.



Figura 23.- Estructura tridimensional de GH. Las proteínas relacionadas a GH presentan una estructura tridimensional formada de cuatro hélices α unidas por dos puentes disulfuro.

4.6 Análisis de los promotores proximales de los genes relacionados a GH

Durante el alineamiento de la región promotora proximal de los genes y las regiones intergénicas de mono verde, se identificaron los principales sitios de unión a factores transcripcionales (Figura 24).

Globalmente, las secuencias de los promotores no presentan cambios significativos en comparación con las previamente reportadas. Los elementos de unión a Pit-1 distales y proximales, no tuvieron cambios con la excepción de una sustitución de T→G presente en los promotores de los genes de GH de los monos del viejo mundo (macaco y mono verde).

En el elemento respuesta a AMPc (CRE), la mayoría de los promotores relacionados a GH del mono verde presentan la misma delección que el de la cabra o una sustitución de una T por una G (T→G).

El elemento TRE, de manera particular, presentó más cambios; para todos los genes de mono verde en las posiciones -48 y -50 hay A y C respectivamente, como se observa en las GH-V del humano y el chimpancé y los PLs. Además se notaron sustituciones (en todos los PLs) específicas para esta especie. La caja TATA y el elemento INrE no presentaron alteración.

	-120	-110	-100	-90	-80	-70	-60	-50	-40
hGH-N	TAAATTATCCAT	TAGCAC	AAGCCCTCAGTGGCCCC	..	ATGCATAAATGTATACAC	AGAAA,CA	GGTGGGGCAA,CA	GAGTGGGAGAGNAGG	
cabra	-----	-----	-T--T-C--G--	-----	-----	-----	-----	-----	-----
call	-----	-----	-G-A--T--	-----	-----	-----	-----	-----	-----
maGHA	-----	-----	-G-A--T--	C.	-----	-----	-----	-----	-----
maGHB	-----	-----	-G-A--T--	CG	T--G-C-G--T	-----	-----	-----	-----
hGH-V	-----	-----	-----	..	-G-C--CA-G-G	-----	-----	-----	-----
hPL3	C-----	-----	-----	..	-----	-----	-----	-----	-----
hPL1	C-----	-----	-----	..	-----	-----	-----	-----	-----
hPL2	-----	-----	-----	..	-----	-----	-----	-----	-----
MGHV	-----	-----	-G-TA-A--	C.	-----	-----	-----	-----	-----
H-N	-----	-----	-G-A--	C.	-----	-----	-----	-----	-----
a L 1	-----	-----	-G-A--	C.	-----	-----	-----	-----	-----
2	-----	-----	-G-A--	C.	-----	-----	-----	-----	-----
caPL 3	-----	-----	-G-A--	C.	-----	-----	-----	-----	-----
C 4	-----	-----	-G-A--	C.	-----	-----	-----	-----	-----
ca 5	-----	-----	-G-A--	C.	-----	-----	-----	-----	-----

	-30	-20	-10	-1
dPit1	NRE3	CRE	pPit1	pTRE
hGH-N	GGCCAGG, TATAAA	AAGGGCCAC	AAGAGCCAGCTC	AAGGATCCCAGGCCCAAC
cabra	-----	-----	-----	-----
call	-----	-----	-----	-----
maGHA	-----	-----	-----	-----
maGHB	-----	-----	-----	-----
hPL3	-----	-----	-----	-----
hPL1	-----	-----	-----	-----
hPL2	-----	-----	-----	-----
hGH-V	-----	-----	-----	-----
MGHV	-----	-----	-----	-----
GH	-----	-----	-----	-----
ca L 1	-----	-----	-----	-----
c PL 3	-----	-----	-----	-----
P 4	-----	-----	-----	-----
aP 5	-----	-----	-----	-----

TATA Box InrE

Figura 24.- Comparación de los promotores proximales. La secuencia consenso se indica en la primera línea, las letras verdes indican los genes del mono verde, las letras moradas los genes de expresión placentaria, los cuadros amarillos los elementos de unión a factores transcripcionales, las letras rosa fenómenos de convergencia, la letra roja sustitución única, los guiones sitios sin sustituciones aminoácidas y los puntos deleciones. La numeración está dada desde el sitio de inicio de la transcripción.

Al realizar el análisis filogenético de los promotores proximales de los genes encontrados y de las regiones intergénicas reportadas para el mono verde y macaco, usando como grupo fuera a la cabra (por ser ésta la especie ancestral reportada que tenía un promotor proximal más completo). caGH-N no se agrupó con promotor alguno y no se encontró un promotor del mono verde que correspondiera al promotor de GH-V reportado para macaco. Los demás promotores reportados para mono verde se asociaron a los promotores proximales reportados para las regiones intergénicas de macaco (Figura 25).

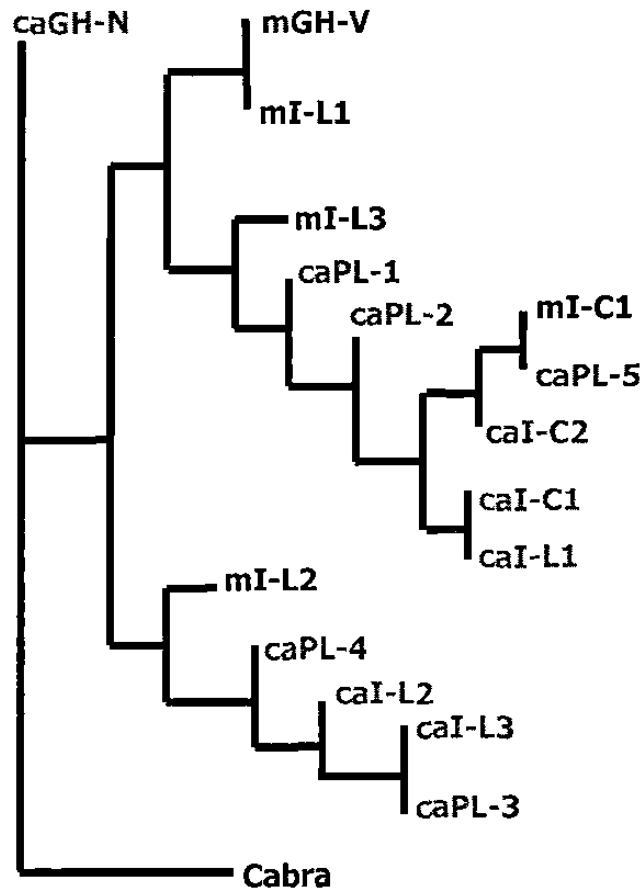


Figura 25.- Análisis filogenético de los promotores proximales. Árbol filogenético de las secuencias nucleotídicas de los promotores proximales de los genes y de las regiones intergénicas de mono verde (caI-C1, caI-C2, caI-L1, caI-L2, caI-L3) además de los promotores proximales de las regiones intergénicas de macaco (mI-C1, mI-C2, mI-L1, mI-L2, mI-L3) y el de GH-V de macaco (mGH-V).

CAPITULO V

DISCUSIÓN

En muchos mamíferos la GH es codificada por un sólo gen. Sin embargo, en los primates, varios eventos de duplicación del gen GH dieron lugar a un complejo multigénico. En el humano, dos GHs (hGH-N y hGH-V) y tres PLs (hPL-1, hPL-2 y hPL-3) integran el locus. Mientras que hGH-N se expresa en pituitaria, el resto lo hacen en la placenta (Chen y cols., 1989). En otros primates el locus GH ha sido también estudiado. Por ejemplo, en el chimpancé se determinó recientemente la organización parcial del locus que está integrado por dos GHs y cuatro PLs (Revol, enviado a publicación). Para el macaco, un mono del viejo mundo se logró únicamente obtener cinco DNAs: dos GHs y tres PLs y la secuencia completa de GH-V (Golos y cols., 1993). En dos monos del nuevo mundo se han reportado únicamente genes relacionados a GH: ocho para el *Callithrix* (Wallis, 2002), y seis para el mono araña (Revol, enviado a publicación).

Aunque Golos y cols (1993) describieron únicamente cinco genes relacionados a GH para el macaco, la intensidad de las bandas hibridadas en el análisis por Southern blot del DNA genómico podría sugerir más de cinco genes. Recientemente, en el Laboratorio de Biología Molecular de la ULIEG se reportó para los monos del viejo mundo (macaco y mono verde) cinco regiones intergénicas, sugiriendo así que el locus está integrado por al menos seis genes (Corrales, 2000)

Los monos del viejo mundo divergieron después de los del nuevo mundo y antes de los grandes monos, por lo tanto ocupan una posición estratégica para inferir acerca de los eventos evolutivos ocurridos durante la duplicación génica que permitió el surgimiento de los lactógenos placentarios.

5.1 Obtención de los genes del complejo GH-PL en el mono verde y comparación.

De las metodologías tradicionalmente utilizadas para obtener genes, destacan el tamizaje de bibliotecas y la amplificación génica por PCR, durante este trabajo se eligió la segunda alternativa. Se utilizaron iniciadores ya disponibles en el laboratorio los cuales se habían sintetizado en base a la secuencia del complejo GH-PL humano y se diseñó un nuevo iniciador 3' en base a las secuencias de los monos del viejo mundo.

Seis genes del complejo GH-PL fueron obtenidos mediante PCR en el mono verde. Dos de ellos se amplificaron con un iniciador 5' que se alinea en la región intergénica a 1500 pb del inicio de la transcripción y los cuatro restantes con otro que se une al inicio del promotor proximal. Los iniciadores 3' usados se unían al final del exón 5, obteniendo así tanto el promotor proximal como la unidad transcripcional en su totalidad.

Aunque la caracterización enzimática permitió diferenciar al menos cinco genes, seis secuencias fueron definidas durante la secuenciación.

El análisis de las secuencias nucleotídicas completas (exones e intrones) reveló que los sitios de "*splicing*" están conservados en todos los genes, lo que permitió asumir el procesamiento correcto de los RNAs.

Aunque los genes del complejo GH-PL por ser miembros de una familia guardan gran similitud entre sí, el análisis de las secuencias nucleotídicas indicó que el gen caGH-N es de tipo GH presentando un 94% de similitud con hGH-N. El análisis de la secuencia aminoacídica de este mismo, corroboró que es el más conservado y podría ser considerado ortólogo a hGH-N. Únicamente cinco sustituciones aminoacídicas se encontraron entre las dos secuencias, mientras que al comparar con maGH-N hubo 19 cambios.

Los cinco genes restantes se consideraron PLs por encontrar en sus secuencias nucleotídicas y aminoacídicas características típicas de PL. Estos genes guardan mayor similitud entre sí que a los demás genes reportados para los grandes monos; esto debido a los múltiples fenómenos de convergencia génica observados.

5.2 Análisis filogenético de las secuencias GH-PL.

El análisis filogenético de las secuencias aminoacídicas de los genes relacionados a GH de primates evidenció dos grupos distintos: las GHs y los PLs (Figura 22). Además, el mismo análisis filogenético sobre las secuencias nucleotídicas evidenció dos ramas distintas: una correspondiendo a las GHs de los monos del nuevo mundo y la otra a los monos del viejo mundo y los grandes monos. Este mismo grupo se ramifica a su vez en dos: uno que agrupa las GHs de los grandes monos y otra los PLs.

Aunque todos los PLs compartieron el mismo ancestro, evolucionaron de manera independiente en los monos del viejo mundo y en grandes monos (chimpancé y humano).

Estos resultados se confirmaron al analizar el alineamiento de las secuencias aminoacídicas, del cual se pudieron deducir las secuencias ancestrales para GH y PL (Figura 21). La versión ancestral PL difiere por 14 sustituciones aminoacídicas de la de GH y está muy relacionada con CAGH-N (con solamente 9 sustituciones). Se observaron también los mecanismos de convergencia que hacen que las secuencias de un mismo grupo se parezcan más entre sí.

Cabe señalar la inserción de un aminoácido (valina) en dos de los PLs del mono verde (CAPL-3 y 4), lo cual no afecta aparentemente la estructura de la proteína. Aunque la adición por sí sola no parece alterar la estructura de las proteínas, la sumatoria de los cambios ocurridos en la proteína CAPL-3 alteran virtualmente la estructura tridimensional de la proteína, desestabilizando la formación de la cuarta hélice, lo que podría dar como resultado una proteína madura con una estructura diferente.

Del análisis realizado a las secuencias aminoacídicas de los genes obtenidos se puede predecir que mantienen los dos puentes disulfuro en la misma posición (aa 53 y 182) que las GHs y PLs del humano y macaco.

Al comparar los sitios funcionalmente importantes en relación de la hormona y su receptor para los diferentes primates: mono araña, macaco, mono verde y humano, usando como grupo fuera al cerdo y un prosimio (*Nycticebus*), nuestros datos soportan la hipótesis de que la especificidad de especie del GHR humano surgió en un ancestro de los primates del viejo mundo y la fase transitoria persiste aún en los monos del nuevo

mundo (Liu y cols., 2001), pues no observamos cambios en los sitios funcionalmente importantes para los monos del viejo mundo y el humano.

De los treinta y cinco sitios funcionalmente importantes analizados, en los PLs se observan once cambios aminoacídicos, de los cuales siete fueron sustituidos por aminoácidos de características similares (ejemplo: hidrofóbico por hidrofóbico). Podemos asumir al menos once sitios determinantes en la unión al receptor, los cuales se conservan tanto en GH como en PL de primates. Esto podría apoyar lo propuesto por Vashdi y cols. (1992), acerca de que los PLs pueden interactuar con receptores lactogénicos o somatogénicos y la unión hormona-receptor podría darse por un mecanismo diferente incluyendo un set de diferentes aminoácidos. Únicamente ensayos de unión de estas proteínas a sus respectivos receptores podrían corroborar esta hipótesis.

5.3 Análisis de los promotores proximales.

Las secuencias de los promotores proximales se encontraron fuertemente conservadas en todos los casos. El gen caGH-N mostró características típicas de GHs y los genes CAPL-1, 2, 3, 4, 5 presentaron características relacionadas a los genes de expresión placentaria (GH-V y PLs).

El análisis filogenético de los promotores de las regiones intergénicas y los genes reportados para mono verde y las regiones intergénicas de macaco, sugiere que el gen caGH-N es el primero del locus por no encontrar asociación con ninguna región intergénica de macaco ni de mono verde del gen previamente reportado (igual que en los locus de humano y *Callithrix*). Tampoco se encontró asociación de la mGH-V con los genes o las regiones intergénicas de mono verde. Esto podría sugerir que en el locus GH-PL del mono verde no hay un gen GH-V ortólogo, pero la presencia de más genes GH-like no puede ser excluida, pues algunas sustituciones nucleotídicas en el sitio de apareamiento de los iniciadores podrían impedir su amplificación por PCR, por lo tanto por ahora solo podemos afirmar que el locus GH-PL en el mono verde está integrado por al menos seis genes.

Los promotores proximales reportados para las regiones intergénicas de macaco y mono verde son muy semejantes a los descritos en este trabajo. Sin embargo, no fue

posible establecer una relación absoluta entre los promotores proximales de los genes y las regiones intergénicas ya que estos últimos fueron secuenciados de manera preliminar (1 clona de cada uno), pero aún así, con los resultados obtenidos se propone la siguiente organización parcial del locus (Figura 26):

El gen caGH-N es el primero del locus.

Al gen caPL-3 le antecede la región intergénica caI-L3

Al gen caPL-4 le antecede la región intergénica caI-L2

Al gen caPL-5 le antecede la región intergénica caI-C2

La relación entre los genes caPL-1 y caPL-2 con las regiones intergénicas caI-C1 y caI-L1 no se logró establecer.

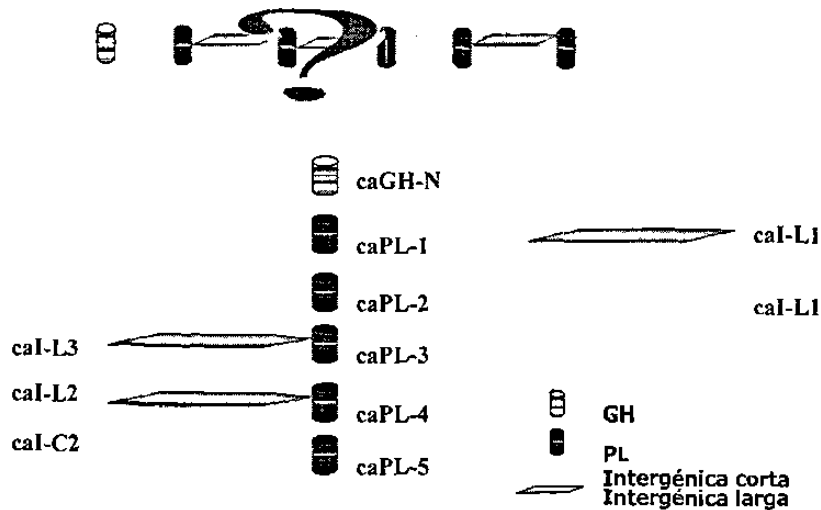


Figura 26.- Organización parcial del locus GH-PL del mono verde. Aunque se desconoce la organización total del locus, se propone que caGH-N es el primer gen del locus, a los genes caPL-1, 3 y 4 les anteceden una región intergénica larga y a los genes caPL-2 y 5 una región intergénica corta, aún que la relación gen-intergénica de caPL-1 y 2 aún no es clara.

Los resultados obtenidos durante este trabajo concuerdan con lo propuesto por Revol y cols (2001) acerca de que la duplicación génica del complejo GH-PL ocurrió de manera independiente en los linajes de primates: los monos del nuevo mundo, monos del viejo mundo y grandes monos. Por otra parte, la gran similitud entre las GHs de macaco, mono verde y humano sugiere que entre estas especies la duplicación génica que dio origen a los lactógenos placentarios fue compartida y este fenómeno ocurrió a partir de un ancestro parecido a las GHs de los monos del viejo mundo.

Las razones para la rápida y aparentemente independiente expansión del complejo multigénico aún no son claras. Se propone que cuando la GH adquirió una nueva función (que incluyó las acciones metabólicas de la GH o interacciones con receptores lactogénicos) las fluctuaciones en la importancia de esta nueva función favorecieron las sustituciones aminoacídicas en la proteína. La presión de los cambios pudo ser relevada si durante la duplicación génica hubo cambios adicionales que pudieron favorecer la segunda función.

CAPITULO VI

CONCLUSIONES

- Se obtuvieron seis genes relacionados a la familia de la hormona del crecimiento en el mono verde. El análisis de las secuencias predijo que todos son funcionales, correspondiendo uno a GH y cinco a PLs.
- La proteína CAGH-N está muy conservada, presentando 5 sustituciones aminoacídicas en relación a HGH-N, ninguna de las cuales afecta la unión de la hormona a su receptor.
- En su forma madura cuatro proteínas están constituidas de 191 aa y dos de 192 aa.
- El análisis de las secuencias corroboró que los PLs de los monos del viejo mundo y los grandes monos provinieron de un ancestro común, semejante en su secuencia a caGH-N.
- Aunque para el macaco se ha reportado un gen GH-V, en este trabajo no se logró amplificar el gen ortólogo.
- Los miembros del locus GH-PL en una misma especie de primates, no presentan una evolución independiente debido a mecanismos de convergencia específicos.

Corrales-Felix G L; 2000. Evolución de las regiones intergénicas del locus GH-PL en los primates del viejo mundo. Tesis de Maestría. Facultad de Medicina UANL.

Cunningham B C, Fuh G, Lowman H B, Bass S H, Mulkerrin M G, Ultsch M, DeVos A M; 1993. The molecular basis for growth hormone-receptor interactions Review Recent Prog Horm Res. 48:253-75.

Cunningham B L and Wells J A; 1989. Resolution etiope mapping of hGH- receptor interactions by alanine- scanning mutagenesis. Science 244:1081-1085.

Dana S, Karin M; 1989. Induction of growth hormone promoter activity by the adenosine 3', 5'-monophosphate pathway involves a novel responsive element. Mol Endocrinol. 3(5):815-821.

Daughady W H, 1981. Growth hormones and somatomedins, In Daughady, W:H (ED). Endocrin Control of growth. Elsevier, New York 1-24.

De Noto F M, Moore D D, Goodman H M; 1981. Human growth hormone DNA sequences and mRNA structure: possible alternative splicing. Nucleic Acids Res. 9:3719-3730.

De Vos AM, Ultsch M, Kossiakoff A A; 1992. Human growth hormone and extracellular domain of its receptor: crystal structure of the complex. Science. 17; 255(5042):306-12.

Dobner P R, Kawasaki E S, Yu LY, Bancroft; 1981. Thyroid of glucocorticoid hormone induces precursor in rat pituitary cells. Proc Natl Acad. Sci USA; 78,41:2230-2234.

Duquesnoy P, Sobrier M L, Duriez B, Dastot F, Buchanan C R, Savage M O, Preece M A, Craescu C T, Blouquit Y, Goossens M; 1994. A single amino acid substitution in the exoplasmic domain of the human growth hormone (GH) receptor confers familial GH resistance (Laron syndrome) with positive GH-binding activity by abolishing receptor homodimerization. EMBO J. 13(6):1386-95.

Edwards III CK, Hasuddin G, Schepper J M, Yunger L M and Kelly K W; 1988. A new defined property of somatotropin: priming of macrophages for production of superoxide anion. Science, 239: 769-771.

Esquivel Escobedo D C; 1999. Organización del locus del complejo GH-PL en el mono araña (*Ateles geoffroyi*). Tesis de Maestría. Facultad de Medicina, UANL.

Frankenne F, Closset J, Gomez F, Scippo M L, Smal J, Hennen G; 1988. The physiology of growth hormones (GHs) in pregnant women and partial characterization of the placental GH variant. J Clin Endoc and Metab 66:1171-80.

Fuh G, Cunningham B C, Fukunaga R, Nagata S, Goeddel D V, Wells J A; 1992. Rational design of potent antagonists to the human growth hormone receptor. Science. 19;256(5064):1677-80

Gilbert W, De Souza S and Long M, 1997; Long Origin of genes. Proc. Nat. Acad. Sci USA 7698-7703

Golos T G, Durning M, Fisher J M, Fowler P D; 1993. Cloning of four growth hormone chorionic somatomammotropin related complementary deoxyribonucleic acids differentially expressed during pregnancy in the Rhesus monkey, placenta. *Endocrinology*. 133; 1744-1751.

Gumucio D L, Wiebauer K, Caldwell R M, Samuelson L C, Meisler M H; 1988. Concerted evolution of human amylase genes. *Mol Cell Biol*. 8(3):1197-205.

Hill D J, Riley S C, Bassett N S, Watwrs M J; 1992. Localization of the growth hormone receptor, identified by immunocytochemistry, in second trimester human fetal tissues and in placental throughout gestation. *J.Clin. Endocrinol Matab*. 75:646-650

Hirt H, Kimmelm J, Birnbaum M J, Chen E Y, Seeburg P H, Eberhardt N L, Barta A; 1987. The human growth hormone locus: Structure evolution and allelic variation. *DNA* 6:59-70

<http://www.adi.uam.es/~burmann/primatologia/primatutor/taxonomi.htm>.

Hughes S M, Huang Z H, Morris I D, Matson P L, Buck P, Lieberman B A; 1994. A double-blind cross-over controlled study to evaluate the effect of human biosynthetic growth hormone on ovarian stimulation in previous poor responders to in-vitro fertilization. *Hum Reprod*. 9(1):13-8.

Hughes; 1996. Gene duplication and recombination in the evolution of mammalian Fc receptors. *J Mol Evol*;43(1):4-10.

Jiang S W, Sephard A R, Eberhardt; 1995. An initiator element is required for maximal human chorionic somatomammotropin gene promoter and enhancer function. *J. Biol Chem*. 270:3683-3692.

Krawczak M, Chuzhanova N A and Cooper D N; 1999. Evolution of the proximal promoter region of the mammalian growth hormone gene. *Gene* 237:143-151.

Kumar S, Hedges B; 1998. A molecular timescale for vertebrate evolution. *Nature* 329, 917-920.

Lefevre C, Imagawa M, Dana S, Grindlay J, Boder M Karin M; 1987. Tissue specific expression of the human growth hormone gene is conferred in part by the binding of a specific trans-acting factor. *EMBO J*; 7:971-981.

Leung D W, Spencer S A, Cachianes G, Hammonds R G, Collins C, Henzel W J, Barnard R, Waters M J, Wood W I; 1987. Growth hormone receptor and serum binding protein: purification, cloning and expression. *Nature*. 10-16;330(6148):537-43.

Lewins B, 2001. *Genes VII*, Oxford University Press and Cell Press. Oxford OX26PD. 59-61.

Li C H Evans H M, Simpson, M E; 1945. Isolation of properties of the anterior hypophisal growth hormone. *J.Biol Chem* 1959:353-366

Li C H; 1972. Recent knowledge of the chemistry of lactogenic hormones In: Wolstenholme GEW, knight J (eds) *lactogenic Hormones*. Churchill Livingston Edinburg p 22.

Lipkin S M, Naar A M, Kall K A, Sack R A, Rosenfeld M G, 1993. Identification of a novel zinc finger protein binding a conserved element critical for Pit-1 dependent growth hormone gene expression. *J. Pediatr Endocrinol* (3-4):225-228.

- Liu J C, Makova K D, Adkins R M, Gibson S and Li W H; 2001. Episodic Evolution of growth hormone in primates and emergence of the specific specificity of human growth receptor. *Molecular biology and evolution* 18(6):945-953.
- MacLeod J N, Worley I, Ray J, Friesen H G, Liebhaber S A, Coke N E; 1991. Human growth hormone-variant is biologically active somatogen and lactogen. *Endocrinology*. 128:1298-1302.
- Martinez Soriano J P, Cab Barrera EL, Tamez Gonzalez R, Leal Klevezas D S; 1993. Detección de *Brucella abortus* por medio de la reacción en cadena de la polimerasa. *Bioquímica*, 18:10-16
- Mathews C K; 1998. *Bioquímica*. Oregon State University 2a Ed. 257-260.
- Matsuda F T, Honjo; 1996. Organization of the human immunoglobulin heavy-chain locus. Review, *Adv Immunol.*;62:1-29.
- Miller W L, Eberhardt N L; 1983. Structure and evolution of the growth hormone gene family. *Endocr Rev*; 4(2):97-130.
- Nachtigal M W, Nickel B E, Cattini P A; 1992. Pituitary specific repression of placental members of the growth hormone gene family. *J.Biol. Chem*; 18:8473-8449.
- Nachtigal M W, Nickel B E, Klasen M E, Zhang W G, Eberhardt N C, Cattini P A; 1989. Human chorionic somatomammotropin and growth hormone gene expression in rat pituitary tumor cells is dependent on proximal promoter sequences. *Nucleic acids Res* 17:11, 4327-4337.
- Nickel B E, Karadami E, Cattini P A; 1990. The human placental growth hormone variants is mitogenic for cat lymphoma Nb2 cells. *Endoc* 126:971-976.
- Nicoll C S, Mayer G L, Russell S M; 1986. Structural features of prolactins and growth hormones that can be related to their biological properties. *Endocr Rev*. 7(2):169-203.
- Ohno R, Harris J E, Hersh E M; 1970. L-asparaginase: Suppression of the immune response of mice to sheep red blood cells. *Clin Exp Immunol*. 7(2):221-7.
- Otha T, 1991. Multigenic families and evolution of complexity *J.Mol. Evol.* 33:34-41.
- Otha T; 1993. Pattern of nucleotide substitutions in growth hormone prolactin family: a paradigm for evolution by gene duplication. *Genetics* 134:1271-1276.
- Oury C, Alsat E, Jacquemin P, Evain-Brion D, Martial J A, Muller M; 1997. A One-nucleotide difference in a cAMP and phorbol ester response element leads to a differential regulation of the human chorionic somatomammotropin A and B gene transcription. *J. Mol. Endocrinol*; 18:87-89
- Owerbach D, Rutter W, Martial J, Baxter J D; 1980. Genes for growth hormone chorionic somatomammotropin and growth hormone like genes on chromosome 17 in humans. *Science* 209:289
- Palmetshofer A, Zechner D, Luger T A, Barta A; 1995. Splicing variants of the human growth hormone RNA: detection in pituitary, mononuclear cells and dermal fibroblasts. *Mol Cell. Endocrinol*. 213(2):225-234.

Park K Y, and Roe J H; 1996. Identification of a negative regulatory site in the upstream region of bovine growth hormone gene. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 219:354-358

Patthy L, Nikolics K, 1994. Agrin-like proteins of the neuromuscular junction. Review. *Neurochem Int*. 24(4):301-16.

Philips L S, vassilopoulou-Sallin R ; 1988. Somatomedins, *N. Englan. J. Med*; 302: 438-446.

Resendez Perez D, Ramirez Solis T, Varela Echavarría A, Martinez Rodríguez H and Barrera Saldaña H A; 1990. Coding potencial of transfeted human placental lactogen genes. *Nucl. Acids Res*. 18:4665-4670

Revol de Mendoza A, Esquivel Escobedo A, Santiago Alarcón D and Barrera Saldaña H A; 2001. Independent duplication of the growth hormone gene in three antropoidean lineages. *The journal of Endocrine Genetics*. 2, 151-159.

Ruddle F H, Bartels J L, Bentley K L, Kappen C, Murtha M T, Pendleton J W; 1994. Evolution of Hox genes. *Annu Rev Genet*. 28:423-42.

Sambrook J. Maniatis T, Fritch E F; 1989. *Molecular cloning. A laboratory manual*, 2a Ed. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold spring Harbor N.Y.

Sanger F, Nicklen S, Coulson A R; 1977. DNA sequencing with chain-terminating inhibitor. *Biotechnology*. 1992(2):104-8.

Schawärzler P. Untergasser G; Hermann M, Dirrhofer S, A bendstein B, Madersbacher S, Berger P; 1997. Selective growth hormone placental lactogen transcription and hormone production in pre and post menopausal human ovaries. *J. Clin Enocrinol Metab*, 82(10):3337-41

Seeburg P H; 1982. The human growth hormone gene family: nucleotide sequences show recent divergence and predict a new polypeptide hormone. *DNA*. 1(3):239-49.

Singer M. Berg P; 1991. *Genes and genomes. A Changing perspective*. University Science Book. USA.

Slater E P, Rabenau O, Karin M, Baxter J D and Beato M; 1985. Glucocorticoid receptor binding and activation of a heterologous promoter by dexamethasone by the first intron of the human growth hormone gene. *Mol Biol and Evol* 4:406-425

Somers W, Ultsch M, De Vos A M, Kossiakoff A A; 1994. The X-ray structure of a growth hormone-prolactin receptor complex. *Nature*. 372(6505):478-81.

Stephanou A S, Handwerger S; 1995. Retinoic acid and tyroid hormone regulate placental lactogen expression in human trophoblast cells. *Endoc* 136:933-938

Theill L E and Karin M; 1993. Transcriptional control of GH expression and anterior pituitary development. *Endoc Rev* 14:670-689.

Tyson J E; 1982. The evolutionary role of prolactin in mammalian osmoregulation: effects on fetoplacental hydromineral transport. *Semin Perinatol*. 6(3):216-28.

Untregasser G, Hermann M, Rumpold H, Berger P; 1998. Complex alternative splicing of the GH-V gene in the human testis. *Eur. J. Endocrinol.* 139(4): 424-427.

Valinski A, Shani M; 1990. Restriction fragment length polymorphism in sheep at the growth hormone locus is the result of variation in gene number. *Animal Biotechnology* 1:135-144

Van Holde K E, Sahasrabudhe C G, Shaw B R; 1974. A model for particulate structure in chromatin. *Nucleic. Acids Res.* 1(11):1579-86.

Van Holde K, Zlatanova J; 1996. What determines the folding of the chromatin fiber?. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 93(20):10548-55.

Vandenbroucke I, Callens T, De Paepe A and Massian L, 2002; Complex splicing pattern generates great diversity in human NF1 transcripts *BML. Genomics*, 3(13):1-10

Vashdi D, Elberg G, Sakal E, Gertler A; 1992. Biological activity of bovine placental lactogen in 3T3-F442A preadipocytes is mediated through a somatogenic receptor. *FEBS Lett.* 29;305(2):101-4.

Wagner A, 1998. The fate of duplicated genes: loss or new function?. *Bioessays.* 20(10):785-8.

Wallis M, Cadman H F; 1981. Receptors for somatotropin (growth hormone) and prolactin. *Biochem Soc Trans.* 9(1):33-5.

Wallis M, Lioupis A, Wallis O C; 1998. Duplicate growth hormone genes in sheep and goat. *Journal of molecular endocrinology* 21:1-15

Wallis M; 1981. The molecular evolution of pituitary growth hormone prolactin and lactogen placental: A protein family showing variable rates of evolution. *J. Mol Evol;* 17:10-18.

Wallis M; 1994. Variable evolutionary rates in the molecular evolution of mammalian growth hormones. *J. Mol. Evol.* 38:619-627.

Wallis M; 1996. The molecular evolution of vertebrate growth hormones: A pattern of near-stasis interrupted by sustained burst of rapid change. *J.Mol. Evol* 43:93-100.

Wallis M; 2000. Episodic evolution of protein hormones in mammals. *J Mol Evol.* 53:10-18

Wallis O C, Wallis M; 1989. Production of plasmids giving high expression of recombinant DNA-derived ovine growth hormone variants in *Escherichia coli*. *FEBS Lett.* 3;250(2):371-6.

Wallis O C; 2002. Characterisation of the GH gene cluster in a new-world monkey, the marmoset (*Callithrix jacchus*). *J Mol Endocrinol.* 29(1):89-97.

Wallis O C, Zangh Y P, Wallis M; 2001. Molecular evolution of GH in primates: Characterization of GH genes from slow loris and marmoset defines an episode of rapid evolutionary change. *Journal of molecular Endocrinology* 26:249-258.

Walter W H, Fitzpatrick S L, Barrera Saldaña H A, Resendez Perez D, Saunders G F; 1991. The human placental lactogen genes: structure, function, evolution and transcriptional regulation. *Endocrine Reviews*, 12:316-328.

Zelus D, Robinson-Rechavi M, Delacre M, Auriault C, Laudet V; 2000. Fast evolution of interleukin-2 in mammals and positive selection in ruminants. *J Mol Evol*. 51(3):234-44.

ANEXO 1 TAXONOMÍA DE PRIMATES

SUBORDEN	INFRAORDEN	SUPERFAMILIA	FAMILIA	SUBFAMILIA	Género	HALLAZGOS EN BIOLOGÍA MOLECULAR	
PROSIMII	Lemuriformes	Lemuroidea	Cheirogaleidae		<i>Microcebus</i>		
					<i>Cheirogaleus</i>	<i>Cheirogaleus major</i> (Lemur gran etano) 144 pb del exon V de GH (Liu y cols., 2001)	
					<i>Phaner</i>		
					<i>Allocebus</i>		
						<i>Lemur</i>	<i>Lemur mongoz coronatus</i> (Lemur coronado), 144 pb del exon V de GH (Liu y cols., 2001)
						<i>Lepilemur</i>	
						<i>Haplemur</i>	
						<i>Varecia</i>	<i>Varecia variegata rubra</i> (Lemur de collar rojo) 144 pb del exon V de GH (Liu y cols., 2001)
						<i>Indri</i>	
						<i>Propithecus</i>	
						<i>Avahi</i>	
						<i>Daubentonia</i>	
						<i>Loris</i>	<i>Nycticebus coucang</i> (Loris lento) 1 gen GH (Wallis y cols., 2001)
						<i>Nycticebus</i>	
Lorisiformes		Lorisioidea	Lorisiidae		<i>Arctocebus</i>		
					<i>Perodicticus</i>		
						<i>Galago</i>	<i>Galago senegalensis</i> (Galago de senegal) y <i>Otolemur crassicaudatus</i> (Bus baby cola gruesa) 1 gen GH (Adkins y cols., 2001)
						<i>Tarsius</i>	<i>Tarsius syrichta</i> (Tarsio Filipino) y <i>Tarsius bancanus</i> (Tarsio del oeste), secuencia parcial de 1075 pb GH (Liu y cols., 2001)
						<i>Callimico</i>	
						<i>Callithrix</i>	<i>Callitrix jacchus</i> (Marmoset orejas blancas) 8 GH: 3 funcionales y 5 pseudogenes y 7 regiones intergénicas (Wallis, 1981, 2002)
						<i>Cebuella</i>	
						<i>Saguinus</i>	
						<i>Leontopithecus</i>	
						<i>Alouatta</i>	
SIMII	MONOS DEL NUEVO MUNDO Platyrrhini	Ceboidea	Cebidae				

				<i>Ateles geoffroyi</i> (Mono araña) 6 genes y 5 intergénicas de GH (Esquivel E. 1999; Revol y cols., 2001), 144 pb del exón V de GH (Liu y cols., 2001).	<i>Ateles</i> <i>Brachyteles</i> <i>Lagothrix</i>
				<i>Saimiri boliviensis</i> (Mono ardilla) cDNA de hipófisis correspondiente a GH (Liu y cols., 2001)	<i>Saimiri</i>
					<i>Cebus</i>
					<i>Pithecia</i>
					<i>Cacajao</i>
					<i>Callicebus</i>
					<i>Chiropotes</i>
					<i>Cercocebus</i>
				** <i>Cercopithecus aethiops</i> (Mono verde) 5 intergénicas parcialmente secuenciadas (Corrales Félix 2000)	<i>Cercopithecus</i>
					<i>Miopithecus</i>
					<i>Erythrocebus</i>
				<i>Macaca Rhesu</i> (Macaco) 5 cDNAs de placenta y la secuencia de GH-V (Golos y cols., 1993)	<i>Macaca</i>
				<i>Papio cynocephalus</i> (Baboon) 144 pb del exón V de GH (Liu y cols., 2001)	<i>Papio</i>
					<i>Mandrillus</i>
					<i>Theropithecus</i>
				<i>Colobus angolensis</i> (mono colobus) 144 pb del exón V de GH (Liu y cols., 2001)	<i>Colobus</i>
					<i>Presbytis</i>
					<i>Nasalis</i>
					<i>Pygathrix</i>
					<i>Rhinopithecus</i>
					<i>Hylobates</i>
				<i>Pongo pygmaeus</i> (orangután) 144 pb del exón V de GH (Liu y cols., 2001)	<i>Pongo</i>
					<i>Gorilla</i>
				<i>Pan troglodytes</i> (Chimpancé) 6 genes y 5 intergénicas (Revol y cols., sometido), 144 pb del exón V de GH (Liu y cols., 2001).	<i>Pan</i>
				<i>Homo sapiens</i> (Humano) locus GH/PL 2 GIs y 3 PLs secuenciado (Chen y cols 1989)	<i>Homo</i>

ANEXO 2. ANÁLISIS PREDICTORIO DE LA ESTRUCTURA SECUNDARIA. EXACTITUD DE LA PREDICCIÓN = 68.11%

CAPL-3			hHG-N			CAPL-3			hHG-N					
Pos aa	ESTR.	HELICE	HEBRA	GIRO	Pos aa	ESTR.	HELICE	HEBRA	GIRO	Pos aa	ESTR.	HELICE	HEBRA	GIRO
1 M	Giro	0.07	0.04	0.89	61 C	Giro	0.21	0.09	0.70	61 Y	Giro	0.37	0.04	0.59
2 A	Giro	0.07	0.04	0.89	62 I	Giro	0.09	0.02	0.89	62 I	Giro	0.19	0.02	0.79
3 A	Giro	0.19	0.02	0.76	63 P	Giro	0.25	0.05	0.69	63 P	Giro	0.40	0.04	0.59
4 G	Giro	0.19	0.02	0.79	64 K	Giro	0.25	0.05	0.69	64 K	Giro	0.40	0.10	0.50
5 S	Giro	0.25	0.05	0.69	65 Q	Giro	0.25	0.05	0.69	65 E	Giro	0.40	0.10	0.50
6 R	HELICE	0.72	0.02	0.44	66 Q	Giro	0.37	0.04	0.59	66 Q	HELICE	0.52	0.05	0.44
7 T	HELICE	0.72	0.02	0.26	67 K	Giro	0.32	0.13	0.55	67 K	HELICE	0.52	0.16	0.32
8 S	HELICE	0.94	0.01	0.04	68 Y	HEBRA	0.20	0.42	0.38	68 Y	HEBRA	0.20	0.42	0.38
9 L	HELICE	0.91	0.04	0.05	69 S	HEBRA	0.09	0.51	0.40	69 S	HEBRA	0.07	0.47	0.46
10 L	HELICE	0.98	0.01	0.01	70 F	HEBRA	0.29	0.49	0.22	70 F	HEBRA	0.09	0.51	0.40
11 L	HELICE	0.98	0.01	0.01	71 L	Giro	0.25	0.23	0.52	71 L	Giro	0.14	0.19	0.67
12 A	HELICE	0.85	0.09	0.06	72 R	Giro	0.19	0.02	0.79	72 Q	Giro	0.07	0.04	0.89
13 F	HELICE	0.85	0.09	0.06	73 N	Giro	0.09	0.02	0.89	73 N	Giro	0.07	0.04	0.89
14 A	HELICE	0.69	0.15	0.17	74 P	Giro	0.09	0.02	0.89	74 P	Giro	0.09	0.02	0.89
15 L	HELICE	0.75	0.12	0.14	75 Q	Giro	0.09	0.03	0.88	75 Q	Giro	0.11	0.07	0.82
16 L	Giro	0.40	0.10	0.50	76 T	Giro	0.06	0.09	0.85	76 T	Giro	0.06	0.12	0.82
17 C	Giro	0.37	0.04	0.59	77 S	Giro	0.07	0.37	0.57	77 S	HEBRA	0.06	0.48	0.47
18 L	Giro	0.37	0.04	0.59	78 L	HEBRA	0.03	0.66	0.31	78 L	HEBRA	0.02	0.83	0.15
19 P	HELICE	0.59	0.04	0.38	79 C	HEBRA	0.02	0.83	0.15	79 C	HEBRA	0.02	0.83	0.15
20 W	HELICE	0.72	0.02	0.26	80 F	HEBRA	0.03	0.66	0.31	80 F	HEBRA	0.03	0.66	0.31
21 L	HELICE	0.59	0.04	0.38	81 S	Giro	0.07	0.37	0.57	81 S	Giro	0.07	0.37	0.57
22 Q	HELICE	0.72	0.02	0.26	82 E	Giro	0.06	0.12	0.82	82 E	Giro	0.09	0.16	0.75
23 E	HELICE	0.52	0.05	0.44	83 S	Giro	0.06	0.12	0.82	83 S	Giro	0.06	0.12	0.82
24 A	Giro	0.25	0.05	0.69	84 I	Giro	0.06	0.12	0.82	84 I	Giro	0.06	0.12	0.82
25 G	Giro	0.09	0.02	0.89	85 P	Giro	0.06	0.09	0.85	85 P	Giro	0.06	0.09	0.85
26 R	Giro	0.07	0.04	0.89	86 T	Giro	0.06	0.09	0.85	86 T	Giro	0.09	0.09	0.83
27 V	Giro	0.09	0.09	0.83	87 P	Giro	0.07	0.04	0.89	87 P	Giro	0.09	0.03	0.88
28 P	Giro	0.11	0.07	0.82	88 S	Giro	0.19	0.02	0.79	88 S	Giro	0.09	0.02	0.89
29 T	Giro	0.09	0.22	0.69	89 N	Giro	0.19	0.02	0.79	89 N	Giro	0.09	0.02	0.89
30 I	Giro	0.09	0.22	0.69	90 M	Giro	0.37	0.04	0.59	90 R	Giro	0.19	0.02	0.79
31 P	HELICE	0.52	0.05	0.44	91 E	HELICE	0.52	0.05	0.44	91 E	Giro	0.37	0.04	0.59
32 L	HELICE	0.59	0.04	0.38	92 E	HELICE	0.59	0.04	0.38	92 E	HELICE	0.52	0.05	0.44
33 S	HELICE	0.88	0.00	0.12	93 T	HELICE	0.59	0.04	0.38	93 T	HELICE	0.52	0.05	0.44
34 R	HELICE	0.88	0.00	0.12	94 Q	HELICE	0.59	0.04	0.38	94 Q	HELICE	0.52	0.05	0.44
35 L	HELICE	0.88	0.00	0.12	95 Q	HELICE	0.59	0.04	0.38	95 Q	HELICE	0.52	0.05	0.44
36 F	HELICE	0.88	0.00	0.12	96 K	Giro	0.40	0.10	0.50	96 K	HELICE	0.59	0.04	0.38
37 D	HELICE	0.88	0.00	0.12	97 S	Giro	0.37	0.04	0.59	97 S	HELICE	0.52	0.05	0.44
38 H	HELICE	0.88	0.00	0.12	98 N	HELICE	0.52	0.05	0.44	98 N	HELICE	0.59	0.04	0.38
39 A	HELICE	0.90	0.01	0.08	99 L	HELICE	0.79	0.07	0.14	99 L	HELICE	0.94	0.01	0.04
40 M	HELICE	0.94	0.01	0.08	100 E	HELICE	0.91	0.04	0.05	100 E	HELICE	0.89	0.03	0.08
41 L	HELICE	0.90	0.01	0.08	101 L	HELICE	0.98	0.01	0.01	101 L	HELICE	0.91	0.04	0.05
42 Q	HELICE	0.88	0.00	0.12	102 L	HELICE	0.85	0.09	0.06	102 L	HELICE	0.91	0.04	0.05
43 A	HELICE	0.88	0.00	0.12	103 H	HELICE	0.60	0.17	0.23	103 R	HELICE	0.91	0.04	0.05
44 H	HELICE	0.88	0.00	0.12	104 I	HELICE	0.60	0.17	0.23	104 I	HELICE	0.85	0.09	0.06
45 R	HELICE	0.88	0.00	0.12	105 S	HELICE	0.60	0.17	0.23	105 S	HELICE	0.69	0.15	0.17
46 A	HELICE	0.88	0.00	0.12	106 L	HELICE	0.54	0.30	0.16	106 L	HELICE	0.85	0.09	0.06
47 H	HELICE	0.88	0.00	0.12	107 L	HELICE	0.60	0.17	0.23	107 L	HELICE	0.69	0.15	0.17
48 Q	HELICE	0.89	0.03	0.08	108 L	HELICE	0.69	0.15	0.17	108 L	HELICE	0.69	0.15	0.17
49 L	HELICE	0.75	0.12	0.14	109 I	HELICE	0.66	0.08	0.26	109 I	HELICE	0.62	0.11	0.27
50 A	HELICE	0.66	0.08	0.26	110 Q	HELICE	0.59	0.04	0.38	110 Q	HELICE	0.59	0.04	0.38
51 I	HELICE	0.48	0.12	0.40	111 S	Giro	0.37	0.04	0.59	111 S	HELICE	0.52	0.05	0.44
52 D	Giro	0.40	0.10	0.50	112 W	Giro	0.40	0.10	0.50	112 W	Giro	0.40	0.10	0.50
53 T	Giro	0.37	0.04	0.59	113 L	Giro	0.37	0.04	0.59	113 L	Giro	0.37	0.04	0.59
54 Y	HELICE	0.59	0.04	0.38	114 E	Giro	0.25	0.05	0.69	114 E	Giro	0.25	0.05	0.69
55 Q	HELICE	0.72	0.02	0.26	115 P	HELICE	0.52	0.05	0.44	115 P	HELICE	0.52	0.05	0.44
56 E	HELICE	0.88	0.00	0.12	116 V	HELICE	0.72	0.02	0.26	116 V	HELICE	0.72	0.02	0.26
57 F	HELICE	0.88	0.00	0.12	117 Q	HELICE	0.72	0.02	0.26	117 Q	HELICE	0.72	0.02	0.26
58 E	HELICE	0.88	0.00	0.12	118 F	HELICE	0.90	0.01	0.08	118 F	HELICE	0.90	0.01	0.08
59 E	HELICE	0.90	0.01	0.08	119 L	HELICE	0.94	0.01	0.04	119 L	HELICE	0.94	0.01	0.04
60 A	HELICE	0.59	0.04	0.38	120 R	HELICE	0.94	0.01	0.04	120 R	HELICE	0.94	0.01	0.04

II

I

ANEXO 3

SECUENCIAS RELACIONADAS A GH DE MONO VERDE

LOCUS 1888pb **DNA** **PRI**
DEFINICIÓN Cercophitecus aethiopsis gen de la hormona del crecimiento normal, (caGH-N)
 cds completo
ORIGEN Mono Verde
ORGANISMO Cercophitecus aethiopsis
 Eucariota; Metazoa; Chordata; Craniana; vertebrata; Euteleostomi; Mamalia;
 Eutheria; Primates; Catarrhini; Cercopithecidae; Cercopithecinae.
REFERENCIA 1 (bases 1 a 1888)
CARACTERÍSTICAS Localización
 Origen 1..1888
 /organismo="Cercophitecus aethiopsis"
CDS Unión (344...415, 677...837, 1048...1167, 1261...1425, 1680...1877)
 /codón de inicio=1
 /producto="hormona del crecimiento normal"
 Traducción=MAAGSRTSLLLAFALLCLPWLQEGSAFPTIPLSRLFDNAMLRHRLHQALFDTYQEFEEAYIPKEQ
 KHSFLQNPQTSLCFSESIPTPSNREETQQKSNLELLRISLLLIQSWLEPVQFLRSVFNANLVYDTSDDVYDLLKDL
 EEGIQTLMGRLEDGSPRTGQIFKQTYSKFDTNSHMNDALLKKNYGLLYCFRKMMDKVETFLRIVQCRSVBGC3F
 exón 1 344...415
 intrón 416...676
 exón 2 677...837
 intrón 838...1047
 exón 3 1048...1167
 intrón 1168...1260
 exón 4 1261...1425
 intrón 1426...1679
 exón 5 1680...1877
 Composicion 436 A; 531 C; 536 G; 385 T.
 Porcentage: 23.1% A; 28.1% C; 28.4% G; 20.4% T.
 Peso Molecular (kDa): ssDNA: 583.31 dsDNA: 1164.07
ORIGIN
 1 ggggtctcga ggactggcta tcatgacatc cttccccgcg ttgaggttgg ccaccatggc
 61 gtgctgccag aggacacca cctgctcctt aaggagagga taagttaggt ggtatctctg
 121 gctgacactc tgtgcacaac cctcacaatg ctggtgacgg tgggaagggg aagatgacaa
 181 gccagggggc atgatcccag catgtgtggg aggagcttct aaattatcca ttagcacagg
 241 cacgtcagtg gcccacatgca taaatgtaca gagaacacagg tgggggcaag cagcaagaga
 301 gaagggggca ggtataaaa agggcccaca agagaccagc tccaggatcc caaggcccaa
 361 ctccccgaac cactcagggg cctgtggaca gccacactag ctgcaatggc tgcaggtgag
 421 cgcccctaaa atccctttct gcatgatgtg tcccaggggg agaggtggca ccctgtagat
 481 gggacggggg cactaacctt caggtttggg gcttctgaat gtgagatagc ccatctaagc
 541 ccagatattt ggtcaatctc agaatgttcc tggctcctgg agggatggac agaaaaaaac
 601 aacagctcc tggggcaggg agagcactgg cctcttctgc tccggctccg tctgttggcc
 661 tccygtttct ccccaggctc ccggacatcc ctgctcctgg cttttgccct gctctggcctg
 721 ccctggcttc aagagggcag tgccttccca accatttccct tatccaggct ttttgacaac
 781 gctatgctcc ggcacctag cctgcaaccag ctggcctttg acacctacca ggagtttgta
 841 agctcttggg gaatgggagc acatcagagg tggcaagaag gggtgacttt ccccggctgg
 901 aaagtaatgg gaggagacta aggagctcag ggttgttttc tgaagcaaag atgcaggcag
 961 atgagcgtac gctgagtgag gttcccagaa aagtaacaat gggagctggt ctccagcata
 1021 gatcctgggt ggtggtcctt ctctaggaa gaagcctata tcccaaagga acagaagcat
 1081 tcatttctgc agaaccceca gacctcctc tgcctctcag agtctatcc gacacctcc
 1141 aacagggagg aaacgcagca gaaatccgtg agtggatgcc ttctcccaa gacggggatg
 1201 ggggaggcct gtggtcagag cccccgggca gcacagccac tgcgtgtcct tcccctgacg
 1261 aacctagagc tgctcogcat ctccctgctg ctcatccagt cgtggctgga acccgtgacg
 1321 ttctctcagga gtgtgtttgc caacaacctg gtgtatgaca cctcggacag cgacgtctat
 1381 gacctcctaa aggacctaga ggaaggcatc caaacgctga tgggggtgag ggtggcgcca
 1441 ggggtcccca atcctggaac cccactggct tgcagggctg ggggagagaa acactgctgc
 1501 cctcttttta gcagttaggc cctgaccca gagaaactac cttagcttc atttccctc
 1561 gtgaatctc caggcctttc tctacacct gaaggggagg gaggaaaatg aatgaatgag
 1621 aggagggagg gaacagtgac caagcgttc gcctctcct ctcttcttc actttgcaga
 1681 ggctggaaga cggcagcccc cggactgggc agatcttcaa gcagacctac agcaagtgtg
 1741 acacaaactc acanaacaat gatgactgc tcaagaacta cgggctgctc tactgcttca
 1801 ggaaggacat ggacaaggtc gagacattcc tgcgcatcgt gcagtgcgc tctgtggagg
 1861 gcagctgtgg cttetaactg cccaggtg

LOCUS 1925 pb DNA PRI
 DEFINICIÓN Cercophitecus aethiopsis gen de lactógeno placentario 1 (caPL-1)
 cds completo
 ORIGEN Mono Verde
 ORGANISMO Cercophitecus aethiopsis
 Eucariota; Metazoa; Chordata; Craniana; vertebrata; Euteleostomi; Mamalia;
 Eutheria; Primates; Catarrhini; Cercopithecidae; Cercopithecinae.
 REFERENCIA 1 (1... 1925 bases)
 CARACTERISTICAS Localización
 Origen 1...1925
 /organismo="Cercophitecus aethiopsis"
 CDS Unión (342...413, 639...799, 1023... 1142, 1235...1408, 1658...1855)
 /codón de inicio=1
 /producto="lactógeno placentario 1"
 Traducción=MAAGSRTSLLAFALLCLPWLQEAGRVPVPLSRLFDHAMIQAHRHLHQLAFDITYEEFEAYIPKEK
 KHSFMENPQASFCFADSIPTPSNMEETQQKSNLELLRMSLLLIQSWLEPVQFLRSVFANNLVHDTSDSDVHDLKDL
 EEGIETLMGRLEDGSPQTGQIFKQTYSKFDTHSQNDDSLKKNYGLLHCFRKDMDMVETFLRMVQCRTVEGSCGF
 exón 1 342...413
 intrón 414...638
 exón 2 639...799
 intrón 780...1022
 exón 3 1023...1142
 intrón 1143...1234
 exón 4 1235...1408
 intrón 1409...1657
 exón 5 1658...1855
 Composición 443 A; 546 C; 548 G; 388 T.
 Percentage: 23.0% A; 28.4% C; 28.5% G; 20.2% T.
 Peso Molecular (kDa): ssDNA: 594.70 dsDNA: 1186.89
 ORIGEN
 1 ggggtctgag ggactggeta tctgacatc cttccccacg ttcaggttgg ccaccatggc
 61 gtgctgccag aggacacca catgaccctt aaagagagga caggttgggt ggtatcgctg
 121 gctgaccctc tgcacaacc tcacaatgtt ggtgacggtg ggaagggaaa gatgacaagc
 181 cagggggcat gatcccagca tgtgtgggag gagcttctaa artagccatt agcacaggca
 241 cgtcagtgcc cccatgccta aacgtacaga gaaatagggt gggcaagca gcaagagata
 301 actggccagg gtataaaaag ggcaccacaag agaccagctc caggatccca aggcccaact
 361 cccgaacca ctcagggtcc tgtggacagc ccacctagct gcaatggctg caggtaagcg
 421 cccctaaaat ccatttctgc acgatgtgtc ccgaggggag aggctgagcc ctgtagatgg
 481 gacgggggca cgcctcctaa gccagatat ttaaccaata tcagaatggt cctggtccct
 541 ggagggatag agagagaaaa acaaacagct cctggggcag ggagagcact ggcctcttgc
 601 tctctggctc cctccggttc cctccggttt cccccaggc tcccgacat ccctgctcct
 661 ggcttttgcc ctctctgctc tgccttggct tcaagaggtt ggtagggctc caagcgtacc
 721 cttatccagc ctttttgacc acgctatgat ccaagcccat cgcctgcacc aactggcctt
 781 tgacacctc gaggagtgtg taagctcttg ggaatgggtt gcgcgtcagg ggtggcagga
 841 aggggtgact ttccccgct ggaaagtcc gggaggagac taaggagctc agggttggtt
 901 tctgaggcga aaatgccggc agatgagcat aactgagcg aggttctcag agaagtaaca
 961 atgggagctg gtctccagca tagagaccag cagtacctct tggggggggg tcttctcct
 1021 aggaagaagc ctatatccca aaggaaaaga agcattcatt catggagAAC ccccaggcct
 1081 ccttctgctt cgcagactct attcccaac cctccaacat ggaggaaacg cagcagaaat
 1141 cgtgagtggt ataccttctc cccaaggcgg ggatggggga gacctgtggt cagagcccc
 1201 gggcagcaca gccactgctt gtccttcccc tgcagaacch agagctgctc cgcctgctcc
 1261 tgctgctcat ccagtcgtgg ctggagcccg tgcagttcct caggagtgtg tttgccaaca
 1321 acctggtgca tgacacctg gacagcgacg tccatgacct cctaaaggac cttagaggaag
 1381 gcatcgaaac gttgatgggg gtgaggatgg cgcaggggt cctcaatcct ggaacctcac
 1441 tggcttcaag ggctggggga gagaaacct gctgctctct ttttagcagt caggccctga
 1501 cccaagagaa ctcaccttag tcttcatttc ccctgatgaa tcttccagg ctttctctac
 1561 accctgaagg ggagggagga aaatgaatga atgagagagg gagggaaggga acagtgaaca
 1621 agcgtctcag ctctccttct cttccttctc tttgagaggg ctggaagatg gcagccccca
 1681 gactgggagc atcttcaagc agacctacag caagtttgac acacactcac agaacgatga
 1741 ctcactgctc aagaactacg ggctgctcca ctgcttcagg aaggacatgg acatggctga
 1801 gacattcctc cgcctgggtg agtgcggcac tgtggagggc agctgtgctt tctaggtgcc
 1861 cgcgtggcat cctgtgacct cctccagtg cctgtcctgg cctggaaag tgcactcta
 1921 gtgcc

LOCUS 1902 pb DNA PRI
 DEFINICIÓN Cercophitecus aethiopsis gen de lactógeno placentario 2 (caPL-2)
 cds completo
 ORIGEN Mono Verde
 ORGANISMO Cercophitecus aethiopsis
 Eucariota; Metazoa; Chordata; Craniana; vertebrata; Euteleostomi; Mamalia;
 Eutheria; Primates; Catarrhini; Cercopithecidae; Cercopithecinae.
 REFERENCIA 1 (bases 1 a 1902)
 CARACTERISTICAS Localización
 Origen 1..1902
 CDS Unión (342...413, 675...835, 1059...1178, 1272...1436, 1694...1891)
 /codón de inicio=1
 /producto="hormona del crecimiento normal"
 Traducción=MAAGSRTSLLLFALLCLPWLQEAGRVPSVPLSRLFDHAMIQAHLHQALAFDITYEEFEAYIPKEK
 KHSMLMENPQASFCFSDSIPTPSNMEETQQKSNLELLRMSLLLIQSWLEFVQFLGSVFNLSLVYGTSDSDVYDLLKDL
 EEGIQTLMRRLBDGSPRTGQIFKQTYSKFDTHSQNDDSLKQVYLLHCFRKMMDMVETFLRMVQCRSVEGSCGF
 exón 1 342...413
 intrón 414...674
 exón 2 675...835
 intrón 836...1058
 exón 3 1059...1178
 intrón 1179...1271
 exón 4 1272...1436
 intrón 1437...1693
 exón 5 1694...1891
 Composición 432 A; 527 C; 555 G; 388 T.
 Percentage: 22.7% A; 27.7% C; 29.2% G; 20.4% T.
 Peso Molecular (kDa): ssDNA: 588.07 dsDNA: 1172.71
 ORIGEN
 1 ggggtctcga ggactggcta tcctgacatc cttcccacg ttcaggttgg ccaccatggc
 61 gtgctgccag aggacaccca catgaccctt aaagagagga caggttgggt ggtatcgctg
 121 gctgaccctc tgcacaaccc tcacaatggt ggtgacgggt ggaagggaaa gatgacaagc
 181 cagggggcat gatcccagca tgtgtgggag gagcttctaa attagccatt agcacaggca
 241 cgtcagtgcc cccatgcgta aacgtacaga gaaataggtg gggtaagca gcaagagata
 301 aggggccayg gtataaaaag ggcacacaag agaccagctc caggatctca aggcccgact
 361 cccgaacca ctcagggttc tgtggacagc ccacctagct gcaatggctg caggtaagcg
 421 ccctaataat ccatttctgc acgatgtgac caggggggag aggtggcgcc ctgtagatgg
 481 gacgggggca ctaaccctca ggtttggggc ttctgaatgt gagtatcgcc atctaagccc
 541 agatatttaa ccaatatcag aatgttctct gtccttggag ggtatagagag agaaaaacaa
 601 acagctctct gggcagggag agcactggcc tcttctctc tggctccctc cgttgccctc
 661 cggtttctcc ccaggctccc ggacatccct gctcctggct tttgcccctc tctgcccctc
 721 ttggcttcaa gaggctgta gggctcccaag cgtaccctta tccaggcttt ttgaccacgc
 781 tatgatccaa gccatcgcc tgcaccaact ggcctttgac acctacgagg agtttgtaag
 841 ctcttgggga atgggtgcat gtcaggggtg gcaggaaggg gtgactttcc cccgctggga
 901 agtcatgga ggagactaag gagctcaggg ttgtttctg aggcgaaaat gccggcagat
 961 gagcatacac tgagtggagt tctcagagaa gtaacaatgg gagctggctt ccagcataga
 1021 gaccagcagt acctcttggg gggggggcct tctcctagga agaagcctat atcccaaagg
 1081 aaaagaagca ttcgctcatg gagaaccccc aggcctcctt ctgcttctca gactctattc
 1141 ccacaccctc caacatggag gaaacgcagc agaaatccgt gagtggatgc cttctcccca
 1201 aggcggggat gggggagacc tgggtcaga gccccgggc agcacagcca ctgctgtctc
 1261 ttcccctgca gaacctagag ctgctccgca tgtccctgct gctcatccag tctgtggctg
 1321 agcccctgca gttcctcggg agtgtgtttg ccaacagcct ggtgtatggc acctcggaca
 1381 ggcagctcta tgacctccta aaggacctag aggaaggcat ccaaacgttg atgcccgtga
 1441 ggggtggcgc aggggtcccc aatcctggaa ccccactggc ttcgagggct gggggagaga
 1501 aacactgctg cctcttttt agcagtcagg cctgaccca agagaactca ccttagtctt
 1561 catttcccc ggtgaatcct ccaggccttt ctctacacc tgaagggggg gagggaat
 1621 gaatgaatga gagagggagg gagggaacag tgaccaagcg ctcagcctct ccttctctc
 1681 cttcactttg cagaggctgg aagatggcag cccccggact gggcagatct tcaagcagac
 1741 ctacagcaag tttgacacac actcacagaa cgatgactca ctgctcaaga actacgggct
 1801 gctccactgc ttcaggaagg acatggacat ggtcagagaa ttcctgcgca tgggtgcagtg
 1861 ccgctctgtg gagggcagct gtggcttcta gatgctggg tg

LOCUS 1913 pb DNA PRI

DEFINICIÓN Cercophitecus aethiopsis gen de lactógeno placentario 3 (caPL-3)
 cds completo

ORIGEN Mono Verde

ORGANISMO Cercophitecus aethiopsis
 Eucariota; Metazoa; Chordata; Craniana; vertebrata; Euteleostomi; Mamalia;
 Eutheria; Primates; Catarrhini; Cercopithecidae; Cercopithecinae.

REFERENCIA 1 (1... 1913 bases)

CARACTERISTICAS Localización

Origen 1...1913

CDS Unión (324...395, 670...830, 1054...1173, 1267...1434, 1691...1889)
 /codón de inicio=1
 /producto="lactógeno placentario 3"
 Traducción=MAAGSRTSLLLAFALLCLPWLQEAGRVPTIPLSRLFDHAMLQAHRAHQLAIDTYQEFEEACIPKQQ
 KYSFLRNPQTSLCFSESIPTPSNMEETQKSNLELLHISLLLIQSWLEPVQFLRSVFNANSLVVYGTSDSDVYDLLKS
 LEEGIQTLMGRLLEDGSPRTGQIFKQYTSKFDTNHNDTLLKNYWLIVYCFRKMKNKVVETFLRMVQCRSVEGSCGF

exón 1 324...395
 intrón 396...669
 exón 2 670...830
 intrón 831...1053
 exón 3 1054...1173
 intrón 1174...1266
 exón 4 1267...1434
 intrón 1435...1691
 exón 5 1692...1889

Composición 449 A; 535 C; 538 G; 391 T.
 Percentage: 23.5% A; 28.0% C; 28.1% G; 20.4% T.
 Peso Molecular (kDa): ssDNA: 591.02 dsDNA: 1179.48

ORIGEN

1 gaagaaatcc ttccccgctg tgaggttggc caccatggcg tgctgccaga ggacaccac
 61 ctgctcctta aagagaggac aagtgggtg atatctctgg ctgacagtct gtgcacaacc
 121 ctcacagtggt tggtagcggg gggaaaggaa acacgacaag ccagggggca tgatcccagc
 181 atgtgtggga ggagcttcta aattagccat tagcacaggc acgtcagtggt caccatgca
 241 taaacgtaca gagaacacag tggggtcaag cagcagagaga taagggggcca gggtataaaa
 301 agggccgggg agagaccaac tccaggatcc caaggcccaa ctgcccgaac cactcagggg
 361 cctgtggaca gccccacctag ctgcaatggc tgcaggtaag cgcccttaa atccatttcc
 421 gcacgatgtg tcccgaagaa agagggtggc cctgttagat gggaccgggg cactaatcct
 481 caggtttggg gcttctgaat atgagtatcg ccatctaage ccagatattc ggccaatctc
 541 acaatgttcc tggctcctgg agggatggag agagaggaaa aaaaaaaaaa aaaaaaacag
 601 ctctaggcc agggacagtg ctggcctctt gctctctgct tccctcgttg tccctcgggt
 661 tctccccagg ctcccggacg tccctgctcc tggcttttgc cctcctctgc ctgcccaggg
 721 ttcaagagggc tggtaggggtc ccaaccattc cgttatccag gctttttgac caccgctatgc
 781 tccaagccca tgcgcggcac cagctggcca ttgacaccta ccaggagttt gtaagctctt
 841 ggggaatggg tgcgcttcag aggtggcagg aaggggtgac ttccccccgc tgggaagtca
 901 tgggaggaga ctaaggagct cagggttggt ttctgaaggc aaaatgcagg cagatgagca
 961 tatgctgagt gaggttccca gaaaagtaac aatgggagct ggtctccagc atagaaacca
 1021 ggggtccttc ttgggtggggg gtccttctcc taggaagaag cctgtatccc aaaggaagag
 1081 aagtattcat tccctgaggaa cccccagacc tccctctgct tctcagagtc tattcccaca
 1141 cctctacaac tggaggaaac acaacagaaa tccgtgagtg gatgcttctc cgcccaggcg
 1201 gggattgggg aggcctgtgg tcagagccac caggcagcac agccactgcc ggtccttccc
 1261 ctgcagaacc tagagctgct ccacatctcc ctgctgctca tccagtcctg gctggagccc
 1321 gtgcagttcc tcaggagtgt gtttgccaac agcctggtgg tgtatggcac ctccggacagc
 1381 gacgtctatg acctcctaaa aagcctagag gaaggcatcc aaacgctgat ggggggtgag
 1441 gtggcaccag ggatccccaa tcttggaaac tactggctt cgagggctgg gggagagaaa
 1501 cactgctgcc ctctttttag cagccaggcc ctgacccaag agaactcacc ttattcttca
 1561 tttccccctg tgcctcctcc aggcctttct ctacaccctg gaggggaggg aggaaaatga
 1621 atgaatgaga gggggagggg gggaaacagt cccaagccct tggcctctct ttctcttctc
 1681 tcactttgca gaggctggaa gatggtagcc cccggactgg gcagatctcc aagcagacct
 1741 acagcaagtt tgacacaaac tcgcacaacg atgacacact gctcaagaac tactggctgc
 1801 tctactgctt caggaaggac atgaacaagg tcgagacatt cctgcccagc gtcagtgccc
 1861 gctctgtgga gggcagctgt ggcttctagg tgcccagcag gcatcctggt ccc

LOCUS 2095 pb DNA PRI
 DEFINICIÓN Cercophitecus aethiopsis gen de lactógeno placentario 4 (caPL-4) cds completo
 ORIGEN Mono Verde
 ORGANISMO Cercophitecus aethiopsis
 Eucariota; Metazoa; Chordata; Craniana; vertebrata; Euteleostomi; Mamalia;
 Eutheria; Primates; Catarrhini; Cercopithecidae; Cercopithecinae.
 REFERENCIA 1 (1...2095 bases)
 CARACTERISTICAS Localización
 Origen 1...2095
 CDS Unión (309...380, 652...812, 1036...1155, 1249... 1416, 1671... 1868)
 /codón de inicio=1
 /producto="lactógeno placentario 4"
 Traducción=MAAGSRTSLLLFALLCLPWLQEAGRVPSVPLSRLFDNAMIQAHLHLQLAFDITYQEFEEAYIPKEQ
 KHSFMENPQTSFCPADSIPTSNMEETQQKSNLELLHISLLLIQSWLEPVQFLRSVFANNLVVYGTSDSDVYDLLKS
 LEBGIQTLMWRLDGSRRRTGQILKQYTSKFDNTHSHNDALLKNVGLLYCFRDKDMNKVETFLRMVQCRAVEGSCGF
 exón 1 309...380
 intrón 381...651
 exón 2 652...812
 intrón 813...1037
 exón 3 1036...1155
 intrón 1156...1248
 exón 4 1249...1416
 intrón 1417...1670
 exón 5 1671...1868
 Composición 505 A; 567 C; 588 G; 435 T.
 Percentage: 24.1% A; 27.1% C; 28.1% G; 20.8% T.
 Peso Molecular (kDa): ssDNA: 647.62 dsDNA: 1291.68
 ORIGEN
 1 ctgcgttgag gttggccacc atggcgtgct gccagaggac acccacctgc tctgaaaga
 61 gaggacaagt tgggtgatat ctctggctga cagtctgtgc acaaccctca cagtgttggg
 121 gacgggtggga agggaaacat gacaagccag ggggcctgat cccagcatgt gtgggaggag
 181 cttctaaatt agccattagc acaggcccgt cagtggcccc atgcataaac gtacagagaa
 241 acaggtgggg tcaagcagcg agagataagg ggccagggta taaaagggc ccacaagaga
 301 ccagctccag gatcccaagg cccaactgcc cgaaccactc agggctcctgt ggacagcca
 361 cctagctgca atggctgcag gtaagcgcct ttaaaatcca tttccgcagc atgtgtcccg
 421 aagaaagagg tggcaccctg tagatgggac cggggcacta atcctcaggt ttggggcttc
 481 tgaatatgag tatcgccatc taagcccaga tatttggcca atctcacaat gtcctggctc
 541 cctggaggga tggagagaga ggaaaaaaa aaaaaaaaac agctcctagg ccagggacag
 601 cgctggcctc ttgctctctg cctcctcctg tgtcctccgg tttctcccca ggctcccggg
 661 cgctcctgct cctggctttt gccctcctct gcctgccatg gcttcaagag gctggtaggg
 721 tcccaagcgt accctatcc aggetttttg acaacgctat gatccaagcc catcgctgc
 781 accagctggc ccttgacacc taccaggagt ttgtaagctc ttggggaatg ggtgcgggtc
 841 aggggtggca agaaggggtg actttccccc actgggaagt cctgggaggg gactaaggag
 901 ctccaggttg tttctgaag cgaaaatgca ggcagatgag catacactga gtgaggttct
 961 cagagaagta acaatgggag ctggctctca gcatagaaac cagcagtcct tcttgggtgg
 1021 gggctcctct cctaggaaga agcctatctc ccaaaggaac agaagcattc gttcatggag
 1081 aacccccaga cctcctctct ctctgcagac tctattcca caccctccaa catggaggaa
 1141 acacaacaga aatccgtgag tggatgcctt ctgcgccagg cggggattgg ggaggcctgt
 1201 ggtcagagcc accaggcagc acagccactg ccggctcctc cctgcagaa cctagagctg
 1261 ctccacatct cctgtgctgt catccagctc tggctggagc ccgtgcagtt cctcaggagc
 1321 gtgtttgcca acaacctggt ggtgatggc acctcggaca gcgacgtcta tgacctcta
 1381 aaaagcctag aggaaggcat ccaaacgctg atgtgggtga ggtgacacc agggatcccc
 1441 aatcctggaa cccactggct tcgaggggtg agggagagaa actgctgtcc tctttttagc
 1501 agagagggtc tgacccaaga gaactcactt tagtcttcat tctcctcctg gaatcctcca
 1561 gggctctctc tacacctga agaggagaga ggaaaacgaa tgaatgagag agagaggggg
 1621 cgaacagtga ccaagcgtc agcctctcct tctctcctt cactttgcag aggctggaag
 1681 acggcagccg cgggactggg cagatcctca agcagacctc cagcaagttt gacacaaact
 1741 cacacaacca tgaccgactg ctcaagaact accggctgct ctactgcttc aggaaggaca
 1801 tgaacaaggt cgagacattc ctgcgcattg tgcagtgccg cgtgtgggag ggcagctgtg
 1861 gcttctaggt gcgcagctg atcctgtgac ccttcccagt gcctctcctg ctcggaaggt
 1921 gccactccag tgcccaccag caatgtccta ataaaattaa gtgtatcatt ttgtctggct
 1981 agatgtcctt ctataatatt ttgtgggtga aggggggtgt atggagcaag gggcagcttg
 2041 ggaagacgac ctgtaggcct gcagggtcta ttgggaacca ggcactgaa atata

LOCUS 1957 pb DNA PRI
 DEFINICIÓN Cercophitecus aethiopsis gen de lactógeno placentario 5 (caPL-5)
 cds completo
 ORIGEN Mono Verde
 ORGANISMO Cercophitecus aethiopsis
 Eucariota; Metazoa; Chordata; Craniana; vertebrata; Euteleostomi; Mamalia;
 Eutheria; Primates; Catarrhini; Cercopithecidae; Cercopithecinae.
 REFERENCIA 1 (1...1957 bases)
 CARACTERISTICAS Localización
 Origen 1...1957
 CDS Unión (341...412, 674...834, 1058...1177, 1271...1435, 1692...1889)
 /codón de inicio=1
 /producto="lactógeno placentario 5"
 Traducción=MAAGSRTSLLLA FALLCLPWLQEAGRVPSVPLSRLFDHAMIQAHLRHLQAFDITYEFPBEAYIPKEK
 KXSLMENPQASFCFADSIPTPSNLEETQQKSNLELLRISLLLIQSWLEPVQFLSSVFANNLVHHTSDSDVHDLKDL
 EEGIETLMWRLEDGSPQTGHIKQTYSKFDTHSQNDSLLKNYGLLHCFRKMDMVMVETFLRMVQCRTEVSGCGF
 exón 1 341...412
 intrón 413...673
 exón 2 674...834
 intrón 835...1057
 exón 3 1058...1177
 intrón 1176...1270
 exón 4 1271...1435
 intrón 1436...1691
 exón 5 1692...1889
 Composición 455 A; 558 C; 547 G; 397 T.
 Percentage: 23.2% A; 28.5% C; 28.0% G; 20.3% T.
 Peso Molecular (kDa): ssDNA: 604.33 dsDNA: 1206.62
 ORIGEN
 1 ggggtctcgag gactggctat cctgacatcc ttccccacgt tcaggttggc caccatggcg
 61 tgctgccaga ggacaccac atgaccctta aagagaggac aagttgggtg gtatcgctgg
 121 ctgaccctct gcacaaccct cacaatgttg gtgaccgtgg gaagggaaag atgacaagcc
 181 agggggcatg atcccagcat gtgtgggagg agcttctaaa ttagccatta gcacaggcac
 241 gtcagtggcc ccatgcgtaa acgtacagag aataggcgg ggtcaagcag caagagataa
 301 ggggcccagg tataaaaaagg gccacaaga gaccagctcc aggatcccaa ggcccaactc
 361 cccgaaccac tcagggtcct gtggacagcc cacctagctg caatggctgc aggtaagcgc
 421 ccctaaaatc catttctgca cgtgtgtcc cgaaggaaga ggctgagccc tgtatagggg
 481 acggggggcac taacctcag gtttggggct tctgaatgtg agtatcgcca tctaagccca
 541 gatatttaac caatatcaca atgttcctgg tcctggagg gatagagaga gaaaaacaaa
 601 cagctcctgg ggcagggaga gcaactggcct ctgtctctc ggctccctcc gttgcectcc
 661 ggtttctccc caggctccc gacatccctg ctctggcct ttgcectcct ctgctgctc
 721 tggttcaag aggtggtag ggtcccaagc gtacccttat ccaggctttt tgaccacgct
 781 atgatccaag cccatcgctc gcaccaactg gcctttgaca cctacgagga gtttgaagc
 841 tcttggggaa tgggtgcgcy tcaggggtgg caagaagggg tgactttccc ccgctgggaa
 901 gtcattggag gagactaagg agctcagggt tgtttctga agcgaaaatg ccggcagatg
 961 agcatacact gagcgagggt ctacagagaag taacaatggg agctggtctc cagcatagag
 1021 accagcagta cctcttggtg gggggctcct ctctagga gaagcctata tcccaaagga
 1081 aaagaagcat tcgctcatgg agaaccacca ggctccttc tgccttcgag actctattcc
 1141 cacaccctcc aacttggagg aaacgcagca gaaatcctg agtggatacc ttctcccaa
 1201 ggcagggatg ggggaggcct gtggtcagag cccccgggca gcacagccac tgcgtgtcct
 1261 tcccctgcag aacctagagc tgcctcccat ctccctgctg ctcatccagt cgtggctgga
 1321 gccctgagc ttcctcagta gtgtgttgc caacaacctg gtgcatcaca cctcggacag
 1381 cgacgtccat gacctcctaa aggacctaga ggaaggcatc gaaacgttga tgtgggtgag
 1441 gatggcacca ggggtcctca atcctggaac ctcaactggct tcaagggtg ggggagagaa
 1501 acaactgctgc cctcttttta gcagtcaggc cctgacccaa gagaactcac cttagtcttc
 1561 atttcctctc atgaatcctc caggctcttc tctacacct gaagggagga ggcaaatga
 1621 atgaatgaga gagggaggga gggaacagt accaagcgtc cagcctctcc ttctctctc
 1681 tcaacttgca gaggctggaa gatggcagcc ccagactgg gcacatctc aagcagacct
 1741 acagcaagtt tgacacacac tcacagaacg atgactcact gctcaagaac tacgggctgc
 1801 tccactgctt caggaaggac atggacatgg tcgagacatt cctgcgcag gtgcagtgcc
 1861 gcactgtgga gggcagctgt ggctctcag tgcctcctg gcatacctgt accgacctc
 1921 cccagtgcc tctcctggaa ctcgggggct gcaggaa

