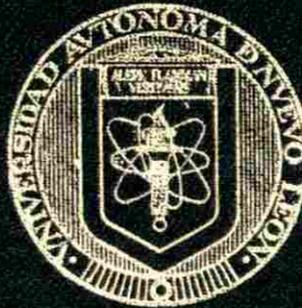


UNIVERSIDAD AUTONOMA DE NUEVO LEON
FACULTAD DE MEDICINA



**OBTENCION DE NUEVOS GENES DE LA
HORMONA DEL CRECIMIENTO EN
VERTEBRADOS**

POR

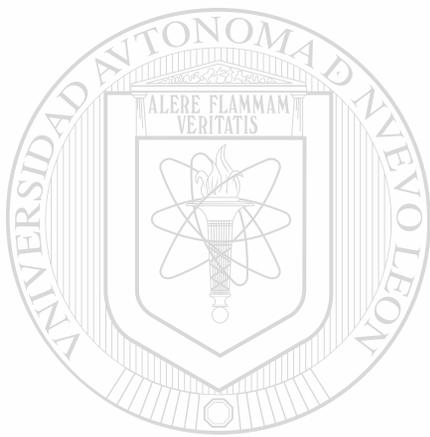
ING. VICTOR MANUEL TREVIÑO ALVARADO

Como requisito parcial para obtener el Grado de
**MAESTRIA EN CIENCIAS CON ESPECIALIDAD EN
BIOLOGIA MOLECULAR E INGENIERIA GENETICA**

MAYO, 1999

COMPTON
144
145

ING. VICTOR MLANUJEL. TREVINHO ALVARADO



UANL

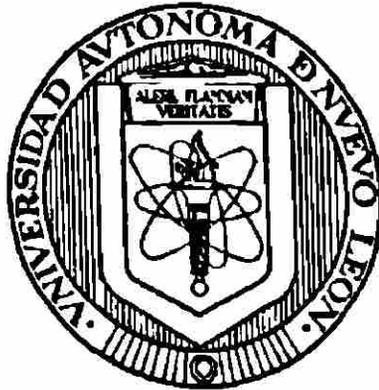
UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN



DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

FACULTAD DE MEDICINA



OBTENCIÓN DE NUEVOS GENES DE LA HORMONA DEL CRECIMIENTO EN VERTEBRADOS

Por

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

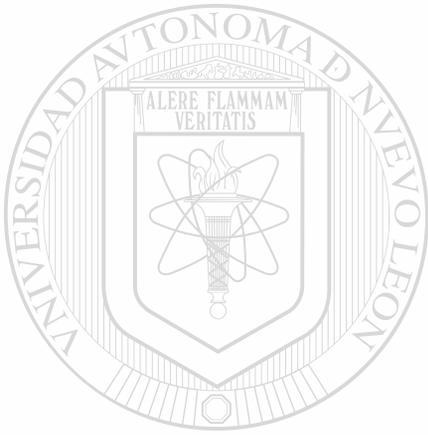
®

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS
Ingeniero Víctor Manuel Treviño Alvarado

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

Mayo, 1999

T
9H44S
T7



UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

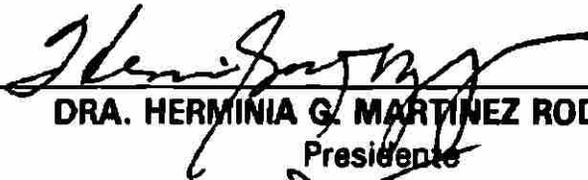
®

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS



**OBTENCION DE NUEVOS GENES DE LA HORMONA DEL CRECIMIENTO
(GH) EN VERTEBRADOS**

Aprobación de la Tesis:



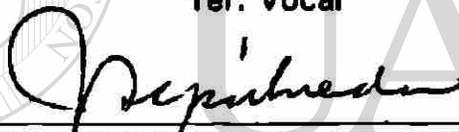
DRA. HERMINIA G. MARTÍNEZ RODRÍGUEZ
Presidente



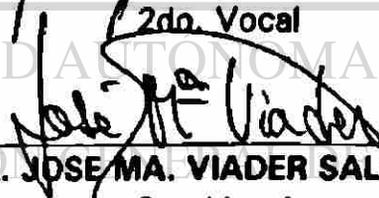
DRA. AGNES REVOL DE MENDOZA
Secretario



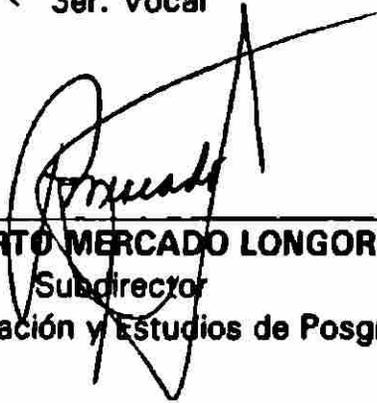
DR. HUGO ALBERTO BARRERA SALDAÑA
1er. Vocal



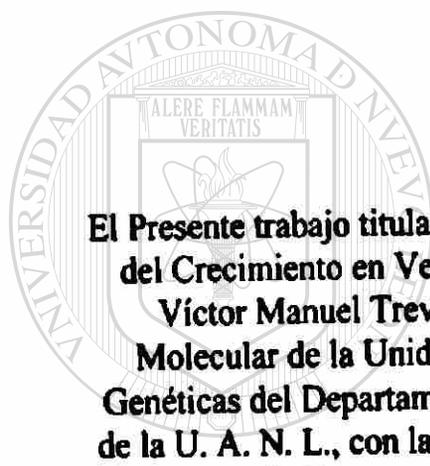
DR. JULIO SEPULVEDA SAAVEDRA
2do. Vocal



DR. JOSE MA. VIADER SALVADO
3er. Vocal



DR. ROBERTO MERCADO LONGORIA
Subdirector
de Investigación y Estudios de Posgrado



El Presente trabajo titulado “Obtención de Nuevos Genes de la Hormona del Crecimiento en Vertebrados” fue llevado a cabo por el Ingeniero Víctor Manuel Treviño Alvarado en el Laboratorio de Biología Molecular de la Unidad de Laboratorios de Ingeniería y Expresión Genéticas del Departamento de Bioquímica de la Facultad de Medicina de la U. A. N. L., con la Asesoría de la Dra. Agnès Revol de Mendoza y la Co-asesoría del Dr. Hugo A. Barrera Saldaña

UNIVERSIDAD AUTONOMA DE NUEVO LEÓN



DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

AGRADECIMIENTOS

A la Dra. Agnès Revol por su apoyo y dirección acompañados de amistad y convivencia.

Al Dr. José Ma. Viader y Dra. Martha Guerrero por su apoyo en este grado.

Al Dr. Hugo Barrera y la Dra. Herminia Martínez por haberme brindado esta oportunidad.

A mis compañeros de generación Dolores, Mario, Sandra, Flor, Maribel, Julio, Perla y Fermín, por acompañarme, ayudarme y hacer de los estudios momentos placenteros y especialmente a Dolores Ezquível por ser ella misma.

A Claudio Moreno y Carlos Vázquez por los momentos de enseñanza, compañía, amistad, regocijo, felicidad, filosofía, ciencia y sobre todo, hermandad.

A todos los profesores por su paciencia en mi desarrollo.

A todo el personal y estudiantes de la ULIEG y especialmente a los laboratorios de Biología Molecular y Celular, por agregar al trabajo científico momentos de interminable diversión.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología por el apoyo económico para la realización de estos estudios.

DEDICATORIA

A mi madre, Ma. Rita Alvarado Martínez, por haber dedicado toda su vida a sus hijos, por educarme para darme la oportunidad de soñar y por apoyarme para realizar algunos de mis sueños.

Al gran amor de mi vida, mi esposa Lucía Elizabeth Cuellar y a Peksi por ser la fuerza que siempre me acompañan y por darle sentido a mi vida.

A mis abuelos por mostrarme su experiencia.

A Lázaro Martínez, José González y Jorge Garza por introducirme al mundo fantástico de la computación.

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

A Jaime F. Treviño, Francisco Treviño y Jesús del Río por sus conversaciones filosóficas, especulativas e inductivas sobre la vida.

“El límite de una computadora es la inteligencia del programador.”

Autor desconocido

“¿Hasta dónde quieres llegar hoy?”

Microsoft

Las partículas se asocian para formar átomos, los átomos se asocian en moléculas, las moléculas en macromoléculas, éstas en células, luego en tejidos, órganos, sistemas y seres vivos, éstos a su vez también se asocian en familias, ciudades y países, asociados para compartir el mismo planeta, que está asociado con el sol y otros cuerpos a un sistema solar y este a una galaxia y luego al universo.

¿Habrá alguna “fuerza” que mantenga asociadas todas las cosas?

¿Habrá algo más allá de las partículas y del universo?

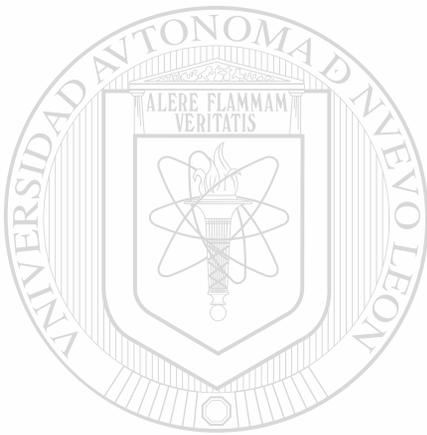
UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

LISTA DE TABLAS	V
LISTA DE FIGURAS	VI
NOMENCLATURA.....	VII
RESUMEN.....	IX
CAPÍTULO 1 INTRODUCCIÓN.....	1
1.1 EVOLUCIÓN MOLECULAR.....	1
1.2 HORMONA DEL CRECIMIENTO COMO MODELO EVOLUTIVO.....	3
1.3 HORMONAS DEL CRECIMIENTO.....	4
1.4 OBTENCIÓN DE LAS SECUENCIAS NUCLEOTÍDICAS.....	5
1.5 JUSTIFICACIÓN.....	5
CAPÍTULO 2 OBJETIVOS.....	7
2.1 OBJETIVO GENERAL.....	7
2.2 OBJETIVOS PARTICULARES.....	7
CAPÍTULO 3 MATERIAL Y MÉTODOS.....	8
3.1 ORIGEN DE LOS REACTIVOS.....	8
3.2 MATERIAL BIOLÓGICO.....	8
3.3 EQUIPO DE LABORATORIO.....	9
3.4 PAQUETES COMPUTACIONALES.....	9
3.5 ESTRATEGIA GENERAL.....	10
3.6 OBTENCIÓN Y ANÁLISIS DE LAS SECUENCIAS NUCLEOTÍDICAS Y AMINOACÍDICAS DE GH.....	10
3.6.1 OBTENCIÓN DE LAS SECUENCIAS.....	10
3.6.2 CONVERSIÓN DE LAS SECUENCIAS A UNA BASE DE DATOS LOCAL.....	13
3.6.3 SELECCIÓN DE LA MEJOR SECUENCIA DE CADA ESPECIE.....	13
3.6.4 AGRUPACIÓN DE LAS SECUENCIAS.....	13
3.6.5 ALINEAMIENTO DE LAS SECUENCIAS.....	14
3.7 DISEÑO DE LA SONDA “CONSENSO” PARA LAS GH.....	14
3.7.1 SELECCIÓN DE LA REGIÓN CONSERVADA COMO SONDA.....	14
3.7.2 AUMENTO DEL DESEMPEÑO DE LA SONDA.....	15
3.7.3 AJUSTES MANUALES DE LA SONDA.....	16
3.8 COMPROBACIÓN DE LA SONDA (GH-EXPLORER I).....	16
3.8.1 COMPROBACIÓN TEÓRICO – VIRTUAL DE LA SONDA.....	16
3.8.2 COMPROBACIÓN PRÁCTICA – EXPERIMENTAL DE LA SONDA.....	16
3.9 DISEÑO DE INICIADORES PARA PCR.....	18
3.10 COMPROBACIÓN DEL JUEGO DE OLIGONUCLEÓTIDOS DISEÑADOS PARA ARTIODÁCTILOS.....	19
3.10.1 AMPLIFICACIÓN DEL GEN DE LA GH A PARTIR DEL DNAG DE ARTIODÁCTILOS.....	19
3.10.2 COMPROBACIÓN DE LOS AMPLICONES.....	19

3.10.3 CLONACIÓN DEL AMPLICÓN DE JIRAF A Y ANÁLISIS DE LAS CLONAS RECOMBINANTES.....	20
3.10.4 SECUENCIACIÓN DE LAS CLONAS RECOMBINANTES DE JIRAF A.....	21
3.11 EXTRACCIÓN Y SEMICUANTIFICACIÓN DEL DNA GENÓMICO	21
CAPÍTULO 4 RESULTADOS.....	22
4.1 OBTENCIÓN, SELECCIÓN Y AGRUPACIÓN DE LAS SECUENCIAS NUCLEOTÍDICAS Y AMINOACÍDICAS.....	22
4.2 ALINEAMIENTO DE LAS SECUENCIAS.....	23
SELECCIÓN DE LA SONDA	24
4.3.1 COMPARACIÓN DE ALGORITMOS.....	24
4.3.2 DETERMINACIÓN DE LA POBLACIÓN DE OLIGONUCLEÓTIDOS POR EVALUAR.....	25
4.3.3 EVALUACIÓN DE LOS OLIGONUCLEÓTIDOS.....	26
4.4 DISEÑO DE LA SONDA (<i>GH-EXPLORER I</i>).....	29
4.5 COMPROBACIÓN DEL DESEMPEÑO DE <i>GH-EXPLORER I</i>	31
4.5.1 COMPROBACIÓN VIRTUAL DE <i>GH-EXPLORER I</i>	31
4.5.2 COMPROBACIÓN EXPERIMENTAL DE <i>GH-EXPLORER I</i>	33
4.6 DISEÑO DE OLIGONUCLEÓTIDOS INICIADORES PARA PCR.....	36
4.6.1 DISEÑO DE INICIADORES PARA ARTIODÁCTILOS.....	36
4.6.2 DISEÑO AUTOMATIZADO DE OLIGONUCLEÓTIDOS PARA PCR	37
4.7 COMPROBACIÓN DEL JUEGO DE INICIADORES DISEÑADO PARA ARTIODÁCTILOS.....	44
4.7.1 AMPLIFICACIÓN POR PCR EN ARTIODÁCTILOS.....	44
4.7.2 CLONACIÓN DEL AMPLICÓN DE JIRAF A	47
4.7.3 SECUENCIACIÓN DE LAS CLONAS RECOMBINANTES DE JIRAF A.....	48
CAPÍTULO 5 DISCUSIÓN	51
5.1 OBTENCIÓN Y COMPARACIÓN DE SECUENCIAS DE GH	51
5.2 DISEÑO DE LA SONDA.....	52
5.3 DISEÑO DE INICIADORES.....	55
5.4 IMPORTANCIA DE LA REGIÓN CONSERVADA EN EL EXÓN 5 DE GH.....	56
CAPÍTULO 6 CONCLUSIONES.....	59
CAPÍTULO 7 ANEXOS	60
7.1 ANEXO 1	60
7.1.1 INFORMES (173) DE SECUENCIAS NUCLEOTÍDICAS DE LA GH EN GENBANK.....	60
7.2 ANEXO 2	63
7.2.1 INFORMES (330) DE SECUENCIAS AMINOACÍDICAS DE LA GH EN GENBANK.....	63
7.3 ANEXO 3	68
7.3.1 INFORME RESULTADO DE LA CONSULTA EN BLAST DE LA SONDA <i>GH-EXPLORER I</i>	68
7.4 ANEXO 4	72
7.4.1 INICIADORES EN CDS DE LA GH.	72

CAPÍTULO 8 REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS 76



UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

®

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

LISTA DE TABLAS

TABLA 1.1 VELOCIDADES DE CAMBIO 2

TABLA 1.2 TOTAL DE SECUENCIAS REPORTADAS DE LA GH EN GENBANK 3

TABLA 3.1 DNA DE ESPECIES ENSAYADAS EN HIBRIDACIÓN CON SONDA..... 17

TABLA 3.2 MUESTRAS DE DNA USADAS EN ENSAYO DE SENSIBILIDAD DE HIBRIDACIÓN CON SONDA 17

TABLA 3.3 TAMAÑOS DE LOS GENOMAS 18

TABLA 3.4 CONDICIONES Y PASOS SEGUIDOS EN LOS ENSAYOS DE PCR 19

TABLA 4.1 ESPECIES ORDENADAS POR CLASIFICACIÓN 22

TABLA 4.2 TOTAL DE SECUENCIAS POR CLASE 23

TABLA 4.3 APAREAMIENTO DE LA SONDA GH-EXPLORER I A DNA DE DIFERENTES ESPECIES..... 35

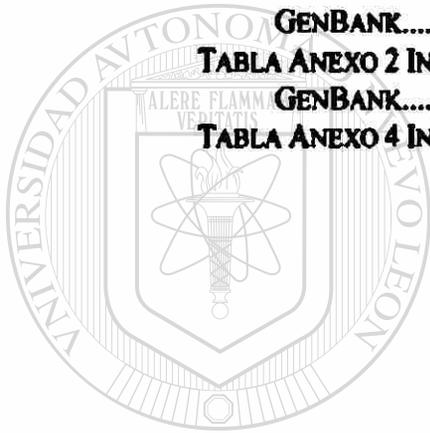
TABLA 4.4 CONJUNTO DE SECUENCIAS USADAS PARA EL DISEÑO DE INICIADORES 39

TABLA 4.5 CONJUNTO DE INICIADORES SELECCIONADOS..... 41

TABLA ANEXO 1 INFORMES DE SECUENCIAS NUCLEOTÍDICAS DE LA GH EN GENBANK..... 60

TABLA ANEXO 2 INFORMES DE SECUENCIAS AMINOACÍDICAS DE LA GH EN GENBANK..... 63

TABLA ANEXO 4 INICIADORES EN CDS DE LA GH 72



UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN



DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

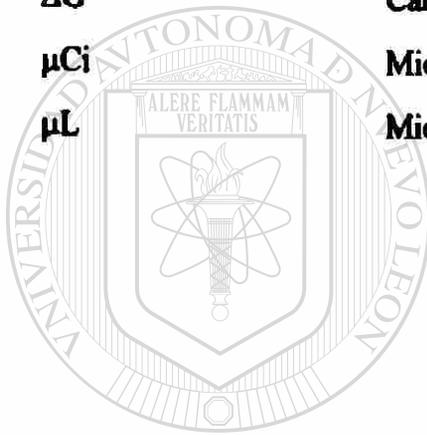
LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1.1 ESTRUCTURA TRIDIMENSIONAL DE LA GH PORCINA	4
FIGURA 3.1 ESTRATEGIA GENERAL.....	11
FIGURA 3.2 VISTA DE <i>BIOCODE EXPLORER</i>	12
FIGURA 3.3 ESTRATEGIA DE CLONACIÓN DEL AMPLICÓN	20
FIGURA 3.4 INICIADORES UTILIZADOS EN LA SECUENCIACIÓN DE LAS CLONAS	21
FIGURA 4.1 MATRIZ DE ALINEAMIENTO AMINOACÍDICO.....	24
FIGURA 4.2 COMPARACIÓN DE ALGORÍTMOS.....	25
FIGURA 4.3 FRECUENCIA DE ALINEAMIENTOS.....	26
FIGURA 4.4 INFORME DEL ALINEAMIENTO DE LA SONDA SEGÚN <i>MAXPROBE</i>	30
FIGURA 4.5 INFORME DEL APAREAMIENTO DE LA SONDA <i>GH-EXPLORER I</i> CON LAS SECUENCIAS DEL <i>GENBANK</i>	32
FIGURA 4.6 MEJORES APAREAMIENTOS.....	32
FIGURA 4.7 BAJO APAREAMIENTO.....	32
FIGURA 4.8 FALSO POSITIVO	33
FIGURA 4.A SEMICUANTIFICACIÓN DEL DNAG DE DIFERENTES ESPECIES	33
FIGURA 4.B DILUCIONES DE DNAG.....	34
FIGURA 4.9 HIBRIDACIÓN DE <i>GH-EXPLORER I</i> CON DNAG DE VARIAS ESPECIES... 35	
FIGURA 4.10 HIBRIDACIÓN DE <i>GH-EXPLORER I</i> CON TITULACIONES DE DNA	36
FIGURA 4.11 ALINEAMIENTO DE LA REGIÓN 5' UTR DE ARTIODÁCTILOS	37
FIGURA 4.12 ALINEAMIENTO DE LA REGIÓN 3' UTR DE ARTIODÁCTILOS	37
FIGURA 4.14 MAPA DE LAS POSICIONES DE APAREAMIENTO DE LOS INICIADORES PARA GH EN VERTEBRADOS	42
FIGURA 4.15 MAPA DE LOS INICIADORES PARA GH EN SECUENCIAS NO AMPLIFICADAS.....	43
FIGURA 4.20 GEL DE DNAG USADOS.....	44
FIGURA 4.21 CÁLCULO DEL TAMAÑO DEL AMPLICÓN.....	44
FIGURA 4.22 PRODUCTOS AMPLIFICADOS USANDO LOS INICIADORES DE ARTIODÁCTILOS	45
FIGURA 4.23 PURIFICACIÓN DEL FRAGMENTO A UTILIZAR COMO SONDA.....	46
FIGURA 4.24 HIBRIDACIÓN DE LOS AMPLICONES CON EL FRAGMENTO DE BGH ...	46
FIGURA 4.25 MINIPREPS DE LAS COLONIAS RECOLECTADAS.....	47
FIGURA 4.26 CARACTERIZACIÓN DE LOS INSERTOS.....	47
FIGURA 4.27 CARACTERIZACIÓN DEL AMPLICÓN.....	48
FIGURA 4.28 SECUENCIA DE DNAG DE <i>GIRAFFA CAMELOPARDALIS</i> (JCGH).....	49
FIGURA 4.29 COMPARACIÓN AMINOACÍDICA DE JCGH	50
FIGURA 5.1 APAREAMIENTO PROMEDIO DE LOS OLIGONUCLEÓTIDOS DE 32NT DE LONGITUD DERIVADOS DE LA SONDA FINAL.....	54
FIGURA 5.2 ALINEAMIENTO AMINOACÍDICO CON <i>GH-EXPLORER I</i>	58
FIGURA ANEXO 3 INFORME DE LA CONSULTA EN BLAST DE LA SONDA GH-EXPLORER I	69
FIGURA ANEXO 4 MAPA DE INICIADORES INTERNOS.....	74

NOMENCLATURA

°C	Grados centígrados
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DNAc	Ácido desoxirribonucleico complementario
BGH	Hormona del crecimiento bovino
Ci	Curies
Cols.	Colaboradores
Da	Daltones
e	10 elevado a una potencia
EDTA	Ácido etilendiaminotetracético
fg	fentogramos
GH	Hormona del crecimiento
h	Horas
hGH	Gen de la Hormona del crecimiento humano
GHR	Receptor de la hormona del crecimiento
HGH	Hormona del crecimiento humano
hGH-V	Gen variante de hormona del crecimiento humano
hPL-1	Gen 1 del lactógeno placentario humano
hPL-2	Gen 2 del lactógeno placentario humano
hPL-3	Gen 3 del lactógeno placentario humano
kb	Kilobases
M	Concentración molar
Mhz	Megahertz
Mb	Megabytes
min	Minutos
mL	Mililitros
ng	Nanogramos
nt	Nucleótidos
pb	Pares de bases

PCR	Reacción en Cadena de la Polimerasa
pg	picogramos
PRL	Prolactina
RNA	Ácido ribonucleico
RNA_m	RNA mensajero
rpm	Revoluciones por minuto
SD	Desviación estándar
seg	Segundos
U	Unidades
X	Veces la concentración original
ΔG	Cambio en la energía libre
μCi	Microcuries
μL	Microlitros



UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN



DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

RESUMEN

Víctor Manuel Treviño Alvarado

Fecha de Graduación: Mayo, 1999

Universidad Autónoma de Nuevo León

Facultad de Medicina

Título del Estudio:

**Obtención de Nuevos Genes de la
Hormona del Crecimiento en
Vertebrados**

Número de Páginas:79

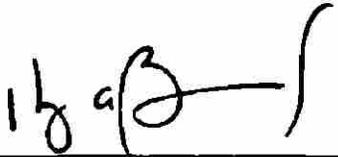
**Candidato para el Grado de Maestría
en Ciencias con especialidad en
Biología Molecular e Ingeniería
Genética**

Área de Estudio: Evolución Molecular

Propósito y Método del Estudio: Para hacer reconstrucciones evolutivas, la Paleontología, la Embriología y la Bioquímica han estado proporcionando datos muy importantes. Sin embargo, el desarrollo de la Biología Molecular ha proporcionado una nueva herramienta para la evolución: Las secuencias de DNA y de aminoácidos de los genes. Los genes más adecuados para realizar las reconstrucciones filogenéticas son aquellos que tienen una amplia representación entre las especies a estudiar. La hormona del crecimiento (GH) se ha encontrado en todos los vertebrados estudiados a la fecha, con 56 secuencias nucleotídicas completas reportadas más 26 en secuencias aminoácídicas, la GH cuenta con un número adecuado de material para estudiar su evolución. Sin embargo, los reportes son principalmente de especies de interés industrial más que científico, al disponer de nuevas secuencias de GH de especies de órdenes no estudiados, se podrían precisar las reconstrucciones filogenéticas. Nos propusimos diseñar varios oligonucleótidos: iniciadores que permitan amplificar por PCR el gen de la GH y una sonda para tamizar bancos genéticos. Para eso, diseñamos una metodología de búsqueda de secuencias consenso analizando todos los oligonucleótidos de las secuencias en cuestión basada en dos etapas, la primera, calificando cada oligonucleótido con el número promedio de nucleótidos iguales a cada secuencia; y la segunda, evaluando los oligonucleótidos mejor calificados en la primera etapa con fórmulas específicas propias de los ensayos de PCR o de hibridación.

Contribuciones y Conclusiones: Logramos encontrar un fragmento altamente conservado en todas las secuencias de GH, mismo que sirvió de base para el diseño de una sonda. La utilidad de la sonda fue demostrada experimentalmente en ensayos de hibridación. La región conservada coincide con una de las regiones que intervienen en la unión a su receptor y está altamente conservada a lo largo de los vertebrados. Se logró diseñar iniciadores para amplificar por PCR el gen de la GH de diferentes órdenes de vertebrados y se comprobó el desempeño de un juego amplificando, clonando y secuenciando el gen de la GH de jirafa. La metodología diseñada para el estudio del gen de la GH, se puede aplicar a cualquier secuencia genética y el análisis se facilitó automatizando el proceso desarrollando programas de computadora.


Dra. Agnés Revol de Mendoza
ASESORA


Dr. Hugo A. Barrera Saldaña
COASESOR

Capítulo 1

Introducción

La teoría de la *Evolución* (Darwin, 1859) expresa que cada especie se derivó a partir de otra más simple. Esto ocurre gracias a un proceso llamado *Selección Natural*, donde el medio ambiente escoge de entre los individuos que compiten entre sí a los individuos genéticamente más aptos para sobrevivir y reproducirse. Darwin hizo una construcción de un árbol evolutivo de acuerdo con las características físicas de las especies. Después, conforme los científicos avanzaron en sus investigaciones, se fueron dando cuenta de que la construcción hecha por Darwin era valiosa pero un tanto "áspera"; pues solo comparaba las especies por su apariencia externa, zona geográfica y alimentación, entre otros. Esta información no podía responder con objetividad cuál era el orden consecutivo en que fueron surgiendo las especies, ni el tiempo que había transcurrido desde su divergencia. Además, los científicos no estaban totalmente de acuerdo en que la apariencia externa pudiera ser el factor determinante. Poco a poco fueron surgiendo otras ramas de la ciencia que también han aportado datos valiosos: 1) la *Anatomía Comparada*, que hace comparaciones de las estructuras óseas, identificando patrones de formación de los huesos; 2) la *Paleontología*, que usa fósiles para calcular el tiempo en que existieron las especies incluso muchas de ellas ya desaparecidas, además, proporciona datos de la estructura ósea, apariencia y en algunos casos hasta de las posibles formas de alimentación, movimiento y comportamiento; 3) la *Embriología Comparada*, que reconstruye la historia evolutiva comparando patrones de desarrollo del embrión; y 4) la *Inmunología y Bioquímica*, que proporcionan datos en el ámbito molecular acerca de reacciones enzimáticas, y estimación de similitud proteica y nucleotídica. Entonces, se ha reconstruido la historia evolutiva comparando desde rasgos burdos como la apariencia hasta datos moleculares. Recientemente con el desarrollo explosivo de la Biología Molecular se pueden ahora obtener las secuencias nucleotídicas de los genes (y también deducir las aminoácidos correspondientes) y con éstas, hacer comparaciones hasta el nivel nucleotídico, el nivel *elemental* del *programa genético* responsable del desarrollo de los organismos. Esta última información ha ido modificando, clarificando e incluso corrigiendo lo que se sabía anteriormente (O'Brien, 1993), creando el camino para una rama de la ciencia, relativamente nueva: La *Evolución Molecular*.

1.1 Evolución Molecular

La Evolución Molecular comprende tres áreas de estudio: (1) *La evolución de macromoléculas*, que se refiere a las velocidades y patrones de cambio que ocurren en el material genético y sus productos durante la evolución, así como a los posibles mecanismos de dichos cambios; (2) *la filogenia molecular* que estudia la reconstrucción de la historia evolutiva de macromoléculas y organismos deducidos de datos moleculares, y (3) *el origen*

de la vida, que estudia los posibles eventos y mecanismos que pudieron originar la vida en nuestro planeta (Li y Graur, 1991).

Es bien conocido que el DNA de todos los organismos está expuesto a cambios en su secuencia por diversos mecanismos llamados *recombinaciones*, *deleciones*, *inserciones* y *mutaciones puntuales*. Estos cambios ocurren a lo largo de todo el genoma y con relativa frecuencia. Sin embargo, dada la relevancia de la región mutada y el tipo de mutación, los cambios no *persisten* uniformemente en todo el genoma a través de las generaciones. Se ha demostrado en diversos estudios que las velocidades de dichos cambios (número de cambios en un sitio por unidad de tiempo) varían entre las diferentes regiones genéticas (regiones codificantes reguladoras e intergénicas); y aún entre ellas mismas (Tabla 1.1). Por estas razones, es deseable analizar la secuencia más completa del gen. Comparando las secuencias nucleotídicas o aminoácidas de un mismo gen entre diferentes especies, se pueden calcular en función del número de cambios y sus patrones, la cronología y las velocidades a las que ocurrieron estos cambios. Estos datos sirven para construir árboles filogenéticos que relacionan las proteínas o las especies entre sí. Al hacer reconstrucciones de árboles filogenéticos, se necesita de secuencias que tengan al menos algunas variaciones, ya que sin éstas no se podría hacer la reconstrucción. Al mismo tiempo, si existen muchas variaciones entre las secuencias, la reconstrucción puede ser difícil o poco confiable. Generalmente se usan secuencias que tengan variación moderada y que estén distribuidas entre las especies en estudio. También se usan secuencias de baja relevancia como pseudogenes para normalizar las estimaciones en tiempo de divergencia en las reconstrucciones.

Tabla 1.1 Velocidades de cambio de diferentes regiones génicas.

Secuencia [‡]	Longitud (aa)	Velocidad [†]
Histona 3 (mutaciones no sinónimas [‡])	135	0.00 ± 0.00
Histona 3 (mutaciones sinónimas)	135	6.38 ± 1.19
Hormona de Crecimiento (mutaciones no sinónimas)	189	1.23 ± 0.15
Hormona de Crecimiento (mutaciones sinónimas)	189	4.95 ± 0.77
Interferón γ (mutaciones no sinónimas)	136	2.79 ± 0.31
Interferón γ (mutaciones sinónimas)	136	8.59 ± 2.56
5' UTR Hormona de Crecimiento	21	1.79 ± 0.85
3' UTR Hormona de Crecimiento	91	1.83 ± 0.41
5' UTR Apolipoproteína A-IV	83	3.06 ± 0.68
3' UTR Apolipoproteína A-IV	134	1.73 ± 0.33
α y β Globina pseudogenes (vaca y cabra)		9.10 ± 0.90

[‡] Varían con la relevancia de la región y el tipo de mutación. Los cálculos fueron hechos a partir de secuencias de humano, ratón y rata, excepto donde se indica.

[†] El tiempo de divergencia se fijó en 80 millones de años. Las velocidades son mostradas en unidades de número de sustituciones por sitio por 10^9 años (extraído de Li y Graur, 1991).

[‡] Mutaciones no sinónimas son las que ocurren en las secuencias codificantes y cuya mutación produce también un cambio de aminoácido.

Se pueden construir árboles filogenéticos a partir de secuencias aminoácidas o nucleotídicas. Sin embargo, la mayor resolución se alcanza con las últimas, ya que cada residuo de aminoácido es codificado por 3 nucleótidos, dando 61 tripletes o codones para los 20 aminoácidos. En la actualidad es más fácil obtener la secuencia nucleotídica que la

aminoacídica; además, de la primera se puede deducir la segunda. De igual manera se pueden construir árboles filogenéticos de secuencias codificantes, no codificantes o ambas, y dado que las velocidades de cambio dependen de la cantidad de diferencias por nucleótido, entre más extensa sea la secuencia por analizar, mayor será la resolución en el cálculo de las velocidades.

Conforme el número de secuencias entre especies evolutivamente “lejanas” aumente, se incrementa la ramificación del árbol filogenético de las especies y se eleva la confiabilidad de sus bifurcaciones; y conforme aumente el número de secuencias entre especies evolutivamente “cercanas”, se van resolviendo las ramillas o las hojas de su rama. En la actualidad existen programas computacionales que ayudan en la realización de estos cálculos, y en la reconstrucción de árboles filogenéticos basándose en ciertos criterios y algoritmos. Entre otros, se encuentran el PHYLIP y CLUSTALW (Higgins, 1994) que realizan un análisis comparativo de las secuencias y proporcionan un árbol, matriz de cambios y/o alineamiento de las secuencias.

En síntesis, para construir un árbol filogenético, se requiere: (1) escoger el gen a estudiar como modelo evolutivo; (2) aumentar el número de secuencias conocidas de este mismo gen entre las diferentes especies, requiriéndose una metodología que facilite la obtención de dichas secuencias; y (3) utilizar modelos matemáticos para analizar las secuencias y construir el árbol evolutivo.

1.2 Hormona del Crecimiento como Modelo Evolutivo

Las hormonas del crecimiento (GHs) pertenecen a una familia de hormonas con similitud estructural y que incluye también a las prolactinas y lactógenos placentarios (PLs) (Sherwood, 1971; Niall y cols, 1971). Se cree que en los pre-vertebrados los genes de prolactina y GH se originaron de un gen ancestral común por duplicación génica seguida por la divergencia de los productos y que el producto polipeptídico de este gen ancestral debió parecerse más a la prolactina (Niall y cols., 1971; Seeburg, 1982; Miller & Eberhardt, 1983). En primates, una segunda duplicación ahora en el gen de la GH, dio origen a los PLs. Tanto la prolactina como la GH están presentes en todos los vertebrados estudiados hasta la fecha (Niall, 1971), entonces el estudio de la GH como modelo evolutivo nos daría datos relevantes para la reconstrucción de árboles filogenéticos exclusivamente de vertebrados. A pesar de que hay muchas secuencias reportadas, hay una tendencia hacia las especies de interés comercial y no tanto a las de relevancia evolutiva.

Tabla 1.2 Total de secuencias de la GH reportadas en GenBank.

Clases	Secuencias Nucleotídicas Reportadas
Peces	41
Anfibios	3
Reptiles	0
Aves	1
Mamíferos	17
Marsupiales	1

1.3 Hormonas del Crecimiento

Las GHs de mamíferos en su forma madura son péptidos de alrededor de 190 aminoácidos con un peso molecular de 22,000Daltones (22KDa), iniciando generalmente con un residuo fenilalanina. La forma precursora tiene alrededor de 215 aminoácidos incluyendo en su extremo amino terminal un péptido señal de 25 aminoácidos. Estas hormonas son producidas y secretadas por los somatotrofos de la hipófisis anterior y estimulan el crecimiento lineal en los animales. Las GHs contienen dos enlaces disulfuro entre cisteínas que estabilizan la estructura tridimensional activa, no contienen glucosilaciones (Niall y cols., 1973; Santomé y cols., 1973; Sato y cols., 1988) y sus características las hacen muy factibles de secuenciar (Ascacio-Martínez, 1994; Castro-Peralta, 1995) y producir en microorganismos (Escamilla, 1996; Gallardo-Blanco, 1998).

Se ha observado que todas las GHs presentan efectos fisiológicos muy similares en los vertebrados estudiados, pero a veces no solo pueden ser activas en la especie de origen sino también en especies que se sitúan abajo en la escala evolutiva. Por ejemplo, la GH bovina, se usa para estimular el crecimiento en peces, pero la GH de peces no ha mostrado actividad en bovinos (Juskevich, 1988).

La estructura de los genes de las GHs está muy conservada, formada por 5 exones separados por 4 intrones, con ciertas excepciones en algunos peces Salmoniformes que presentan 6 exones y 5 intrones. Las estructuras terciarias se caracterizan por presentar 4 hélices α que están conservadas (Figura 1.1) en mamíferos como lo muestran las estructuras cristalográficas de las GHs del cerdo (Abdel-Mequid y cols., 1987) y del humano (De Voss y cols., 1992), así como la predicha para la vaca (Carlacci y cols., 1991).

En la actualidad se cuenta con las secuencias nucleotídicas y/o aminoacídicas de la GH de varias especies particularmente en las de interés agropecuario (Tabla 1.2). Mayoritariamente solo está disponible la secuencia de aminoácidos. En cuanto a la secuencia nucleotídica, frecuentemente solo se conocen las secuencias que codifican para las proteínas (RNAm o DNA complementario - DNAc -) y éstas son todavía parciales en algunos casos. No obstante, existen muchas especies y órdenes en los cuales no se ha reportado secuencia alguna hasta ahora.

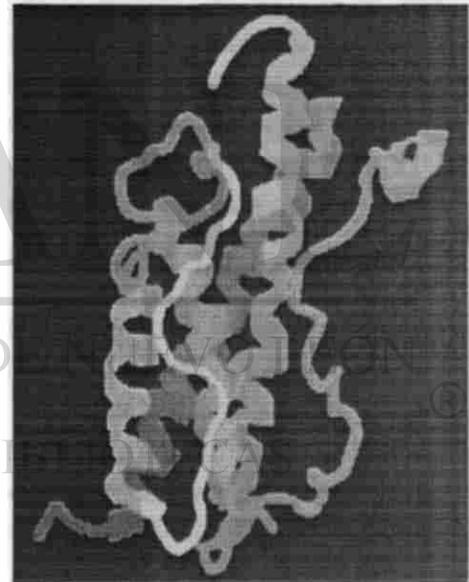


Figura 1.1 Estructura tridimensional (3D) de la GH porcina. En diferentes colores se muestran las 4 hélices α (recreada en RasMol v2.6).

1.4 Obtención de las Secuencias Nucleotídicas

El material genético se puede obtener tanto del DNA de células nucleadas e indirectamente del RNAm de células que expresan el gen a estudiar, una vez que en el laboratorio se retrotranscribe a DNA por la acción enzimática de una transcriptasa reversa. El DNA resultado de transcripción reversa es llamado DNA complementario (DNAc) y no incluye intrones, ya que proviene del RNAm maduro.

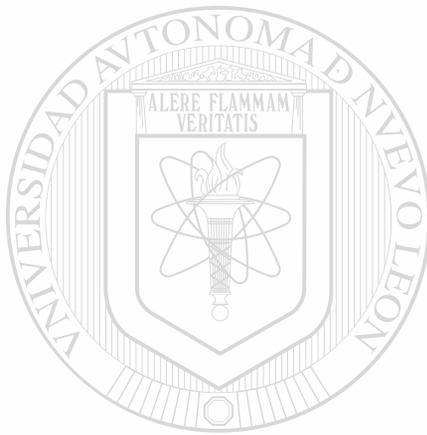
Originalmente las secuencias nucleotídicas se obtuvieron al tamizar bancos de genes o genotecas de DNA genómico (DNAg) y bancos de DNAc. Para construirlos, se purifican a partir del tejido de interés, el DNAg o los RNAm. El material se fragmenta cortando con enzimas de restricción el DNAg o se prepara retro-transcribiendo el RNAm en DNAc. La construcción del banco se logra insertando los fragmentos de DNA en un vector derivado de un fago lítico por ejemplo, que se usa para infectar bacterias. La selección de las clonas que tienen el fragmento de interés se puede hacer por hibridación del DNA con sondas homólogas o heterólogas, o por actividad inmunológica o enzimática del producto. Ya seleccionada la colonia fágica, se extrae el DNA, se corta y se obtiene la secuencia del fragmento que contiene. Así, se obtuvo de hipófisis de la trucha arco iris *Oncorhynchus mykiss*, el DNAc de la GH (Agellon y cols., 1986). Cuando no se tiene información sobre la proteína en estudio de una especie dada, pero se conoce la de la proteína homóloga en otra especie relativamente cercana, se pueden utilizar en el tamizaje sondas heterólogas de la especie conocida. De esta manera, por ejemplo, se obtuvieron el DNAc de *Caranx delicatissimus* al usar una sonda de *Seriola quinqueradiata* (Yamakawa y cols., 1988) y para el DNAc de cabra, se utilizó el DNAc de vaca (Yamano y cols. 1988). El gen de la GH bovina se obtuvo a partir de DNAg de hígado cortado con *EcoRI* y clonado en un vector derivado del bacteriófago λ (Gordon y cols. 1982).

Con el incremento de secuencias reportadas y con la aparición de la Reacción en Cadena de la Polimerasa conocida como PCR (por sus siglas del inglés), la obtención de secuencias nucleotídicas se ha facilitado enormemente. Al tener los oligonucleótidos adecuados, se puede amplificar el fragmento de interés y evitar la construcción del banco. Así se obtuvieron la secuencia de DNAc de perro *Canis familiaris* (Ascacio-Martinez y cols., 1995), de gato *Felis catus* (Castro-Peralta y cols., 1995), y de caballo *Equus caballus* (Ascacio-Martinez y cols., 1995).

1.5 Justificación

Diseñando oligonucleótidos consenso de un grupo de especies, se puede amplificar específicamente el gen de la GH por PCR sin la necesidad de construir un banco. Para los casos en los que no se logra obtener un producto de PCR de la GH usando los oligonucleótidos diseñados y para aprovechar los bancos construidos, se puede diseñar un oligonucleótido consenso que sirva para sondear un banco.

En la actualidad, se conocen al menos 4060 especies vivientes de mamíferos, de las cuales 171 (4%) corresponden a Artiodáctilos y a pesar de que es el 5° orden con más especies, es el orden con más secuencias conocidas de DNA de la GH (7 especies, 5%) gracias a su interés agropecuario. Sin embargo de la familia de *Giraffa camelopardalis*, todavía no existe una secuencia de GH reportada. Los Artiodáctilos, constituyen entonces un buen modelo para tratar de diseñar oligonucleótidos consenso que permitan amplificar sus genes de la GHs. Al mismo tiempo, se podría diseñar un oligonucleótido consenso que al usarse como sonda y facilitar el aislamiento de los genes de las GHs de cualquier vertebrado.



UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN



DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

Capítulo 2

Objetivos

Contribuir al conocimiento de la filogenia molecular, facilitando la obtención de nuevas secuencias de la hormona del crecimiento mediante el desarrollo de oligonucleótidos específicos para diferentes órdenes de vertebrados.

2.1 Objetivo General

Diseñar un método que facilite la detección de genes de las hormonas del crecimiento de vertebrados.

2.2 Objetivos Particulares

1. Recuperar las secuencias nucleotídicas y/o aminoacídicas de las hormonas del crecimiento (GH) reportadas en los bancos de información existente.
2. En función de la clasificación de las especies, agrupar y alinear dichas secuencias de GHs, seleccionando de cada especie el informe de la secuencia más completa o más actualizada.
3. Seleccionar una región altamente conservada en la escala evolutiva que permita diseñar un(os) oligonucleótido(s) como sonda para tamizar bancos de DNAg o DNAc.
4. Comprobar la utilidad los oligonucleótidos tanto en el laboratorio (por hibridación con DNA de varias especies) y en computador (por comparación con las secuencias reportadas).
5. En los órdenes donde sea factible, diseñar oligonucleótidos consenso que permitan obtener el gen de la GH, amplificando por PCR.
6. Confirmar la utilidad del juego de oligonucleótidos diseñado para Artiodáctilos, amplificando a partir del DNA genómico de jirafa, su gen de la GH.

Capítulo 3

Material y Métodos

3.1 Origen de los Reactivos

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

La enzima *Taq* DNA polimerasa, dNTP's y reactivos necesarios para realizar la PCR fueron adquiridos de Promega (Madison, WI, USA).

La enzima T4 polinucleótido cinasa y su solución amortiguadora fue adquirida de New England Biolabs, Inc. (United Kingdom).

El juego de hexanucleótidos fue adquirido de Gibco BRL (Gaithersburg, MD, EUA).

Los nucleótidos radioactivos [³²P]-αdATP y [³²P]-γdATP NEG502Z se adquirieron de las compañías Amersham International (Buckinghamshire, UK) y New England Nuclear (Boston, MA, EUA) respectivamente.

El DNA del fago λ usado como control negativo marcador de peso molecular en los geles fue adquirido en Gibco BRL (Gaithersburg, MD, EUA).

El Kit de secuenciación AmpliCycle fue de Perkin-Elmer Cetus (Norwalk, CT, EUA).

El oligonucleótido (*GH-Explorer 1*) usado como sonda general de la GH en ensayos de hibridación fue sintetizado por Life Technologies (Gibco-BRL, Gaithersburg, MD, EUA).

El juego de oligonucleótidos para Artiodáctilos fue sintetizado en el laboratorio de Química Biomolecular de la ULIEG.

3.2 Material Biológico

El vector utilizado para la clonación del producto amplificado de la hormona del crecimiento de jirafa, pBS(II)-SK+, se obtuvo de la plasmidoteca de la ULIEG.

El plásmido pPic9kBGH (Gallardo y cols., 1998) usado para obtener un fragmento de 494pb utilizado como sonda fue obtenido de la plasmidoteca de la ULIEG, construido y proporcionado amablemente por el Biol. Hugo Gallardo y el Dr. Hugo Barrera.

El plásmido pBR322 usado como control negativo y de peso molecular en los experimentos de hibridación fueron obtenidos de la plasmidoteca de la ULIEG y proporcionados por J. Claudio Moreno Rocha.

El plásmido pBS-hPL-3 usado como marcador de peso molecular fue obtenido de la plasmidoteca de la ULIEG, proporcionado y construido por el Biólogo y M. C. J. Claudio Moreno Rocha.

El plásmido pSV-hPL-1 usado como problema en una hibridación fue obtenido de la plasmidoteca de la ULIEG.

El tejido placentario y sangre de jirafa así como la sangre de gamo, cebrá y avestruz utilizados para la extracción de DNA, amplificación y clonación de la GH, fueron

proporcionados por la Ing. Rocío García Rojas del Departamento de Veterinaria de Africom Safari de Puebla, México.

Las muestras obtenidas de sangre de puerco, vaca y cabra utilizados para la extracción de DNA, fueron obtenidas del Rastro Municipal de Monterrey, Nuevo León, México.

Los tejidos de tiburón, catarán, guppy, carpa, tilapia, ameca y serpiente fueron donados por el Dr. Roberto Mendoza y por el Dr. Carlos Aguirre del Laboratorio de Fisiología y del Museo de Historia Natural respectivamente, ambos de la Facultad de Ciencias Biológicas de la UANL.

El tejido de pollo fue donado por Vicant Representantes Internacionales S. de R.L.C.V., en Monterrey, Nuevo León, México.

El tejido de lagartija y tortuga fue donado por Lucia Elizabeth Cuéllar Chávez.

El tejido placentario de gato fue donado por el Departamento de Fisiología de la Facultad de Medicina de la UANL y proporcionado por M.C. y Q.F.B. Ana María Sifuentes Rincón.

Una fracción del DNA humano fue extraída de sangre del M.C. y Biol. J. Claudio Moreno Rocha del laboratorio de Biología Molecular de la ULIEG.

El DNA de gamo, búfalo americano y una fracción del DNA humano fueron proporcionados por la Q.C.B. Dolores Esquivel del laboratorio de Biología Molecular de la ULIEG de la Facultad de Medicina de la UANL.

El tejido de la cepa de ratón CD1 fue donado por el Departamento de Inmunología de la Facultad de Medicina de la UANL, y proporcionado por M.C. y Q.F.B. Irma Martínez Ávila.

Todo el material biológico, aunque no representa algún riesgo para la salud, fue manejado siguiendo los requerimientos impuestos por la Secretaría de Salud. El manejo de productos radiológicos se realizó siguiendo los lineamientos de la Comisión Nacional de Seguridad Nuclear y Salvaguarda de la Secretaría de Energía.

3.3 Equipo de Laboratorio

Se utilizaron microcentrifugas *Eppendorf* modelos 5402 y 5415, fuentes de poder *EC600* e *ISCO494*, un agitador de tubos (vortex) modelo *Maxi Mix*, una placa agitadora con control de temperatura modelo *PC320* marca *Corning*, un ultracongelador marca *So-Low* de *Environmental Equipment*, una campana de flujo laminar marca *Labconco Corporation*, dos termocicladores modelo *PT150* y *PT100* marca *MJ Research*, una báscula digital marca *Sartorius* modelo *1206MP*, un equipo de secuenciación *Genomyx* de *Genomyx Corporation*, un horno incubador *Hybrid Incubator*, así como material clásico de laboratorio.

3.4 Paquetes Computacionales

Se utilizaron los paquetes incluidos en *Microsoft Office '97*, *Word* como procesador de texto, *PowerPoint* como editor de diapositivas y *Excel* como creador de hojas de cálculo. Un sistema *UMAX Scan* (©1990-1991 *UMAX Scanner Driver*, *Impact Research Inc*) de

adquisición de imágenes y como manejador Adobe Photoshop Limited Edition 2.5.1. Un sistema modelo Gel-Doc 1000 de BioRad (U. K.) como digitalizador de imágenes de geles y/o películas y el *Molecular Analyst* incluido con este sistema como cuantificador.

Para análisis en Biología Molecular, se usó *Amplify* v1.2b (Bill Engels © 1992 University of Wisconsin Genetics M. Madison, WI, EUA), *DNA Strider*TM v1.1 (© Chemical Merck and C.E.A. 1989 Service de Biochimie-Départament de Biologie-Institut de Recherche Fondamentale-CEA-FRANCE), *OLIGO* v4.0 (© 1992, Plymouth, Mn, EUA).

Para los alineamientos se utilizó *CLUSTALW* versión PC.

Para los análisis densitométricos de las hibridaciones se utilizó *ImageTool* v1.28 (© 1995-1997 The University of Texas Health Science Center en San Antonio, Texas, EUA).

Para el almacenamiento en base de datos y desarrollo de programas se utilizó *Visual Basic* v5.0 (© Microsoft Corp.) y *Visual C++* v5.0 (© Microsoft Corp.) respectivamente.

3.5 Estrategia General

Para conseguir los objetivos planteados en este proyecto, se propuso la estrategia general que se muestra en la Figura 3.1.

3.6 Obtención y Análisis de las Secuencias Nucleotídicas y Aminoacídicas de GH

3.6.1 Obtención de las Secuencias

Para obtener las secuencias, se usaron las direcciones de Internet del GenBank:

www.ncbi.nlm.nih.gov/Entrez/nucleotide.html

www.ncbi.nlm.nih.gov/Entrez/protein.html

Se introdujo la consulta:

<"growth hormone"[Protein Name] | "somatotropin"[Protein Name]>*

* El símbolo "|" en computación significa "OR" que quiere decir "O" (alternativa) y se usa para no provocar confusión con la palabra "OR". Los símbolos "<>" se utilizan para delimitar una expresión literal.

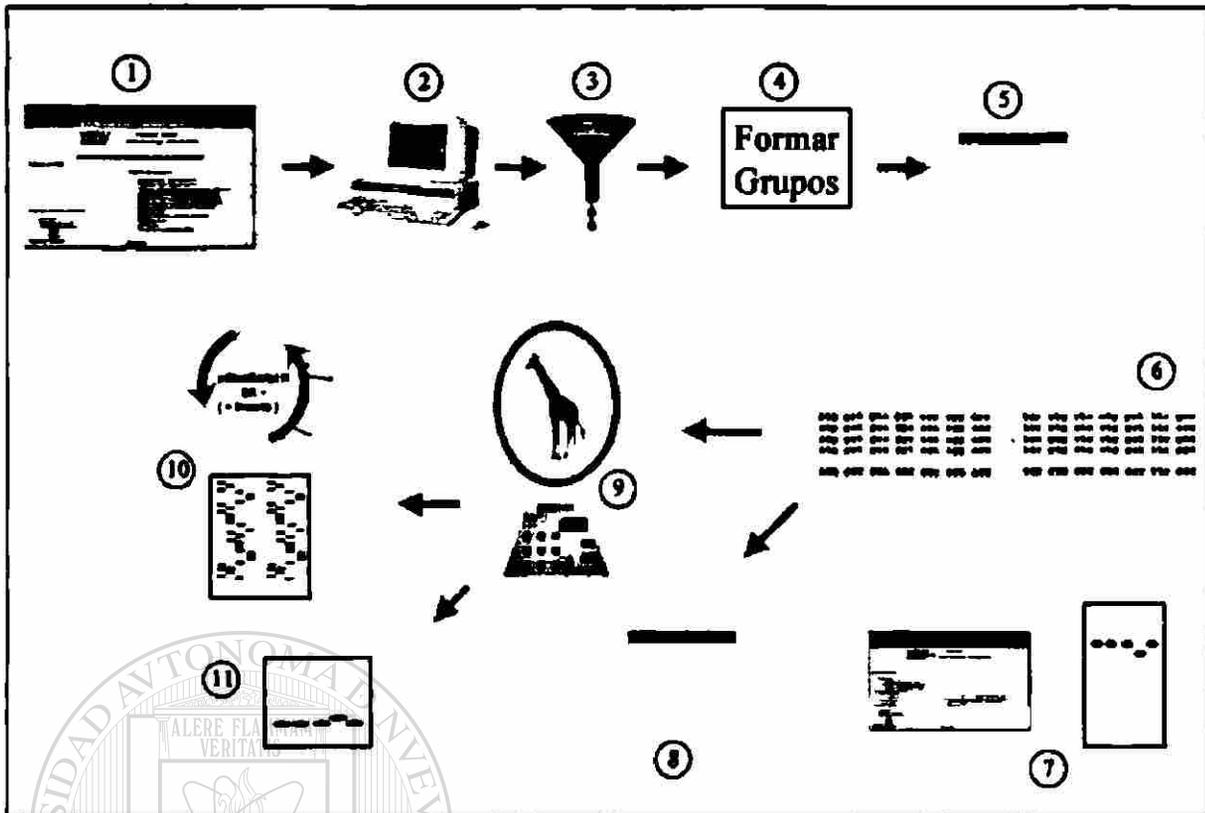


Figura 3.1 Estrategia General. Se ilustran los pasos seguidos en el trabajo y que son: 1) Obtención de las Secuencias. 2) Conversión y almacenamiento local. 3) Filtrado. 4) Agrupación. 5) Alineamiento por grupos. 6) Diseño de iniciadores consenso y sonda(s). 7) Comprobación teórica-virtual y/o práctica de la(s) sonda(s). 8) Comprobación teórica-virtual de los iniciadores. 9) Amplificación de la GH de jirafa usando iniciadores de Artiodáctilos. 10) y 11) Comprobación del producto amplificado por clonación y secuenciación y/o por hibridación con sonda conocida.

Es conocido que existen versiones diferentes de la hormona y, además, variaciones al nombrarlas teniendo nombres como "growth hormone a", "b", "c", "1", "2", "i", "ii", algunos otros como "growth hormone precursor", "pregrowth hormone" y combinaciones. Para resolver esto, primero se obtuvieron todas las variaciones en cada uno de los dos términos usando el valor "List Terms" en la opción "Mode" en la misma página. Los términos usados fueron los siguientes:

growth hormone
 growth hormone 12
 growth hormone 9d
 growth hormone alt
 growth hormone factor i
 growth hormone gh precursor
 growth hormone ii
 growth hormone precursor aa 17 to
 growth hormone precursor aa 25 to 191
 growth hormone prohormone
 growth hormone wt

 somatotropin
 somatotropin 2 splice frame 2 precursor

growth hormone 1
 growth hormone 2
 growth hormone a
 growth hormone b
 growth hormone gh 1
 growth hormone i
 growth hormone ii precursor
 growth hormone precursor aa 17 to 187
 growth hormone precursor aa 28 to 190
 growth hormone type 2
 growth prehormone aa 12 to 173
 somatotropin 1 precursor
 somatotropin 20k

growth hormone 1 precursor
 growth hormone 2 precursor
 growth hormone aa 1 217
 growth hormone c variant
 growth hormone gh 2
 growth hormone i precursor
 growth hormone precursor
 growth hormone precursor aa 23 to 188
 growth hormone prepeptide

 growth hormone variant
 pregrowth hormone

 somatotropin 2 precursor
 somatotropin 22k

somatotropin a
 somatotropin i
 somatotropin ii precursor
 somatotropin, variant

somatotropin alpha chain
 somatotropin i precursor
 somatotropin precursor i

somatotropin b
 somatotropin ii
 somatotropin precursor ii

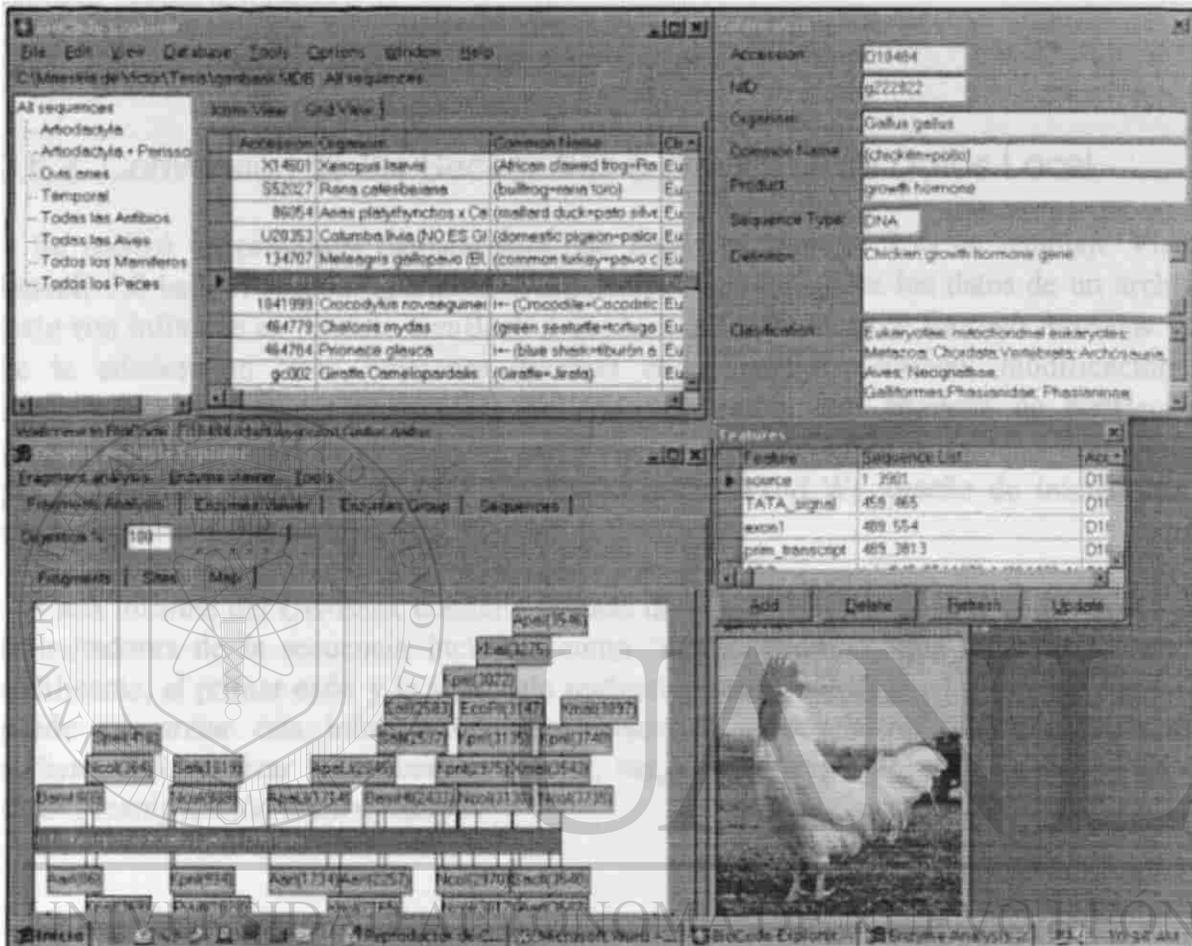


Figura 3.2 Vista de *BioCode Explorer*. Se muestra información de la secuencia seleccionada y un mapa de restricción.

Por lo tanto, la consulta definitiva fue:

```

((((((((((((((((((((((((((((((((((((((((("growth hormone"[Protein Name] OR "growth hormone 1"[Protein Name]) OR "growth hormone 1 precursor"[Protein Name]) OR "growth hormone 12"[Protein Name]) OR "growth hormone 2"[Protein Name]) OR "growth hormone 2 precursor"[Protein Name]) OR "growth hormone 9d"[Protein Name]) OR "growth hormone a"[Protein Name]) OR "growth hormone aa 1 217"[Protein Name]) OR "growth hormone alt"[Protein Name]) OR "growth hormone b"[Protein Name]) OR "growth hormone c variant"[Protein Name]) OR "growth hormone factor i"[Protein Name]) OR "growth hormone gh 1"[Protein Name]) OR "growth hormone gh 2"[Protein Name]) OR "growth hormone gh precursor"[Protein Name]) OR "growth hormone i"[Protein Name]) OR "growth hormone i precursor"[Protein Name]) OR "growth hormone ii"[Protein Name]) OR "growth hormone ii precursor"[Protein Name]) OR "growth hormone precursor"[Protein Name]) OR "growth hormone precursor aa 17 to"[Protein Name]) OR "growth hormone precursor aa 17 to 187"[Protein Name]) OR "growth hormone precursor aa 23 to 188"[Protein Name]) OR "growth hormone precursor aa 25 to 191"[Protein Name]) OR "growth hormone precursor aa 26 to 190"[Protein Name]) OR "growth hormone prepeptide"[Protein Name]) OR "growth hormone prohormone"[Protein Name]) OR "growth hormone type 2"[Protein Name]) OR "growth hormone variant"[Protein Name]) OR "growth hormone wt"[Protein Name]) OR ("growth hormone aa 12 to 173"[Protein Name] OR "somatotropin"[Protein Name])
    
```

```
OR (((((((((((("somatotropin 1 precursor"[Protein Name] OR "somatotropin 2 precursor"[Protein Name]) OR "somatotropin 2 splice form 2 precursor"[Protein Name]) OR "somatotropin 20k"[Protein Name]) OR "somatotropin 22k"[Protein Name]) OR "somatotropin a"[Protein Name]) OR "somatotropin alpha chain"[Protein Name]) OR "somatotropin b"[Protein Name]) OR "somatotropin i"[Protein Name]) OR "somatotropin i precursor"[Protein Name]) OR "somatotropin ii"[Protein Name]) OR "somatotropin ii precursor"[Protein Name]) OR "somatotropin precursor i"[Protein Name]) OR "somatotropin precursor ii"[Protein Name]) OR "somatotropin, variant"[Protein Name]))
```

3.6.2 Conversión de las Secuencias a una Base de Datos Local

Se realizó un programa llamado *BioCode Explorer* (Figura 3.2) en lenguaje Visual Basic® 5.0 bajo el sistema operativo Windows®95 que transfiere los datos de un archivo texto con informes en formato GenBank a una base de datos local en formato Access® 1.1. Se le adicionaron otras funciones diversas como edición (adición, modificación y eliminación) de secuencias, análisis de codones, cortes con enzimas de restricción, visualización del mapa de restricción, extracción y exportación de secuencias delimitadas por marcadores, alineamiento (por ligación con CLUSTALW), diseño de iniciadores y sondas consenso, entre otros.

Cada informe del GenBank contiene además de la información general de la secuencia, delimitadores de la secuencia incluida, como "cds", "exon1", "tata_signal" (secuencia codificante, el primer exón y la señal tata respectivamente, entre otros). *BioCode Explorer* puede interpretar esta información para extraer la secuencia referida y manipularla, pudiendo así, analizar las secuencias (cortar, ver, alinear, exportar, etc.) sin necesidad de alguna manipulación extra o manual.

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

3.6.3 Selección de la Mejor Secuencia de Cada Especie

Con *BioCode Explorer* se ordenaron las secuencias por especie (organismo). Se activaron las "ventanas" de información acerca de las secuencias. En cada especie, se seleccionaron aquellos informes obsoletos o incompletos y se eliminaron activando la opción "delete sequences". Éste proceso se repitió hasta tener una sola secuencia de cada especie.

3.6.4 Agrupación de las Secuencias

Usando *BioCode Explorer* se ordenaron las secuencias en base a la clasificación y se exportaron usando la opción "Export Information" y se analizaron en *Excel*. El nivel de la clasificación para la agrupación fue variable según el número de secuencias "cercanas" reportadas. Se efectuó una segunda agrupación por clases. Las clases fueron: Peces, Anfibios, Reptiles, Aves, Mamíferos y Marsupiales.

3.6.5 Alineamiento de las Secuencias

Se construyó una matriz de alineamiento (% similitud) de todas las secuencias utilizando *BioCode Explorer* para ordenar por clasificación y para extraer las secuencias aminoacídicas y *CLUSTALW* para calcular el porcentaje de similitud. Cada par de secuencias fue usado como entrada para *CLUSTALW*. Los resultados fueron graficados utilizando *Excel*.

3.7 Diseño de la Sonda “consenso” para las GH

3.7.1 Selección de la Región Conservada como Sonda

Para buscar los posibles oligonucleótidos, primero se elaboró un programa (en lenguaje C++) que suma el número total de secuencias en que *aparee totalmente* un oligonucleótido y se ejecutó con todos los posibles oligonucleótidos de 16 bases de longitud derivados de las todas secuencias codificantes; posteriormente se elaboró otro programa (*MaxProbe*) que calcula el consenso de un oligonucleótido computando el mejor *alineamiento* con cada una de las secuencias y se ejecutó con todos los posibles oligonucleótidos de 16 y 32 bases de longitud de las todas secuencias codificantes. Los resultados de ambos programas se compararon con oligonucleótidos de 16 bases de longitud. El alineamiento utilizado en *MaxProbe* se consiguió utilizando el algoritmo de selección de la mejor diagonal (White, 1984) sin considerar inserciones ni deleciones (sin “gaps”). No se calcularon aquellos oligonucleótidos que formaran parte de dos exones siempre y cuando ésta información estuviera disponible en el informe original. Para seleccionar el mejor oligonucleótido entre “los mejores”, se diseñó una función (f_{sonda} descrita en el capítulo 4) que considera: a) Alineamiento, b) Apareamiento en los extremos, c) Energías intramoleculares e intermoleculares, d) Temperatura de fusión media, y, adicionalmente consideramos un parámetro al que denominamos “*encadenamiento*”, que está en función del número máximo de nucleótidos consecutivos que aparean con el oligonucleótido en cuestión. Para determinar el peso aproximado de cada parámetro, se ejecutó el programa variando en cada ejecución un solo parámetro hasta obtener resultados satisfactorios. Para determinar los oligonucleótidos que podrían ser “los mejores”, antes de evaluarlos con f_{sonda} , se formaron dos grupos. El primer grupo se ordenó por apareamiento promedio y el segundo por apareamiento promedio menos dos desviaciones estándar; se analizaron con f_{sonda} solo el 5% de los más altos de cada grupo. Para determinar la suficiencia del 5%, se ordenaron todos los valores de apareamiento promedio y apareamiento promedio menos dos desviaciones estándar, se determinó el punto de inflexión del crecimiento de la curva resultante y se elaboró un gráfico para mostrar los resultados.

3.7.2 Aumento del Desempeño de la Sonda

Para ampliar la longitud de la sonda, a la secuencia obtenida se le agregaron nucleótidos consenso en su respectiva posición en cada extremo hasta que la evaluación (f_{sonda}) fuera menor que la inmediata anterior o rebasara el límite de 50 nucleótidos. También se eliminaron nucleótidos en los extremos mientras la evaluación fuera mayor que la inmediata anterior. Esto con el fin de corregir si al extender un extremo, pueda resultar mejor que se recorte el otro y viceversa, dado que la asignación inicial esta basada únicamente en alineamiento sin tomar en cuenta los demás parámetros.

Idealmente se deseaba que la sonda apareara en iguales circunstancias (de temperatura, apareamiento y energías) a todas las secuencias con el fin de homogeneizar los experimentos. Dado que las secuencias no son exactamente iguales, en general no es posible obtener una sonda con los mismos parámetros para todas las secuencias blanco; entonces, para minimizar la desviación de los parámetros, se diseñó un algoritmo para que funcione de la siguiente manera:

Considerando $Nt(a,b) = 1$ si el nucleótido a es igual al nucleótido b y $Nt(a,b) = 0$ en caso contrario; $Seq(c,m,d) = 1$ si el nucleótido m de la secuencia c es igual al nucleótido d , $Seq(c,m,d) = 0$ en caso contrario; y $^k S$ como el nucleótido en la posición k de la secuencia S ...

- 1) Para cada secuencia i se calcula el número de nucleótidos que aparean con el oligonucleótido en cuestión ($\#ap_i = \sum Nt(^k Sec_i, ^k Oligo)$).
- 2) Para cada posición j en el oligonucleótido y para cada uno de los nucleótidos se calcula el número de secuencias que tienen en la posición j ese nucleótido ($\#Sa_j = \sum Seq(^j Sec_i, A)$, $\#Sg_j = \sum Seq(^j Sec_i, G)$, $\#Sc_j = \sum Seq(^j Sec_i, C)$, $\#St_j = \sum Seq(^j Sec_i, T)$) y se calcula $\#Sx_j = \sum Seq(^j Sec_i, Oligo_j)$ como el número de secuencias que tienen el mismo nucleótido que el oligonucleótido en cada posición j .
- 3) Se calcula $G_{y(a,g,c,i)} = \#ap_i / \#S_{(a,g,c,i)} - \#ap_i / \#S_{x_j}$ que representa la "ganancia" de cambiar la posición j por algún nucleótido.
- 4) Si para alguna $G_{y(a,g,c,i)}$ hay un valor positivo, se hace el cambio en el oligonucleótido en la posición j por el nuevo nucleótido. Se evalúa el nuevo oligonucleótido $O_{y(a,g,c,i)} = f_{sonda}$. Se vuelve a ejecutar el algoritmo desde el paso 1 tomando como entrada el nuevo oligonucleótido (solo hasta un nivel de recursividad[†] de 3, o sea, solo se pueden cambiar 3 nucleótidos en cada oligonucleótido).
- 5) De todos los valores $O_{y(a,g,c,i)}$ calculados se toma el mayor siempre y cuando rebase el valor de f_{sonda} del oligonucleótido original.

[†] En computación, "recursividad" se conoce como un proceso que puede necesitar usar su mismo proceso y que usa una condición de salida para evitar quedarse en un ciclo infinito.

3.7.3 Ajustes Manuales de la Sonda

Una vez escogida una secuencia y usando el programa diseñado, se extendió la secuencia en el extremo 3' para incrementar el desempeño en animales superiores. Además, se introdujo en una posición una degeneración de 2 nucleótidos para incrementar el desempeño exclusivamente en primates, sin afectar a las demás especies.

3.8 Comprobación de la Sonda (*GH-Explorer I*)

3.8.1 Comprobación Teórico – Virtual de la Sonda

En la página de Internet de BLAST 2.0.5 (Altschul, 1997) www.ncbi.nlm.nih.gov/cgi-bin/BLAST/mph-newblast?iform=1 se introdujo en el cuadro de opciones <-W 8> y en el cuadro de consulta se introdujo la secuencia:

gcctgcttcargaggacatgcacaaggtggagacctacctgagggtcatgaagtg

3.8.2 Comprobación Práctica – Experimental de la Sonda

Se hicieron dos ensayos de hibridación para probar el desempeño de la sonda *GH-Explorer I*. El primer ensayo fue una hibridación tipo slot-blot en membrana de nylon con dispositivo a vacío (Ausubel et. al. 1992) usando en su mayoría 8µg de DNA genómico de varias especies (Tabla 3.1). Las especies a probar en estos ensayos fueron escogidas procurando abarcar a todos los vertebrados, seleccionando especies representativas de cada clase. La temperatura de prehibridación, hibridación y último lavado fueron 42°C, 48°C y 50°C respectivamente. Las concentraciones de sales no fueron cambiadas con respecto del protocolo original. A la solución de prehibridación del protocolo original se omitió el DNA de esperma de Salmón (ya que hibridaría con la *GH-Explorer I*). Se omitieron el paso de la membrana al filtro húmedo con solución de desnaturalización y el paso de la membrana al filtro húmedo con solución de neutralización (Sambrook et. al. 1989). La sonda fue marcada inmediatamente antes de hacer la incubación para hibridación. La exposición fue hecha en película ultrasensible con pantalla amplificadora durante 20h. Se hizo un segundo ensayo para probar la sensibilidad (Tabla 3.2). Se siguió el mismo protocolo propuesto por Ausubel et. al.; esta vez solo se omitió el DNA de esperma de Salmón en la solución de prehibridación. Se usó la misma solución de hibridación que en el ensayo anterior cuya radiactividad tenía una vida media transcurrida. La exposición fue de 72h. Ambas películas fueron sometidas a análisis densitométrico, integrándose únicamente la curva de cada banda. Para calcular la fuerza relativa de apareamiento de *GH-Explorer I* con los diferentes DNAs; se utilizaron las áreas de la titulación de DNAs de gallo para calcular una curva de calibración lineal, transformándose a logaritmos tanto la concentración de DNAs relativa a 8µg de DNAs de gallo como el área densitométrica de las muestras; con el área de todas las demás muestras se calculó un aproximado de la fracción de 8µg de DNAs de gallo que

equivaldrían a hibridar y dar una señal densitométrica aproximadamente igual; la fracción se dividió por el número de genomas relativos a gallo según la especie. Los tamaños de los genomas (Tabla 3.3) fueron extraídos de la página de Internet www.cbs.dtu.dk/databases/DOGS/index.html.

Todos los ensayos involucraron el marcaje radiactivo de la misma. La reacción para el marcaje se llevó a cabo con un volumen final de 10µL con 10U de T4 Polynucleotide Kinase, 20µCi de γ -ATP (6000Ci/mmol), 20pmoles *GH-Explorer I* y 1x del amortiguador apropiado.

Tabla 3.1 DNA de especies ensayadas en hibridación con la sonda *GH-Explorer I*.

DNA*	Pes	DNA*	Pes	DNA*	Pes	DNA*	Pes	DNA*	Pes
Humano	A1	Gallo	B1	Tilapia	C1	PBSjcGH-J5 (12ng)	D1	Gallo (800ng)	E1
Gato	A2	Avestruz	B2	Ameca (7.5µg)	C2	" (1.2ng)	D2	Gallo (80ng)	E2
Vaca	A3	Tortuga	B3	Catán	C3	" (120pg)	D3		
Jirafa	A4	Víbora	B4	Tiburón	C4	" (12pg)	D4		
Cerdo	A5	Gecko (7.5µg)	B5	Guppy (3µg)	C5	" (1.2pg)	D5		
Ratón	A6	Carpa	B6	C(-) PBR322	C6	" (0.12pg)	D6		

*Todas las muestras con 8µg de DNA, excepto donde se indica.

Tabla 3.2 Muestras de DNA usadas en el ensayo de sensibilidad en hibridación con la sonda *GH-Explorer I*.

Columna	Línea A	DNA	Línea B	DNAg	Línea C	DNA	Línea D	DNA
1	pBSjcGH-J1-Eco RI	3.2ng	Gallo	8µg	PSVhpl1-EcoRI	3.2ng	C(-) λ	2 µg
2	PBSjcGH-J1-Eco RI	320pg	Gallo	800ng	PSVhpl1-EcoRI	320pg	C(-) λ	200ng
3	PBSjcGH-J1-Eco RI	32pg	Gallo	80ng	PSVhpl1-EcoRI	32pg	C(-) λ	20ng
4	PBSjcGH-J1-Eco RI	3.2pg	Gallo	8ng	PSVhpl1-EcoRI	3.2pg	C(-) λ	2ng
5	pBSjcGH-J1-Eco RI	320fg			PSVhpl1-EcoRI	320fg	C(-) λ	200pg
6	pBSjcGH-J1-Eco RI	32fg			pSVhpl1-EcoRI	32fg	C(-) λ	20pg

Tabla 3.3 Tamaños de los genomas usados para normalizar las señales de hibridación.

Especie Incluida en Ensayo		Especie Fuente	Tamaño Haploide del Genoma (Pares de bases)
Nombre Común	Nombre Científico	Nombre Científico	
Humano	<i>Homo sapiens</i>	<i>Homo sapiens</i>	3.40x10 ⁹
Gato	<i>Felis catus</i>	<i>Canis familiaris</i> [*]	3.36x10 ⁹
Vaca	<i>Bos taurus</i>	<i>Bos taurus</i>	3.65x10 ⁹
Jirafa	<i>Giraffe camelopardalis</i>	<i>Bos taurus</i> [*]	3.65x10 ⁹
Cerdo	<i>Sus scrofa</i>	<i>Sus scrofa</i>	3.11x10 ⁹
Ratón	<i>Mus musculus</i>	<i>Mus musculus</i>	3.45x10 ⁹
Gallo	<i>Gallus gallus</i>	<i>Gallus gallus</i>	1.20x10 ⁹
Avestruz	<i>Struthio camelus</i>	<i>Gallus gallus</i> [*]	1.20x10 ⁹
Tortuga	<i>Trichemys scripta</i>	<i>Caiman crocodylus</i> [*]	2.60x10 ⁹
Víbora	<i>Crotalus atrox</i>	<i>Boa constrictor</i> [*]	2.10x10 ⁹
Gecko	<i>Hemidactylos turcicus</i>	<i>Caiman crocodylus</i> [*]	2.60x10 ⁹
Carpa	<i>Cyprinus carpio</i>	<i>Cyprinus carpio</i>	1.70x10 ⁸
Tilapia	<i>Tilapia sp.</i>	<i>Cyprinus carpio</i> [*]	1.70x10 ⁸
Ameca		<i>Cyprinus carpio</i> [*]	
Catán	<i>Lepisosteus osseus</i>		1.70x10 ⁹
Tiburón [†]	<i>Squalus sp.</i>	<i>Carcarias obscurus</i>	2.70x10 ⁹
Guppy	<i>Poecilia reticulata</i>	<i>Cyprinus carpio</i> [*]	1.70x10 ⁸

* Especie cercana cuyo tamaño del genoma sí está disponible. [†] Cazón "dogfish".

3.9 Diseño de Iniciadores para PCR

El diseño de iniciadores para PCR se cubrió en dos etapas. La primera, en artiodáctilos, se usó el programa CLUSTALW para hacer los alineamientos, manualmente se detectaron dos zonas conservadas, se utilizó OLIGO para diseñar el par de oligonucleótidos y se verificó su desempeño usando el programa Amplify. En la segunda etapa, que incluye todas las especies, se diseñó un programa, *MaxPrimer* que usa la misma metodología utilizada en *MaxProbe* para buscar las regiones consenso dentro de las secuencias y se hicieron modificaciones en la evaluación para considerar los parámetros propios del proceso de PCR como iniciabilidad[†]. Se utilizó *BioCode Explorer* para extraer cuando mucho 500pb de la región 5' justo antes del codón de inicio y 1000pb de la región 3' justo después del codón de terminación de cada secuencia. Se eliminaron las secuencias de longitud menor a 22pb. Se ejecutó *MaxPrimer* con el juego de secuencias 5' y con el juego de secuencias 3'. Se comprobó el desempeño de los iniciadores de 22nt reportados por *MaxPrimer* en *Amplify*. Se comprobó la especificidad de los oligonucleótidos haciendo búsqueda en *GenBank* usando *BLAST*.

[†] Se usó "iniciabilidad" como la capacidad de potenciar la iniciación de polimerización y traduciendo del inglés "primability".

3.10 Comprobación del Juego de Oligonucleótidos Diseñados para Artiodáctilos

3.10.1 Amplificación del Gen de la GH a partir del DNAG de Artiodáctilos

Se hicieron ensayos de PCR usando el juego para amplificar la GH de cabra, vaca, oveja, jirafa, búfalo americano, cerdo y cebrá usando DNAG como templado. El DNAG de cabra, vaca y cerdo se obtuvieron a partir de sangre periférica usando la técnica de TSNT. El DNAG de búfalo americano, oveja y cebrá se obtuvieron de un stock de nuestro laboratorio. La integridad de los DNAG usados se probó en gel de agarosa. Las condiciones y concentraciones de los reactivos fueron las siguientes:

Tabla 3.4 Condiciones y pasos seguidos en los ensayos de PCR.

Reactivo	Concentración	Paso	Tiempo @ Temp
DNAG	75ng	1) Desnaturalización Inicial	3min a 94.0°C
MgCl ₂	1.5mM	2) Desnaturalización	1min a 94.0°C
dNTP's	0.2mM	3) Apareamiento	1min a 58°C~59.5°C
pArt5'-140	0.5µM	4) Extensión	1min a 72.0°C
pArt3'-139	0.5µM	30 veces: Pasos 2~4	
Amortiguador	1.0x	5) Extensión Final	10min a 72.0°C
Taq Polimerasa	1.25U		
H ₂ O	c.b.p. 25µL		

Se hicieron ensayos con temperaturas de apareamiento de 58°C y 59.5°C. En las especies de difícil amplificación se hicieron reacciones adicionales titulando MgCl₂ y variando temperaturas. Los amplicones se observaron en geles de agarosa al 0.8% usando generalmente 7µL de la reacción. La electroforesis se efectuó a temperatura ambiente y a 5V/cm, el amortiguador de corrida fue TBE 0.5x (1x: 89mM Tris base, 89mM ácido bórico y 2mM EDTA) y los geles fueron preparados con TBE 1x.

3.10.2 Comprobación de los Amplicones

Para comprobar que los productos amplificados corresponden a GH, se hizo un ensayo de hibridación en gel (Lueders, 1994)²⁴ de los productos de PCR con una sonda marcada con dATP-α³²P y Taq Polimerasa extraída de una región codificante de 494pb de la hormona del crecimiento Bovina clonada en el plásmido pPic9kbGH cuyo fragmento es liberado cortando con la endonucleasa PvuII. 60ng del fragmento se purificaron con fibra de vidrio y 25ng con Elutrap (Schleicher & Schuell, Inc). El fragmento fue marcado usando una variación de la técnica de Vector T: 85ng del fragmento de 494pb, 1x de amortiguador

Taq DNA polimerasa, 3.3 μ M (10 μ Ci) de [α -³²P]dATP, 2.5mM de MgCl₂, 2.5U Taq DNA polimerasa en 50 μ L de reacción y 1 gota de aceite mineral e incubando 2h a 72°C.

3.10.3 Clonación del Amplicón de jirafa y Análisis de las Clonas Recombinantes

El producto amplificado obtenido de jirafa se clonó en pBS-SK(+) utilizando la técnica de Vector T (Harrison, 1994) como se muestra en la Figura 3.3. El plásmido pBS-SK(+) se linearizó utilizando la endonucleasa *EcoRV* para producir extremos romos. La reacción para generar el Vector T fue: 2 μ g de plásmido, 1x amortiguador Taq DNA polimerasa, 1mM dTTP, 3mM MgCl₂, 3U de Taq DNA polimerasa y 1 gota de aceite mineral e incubando la reacción 2h a 72°C. La reacción de ligación fue: 150ng de Vector T recién preparado, 1x de amortiguador T4 DNA ligasa, 90ng de producto de PCR y 0.75U de T4 DNA ligasa incubando toda la noche a 16°C. Toda la reacción fue utilizada para la transformación de células *XLI-Blue* calcio - competentes. Tres clonas se caracterizaron utilizando las enzimas de restricción *NciI*, *PvuII*, *PstI*, *SacI*, *EcoRI* y *XhoI*.

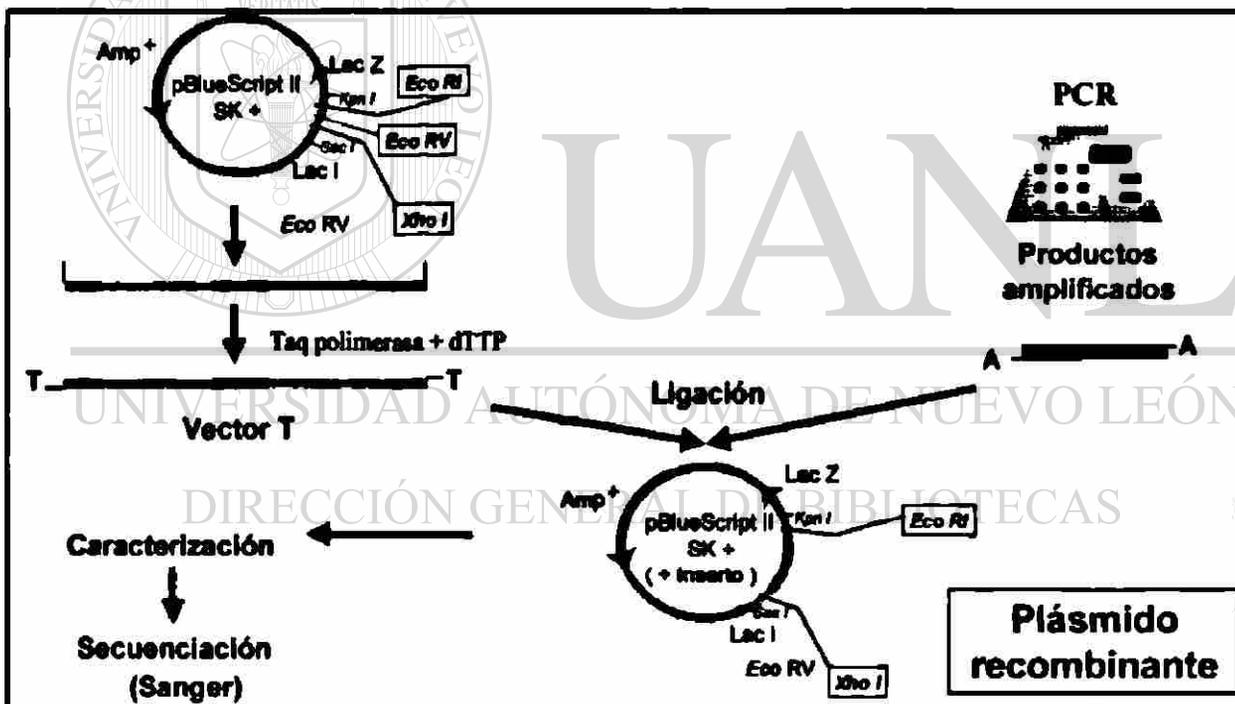
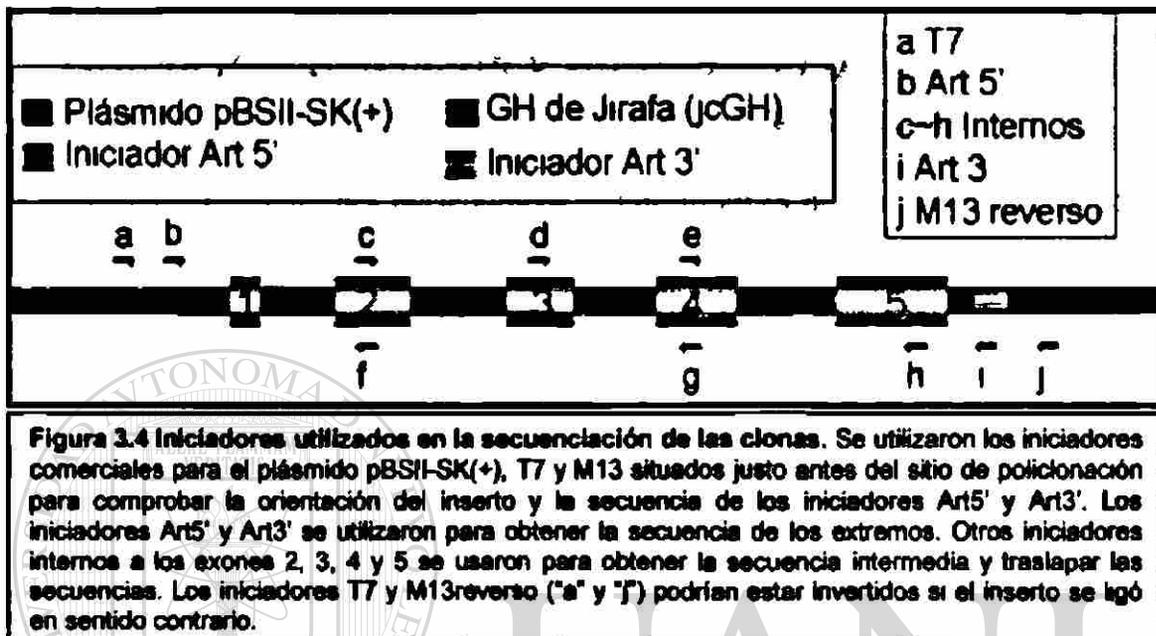


Figura 3.3 Estrategia de Clonación del amplicón. El plásmido pBSII-SK+ es linearizado con *EcoRV* al que se le adicional dT a los extremos 3', por su parte los amplicones ya cuentan con una dA en sus extremos 3'. Los extremos de cada fragmento son complementarios unos con otros favoreciendo la reacción de ligación. El plásmido recombinante obtenido es usado para transformar bacterias calcio competentes para su propegación. El plásmido aislado y multiplicado es utilizado como templado para caracterizarlo y secuenciarlo.

3.10.4 Secuenciación de las Clonas Recombinantes de Jirafa

Tres clonas fueron sometidas a secuenciación cíclica utilizando un conjunto de iniciadores como se muestra en la Figura 3.4. Se utilizaron, además de los iniciadores de artiodáctilos, Art5' y Art3' y de los iniciadores comerciales T7 y M13 reverso para pBSII-SK(+), 6 iniciadores adicionales que ya se encontraban disponibles en nuestro laboratorio.



3.11 Extracción y Semicuantificación del DNA Genómico

Se utilizó la técnica TSNT para hacer la extracción de DNAG de sangre periférica de vaca, cerdo y cabra. Se usó un stock de nuestro laboratorio de DNAG de placenta humana extraída usando la técnica de Gross-Bellard (Ausubel et. al. 1992), esta misma técnica se utilizó para hacer la extracción de DNAG de sangre de gallo, avestruz, tortuga y serpiente aumentando 3 veces el volumen final sin cambiar la concentración de Proteinasa K. Se usó la técnica de Goelz (Goelz, et. al. 1985) para extraer DNAG de hígado de gato, ratón y lagartija; de músculo de carpa, tilapia, ameca y catán; de aleta de tiburón y de placenta de jirafa. La integridad de los DNAG fue verificada en un gel de agarosa al 0.8%. La semicuantificación fue realizada integrando el área densitométrica de un estándar de DNAG de humano y aproximando proporcionalmente con el área densitométrica de los demás DNA, utilizando el paquete *Molecular Analyst*.

Capítulo 4

Resultados

4.1 Obtención, Selección y Agrupación de las Secuencias Nucleotídicas y Aminoacídicas

S obtuvieron 173 informes nucleotídicos y 330 informes de aminoacídicos en formato GenBank, el informe condensado se muestra en los Anexo 1 y 2.

Tabla 4.1 Especies ordenadas por clasificación.

Accession	Sec	Organismo	Grupo	Accession	Sec	Organismo	Grupo
478615	AA	<i>Acipenser gueldenstaedti</i>	Peces	1174395	AA	<i>Esch lucius</i>	Peces
873969	ARN	<i>Amia calva</i>	Peces	X77245	DNAG	<i>Coregonus autumnalis</i>	Peces
882520	ARN	<i>Lepisosteus osseus</i>	Peces	L04688	DNAG	<i>Oncorhynchus keta</i>	Peces
M24066	ARN	<i>Anguilla japonica</i>	Peces	M24768	ARN	<i>Oncorhynchus kisutch</i>	Peces
U63805	DNAG	<i>Poecilia reticulata</i>	Peces	850867	ARN	<i>Oncorhynchus tshawytscha</i>	Peces
U63804	DNAG	<i>Colisa lalia</i>	Peces	Y07741	DNAG	<i>Oncorhynchus mykiss</i>	Peces
482753	AA	<i>Tilapia moosembica</i>	Peces	X61938	DNAG	<i>Salmo salar</i>	Peces
D50368		<i>Seriola quinqueradiata</i>	Peces	AB001865	DNAG	<i>Coregonus lavaretus</i>	Peces
878253	ARN	<i>Norona saxatilis</i>	Peces	464784	AA	<i>Prionace glauca</i>	Peces
X55176	DNAG	<i>Caranx delicatissimus</i>	Peces	X14601	DNAG	<i>Xenopus laevis</i>	Anfibios
L43628	ARN	<i>Seriola dumerilii</i>	Peces	X14602	DNAG	<i>Xenopus laevis</i>	Anfibios
M35627	ARN	<i>Seriola quinqueradiata</i>	Peces	852027	ARN	<i>Rana catesbeiana</i>	Anfibios
U16816	DNAG	<i>Lates calcarifer</i>	Peces	1041999	AA	<i>Crocodylus novaeguineae</i>	Reptiles
A08993	DNAG	<i>Tilapia sp.</i>	Peces	464779	AA	<i>Chelonia mydas</i>	Reptiles
M84774	DNAG	<i>Tilapia nilotica</i>	Peces	86054	AA	<i>Anas platyrhynchos</i>	Av s
X79002	DNAG	<i>Coryphaena hippurus</i>	Peces	134707	AA	<i>Meleagris gallopavo</i>	Av es
X65716	DNAG	<i>Dicentrarchus labrax</i>	Peces	D10484	DNAG	<i>Gallus gallus</i>	Av s
L43629	ARN	<i>Lateolabrax japonicus</i>	Peces	D00476	DNAG	<i>Capra hircus</i>	Mamíferos
X59377	DNAG	<i>Acanthopagrus butcheri</i>	Peces	M57764	DNAG	<i>Bos taurus</i>	Mamíferos
U48221	DNAG	<i>Sparus aurata</i>	Peces	X72947	DNAG	<i>Bubalus arnee bubalis</i>	Mamíferos
1083902	AA	<i>Acanthopagrus latus</i>	Peces	D16298	DNAG	<i>Capricornis crispus</i>	Mamíferos
134713	AA	<i>Chrysophrys major</i>	Peces	M37310	DNAG	<i>Ovis aries</i>	Mamíferos
85649	AA	<i>Euthynnus pelamis</i>	Peces	259870	AA	<i>Cervidae</i>	Mamíferos
88653	AA	<i>Thunnus albacares</i>	Peces	D16299	DNAG	<i>Cervus nippon</i>	Mamíferos
134721	AA	<i>Thunnus thynnus</i>	Peces	Y12578	DNAG	<i>Cervus elaphus</i>	Mamíferos
D29737	DNAG	<i>Paralichthys olivaceus</i>	Peces	M17704	DNAG	<i>Sus scrofa</i>	Mamíferos
482759	AA	<i>Hippoglossoides platessoides</i>	Peces	1070554	AA	<i>Lama pacos</i>	Mamíferos
103957	AA	<i>Pseudopleuronectes americanus</i>	Peces	E23067	ARN	<i>Canis familiaris</i>	Mamíferos
U01143	ARN	<i>Solea senegalensis</i>	Peces	134722	AA	<i>Vulpes vulpes</i>	Mamíferos
U89917	ARN	<i>Sebastes schlegelii</i>	Peces	89010	AA	<i>Alopex lagopus</i>	Mamíferos
L43627	ARN	<i>Sebasticus marmoratus</i>	Peces	U13390	ARN	<i>Feiia catus</i>	Mamíferos
U63803	DNAG	<i>Arothron maculatus</i>	Peces	X56120	ARN	<i>Mustela vison</i>	Mamíferos
D63807	DNAG	<i>Pogon rubripes</i>	Peces	284549	AA	<i>Balaenoptera borealis</i>	Mamíferos
Y09421	DNAG	<i>Alburnus alburnus</i>	Peces	E38127	DNAG	<i>Cryptolagus cuniculus</i>	Mamíferos
U28388	ARN	<i>Carassius auratus</i>	Peces	U02929	ARN	<i>Equus caballus</i>	Mamíferos
Z60419	DNAG	<i>Ctenopharyngodon idella</i>	Peces	U02293	DNAG	<i>Macaca mulatta</i>	Mamíferos
X51969	DNAG	<i>Cyprinus carpio</i>	Peces	M13438	DNAG	<i>Homo sapiens</i>	Mamíferos
U21920	DNAG	<i>Abramis brama</i>	Peces	134706	AA	<i>Loxodonta africana</i>	Mamíferos
M94348	DNAG	<i>Hypophthalmichthys molitrix</i>	Peces	320148	AA	<i>Cavia porcellus</i>	Mamíferos
Z60473	DNAG	<i>Hypophthalmichthys nobilis</i>	Peces	866299	ARN	<i>Nesocricetus auratus</i>	Mamíferos
1836078	AA	<i>Clarias gariepinus</i>	Peces	Z46663	DNAG	<i>Mus musculus</i>	Mamíferos
869215	DNAG	<i>Ictalurus punctatus</i>	Peces	J00739	DNAG	<i>Rattus norvegicus</i>	Mamíferos
L27835	ARN	<i>Pangasianodon gigas</i>	Peces	264607	AA	<i>Macropus rufogriseus</i>	Mamíferos
M61713	ARN	<i>Pangasius pangasius</i>	Peces	AF052192		<i>Trurus</i>	up
482758	AA	<i>Gadus morhua</i>	Peces				
483102	AA	<i>Gadus morhua</i>	Peces				

Las secuencias de cada especie que formaron parte de la base de datos final se encuentran resaltadas en el Anexo 1 y 2. Obtuvimos 90 secuencias correspondientes a 89 especies (Tabla 4.1).

El espacio físico de la base de datos es de alrededor de 5MB sin incluir las imágenes de los organismos. Al hacer el desglose (Tabla 4.2) por clases y sus subclases con más secuencias reportadas, se observa que algunas clases han sido estudiadas preferencialmente, 62% del total de secuencias reportadas son de peces, seguido por los mamíferos con 28% dejando únicamente el 10% a todas las demás clases de vertebrados. Vemos también que el 29% (26/89) de las especies no tiene una secuencia nucleotídica reportada, sin embargo, en mamíferos esta cifra sube a 47% (8/17).

Tabla 4.2 Total de secuencias por clase. Se detallan dos de las clases más estudiadas, peces y mamíferos.

#	Especies	Clase	Nt	%	aa	%	Tot Sec	%Tot Sec	#
55		Peces	41	65%	14	54%	55	62%	7 Salmoniformes
									5 Siluriformes
									7 Cypriniformes
									19 Perciformes
									4 Pleuriformes
2		Anfibios	3	5%	0	0%	3	3%	
2		Reptiles	0	0%	2	8%	2	2%	
3		Aves	1	2%	2	8%	3	3%	
26		Mamíferos	17	27%	8	31%	25	28%	10 Artiodactyla
									5 Carnivora
									2 Primates
									4 Rodentia
1		Marsupial	1	2%	0	0%	1	1%	
89		Total	63	100%	26	100%	89	100%	

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

4.2 Alineamiento de las Secuencias

En la Figura 4.1 se muestra un gráfico de la matriz de alineamiento aminoacídico (ordenado según Tabla 4.1) de todas las secuencias seleccionadas de las GH reportadas. Podemos apreciar que entre los peces, el parecido puede ir mayoritariamente desde 100% a 60% y solo entre unos pocos hasta de 40%; conforme hacemos la comparación en la dirección de los mamíferos, el parecido va disminuyendo llegando hasta aproximadamente 20%. *Xenopus Laevis*, un anfibio, se parece más a mamíferos que a peces. En mamíferos, la GH se aprecia más conservada.

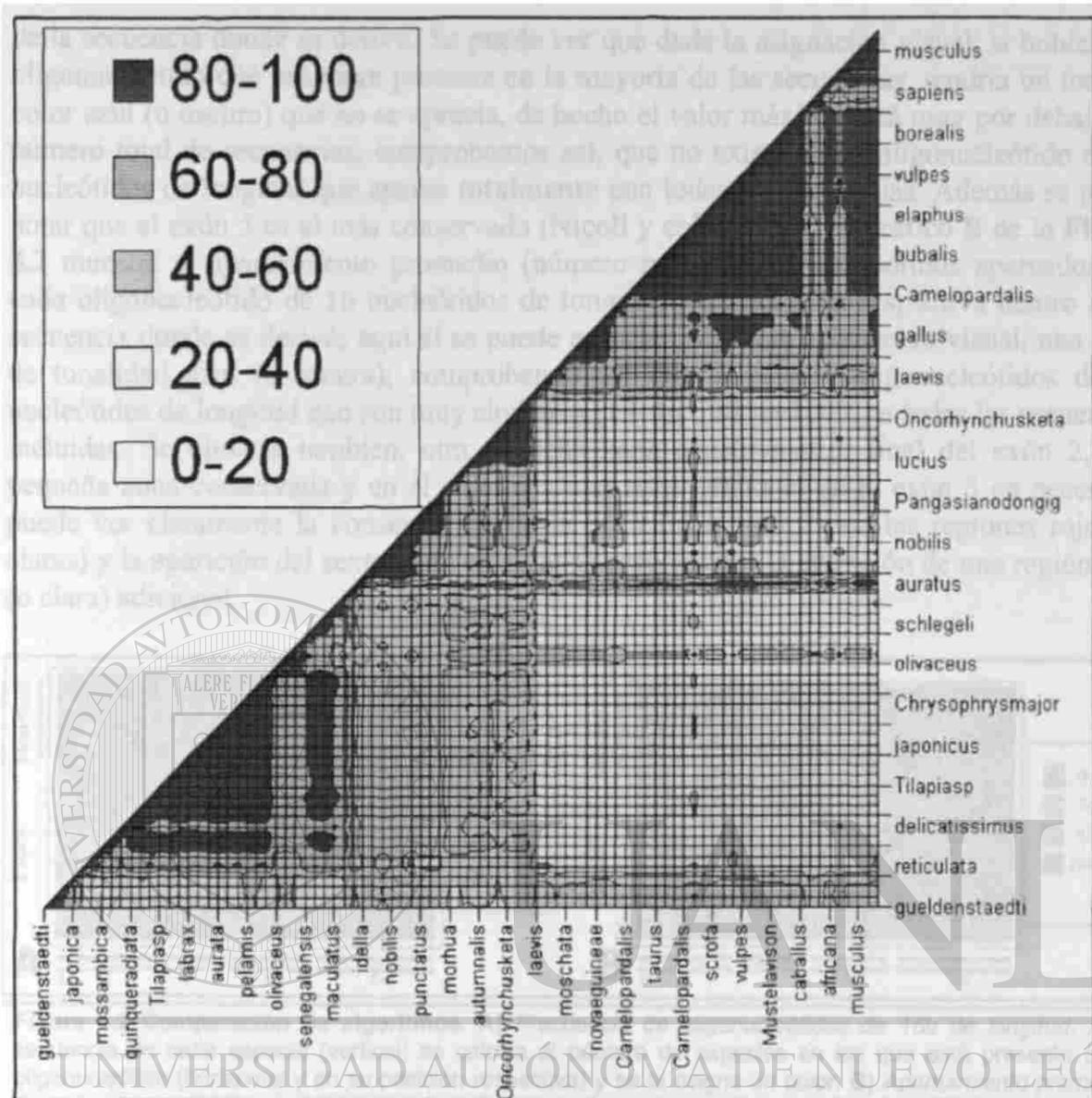


Figura 4.1 Matriz de alineamiento aminoacídico (% similitud). Todas las especies ordenadas por clasificación (se nombraron únicamente 1 de cada 3). En horizontal de izquierda a derecha peces, anfibios, reptiles, aves, mamíferos y marsupiales. De la misma manera en vertical de abajo hacia arriba.

4.3 Selección de la Sonda

Dado que deseábamos obtener un oligonucleótido conservado en todas las especies, pensamos básicamente en dos estrategias de búsqueda y comparamos los resultados. Se utilizaron oligonucleótidos de 16 bases de longitud para efectos de la comparación y 32 bases de longitud como base para el diseño de la sonda.

4.3.1 Comparación de Algoritmos

En el gráfico A de la Figura 4.2, se muestra el número de secuencias en que está presente cada oligonucleótido de 16 nucleótidos de longitud y su posición respectiva dentro

de la secuencia donde se derivó. Se puede ver que dada la asignación visual, si hubiese un oligonucleótido que estuviera presente en la mayoría de las secuencias, tendría un tono de color azul (u oscuro) que no se aprecia, de hecho el valor máximo está muy por debajo del número total de secuencias; comprobamos así, que no existe algún oligonucleótido de 16 nucleótidos de longitud que aparezca **totalmente** con todas las secuencias. Además se puede notar que el exón 5 es el más conservado (Nicoll y cols., 1986). El gráfico B de la Figura 4.2 muestra el apareamiento promedio (número promedio de nucleótidos apareados) de cada oligonucleótido de 16 nucleótidos de longitud y su posición respectiva dentro de la secuencia donde se derivó; aquí sí se puede apreciar, según la asignación visual, una zona de tonalidad azul (u oscura); comprobando así que sí existen oligonucleótidos de 16 nucleótidos de longitud que son muy similares (13~16 ó 81%~100%) a todas las secuencias incluidas. Se observa también, otra pequeña zona conservada al final del exón 2, una pequeña zona conservada y en el exón 4 y una zona adicional en el exón 5 en peces. Se puede ver claramente la conservación de la posición intrónica por las regiones rojas (o claras) y la aparición del sexto exón en algunas especies por la aparición de una región roja (o clara) adicional.

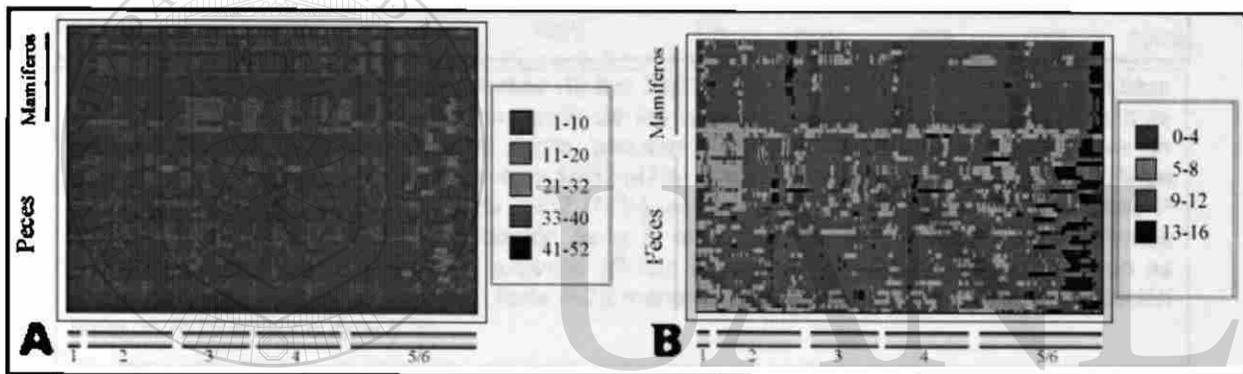


Figura 4.2 Comparación de algoritmos. A) Frecuencia de oligonucleótidos de 16b de longitud. A la secuencia de cada especie (vertical) se calcula el número de especies en las que está presente cada oligonucleótido (horizontal y en su posición respectiva) y se le asigna un color. **B) Apareamiento promedio de cada oligonucleótido de 16b de longitud.** De cada oligonucleótido (horizontal) de cada especie (vertical), se obtiene la suma de nucleótidos con los que tiene el mejor apareamiento en cada secuencia y se divide entre el número de especies (52). La posición aproximada de cada oligonucleótido con respecto a cada exón se muestra en la parte inferior. La asignación de colores se muestra a la derecha de cada gráfico. Las zonas rojas (o claras) indican la posición de los intrones debido a que no se hizo el cálculo y se usó 0 (solo en las secuencias donde sí se tenía tal información y en gráfico B).

4.3.2 Determinación de la Población de Oligonucleótidos por Evaluar

La población total de oligonucleótidos de 32 bases de longitud fue de 28,038 para las 52 secuencias nucleotídicas completas de la GH. El evaluar toda la población resultaría de un esfuerzo inútil dado que las secuencias de bajo apareamiento lógicamente resultarían en una evaluación baja. Para determinar la fracción de la población por evaluar, se determinaron las frecuencias de los alineamientos promedio y alineamientos promedio menos dos desviaciones estándar redondeados al entero más cercano y se analizaron los resultados gráficamente. Se puede ver en la curva A de la Figura 4.3 que el 96% de los oligonucleótidos tiene un apareamiento promedio menor a 78%, el 83% de los oligonucleótidos tienen 68% que es muy bajo contra un máximo de 91%. En la curva B de la Figura 4.3, el 95% de los oligonucleótidos, tienen un valor de alineamiento menos dos

desviaciones estándar menor a 18 que corresponde al 72% con respecto del valor máximo de 25. Por lo tanto, evaluar el 5% superior en ambos criterios resulta ser suficientemente sobrado.

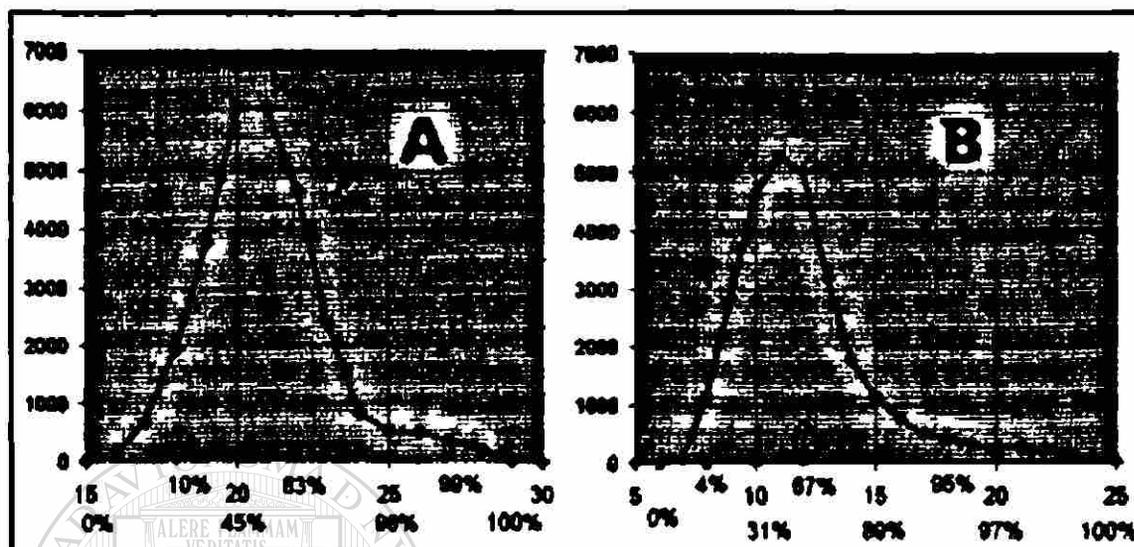


Figura 4.3 Frecuencia de alineamientos de los 28,038 oligonucleótidos consenso posibles de 32nt de longitud. Vertical, la frecuencia de los alineamientos redondeados al entero más cercano. Horizontal, alineamiento en negro, porcentaje de la población en rojo. A) Curva de alineamientos promedios (P): El mínimo es 15/32 (47%) y el máximo 29/32 (91%). Casi el 96% de los oligonucleótidos alinea menos de 25/32 (78%), es decir, solo el 4% de la población tiene P superior a 77%. El 83% de la población tiene P muy bajo, 22/32 (68%). B) Alineamientos promedios menos dos desviaciones estándar (P-2S): El mínimo es 7/32 (22%) y el máximo es 26/32 (81%). El 89% de la población tiene P-2S menor o igual a 15 y solo el 3% de la población tiene un P-2S mayor o igual a 20.

4.3.3 Evaluación de los Oligonucleótidos

Se determinó anteriormente que evaluar el 5% de los oligonucleótidos con más alto apareamiento es suficiente para encontrar un buen oligonucleótido como sonda, pero para determinar dentro de esta sub-población los mejores oligonucleótidos, fue necesario diseñar una función que compare los oligonucleótidos entre sí. Las ideas básicas que nos llevaron a diseñar la función a la que llamamos f_{sonda} fueron las siguientes:

- El éxito de una buena hibridación depende directamente del apareamiento entre cada nucleótido de la sonda con la secuencia blanco. Decidimos incluir el número de nucleótidos iguales con cada secuencia blanco en forma de promedio.
- El éxito de una buena hibridación, depende también de la ausencia o minimización del apareamiento de la sonda con ella misma: Decidimos incluir la energía de formación de estructuras de lazos u horquilla y dimerizaciones.
- Dado que la sonda no aparearía perfectamente con todas las secuencias blanco, por lo tanto habrían desapareamientos a lo largo de la sonda, es indeseable que los desapareamientos ocurran en alguno de los extremos de la sonda: Si los extremos no están apareados, se podría facilitar el despareo de la misma. Decidimos incluir el apareamiento de los últimos tres nucleótidos en cada extremo de la sonda, en forma de promedio y peso a cada uno de ellos.

Asimismo, el correcto apareamiento de alguno de los extremos de la sonda con la secuencia blanco, podría favorecer una posible reacción de PCR.

- Dado que las secuencias blanco no son exactamente las mismas, la temperatura de apareamiento sería variable. *Decidimos homogenizar las temperaturas:* La temperatura óptima depende básicamente del apareamiento con cada secuencia blanco, del contenido de GC y del tamaño del oligonucleótido, así como la concentración de sales. Incluimos la temperatura de fusión media en forma promediada.
- *Dado que se consideran despareamientos en la secuencia, pero no la distribución de ellas:* Decidimos incluir el tamaño máximo de apareamiento contiguo con cada secuencia blanco, de una forma promediada.
- Es posible que dos oligonucleótidos tengan promedio de apareamiento y promedio de temperatura similares. Para poder evaluar cual de los dos resultaría ser el mejor, se decidió que el mejor de los oligonucleótidos que tienen promedios muy similares sería el oligonucleótido cuya desviación estándar del apareamiento y/o temperatura sea mínima: Esto evitaría que algunas secuencias tengan muy poco apareamiento y/o muy baja temperatura, pero compensado con otras secuencias de apareamiento y/o temperatura altos. Decidimos reducir el promedio en dos desviaciones estándar a cada término, bajo la suposición de que la distribución del apareamiento y de las temperaturas se aproxima a una curva estadística normal. Dada la suposición de una distribución normal, la media menos dos desviaciones representan el 96% de la población y resulta en un estadístico tal, que sólo el 2% de la población está por debajo de este valor; es decir, solo una de las 52 secuencias podrían estar por debajo del estadístico escogido. Ahora, la desviación estándar de la población se ve afectada por secuencias blanco que aparezcan muy poco con la sonda o a secuencias blanco que aparezcan mucho con la sonda o a ambos casos en la misma población. Entonces es preferible que la desviación estándar de un oligonucleótido sea provocada por apareamientos altos que por apareamientos bajos. Para "premiar" a aquellos oligonucleótidos cuya desviación es provocada por secuencias blanco con muy alto apareamiento y "castigar" aquellos oligonucleótidos cuya desviación es provocada por secuencias blanco con muy bajo apareamiento: decidimos introducir como "corrección", el número de secuencias de apareamiento superior al 89% menos el número de secuencias con apareamiento por debajo de 61%.

Para determinar el peso aproximado de cada término, se formaron 5 grandes grupos:

Término	Unidades	Rango
Apareamiento	Nucleótidos	0~L*
Temperatura media de fusión	°C	0~100
Apareamiento en los extremos (5' y 3')	Nucleótidos	0~N [§]
Encadenamiento	Nucleótidos	0~L*
Energías intermoleculares e intramoleculares	Kcal/mol	-95~0 [†]

*L es la longitud del oligonucleótido. § N es el número de secuencias.

† Calculado para 50 nucleótidos aunque en ejecución se determina en función de la longitud real del oligonucleótido en curso.

Para evaluar todos los parámetros en una sola función, a cada término se le asoció una constante de "peso" relativo. El peso relativo de cada constante fue determinado variando solo una de las constantes, hasta obtener resultados satisfactorios. Para poder sumar cada uno de los parámetros, dado que son unidades completamente diferentes y a escalas diferentes, se normalizaron al valor máximo y mínimo permisible resultando en valores de 0 y 1 antes de multiplicar por el "peso" relativo de cada uno. Para comparar oligonucleótidos de diferente tamaño, los términos se multiplicaron por el inverso de la longitud del oligonucleótido.

La función para evaluar los oligonucleótidos resultó ser la siguiente :

$$f_{sonda} = sP + sE + sG + sJ + sM$$

donde

$$sP = (P_m - 2P_{SD}) * 0.18 * (1/50 + 1/Ol) + 0.333 * (N_{Ov} - N_W) / N_{sec}$$

$$sE = 0.6 N_{m5+0} + 0.3 N_{m5+1} + 0.1 N_{m5+2} + 0.6 N_{m3+0} + 0.3 N_{m3-1} + 0.1 N_{m3-2}$$

$$sG = sGH + sGD$$

$$sGH = 0.04 * (\Delta GH_N + 12.6) / 12.6$$

$$sGD = 0.04 * (\Delta GD_N + 19.8) / 19.8$$

$$sJ = 0.5 * (J_m - J_n) * 0.05 * (1/50 + 1/Ol)$$

$$sM = (Tm_m - 2Tm_{DS}) * 0.18 * (1/50 + 1/Ol) + 0.333 * (N_{Ov} - N_W) / N_{sec}$$

$$Tm_m = Tm_{opt} \text{ promedio } (\Sigma(Tm_{opt}) / N_{sec})$$

$$Tm_{DS} = \text{Desviación estándar de } Tm_{opt}$$

$$Tm_{opt} = Tm_{Primer} * 0.3 + Tm_{Product} * 0.7$$

$$Tm_{Product} = (100.5 + 16.6 * \log_{10}(0.050) + 0.41 * \%GC - (820 / Ol) - \%mismatch$$

$$Tm_{Primer} = (1000.0 * (\Delta h - 3.4) / (\Delta s + 1.987 * \log(1 / 50 * 10^9))) - 273.15 + 16.6 * \log_{10}(50 * 10^3)$$

$$P_m = \text{Apareamiento promedio}$$

$$P_{SD} = \text{Desviación estándar del apareamiento promedio}$$

$$Ol = \text{longitud del oligonucleótido.}$$

$$N_{sec} = \text{Número de secuencias}$$

$$N_{Ov} = \text{Número de secuencias que rebasan 89\% de apareamiento}$$

$$N_W = \text{Número de secuencias que no llegan a 61\% de apareamiento}$$

$$N_{m5+0} = \text{Número de nucleótidos que aparean en el extremo 5'}$$

$$N_{m5+1} = \text{Número de nucleótidos que aparean 1 nucleótido después del extremo 5'}$$

$$N_{m5+2} = \text{Número de nucleótidos que aparean 2 nucleótidos después del extremo 5'}$$

$$N_{m3-2} = \text{Número de nucleótidos que aparean 2 nucleótidos antes del extremo 3'}$$

$$N_{m3-1} = \text{Número de nucleótidos que aparean 1 nucleótido antes del extremo 3'}$$

$$N_{m3-0} = \text{Número de nucleótidos que aparean en el extremo 3'}$$

$$J_m = \text{Promedio del encadenamiento (numero máximo de nucleótidos que aparean y estan consecutivos)}$$

$$J_n = \text{Mínimo de cada uno de los encadenamientos de cada secuencia}$$

$$\Delta GH_N = \text{Energía libre máxima de formación de un complejo de horquilla calculada con el método Neighbor (Breslauer y cols. 1986)}$$

$$\Delta GD_N = \text{Energía libre máxima de formación de un complejo intermolecular calculada con el método Neighbor (Breslauer y cols. 1986)}$$

Los 5 grupos se aproximan a los pesos relativos de 0.36, 0.12, 0.08, 0.10 y 0.36 de peso para sP , sE , sG , sJ y sM respectivamente.

4.4 Diseño de la Sonda (GH-Explorer I)

Las secuencias iniciales de 32 nucleótidos ordenadas por alineamiento promedio reportadas según *MaxProbe* fueron:

- 1) ctggcctgcttcaagaaggacatgcacaaggt
- 2) aaggtggagacctacctgacggtggccaaatg
- 3) tcctatcgactgattgagtcttgggagttccc
- 4) ctacgaactgctggcctgcttcaagaaggaca
- 5) ggctctctccagaggccaactgcacacctgtag
- 6) ttgagtcttgggagttccccagtcggtctctg
- 7) tgaggagcagcgacagctcaacaaaatcttcc
- 8) gaactgctggcctgcttcaagaaggacatgca
- 9) ttcaagaaggacatgcacaaggtggagacct
- 10) gtggagacctacctgacggtggccaaatgcag
- 11) cacaaggtggagacctacctgacggtggccaa

Sin embargo, después de que *MaxProbe* realizó la extensión y cortes automáticos en ambos extremos, 7 de las secuencias, las secuencias 1, 2, 4, 8, 9, 10 y 11 convergieron a la secuencia siguiente:

gcctgcttcaagaaggacatgcacaaggtggagacctacctg (42nt)

La convergencia se explica "alineando" y comparando las secuencias entre si...

```

gcctgcttcaagaaggacatgcacaaggtggagacctacctg (42nt)
ctacgaactgctggcctgcttcaagaaggaca (4)
gaactgctggcctgcttcaagaaggacatgca (8)
ctggcctgcttcaagaaggacatgcacaaggt (1)
ttcaagaaggacatgcacaaggtggagacct (9)
cacaaggtggagacctacctgacggtggccaa (11)
aaggtggagacctacctgacggtggccaaatg (2)
(10) gtggagacctacctgacggtggccaaatgcag
  
```

Podemos ver que en realidad es la misma zona y que cada oligonucleótido abarca una buena parte de ésta, pero la única que está totalmente inmersa es el oligonucleótido 9.

En la Figura 4.4 muestra el informe después de indicar a *MaxProbe* que extendiera el extremo 5' de la sonda. Se ve que el apareamiento promedio de la sonda con todas las secuencias es de 48 de 56 nucleótidos (86%); en el peor de los casos (primates), 42 de 56 (75%) y 51 de 56 (91%) en el mejor de los casos (gallo y roedores). La posición 11 se degeneró incluyendo A y G para aumentar el desempeño en primates sin afectar a las demás secuencias (elevando principalmente el encadenamiento -join-). La secuencia definitiva de la sonda a la que llamamos *GH-Explorer I* es la siguiente:

↓

5' gcctgcttcaRgaaggacatgcacaaggtggagacctacctgaggggtcatgaagtg3'

↑

La posición del 5º intrón encontrada en algunos peces se marca con flechas y está situada cerca de la mitad de la sonda. Se especifica también la degeneración introducida.

Obtención de nuevos genes de la hormona del crecimiento (GH) en vertebrados

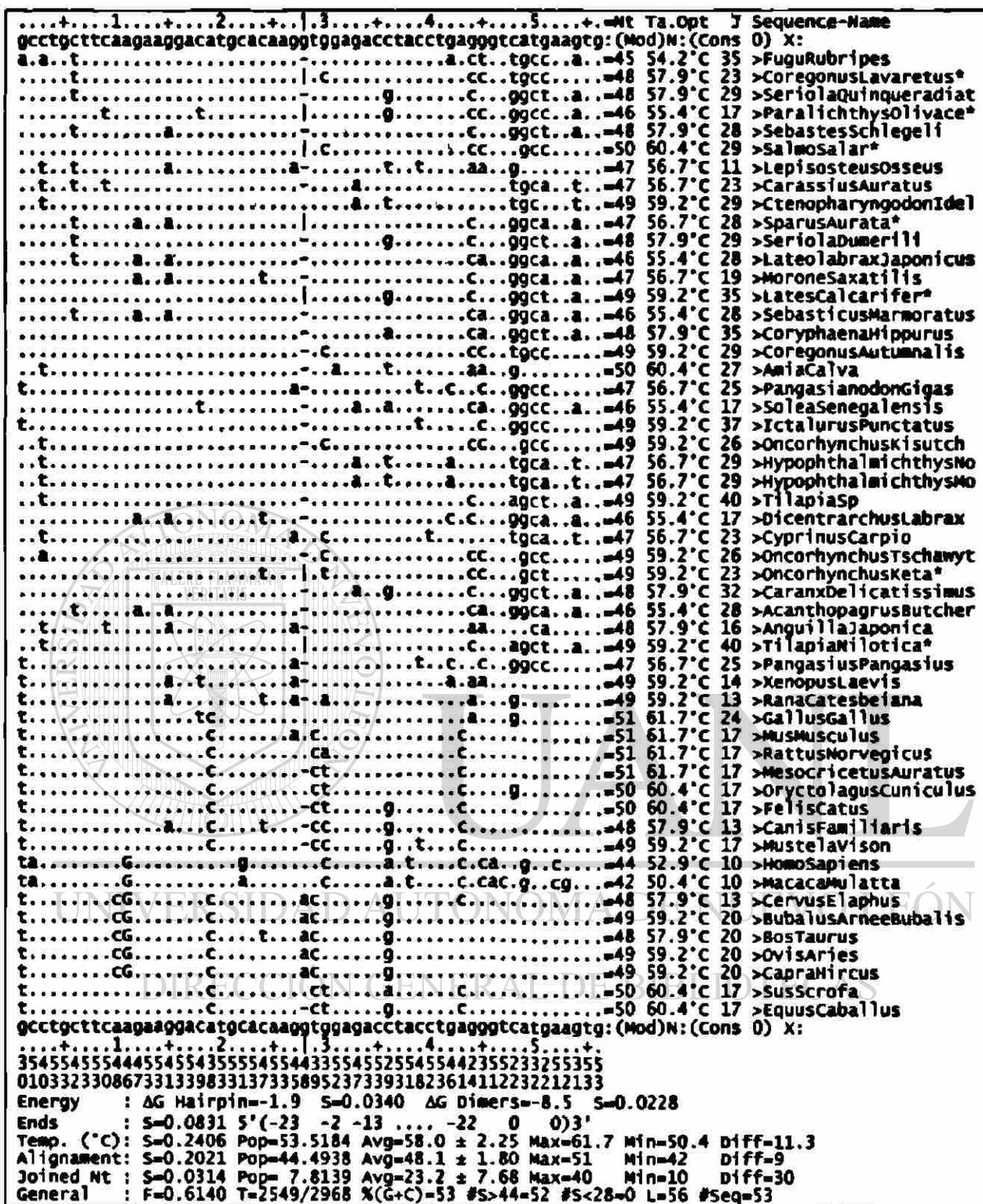


Figura 4.4 Informe del alineamiento de la sonda según MaxProbe. Se muestra el alineamiento. Se resalta con mayúsculas la posición de la degeneración, incrementando el valor de encadenamiento -join- en primates de 10 hasta 19. Se muestra con una barra vertical (|) la posición del intrón 5 solo en las especies que se sabe que lo contienen, un punto (.) en las que se sabe que no lo contienen y un guión (-) en las que no hay evidencia experimental al respecto dado que son secuencias de DNAc. La barra vertical, el punto y el guión, indican igualdad con el nucleótido de la secuencia en cuestión (arriba y abajo).

4.5 Comprobación del Desempeño de *GH-Explorer I*

4.5.1 Comprobación Virtual de *GH-Explorer I*

Para comprobar la especificidad de la sonda por la GH de vertebrados, se efectuó una consulta en la página de Internet del *GenBank* con la secuencia de *GH-Explorer I*, como se indicó en Material y Métodos. En el informe completo (Anexo 3) se obtuvieron 189 secuencias, de los cuales 173 corresponden a todos los informes de GH obtenidos (Anexo 1), por lo tanto, 16 son falsos positivos. Unos fragmentos representativos por analizar se muestran en la Figura 4.4. Casualmente, las secuencias de GH de pato (Figura 4.6) y atún, las que mejor aparean con la sonda *GH-Explorer I*, no habían sido incluidas en el grupo de secuencias en estudio, seguramente por errores en el filtrado. Las secuencias nucleotídicas de *Bufo marinus* (sapo), *Trichosurus vulpecula* (possum) y algunas otras especies, fueron reportadas en el lapso mientras se hacía el estudio y este escrito. Por el alto parecido con Pato, Atún, Sapo y Possum entre otros, queda demostrado que aún con secuencias desconocidas de la hormona del crecimiento, la sonda *GH-Explorer I* aparece positivamente, así sean de aves, peces, anfibios o vertebrados superiores. Indicando que la zona y secuencia escogida tiene una alta importancia evolutiva y/o funcional.

Gallo (*Gallus domesticus*, *Gallus Gallus*) es uno de los que aparean más alto (Figura 4.6) con el grupo de secuencias en estudio (Figura 4.3) y que en el informe también sale evaluado muy alto (por alto "score" y bajo "E"), coincidiendo con el informe; así mismo sucede con macaco que es de los que menos aparean (Figura 4.7). De los falsos positivos, basta con ver el apareamiento que resulta ser muy pobre, dan un resultado "positivo" debido a que se usó un tamaño mínimo de apareamiento de 8 nucleótidos en el informe, o sea, que todas las secuencias que al menos apareen 8 nucleótidos consecutivos serían posibles positivos, sin embargo el apareamiento es realmente bajo.

* El informe de los apareamientos no se muestra completo debido al volumen de información. Para analizarlos, debe reproducir la consulta como se indica en material y métodos e introducir el número máximo posible en el parámetro "Alignments" de la página de Internet correspondiente.

Obtención de nuevos genes de la hormona del crecimiento (GH) en vertebrados

Sequences producing significant alignments:	Score (bits)	E Value
emb X07079 APGH Duck mRNA for growth hormone	<u>83</u>	4e-15
emb X06735 TTGHR Tuna mRNA for growth hormone	<u>83</u>	4e-15
...(omisión)...		
emb V01238 RMGROW2 Rat gene for growth hormone (presomatotropin...	<u>75</u>	1e-12
emb X17618 GDGHSOM G.domesticus growth hormone somatotropin mRNA	<u>75</u>	1e-12
...(omisión)...		
gb L25053 RATGNRRR Rattus norvegicus Gonadotropin releasing hor...	<u>75</u>	1e-12
...(omisión)...		
gb AF062746 AF062746 Bufo marinus growth hormone precursor, mRNA...	<u>67</u>	3e-10
...(omisión)...		
gb U02293 MMU02293 Macaca mulatta growth hormone-variant gene, ...	<u>47</u>	3e-04
...(omisión)...		
gb 882528 882528 growth hormone [Lepisosteus osseus-long-nosed ...	<u>41</u>	0.019
emb Z32691 ECT7DN1 E.coli (HM174) pT7T7/T7H DNA, 11271 bp	<u>39</u>	0.075
emb Z32693 ECT7DN3 E.coli pT7hGH_p1 DNA, 6160bp	<u>39</u>	0.075
gb AF075648 AF075648 Equus caballus microsatellite LEX046	<u>37</u>	0.30
gb L16556 MACGH Monkey growth hormone mRNA, complete cds and fl...	<u>37</u>	0.30
...(omisión)...		
db D10640 ONHPSOL Chum salmon mRNA for somatolactin, complete cds	<u>35</u>	1.2
...(omisión)...		
gb U63803 AMU63803 Arothron maculatus growth hormone (GH) gene, ...	<u>33</u>	4.8
...(omisión)...		
gb U90307 HSU90307 Human iroquois-class homeodomain protein IRX...	<u>33</u>	4.8

Figura 4.5 Fragmentos representativos del informe del apareamiento de la sonda *GH-Explorer I* con las secuencias reportadas en GenBank.

```

emb|X07079|APGH Duck mRNA for growth hormone          Length = 794
Score = 82.7 bits (41), Expect = 4e-15
Identities = 51/55 (92%), Positives = 51/55 (92%)
Query: 2   cctgcttcargaaggacatgcacaaggtggagacctacctgaggggtcatgaagtg 56
          ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| |||
Sbjct: 601 cctgcttcaagaaggacctgcacaaggtggagacctacctgaaggtgatgaagtg 655

```

```

emb|X17618|GDGHSOM G.domesticus growth hormone somatotropin mRNA Length = 782
Score = 74.7 bits (37), Expect = 1e-12
Identities = 50/55 (90%), Positives = 50/55 (90%)
Query: 2   cctgcttcargaaggacatgcacaaggtggagacctacctgaggggtcatgaagtg 56
          ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| |||
Sbjct: 597 cctgcttcaagaaggatctgcacaaggtggagacctacctgaaggtgatgaagtg 651

```

Figura 4.6 Mejores apareamientos.

```

gb|U02293|MMU02293 Macaca mulatta growth hormone-variant gene, complete cds.
          Length = 2594
Score = 46.6 bits (23), Expect = 3e-04
Identities = 30/33 (90%), Positives = 30/33 (90%)
Query: 3   ctgcttcargaaggacatgcacaaggtggagac 35
          ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| |||
Sbjct: 1889 ctgcttcaggaaggacatgaacaaggtcgagac 1921

```

Figura 4.7 Bajo apareamiento.

Existe un falso positivo que resulta en un apareamiento muy alto, "Rattus norvegicus Gonadotropin releasing hormone" (Figura 4.8), el cual analizando las referencias del informe, descubrimos que la secuencia es derivada de una línea celular de tumor pituitario. Las otras secuencias reportadas son muy poco parecidas o bacterianas; lo que nos sugiere

que pudo haber recombinación específica en esta línea celular que pudo dar lugar a la obtención de esa secuencia.

```
gb|L25053|RATGNRH Rattus norvegicus Gonadotropin releasing hormone receptor
(GnRH-R) mRNA, complete cds. Length = 2938
Score = 74.7 bits (37), Expect = 1e-12
Identities = 50/55 (90%), Positives = 50/55 (90%)
Query: 2 cctgcttcargaaggacatgcacaagggtggagacctacctgagggtcatgaagtg 56
      ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| |||||
Sbjct: 149 cctgcttcaagaaggacctgcacaaggcagagacctacctgagggtcatgaagtg 95
```

Figura 4.8 Falso positivo. Vease texto.

4.5.2 Comprobación Experimental de *GH-Explorer I*

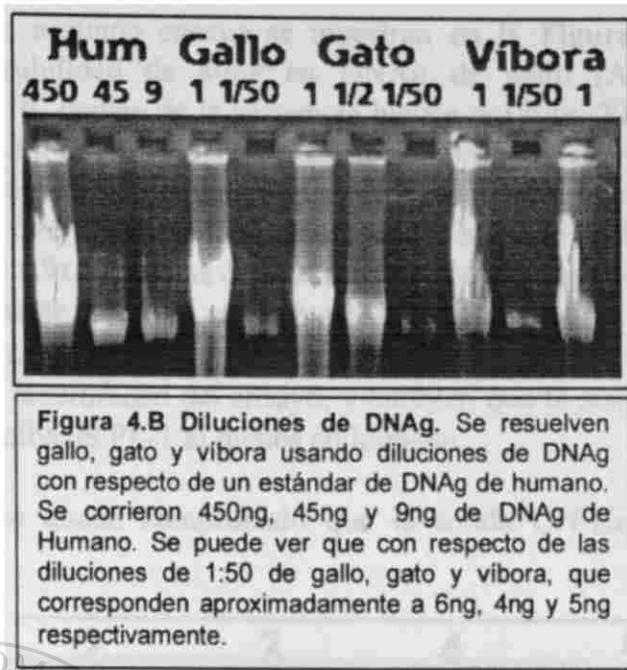
4.5.2.1 Extracción y Semicuantificación del DNAg

En la Figura 4.A se muestra la imagen del gel con los DNAg de humano, carpa, ratón, catán, tortuga (1), tiburón, avestruz, jirafa, gato, ameca, gallo, lagartija, guppy, tilapia, tortuga (2) y serpiente. Los resultados de la cuantificación son 450ng, 350ng, 250ng, 250ng, 200ng, 200ng, 700ng, 300ng, 185ng (en Figura 4.B), 50ng, 300ng (en Figura 4.B), 150ng, 20ng, 350ng, 400ng y 300ng respectivamente. Había duda en los carriles de gato, víbora y gallo que se resolvieron haciendo una extracción Fenol:Sevag[†] (1:1), diluyendo con H₂O y calentando 2min a 60°C. Los resultados se muestran en la Figura 4.B.



Figura 4.A Semicuantificación del DNAg de diferentes especies. humano, carpa, ratón, catán, tortuga (1), tiburón, avestruz, jirafa, gato, ameca, gallo, lagartija, guppy, tilapia, tortuga (2) y serpiente de izquierda a derecha respectivamente.

[†] Sevag esta compuesto de Cloroformo:Alcohol isoamílico (24:1).



4.5.2.2 Ensayo de Hibridación

Para comprobar el funcionamiento de *GH-Explorer I*, se hicieron dos ensayos de hibridación tipo slot-blot en membrana de nylon usando DNAg de varias especies como secuencias blanco. El primer ensayo demuestra que la sonda *GH-Explorer I* hibridó con todos los DNAg de las especies incluidas y el resultado se muestra en Figura 4.9. Se observan diferencias en la intensidad de detección, las cuales pueden ser debidas a la variación en la cantidad y calidad del DNAg, diferencias en los tamaños de los genomas y al apareamiento de la sonda según la secuencia. La única variación significativa en la cantidad de DNAg es guppy (C5) con 3.5µg en vez de 8µg, por lo tanto, las variaciones en intensidad deberían corresponder a las variaciones de apareamiento de *GH-Explorer I* con la secuencia específica normalizando respecto al tamaño del genoma. Podemos ver que 800ng de DNAg de gallo (E1) se detectan perfectamente, con dificultad se logran apreciar 80ng de DNAg de gallo (E2). La integración densitométrica que se ve en la Tabla 4.3 muestra que las dos líneas más intensas son las de gallo y ratón (A6 y B1) que parecieran coincidir con los resultados obtenidos en el apareamiento tanto en el diseño de la sonda (Figura 4.4 Apareamiento *Gallus gallus*=51/56 y *Mus musculus*=51/56) como en el informe de BLAST (Anexo 3); las siguientes en cuanto a intensidad serían Carpa y Tilapia (B6 y C1 respectivamente) que también parecen coincidir (Figura 4.4 Apareamiento *Cyprinus carpio*=47/56 y tilapia=49/56). De hecho, tilapia posee un sexto exón y no se aprecia diferencia significativa. Las menos intensas son humano, jirafa y cerdo (A1, A4 y A5), en humano también es consistente con el informe de BLAST. En catán y tiburón (C3 y C4) se aprecia una señal aceptable, considerando que éstos peces son muy primitivos y que pudieran tener más variaciones en la secuencia nucleotídica que todavía no se conoce. Toda la línea D es de DNA plasmídico usado como control positivo y de sensibilidad, y no se aprecia señal alguna; dado que el control negativo también es un plásmido, se tuvo duda de la integridad del ensayo y para resolverlo se hizo el segundo ensayo.

Los resultados del segundo ensayo se muestran en la Figura 4.10. En este ensayo confirmamos la sensibilidad de 80ng en DNAg de gallo (A3) lo que equivale a aproximadamente 6×10^4 copias de la secuencia blanco o 120fg. Ya no se aprecian 8ng de DNAg de gallo (A4). En DNA de GH de jirafa se pudieron detectar hasta 12pg (B3) ($32 \text{pg} / (4833/1875)$) que equivalen a 6.13×10^6 copias de la secuencia blanco que es 2 órdenes de magnitud menos. En DNA de lactógeno placentario 1 humano (hpl-1) se lograron detectar 3.2ng lo que equivale a 9×10^8 copias de la secuencia blanco que son 4 órdenes de magnitud menos (aproximadamente tomando en cuenta las intensidades y la cantidad de DNA). Por densitometría no se detecta nada en los controles negativos (D1~D6). Comprobamos la reproducibilidad y la sensibilidad del ensayo, y también que la sonda tiene menos afinidad por otro gen de la familia, el PL-1 al menos en humano.

Con estos ensayos queda comprobado que la sonda *GH-Explorer I* funciona para vertebrados.

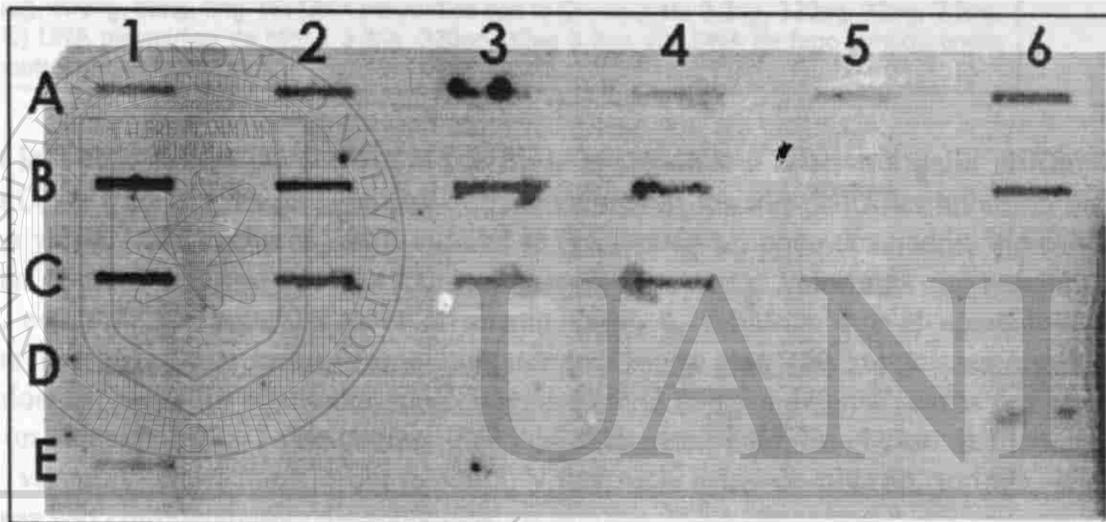


Figura 4.9 Hibrización de *GH-Explorer I* con DNAg de varias especies. Línea A: Humano, gato, vaca, jirafa, cerdo y ratón (de 1 a 6 respectivamente). Línea B: gallo, avestruz, tortuga, víbora, gecko, carpa. Línea C: Tilapia, ameca, catán, tiburón, guppy y pBR322 (Control negativo). Línea D: pBSjGH-J5 (titulación). Línea E: gallo 800ng y gallo 80ng.

Tabla 4.3 Apareamiento de la sonda *GH-Explorer I* a DNA de diferentes especies ³.

	1	2	3	4	5	6		1	2	3	4	5	6
A	0.62	0.77	0.47	0.30	0.45	0.90	A	1.83	2.28	1.45	0.87	1.17	2.77
B	1.00	0.73	0.68	0.64	0.33	0.72	B	1.09	0.77	1.55	1.16	0.75	1.07
C	0.89	0.82	0.56	0.63	0.27		C	1.35	1.33	0.82	0.93	0.84	
D							D						
E	0.098	0.015					E	0.85	1.09				

³ (Izquierda) Integración densitométrica de las señales de la Figura 4.10 relativas a gallo. Se subrayan los que participaron en la curva de calibración. (Derecha) Fuerza de apareamiento relativo a gallo ($(\log(\text{Área_Relativa_a_gallo}) - b) / m$) / ($\text{Tamaño_Genoma_gallo} / \text{Tamaño_Genoma_Especie}$); $m = 0.91374$, $b = -0.03238$), es decir, los que tienen un apareamiento "aparente similar" a gallo, tendrán un valor cercano a 1, menor para los que aparean menos y mayor para los que aparean más. En gecko, ameca y guppy se hicieron correcciones por la cantidad disminuida de DNAg. Los tamaños utilizados en cada genoma se muestran en Tabla 3.4.

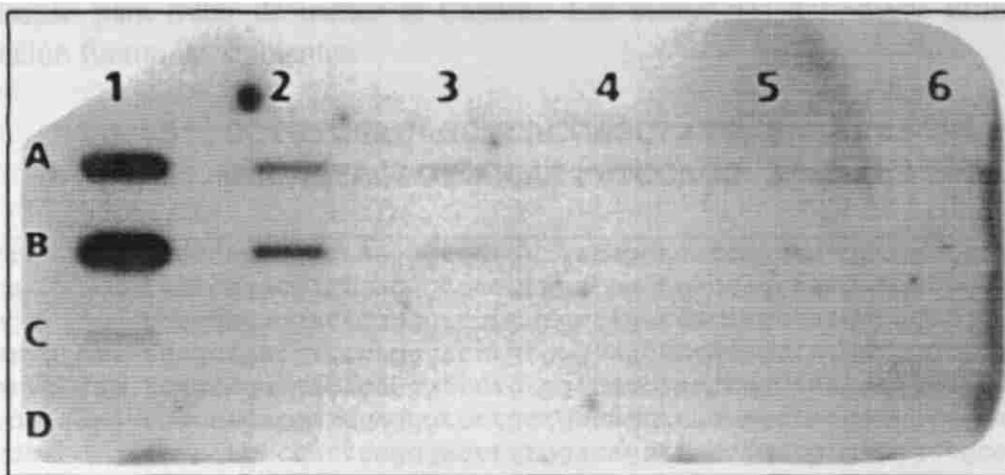


Figura 4.10 Hibridación de *GH-Explorer I* con titulaciones de DNA. (A) DNAg de gallo 8ug, 800ng, 80ng, 8ng. (B) DNA plasmídico con la GH de jirafa 3.2ng, 320pg, 32pg, 3 2pg. (C) DNA plasmídico de hPL-1 3.2ng, 320pg, 32pg 3.2pg. (D) DNA de fago lambda como control negativo.

En la Tabla 4.3, se pueden ver la fuerza de apareamiento relativa a gallo utilizando la sonda *GH-Explorer I*. Es de esperarse que los valores de los tres controles hubiesen dado el mismo valor: 1, sin embargo, estos valores se encuentran un poco desviados, indicando un margen de error cercano al 15%. Asimismo se observa que el valor más alto resulta ser en ratón, con 2.77; se esperaba tener el mismo valor, 1, debido a que el apareamiento es similar (51/56). Otros casos, como humano (44/56) y gato (50/56) y vaca están muy elevados. En peces los resultados son cercanos dado el margen de error, carpa por ejemplo, tiene un valor de 1.07 y coincide muy bien con el apareamiento. En el caso de tilapia puede haber variación en el tamaño del genoma, y, las secuencias de tiburón, tortuga, gecko y avestruz son completamente desconocidas.

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

4.6 Diseño de Oligonucleótidos Iniciadores para PCR

Para el diseño de iniciadores para PCR se usaron dos metodologías. La primera y la más común fue el alineamiento de las secuencias de los artiodáctilos para buscar un consenso. La segunda metodología fue usando la estrategia de búsqueda de consensos como en el diseño de la sonda *GH-Explorer I*.

4.6.1 Diseño de Iniciadores para Artiodáctilos

El alineamiento realizado en *CLUSTALW* de las secuencias 5' y 3' de Artiodáctilos se muestra en la Figura 4.11 y Figura 4.12 respectivamente. Ambos oligonucleótidos tienen una longitud de 24nt y la temperatura de fusión media (T_m) resulta ser de 69°C y 72°C para el 5' y 3' respectivamente. El nucleótido en la posición 6 de Art5'-140 fue cambiado del consenso para romper una estructura de horquilla (apareamiento intramolecular)

oligonucleótidos. Para evaluar los iniciadores fue necesario diseñar una función para compararlos entre sí. Dado el éxito obtenido en este trabajo para la evaluación de una sonda consenso, pensamos que básicamente la tarea de búsqueda y evaluación era la misma y que solo faltaría considerar una característica propia del ensayo, la iniciabilidad, que fue considerada exactamente igual como la calcula el programa *Amplify 1.2* sumando un valor correspondiente a cada posición apareada del iniciador con la secuencia blanco. La suma es dividida por el valor máximo que pueda tener un iniciador dada la longitud para obtener un porcentaje de iniciabilidad. En este trabajo consideramos una secuencia amplificada si rebasa el valor de 84% de iniciabilidad. Los valores de cada posición son 30, 20, 10, 10, 9, 9, 8, 7, 6, 5, 5, 4, 3, 2, 1, 1, ...; donde el valor mayor corresponde al extremo 3' y el menor al 5'. Para considerar cual de dos iniciadores sería mejor, también se considera el número de secuencias amplificadas por cada iniciador. El detalle de las modificaciones al proceso original de *MaxProbe* incluidos en *MaxPrime* es el siguiente:

- 1) Evaluación ponderada desde el extremo 3' hasta el 5' (Engels, 1992) para evaluar la iniciabilidad.
- 2) Análisis del número de oligonucleótidos necesarios hasta que cada secuencia tenga al menos un oligonucleótido con apareamiento > 85%, para "asegurar" que todas las secuencias tengan al menos un iniciador.
- 3) Evaluación de los oligonucleótidos agrupando únicamente a las especies que sobrepasan 84% de iniciabilidad ("primability" – Capacidad del oligonucleótido a favorecer la iniciación de la polimerización por la polimerasa) para no desviar los estadísticos utilizados en la evaluación de cada oligonucleótido y que la comparación entre oligonucleótidos sea válida.
- 4) Evaluación de oligonucleótidos hasta que todas las secuencias pueden ser blanco de un iniciador usando el criterio de iniciabilidad o hasta que acabarse el conjunto de iniciadores.
- 5) Los oligonucleótidos seleccionados hasta el punto 4) son "desplazados" hacia 5' y 3' 21nt para encontrar la mejor zona dentro de la región.
- 6) Se evalúa la mejor iniciabilidad en lugar de mejor Alineamiento.
- 7) Se calculan los mejores conjuntos de iniciadores que minimicen el número de iniciadores y maximicen el número de secuencias polimerizadas.

La fórmula para evaluar a los iniciadores resultó ser la siguiente:

$$f_{\text{iniciador}} = (f_{\text{sonda}} + s_{\text{Ini}}) * (1 + S_a / 2) \quad \text{sustituyendo...}$$

$$f_{\text{iniciador}} = (s_P + s_E + s_G + s_J + s_{Tm} + s_{\text{Ini}}) * (1 + S_a / 2)$$

donde

s_P , s_E , s_G , s_J y s_{Tm} son parámetros calculados igual que en f_{sonda} considerando solo las secuencias que se evalúan son aquellas con iniciabilidad > 84%.

$s_{\text{Ini}} = (\text{Ini}_m - 2\text{Ini}_{SD}) * 0.40$.

$S_a = \text{Número de secuencias con iniciabilidad (Ini)} > 84\%$.

$\text{Ini}_m = \text{Media de Ini}_k$.

$\text{Ini}_{SD} = \text{desviación estándar de Ini}_k$.

$\text{Ini}_k = (\sum I_{\text{fac}_i}) * 100 / \text{Ini}_{\text{max}}$; donde k es cada secuencia e i la posición de cada nucleótido dentro de la secuencia.

$Ifac_i =$ Alguno de $\{ 15, 12, 10, 10, 9, 9, 8, 7, 6, 5, 5, 4, 3, 2, 1, 1, \dots \}$ para $i = \{1, 2, 3, 4, \dots\}$ si y solo si el nucleótido en la posición i es igual tanto en el iniciador como en la secuencia blanco (donde $i = 1$ para el nucleótido en el extremo 3', $i = 2$ para el consecutivo hacia 5' y así sucesivamente).

$Ini_{max} = (\sum Ifac_i)$; considerando el iniciador y la secuencia blanco iguales.

La Tabla 4.4 muestra las especies y los tamaños de la secuencia usada para la búsqueda de iniciadores. Se obtuvieron 42 secuencias para el extremo 5' y 50 para el extremo 3' variando los tamaños. La amplificación *in silico* solo es posible en aquellas secuencias que tienen tanto extremo 3' como 5' y solo éstas fueron usadas para la comprobación en *Amplify 1.2*.

Tabla 4.4 Conjunto de secuencias usadas para el diseño de iniciadores.[§]

5'	CDS	Especie	3'	5'	CDS	Especie	3'
	588	<i>AmiaCalva</i>	248	38	633	<i>CoregonusAutumnalis</i>	71
22	636	<i>LepisosteusOsseus**</i>	1000		498	<i>OncorhynchusKisutch</i>	484
	630	<i>AnguillaJaponica</i>	181	72	633	<i>Oncor. Tschavytcha**</i>	433
	251	<i>PoeciliaReticulata</i>		500	633	<i>OncorhynchusKeta</i>	792
	251	<i>ColisaLalia</i>		500	633	<i>SalmoSalar</i>	1000
50	615	<i>MoroneSexatilis</i>	255	380	633	<i>CoregonusLavaretus</i>	520
32	621	<i>CaranxDelicatissimus</i>	180	258		<i>XenopusLaevis</i>	228
396	615	<i>SeriolaQuinqueradiata</i>	168	420		<i>XenopusLaevis</i>	
96	468	<i>SeriolaDumerilii</i>		648		<i>RanaCatesbeiana</i>	1
500	615	<i>LatesCalcarifer</i>	310	500	651	<i>GallusGallus</i>	182
26	624	<i>TilapiaSp</i>	237	38	651	<i>Anas platyrhynchos</i>	106
500	615	<i>TilapiaNilotica</i>	418	48	651	<i>Meleagris Gallopavo</i>	79
	612	<i>CoryphaenaHippurus</i>		431	654	<i>CapraHircus</i>	480
	615	<i>DicentrarchusLabrax</i>			654	<i>BubalusArneeBubalis</i>	
	564	<i>LateolabraxJaponicus</i>		500	654	<i>BosTaurus</i>	518
	615	<i>AcanthopagrusButcheri</i>		500	654	<i>OvisAries</i>	1000
24	615	<i>SparusAurata</i>	233	275	13	<i>CapricornisCrispus</i>	
118	573	<i>ParalichthysOlivaceus</i>	180	220	654	<i>GiraffaCamelopardal</i>	32
17	612	<i>SoleaSenegalensis</i>	119	180	654	<i>CervusElaphus</i>	114
21	615	<i>SebastesSchlegeli</i>	258	277	13	<i>CervusNippon</i>	
	564	<i>SebasticusMarmoratus</i>		239	651	<i>SusScrofa</i>	343
	243	<i>ArothronMaculatus</i>			651	<i>CanisFamiliaris</i>	69
500	591	<i>FuguRubripes</i>	1000	51	651	<i>FelisCatus</i>	111
	567	<i>CarassiusAuratus</i>		33	651	<i>MustelaVison</i>	99
500	633	<i>CtenopharyngodonIdella</i>	735	188	651	<i>OryctolagusCunicul</i>	728
272	633	<i>CyprinusCarpio</i>	751		651	<i>EquusCaballus</i>	113
	198	<i>AbramisBrama</i>		500	654	<i>MacaMulatta</i>	621
30	633	<i>Hypophthalmich.Nobilis</i>	503	500	654	<i>HomoSapiens</i>	633
22	633	<i>Hypophthalmich.Molitrix</i>	511	47	651	<i>MesocricetusAuratus</i>	111
500	603	<i>IctalurusPunctatus</i>	715	500	651	<i>MusMusculus</i>	175
58	603	<i>PangasianodonGigas</i>	515	460	651	<i>RattusNorvegicus</i>	171
	604	<i>PangasiusPangasius</i>					

[§] Se resaltan las secuencias con extremos 5' y 3' y se aprecia que no todas las secuencias tienen tanto fragmentos 3' como 5'. Las secuencias de pato y pavo (aves) que se muestran punteadas no fueron consideradas para el diseño automatizado de iniciadores, sin embargo fueron utilizadas junto con gallo para diseñar un par de iniciadores usando la metodología tradicional basada en un alineamiento múltiple e identificando manualmente una zona consenso. Se marca con doble asterisco (**) la secuencia completa que no se puede determinar si hay amplificación por los iniciadores escogidos.

Del conjunto de iniciadores reportado por *MaxPrimer*, se escogieron manualmente los de mejor amplificación por mayor número de especies hasta incluir el mayor número de

especies posibles. Se ignoraron los oligonucleótidos que solo podrían amplificar una sola secuencia. Dado que ningún iniciador producía un producto amplificado en gallo, se consideraron dos secuencias más de aves, la de pato y pavo (filtradas erróneamente y explicadas en resultados anteriores) para diseñar un par de iniciadores exclusivo para aves. Se usó la misma metodología tradicional como en el diseño de iniciadores para artiodáctilos del punto anterior.

El conjunto de iniciadores escogidos se muestra en la Tabla 4.5. La secuencia de cada iniciador fue introducida como consulta en la base de datos *GenBank* mediante *BLAST*[‡] con el objetivo de encontrar inespecificidades. La única combinación de iniciadores con energía -10Kcal/mol es “Ext_5’_(pez/6)” y “Ext_3’_(pez/1)” con -14.5Kcal/mol . En total, resultaron 11 iniciadores para el extremo 5’UTR y 8 para el extremo 3’UTR. De los 11 iniciadores del extremo 5’, 3 son exclusivos para mamíferos, 1 para aves y 7 para peces, coincidiendo con la observación global de los alineamientos donde las GHs resultaron estar más conservadas en mamíferos que en peces. La región de apareamiento del iniciador “Ext5’/pit/mam-1” en mamíferos coincide con un sitio de unión del factor transcripcional Pit-1 (Ingraham, 1988) que está muy conservado en mamíferos situado unas 185pb antes del codón de inicio; por lo tanto se presume que también podría estar conservada esta región en los demás mamíferos, aún así, se decidió incluir dos iniciadores más “Ext5’/mam-2” y “Ext5’/mam-3” que se aparean aproximadamente 30pb y 45pb antes del codón de inicio, respectivamente. De los 8 iniciadores para el extremo 3’, 2 son principalmente para mamíferos, 1 para aves y 5 para peces. Se observa que el iniciador de mamíferos del extremo 3’ Ext3’(mam/1) es similar a Art3’ diseñando manualmente en el punto anterior, esto confirma que la metodología automatizada de diseño es acertada, no se observa un iniciador parecido a Art5’ debido por un lado a que no se consideraron los 3 nucleótidos de región codificante incluidos en Art5’ y a que el iniciador Ext5’/pit/mam-1 es de más alta similitud y abarca además, a más especies, es decir, el algoritmo de búsqueda no encuentra algún iniciador similar a Art5’ porque no hay alguna especie incluida en Art5’ que no este incluida en Ext5’/pit/mam-1. En los resultados de *BLAST* de cada iniciador, se aprecian diferencias notables entre el número de especies consideradas positivas por *MaxPrime* y el número de especies consideradas positivas por *BLAST* (la diferencia se discute en el Capítulo 5). Para considerar los positivos en secuencias no relacionadas a GH (columna “otras [+]” en Tabla 4.4), en cada informe de *BLAST* se contaron el número de secuencias “diferentes”[§] con el nucleótido del extremo 3’ que sí estuviese apareado. En general no hay muchos positivos ya que la mayoría corresponden a DNA bacteriano en los cuales solo puede haber problemas si hay contaminación, pero, hay algunos iniciadores problemáticos como “Ext_3’(pez/5)” y “Ext_5’(pez/2)”, por las regiones ricas de un solo nucleótido.

En la Figura 4.14 se muestra un mapa de las posiciones de apareamiento de todos los iniciadores en las secuencias con al menos un producto amplificable. Se puede ver, en general, que los iniciadores se aparean precisamente en las regiones 5’UTR y 3’UTR. También se observa que hay iniciadores como los simbolizados por “q” y “s” que se aparean en regiones relativamente distales. Además, se aprecia que los iniciadores

[‡] Usando “-W 7 -q 1 -e 20” en “other advanced options” en la página “Advanced Blast” (tamaño de palabra 7, penalización de desapareamiento de 1 y expectativa de 20).

[§] Debido a que hay múltiples reportes de secuencias de DNA, se consideran las secuencias diferentes si hacen referencia a genes diferentes, regiones de DNA diferentes dentro un genoma o genomas diferentes.

diseñados de secuencias consenso de peces no se aparean en regiones no codificantes de mamíferos y viceversa. Sin embargo, en regiones codificantes de mamíferos se aparean iniciadores de peces y también, se aparean algunos iniciadores de mamíferos en secuencias de peces (como en la secuencia de *Giraffe camelopardalis* obtenida en este trabajo). De todas las secuencias con ambos extremos disponibles, solo 1, *Lepisosteus Osseus* no se puede determinar si hay amplificación debido a que el extremo 5' no es lo suficientemente largo. En la Figura 4.15 se muestra un mapa las secuencias que no pudieron ser amplificadas por los iniciadores. En estas secuencias, es claro que no se puede determinar la amplificación de la secuencia codificante completa de la GH debido a la ausencia de alguno de los extremos. Aún así, en la *Discusión* (capítulo 5) se plantea una buena alternativa para obtener al menos un fragmento mayoritario de la secuencia codificante de la GH.

Tabla 4.5 Conjunto de iniciadores seleccionados.

Nombre	Secuencia (5' → 3') *	T _m (°C)	ΔG Loop	ΔG Dímero	Máximo ↓	Se (+)	BLAST (+)	Otras (+)
a) Ext_5' (mam-pit/1)	TCTAAATTATCCATYAGCACA	52.8	-0.4	-5.3	AATF TTAA	12	12	1
b) Ext_5' (mam/2)	AGGGTCCTGTGGACAGCTCAC	67.7	-1.4	-6.6	CAGG GTCC	13	13	1
c) Ext_5' (mam/3)	TTCACCAGACCCTCAGGGTC	65.9	-1.7	-6.0	GACC CTGG	10	9	0
d) Ext_5' (pez/1)	CAGAAGCAGAACCTGAACCAG	64.0	0.7	-3.5	CTG GAC	5	4	5
e) Ext_5' (pez/2)	AGAAACAGAACCTGAACCCTGA	60.3	0.7	-3.5	CAG GTC	8	**5	>15
g) Ext_5' (pez/3)	ATGTTTCTCTTGATGAATTTA	52.8	0.6	-5.3	AATF TTAA	4	4	3
h) Ext_5' (pez/4)	ATCATCCTTGGCAATTAAGAG	56.5	0.6	-5.3	AATF TTAA	4	4	0
i) Ext_5' (pez/5)	ATGTGTCTACCCTGAGCGAA	59.4	2.7	-3.6	CG GC	4	4	0
f) Ext_5' (pez/6)	ACCTGAAACAGAGCCTGAACT	60.3	1.7	-3.5	CAG GTC	4	**2	2
k) Ext_5' (pez/7)	TCTTCAGAGAGATTTGGCAAA	56.5	-0.5	-5.7	TTTG AAAC	2	2	1
l) Ext_5' (pez/8)	GAACTGATCCCAGACCAGCC	63.3	0.7	-4.7	GATC CTAG	3	2	0
t) Ext_5' (ave/1)	GCAACACCTGAGCAGCTCTCC	65.9	-1.1	-6.3	AGCT TCGA	3	3	1
m) Ext_3' (mam/1)	CTGGAAGGTGCCACTCCAGGG	69.6	-7.1	-11.	CTGGA GACCCT	11	6	7
n) Ext_3' (mam/2)	AGGGTCCTGTGGACAGCTCAC	49.1	-1.4	-6.6	CAGG GTCC	13	7	0
o) Ext_3' (pez/1)	AGCAAGAGCCTGTCTCCAGGG	67.7	-2.1	-6.6	CTG GGAC	6	6	7
p) Ext_3' (pez/2)	GCATTAGTGTTAGCCTCTGTT	58.4	1.2	-3.1	GC CP	7	6	0
q) Ext_3' (pez/3)	GTTCTGTAGCTCCRCCTCAAT	62.1	2.4	-6.3	AGCT TCGA	9	2	1
r) Ext_3' (pez/4)	TTACAGTGGTGCTAAGCAAT	58.4	-1.4	-6.6	TGCT ACGA	6	6	0
s) Ext_3' (pez/6)	TGAAATAAAGTGTGTTCAATC	54.7	-1.1	-5.4	TGAA ACTT	9	4	2
u) Ext_3' (ave/1)	AGAGCAACTGCACCATCTGAG	64.0	0.2	-6.9	TGCA ACCT	3	3	0

* Las degeneraciones se encuentran subrayadas y el iniciador resaltado resulta ser casi el mismo que Art3' de artiodáctilos obtenido por la metodología tradicional. † Máxima energía de estructura intramolecular. ‡ Máxima energía intermolecular. ‡ Secuencia que ocasiona el máximo de estas energías. ‡ Número de secuencias positivas "in silico" usando MaxPrime. †† Número de secuencias que también fueron positivas es BLAST. ††† número de positivos de otras secuencias no relacionadas. ** Las energías (ΔG's) están en Kcal/mol.

** La consulta consistió de 13nt del extremo 3' y sin el parámetro "q" y con 100 de expectación en Blast.

†† Sin los parámetros "q" y "e" en Blast.

Obtención de nuevas genes de la hormona del crecimiento (GH) en vertebrados



Figura 4.14 Mapa de las posiciones de apareamiento de los iniciadores para GH en vertebrados. Los recuadros representan la secuencia y el tamaño proporcional del gen de la GH en cada especie. Se consideraron cuando mucho 500nt arriba y debajo de CDS y se alinearon con respecto de codón de terminación. Cada iniciador se simbolizó con una letra. Cada carácter (posición) representa 20.75nt.

Obtención de nuevos genes de la hormona del crecimiento (GH) en vertebrados



DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

4.7 Comprobación del Juego de Iniciadores Diseñado para Artiodáctilos

4.7.1 Amplificación por PCR en Artiodáctilos

En la Figura 4.20 se muestran los DNAG de cabra, puerco, vaca, búfalo americano, oveja, jirafa y cebrá usados en las reacciones de PCR, se aprecia en general un buen estado del DNAG en todas las especies excepto en búfalo americano donde se observa una considerable degradación del DNAG.

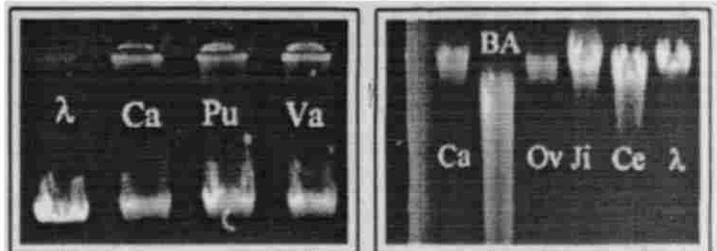


Figura 4.20 Gel de DNAG usados. (Izquierda) DNAG fago λ , cabra, puerco y vaca. (Derecha) DNAG de cabra, búfalo americano, oveja, jirafa, cebrá y fago λ .

El tamaño del amplicón esperado para cabra es de 1721pb y en la Figura 4.21 se puede ver que el amplicón de cabra corresponde a un tamaño aproximado de 1737pb. Los tamaños de los amplicones esperados para oveja y cerdo son 1719pb y 1669pb respectivamente. En la Figura 4.22 se logra ver que los amplicones de cabra y oveja aparentan ser del tamaño esperado, sin embargo, en cerdo, no es claro que las bandas alrededor de la banda de 1615pb del marcador central corresponden o no al producto de la GH de cerdo. Asimismo se puede ver que los cambios en la concentración de $MgCl_2$

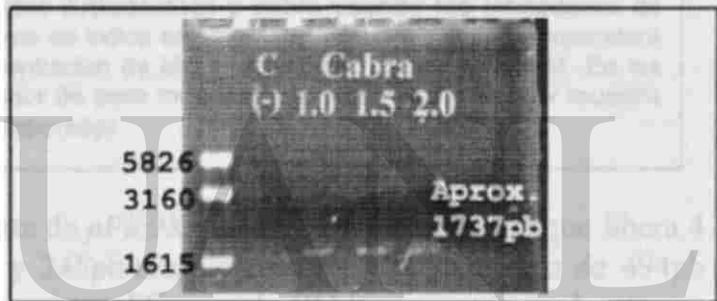


Figura 4.21 Cálculo del tamaño del amplicón de cabra. Se muestran pbsht-3-Sma I, C (-), amplicones de cabra a 1.0mM $MgCl_2$, 2.0mM $MgCl_2$ y 2.0mM $MgCl_2$ generados a una temperatura de apareamiento de 61°C. Se midió la distancia en píxeles (puntos gráficos) desde el inicio del carril hasta la mitad del largo de cada banda. Se calculó el ajuste lineal usando el \log_{10} de las distancias y el \log_{10} de los tamaños del marcador (carril izquierdo) cuyo coeficiente de correlación fue de 0.99. El tamaño calculado de las bandas fue de 1737pb que es muy cercano al tamaño esperado de 1721pb.

no mejoran la especificidad en cerdo aunque se aprecia una mejoría en la intensidad y por lo tanto una mejoría en la amplificación. Adicionalmente se observan los amplicones de jirafa y búfalo americano que por comparación del tamaño con cabra y oveja parecen corresponder a su GH; la degradación del DNAG en búfalo americano parece no estar alterando la reacción. Aunque cebrá no es parte del orden Artiodáctilos sino de los Perisodáctilos, por su cercanía evolutiva creíamos posible la obtención de su GH con el mismo juego de iniciadores. En la misma Figura 4.22 se aprecian bandas no específicas, siendo las de mayor intensidad las bandas cercanas a un producto de un tamaño alrededor de los esperados. Considerando que no hay ninguna secuencia genómica de la GH de algún Perisodáctilo, entonces, no se puede descartar la posibilidad de que se haya amplificado la

GH de cebra en este ensayo; se puede ver también, que la mejor intensidad se obtiene a una concentración de $MgCl_2$ de 2.5mM tanto en cebra como en cerdo.

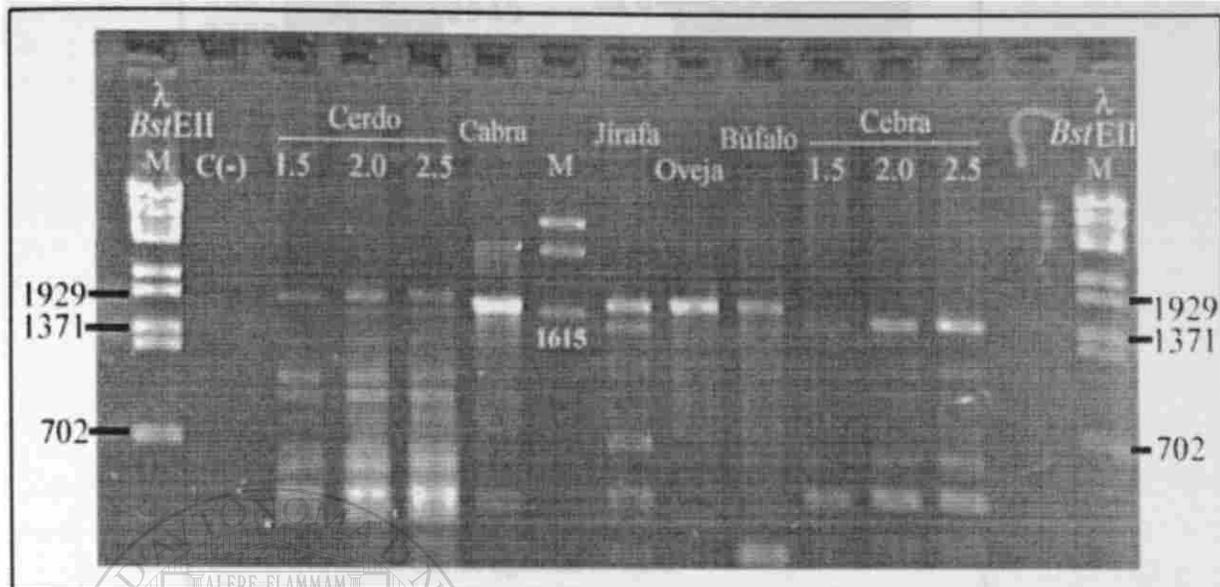


Figura 4.22 Productos amplificados de varios Artiodáctilos y cebra usando los iniciadores de Artiodáctilos. La reacción se llevó a cabo como se indica en Material y Métodos y a una temperatura de 58°C. En cerdo y cebra, se tituló la concentración de $MgCl_2$ en 1.5mM, 2.0mM y 2.5mM. En los extremos se muestran los tamaños del marcador de peso molecular. Al centro otro marcador muestra una banda de 1615pb cercana a los tamaños esperados.

En la Figura 4.23-A se observa el corte de *pPic9KbGH* con la enzima *PvuII* que libera 4 fragmentos de 6130pb, 2949pb, 494pb y 245pb respectivamente. El fragmento de 494pb corresponde a la mayor parte de la secuencia codificante de GH bovina casi en el extremo 3', y en la Figura 4.23-B se puede ver la misma banda ya purificada.

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

®

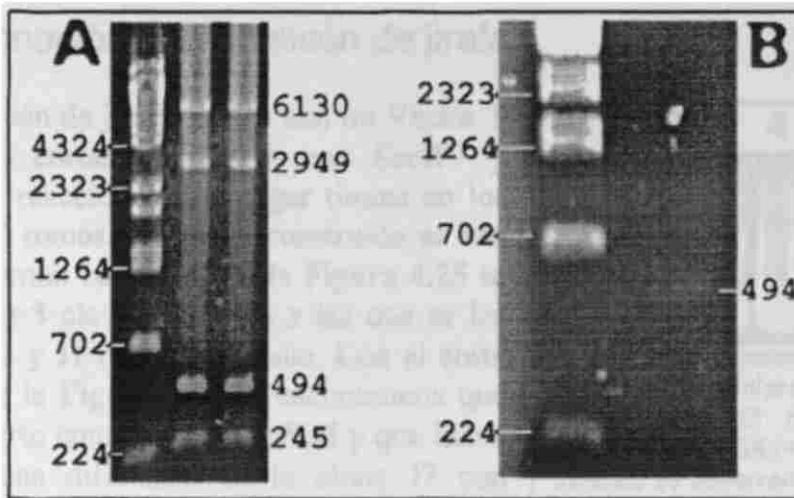


Figura 4.23 Purificación del fragmento a utilizar como sonda.
A) Corte de *pPic9KbGH* con *PvuII*; el primer carril corresponde a un marcador de peso molecular que flanquea el fragmento de 494pb; se muestran los tamaños correspondientes esperados de los fragmentos. Gel de agarosa al 0.8%. **B)** Purificación del fragmento; se muestra el fragmento purificado flanqueado por el mismo marcador. Gel de agarosa al 1.6%

En la Figura 4.24 se observa que los amplicones de cabra, vaca, oveja, jirafa y búfalo americano hibridan muy bien con la sonda construida a partir del fragmento de 494pb de una región codificante de la GH bovina. Se concluye que los amplicones de jirafa y búfalo americano deben corresponder sus GHs, no obstante, en cerdo y cebra no se observa hibridación alguna, concluyendo que ninguno de los amplicones de ambas especies corresponde a sus GHs.

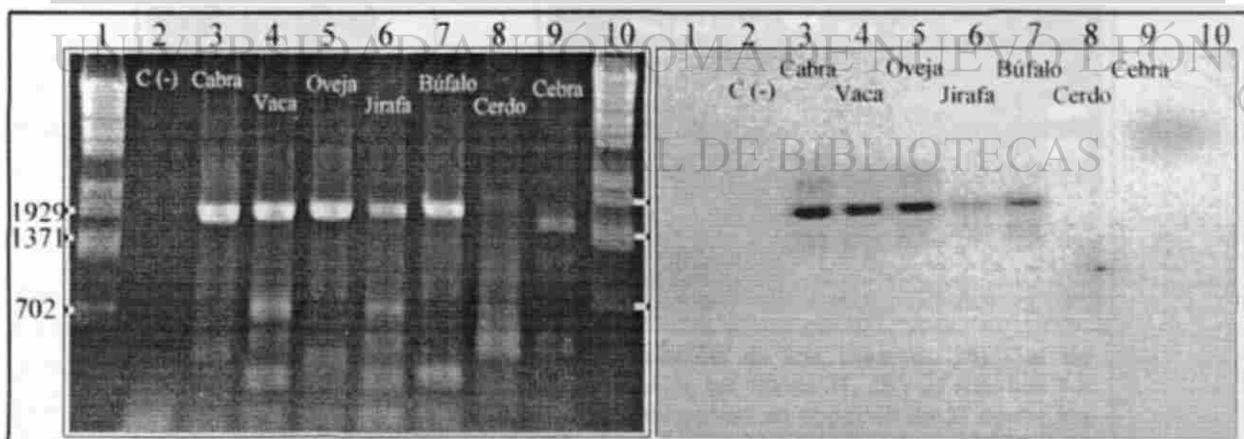


Figura 4.24 Hibridación de los amplicones con el fragmento de bGH de 494pb. (Izquierda) Gel de agarosa con los amplicones de Artiodáctilos y cebra. La reacción de PCR se llevo a cabo como se explica en Material y Métodos usando 59.5°C como temperatura de apareamiento y 1.5mM de $MgCl_2$, excepto en cerdo y cebra en los que se usó 2.5mM de $MgCl_2$. (Derecha) Autorradiografía del mismo gel después de la hibridación con la sonda de 494pb extraída de una parte de la secuencia de bGH clonada en *pPic9KbGH*.

4.7.2 Clonación del Amplicón de jirafa

El amplicón de jirafa se ligó con un Vector T generado al cortar pBSII-SK+ con *EcoRV* y haciendo la reacción para agregar timina en los extremos 3' romos. El vector construido se usó para transformar bacterias. En la Figura 4.25 se observan las 3 clonas de jirafa a las que se les llamó J5, J7 y J1 respectivamente. Con el corte con *NciI* de la Figura 4.26-A encontramos que nuestro inserto contenía el sitio *NciI* y que había al menos una diferencia en la clona J7 con respecto de J1 y J5. La diferencia podría deberse a una mutación puntual introducida en la reacción de PCR o a una dirección opuesta del inserto con respecto de las otras dos clonas. Para resolver ésta incógnita, realizamos cortes a las tres clonas con la enzima *PvuII* tal como se muestra en la Figura 4.26-B, donde se ve muy claro que al eliminar el sentido del inserto cortando previamente con *XhoI* y *EcoRI*, J1, J5 y J7 aparentan ser clonas con el mismo inserto, solo que J7 con un inserto en sentido opuesto relativo a las otras dos.

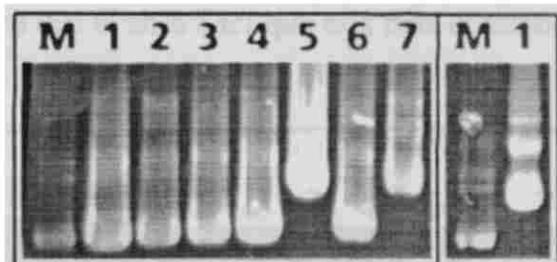


Figura 4.25 Minipreps de las colonias recolectadas. El marcador (M) es el plásmido pBSII-SK (+). Por el retraso de las bandas, se observan claramente 3 clonas (carril 5 y 7 del gel de la izquierda y carril 1 del gel de la derecha) con inserto a las que se les denominó J5, J7 y J1 respectivamente.

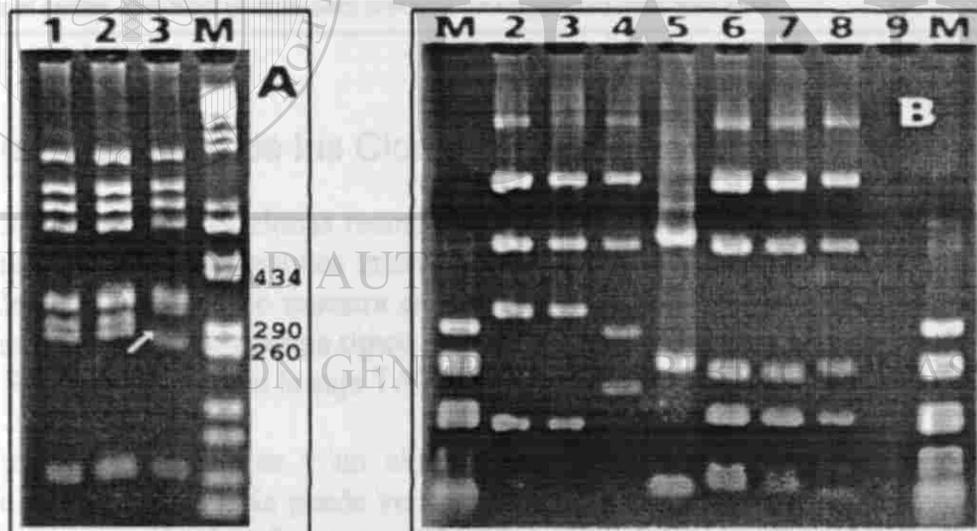
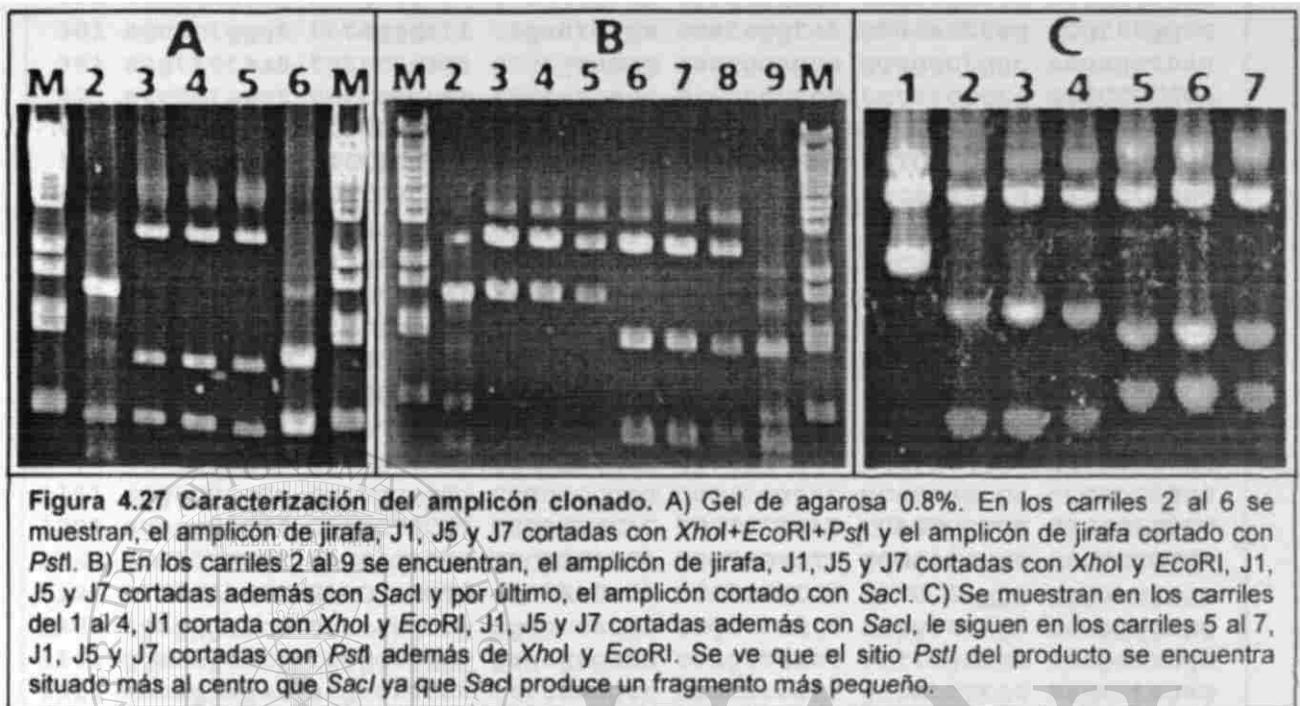


Figura 4.26 Caracterización y Determinación de los Insertos. A) Gel de agarosa al 2% mostrando los cortes con *NciI* de las clonas J1, J5 y J7 (carriles 1, 2 y 3 respectivamente). La flecha indica una diferencia en el patrón de J7 contra las otras dos. B) Gel de agarosa al 1.6%. Los carriles 2 al 4 son cortes con *PvuII* de las clonas J1, J5 y J7 respectivamente, se observa una diferencia en J7 con respecto de los otros dos patrones. El carril 5 muestra un corte del amplicón de jirafa con *PvuII* el cual coincide con las tres clonas cortadas con *PvuII* a las que previamente se les eliminó el sentido cortando con *XhoI* y *EcoRI* (carriles 6 al 9).

En la Figura 4.27-A podemos observar que el inserto contiene un sitio *Pst*I. En la Figura 4.27-B vemos que el inserto contiene también un sitio *Sac*I, además, en la Figura 4.27-C se muestra que el sitio *Pst*I está más al centro que el sitio *Sac*I que está más cercano a alguno de los extremos.



4.7.3 Secuenciación de las Clonas Recombinantes de jirafa

Se secuenciaron las tres clonas recombinantes obtenidas usando tanto oligonucleótidos comerciales como oligonucleótidos internos y los iniciadores Art-5' y Art 3'. La secuencia y las señales importantes[‡] se muestra en la Figura 4.28. Se observa que los extremos de los intrones coinciden con sistema típico del par de binucleótidos GT-AG para la remoción intrónica. Se muestra también la caja TATA y el inicio de transcripción.

La secuencia aminoacídica y un alineamiento con las GH de otros artiodáctilos se muestra en la Figura 4.29. Se puede ver la alta similitud de la hormona de crecimiento de jirafa con otros artiodáctilos. Con vaca es la especie con la que tiene mejor similitud (98%) y la peor similitud es con cerdo (88%). Solo tiene 4 diferencias con respecto del consenso. No se observan inserciones ni deleciones.

[‡] La secuencia 5' no codificante (UTR) fue obtenida por dos clonas adicionales donde se usó un iniciador que se aparee alrededor de 210pb arriba del codón de iniciación en una región regulatoria para el factor transcripcional Pit-1.

1	ccccgggct	gcaggaattc	gattggaggg	aattctaat	tatccattag	cacaggctac
61	cagtggctct	tgataaatg	tatagagcgc	acaggtggag	ggaaagggag	agagagaagg
121	<u>gtataaaag</u>	ggcccagcag	ggaccaattc	<u>caggatccaa</u>	<u>ggaoocagtt</u>	<u>caocagaoga</u>
181	<u>ctcagggtoe</u>	<u>tgtggaeege</u>	<u>tcaccagota</u>	<u>TGATGGCTGC</u>	<u>AGgtaagctc</u>	<u>gctaaaatcc</u>
241	cctccagctt	aacgtgtcct	aaaggggtga	tgtggggggc	ctgctgatgg	atggggacac
301	agctctgggt	tttagggctt	ctgaatgtga	acataggtat	ctacactcag	acgtttggcc
361	aagttttaaa	tgttctcagt	ccctggaggg	aagggcagga	gggggctggc	aagagatcag
421	gtgtctagct	ccctgggccc	ctctgtcacg	gccctcctgg	tctctccctg	<u>gCCCCCGGA</u>
481	<u>CCTCCCTGCT</u>	<u>CCTGCCCTTC</u>	<u>GCCCTGCTCT</u>	<u>GCCTGCCCTG</u>	<u>GACTCAGATG</u>	<u>GTGGGCGCCT</u>
541	<u>TCCCAGCCAT</u>	<u>GTCTCTCTCC</u>	<u>GCCCTGTTTG</u>	<u>CCAACGCTGT</u>	<u>GCTCCGGGCT</u>	<u>CAGCACCTGC</u>
601	<u>ATCAGCTGGC</u>	<u>TGCTGACACC</u>	<u>TTCAAAGAGT</u>	<u>TTgtaaagctc</u>	cccagggatg	catcctaggg
661	gtggggaggg	aggaaggggt	gaatccgcgc	cccctccaca	tagtgggggg	aaactgagga
721	gctcagaggt	attttatcca	aatgaggatg	cggtcagggg	agcagaaatg	gggctgtgtg
781	gggtggggag	ggtttcaaat	aaggcagtga	ggggaaccgc	gcaccaactt	agacctgggt
841	gggtgtgttc	ttccccagc	<u>AGCGCACCTA</u>	<u>CATCCCAGAG</u>	<u>GGACAGAGAT</u>	<u>ACTCCATCCA</u>
901	<u>GAACACCCAG</u>	<u>GTTCCTTCT</u>	<u>GCTTCTCCGA</u>	<u>AACCATCCCC</u>	<u>GCCCCACCG</u>	<u>GCAAGAACGA</u>
961	<u>GGCCAGCAG</u>	<u>AAATCAgtga</u>	gtggccacct	aggaccgagg	agcaggggac	ctccttcac
1021	ctaagtaggc	tgccccagct	ttccacaccg	ggcctggggc	ggccttctcc	ccgaggtggc
1081	agaggggtgt	ggatggcagt	ggaggatgac	ggttggcggg	ggtaggcagga	ggtcctccgg
1141	cagagggccga	ccttgcaggg	ccgccccgag	cccgcggcac	ccaccgacca	cccatctgcc
1201	agcagGACTT	<u>GGAOCTGCTT</u>	<u>CGCATCTCAC</u>	<u>TCCTCCTCAT</u>	<u>CCAGTCGTGG</u>	<u>CTCGGACCCC</u>
1261	<u>TGCAGTTCTT</u>	<u>CAGCAGAGTC</u>	<u>TTCAGCAACA</u>	<u>GCCTGGTGTT</u>	<u>TGGCACCTCG</u>	<u>GACCGCGTCT</u>
1321	<u>ATGAGAACT</u>	<u>GAAGACCTG</u>	<u>GAGGAAAGCA</u>	<u>TCCTGGCCCT</u>	<u>GATGCGAgtg</u>	gggatggcgt
1381	tgtgggtccc	ttccacgctg	ggggccatgc	cgcctctc	ctggcttagc	ccaggggtgg
1441	ggaacgcacg	tgggggtggg	gagagagaaa	cctgctctct	ctctagcagt	ccagccttga
1501	cccaggagaa	acgttttccc	cttttaagtc	ctccctctc	gcccttctcc	aagcctagag
1561	gggaggggtg	aaaatggagc	gggcaggagg	aagcctctct	tgagggctct	tggcctctc
1621	tgtctcttcc	tcccttggcg	gdAGCTGGAA	<u>GATGGCACCC</u>	<u>CCCCGGCTGG</u>	<u>GCAGATCCTC</u>
1681	<u>AAGCAGACCT</u>	<u>ATGACAAATT</u>	<u>TGACACGAAC</u>	<u>ATGCGCAGTG</u>	<u>ACGACCCGCT</u>	<u>GCTCAAGAAC</u>
1741	<u>TACAGGCTGC</u>	<u>TCTCCTGCTT</u>	<u>CCGGAAGGAC</u>	<u>CTGCACAAGA</u>	<u>CAGAGACGTA</u>	<u>CCTGCCGGTTC</u>
1801	<u>ATGAAAGTGC</u>	<u>GCCGCTTCGG</u>	<u>GGAGGCCAGC</u>	<u>TGCGCCTTCT</u>	<u>AGTtgccagc</u>	catctgttgt
1861	taccctctc	ctgtg	1875			

Figura 4.28 Secuencia de DNAg de la GH de *Giraffa Camelopardalis* (jcGH). La secuencia codificante se muestra resaltada, en mayúsculas y es hipotética, se obtuvo por comparación con la secuencia de *Bos Taurus* (vaca). El par de binucleótidos gt y ag en los extremos de los intrones se muestra subrayado. Tanto la caja tata (en color y doble subrayado) como la región 5' no codificante (en color y punteada) son hipotéticos y se obtuvo por comparación con la secuencia de *Capra Hircus* (cabra)

Obtención de nuevos genes de la hormona del crecimiento (GH) en vertebrados

1	MMAAGPRTSL	LLAFALLCLP	WTQMVGAFFA	MSSSGLFANA	VLRAQHLHQL	AADTFKEFER
61	TYIPEGQRYs	IQNTQVAFCF	SETIPAPTgK	NEAQKSDLE	LLRISLLLIQ	SWLGPLOFLS
121	RVFNSLVFG	TSDRVYEKlK	DLEEGILAlM	RELEDGtPRA	GQILKQTYDK	FDTNMRSDDA
181	LLKNYrLLSC	FRKDLHkTET	YLRVMKCRrF	gEASCAF		217
Consensus	MMAAGPrtSl	LLAFaLLCLP	WTqvVGAFPA	Ms1SgLFANA	VLRAQHLHQL	AADTFKEFER
CapraHir	1T.....
BosTauru	1
BubalusA	1T.....
OvisArie	1T.....
GiraffaC	1M.....S.....
CervusEl	1A.....E.....
SusScrof	1A.....RE.....P.....S.....Y.....
Consensus	tYIPEGQRYs	IQntQvAFCF	SETIPAPTgK	nEAQKSDLE	LLRISLLLIQ	SWLGPLOFLS
CapraHir	61
BosTauru	61
BubalusA	61
OvisArie	61S.....
GiraffaC	61
CervusEl	61
SusScrof	60	A.....A.A.....D.....R.....V.....F.....V.....
Consensus	RVFtNSLVFG	TSDrVYEKlK	DLEEGILAlM	RELEDgtPRA	GQILKQTYDK	FDTNMRSDDA
CapraHir	121V.....
BosTauru	121
BubalusA	121V.....
OvisArie	121L.....V.....
GiraffaC	121S.....
CervusEl	121
SusScrof	120Q.....S.....L.....
Consensus	LLKNYgLLSC	FRKDLHkTET	YLRVMKCRrF	gEaSCAP		
CapraHir	181
BosTauru	181
BubalusA	181
OvisArie	181
GiraffaC	181R.....
CervusEl	181
SusScrof	180K.....A.....V.....S.....

	Cap	Bos	Bub	Ovi	Gir	Cer	Sus	
	1	2	3	4	5	6	7	
CapraHir	1	100	99	100	99	97	98	89
BosTauru	2	99	100	99	98	98	99	90
BubalusA	3	100	99	100	99	97	98	89
OvisArie	4	99	98	99	100	96	97	88
GiraffaC	5	97	98	97	96	100	97	88
CervusEl	6	98	99	98	97	97	100	90
SusScrof	7	89	90	89	88	88	90	100

Figura 4.29 Comparación aminoacídica de la secuencia de jcGH. El alineamiento se realizó usando CLUSTALW. Un punto (.) en la secuencia significa conservación con la secuencia consenso. En la secuencia consenso, una mayúscula indica conservación en todas las secuencias.

Capítulo 5

Discusión

Para hacer reconstrucciones evolutivas de las especies, la Paleontología, la Embriología y la Bioquímica han estado proporcionando datos muy importantes. Sin embargo, las secuencias de DNA ahora constituyen otra fuente para las reconstrucciones filogenéticas de las especies. La hormona del crecimiento (GH) que se ha encontrado en todos los vertebrados estudiados a la fecha, fue nuestro modelo a estudiar. Las GH reportadas a la fecha llegan a alrededor de 56 en secuencias nucleotídicas completas más 26 en secuencias aminoacídicas. Con nuevas secuencias de GH de especies de ordenes no estudiados, se podrían hacer mejores reconstrucciones filogenéticas. En este trabajo nos propusimos analizar la información de las secuencias reportadas de GH en diferentes especies para proponer herramientas que ayuden a obtener la secuencia de DNA de GH de otras especies. Obviamente, un objetivo implícito de nuestro trabajo fue generalizar la metodología hacia el estudio de otras secuencias génicas. Las herramientas que proponemos son, iniciadores para amplificar por PCR el gen de GH y una sonda para tamizar bancos genéticos. La metodología usada para obtener los iniciadores y la sonda, la generalizamos para cualquier secuencia genética y facilitamos el análisis por automatización del proceso, desarrollando programas de computadora.

5.1 Obtención y Comparación de Secuencias de GH

Al analizar los datos obtenidos de la cantidad de secuencias reportadas por clase, el 62% de las secuencias reportadas es de peces y el 28% de los mamíferos, únicamente un 10% de las secuencias proviene de anfibios, reptiles, aves y marsupiales. Confirmamos entonces, la tendencia de interés económico-industrial más que evolutivo.

La exclusión de pato y atún en el proceso de búsquedas de secuencias, dan una alerta que tanto el proceso de filtrado como el de obtención de los informes, son muy importantes y aunque son aparentemente sencillos, la realidad es que son complicados. La consulta ("query") se efectuó únicamente sobre los nombres de proteínas, ya que el número de informes en todos los términos era astronómicamente alto. La consulta realizada en GenBank fue demasiado compleja, problema derivado por los múltiples nombres que se le da a nuestra proteína si consideramos que básicamente se le conoce como "Hormona del Crecimiento" y "Somatotropina". No hay una norma para nombrar a las proteínas que ingresan al GenBank (o al menos no se sigue o revisa) y combinado con la imposibilidad en GenBank de hacer búsquedas "menos restringidas", el problema se hace aún más grave.

Encontramos que la GH está más conservada en vertebrados superiores que en peces. Si comparamos las dos zonas con más parecido en la matriz de alineamiento de la Figura 4.1, la zona de mamíferos se aprecia mayor, aún cuando la cantidad de secuencias reportadas de

la GH en mamíferos es menor relativa a peces. Podría pensarse que el área mayor en mamíferos es debida principalmente a la cercanía de las especies mas que a la diversificación de ellas, como sucede en peces; y por lo tanto podríamos estar induciendo información por un "efecto" producido por el propio conjunto de datos. Pero, podemos ver que en animales superiores representativos de clases como aves, reptiles y marsupiales, la GH es muy parecida entre todos éstos y con mamíferos, contrariamente con lo que sucede en peces. Además, los resultados son congruentes con la idea de que siendo los peces mucho más antiguos que los mamíferos, son los peces los que están más diversificados.

5.2 Diseño de la Sonda

La búsqueda del mejor apareamiento considerando diferencias resultó ser exitosa. Algunos autores han usado la *frecuencia de oligonucleótidos* como algoritmo de búsqueda de regiones conservadas. Jacques van Helden (van Helden, 1998) usó exitosamente esta estrategia para encontrar regiones conservadas en secuencias promotoras de genes de levadura, aunque usó únicamente oligonucleótidos de 6 bases de longitud. No obtuvimos resultados satisfactorios bajo una metodología similar. Algunos otros métodos como el de *teoría de la información* empleado por *wconsensus* (Hertz, 1990), resulta muy tardíos cuando el número de secuencias por analizar y/o la longitud de las secuencias crecen, además, depende de un alineamiento global múltiple que complica el proceso (se probó *wconsensus* en una estación de trabajo Sparc de Sun con CPU a 133Mhz con 53 secuencias de alrededor 630pb de la región codificante de las GHs, mismas usadas en este trabajo. El proceso tardó 6 horas aproximadamente y el resultado, que no se muestra aquí, fué una matriz de 186 elementos de ancho indicando una zona "consenso" de 186pb, la región era tan heterogénea que no fue posible distinguir alguna zona conservada; en cambio *MaxProbe* diseñado exclusivamente para este propósito, tardó en el peor de los casos aproximadamente 30 minutos en una PC con CPU Intel-Pentium a 150MHz y el trabajo se reduce prácticamente a escoger algún oligonucleótido de los posibles). El cambio de estrategia a una búsqueda del mejor apareamiento considerando diferencias ("mismatches") resultó ser muy "reveladora", sencilla y rápida, además, el tiempo de cálculo crece linealmente cuando crece el número y tamaño de las secuencias.

En los parámetros de evaluación de la sonda, dimos origen a un concepto que llamamos "encadenamiento", que evalúa el número de nucleótidos consecutivos sin un desapareamiento. Las fórmulas de cálculo de temperaturas consideran desapareamientos, pero no consideran la distribución de éstos. El pensamiento básico que dió origen al "encadenamiento" fue que si tuviésemos dos zonas con el mismo número de desapareamientos pero distribuidos de manera diferente, en alguna de las zonas se pegaría con más fuerza que la otra, aún cuando todos los cálculos de apareamiento y temperatura quedarían iguales; compensamos entonces, a aquella que tiene el "encadenamiento" más extenso. En la fórmula final de evaluación, no se considera un estadístico tipo "media menos dos desviaciones estándar" que se utilizó para evaluar el peor de los casos, ya que la desviación estándar del "encadenamiento" es muy alta, de hecho vimos que la curva de los "encadenamientos" está muy desviada de una curva normal (resultados no mostrados).

En el algoritmo de mejoramiento de una secuencia consenso reportada por *MaxProbe*, solo es tomado en cuenta el apareamiento, aumentando aquellas secuencias que tienen muy bajo apareamiento y por consecuencia aumenta la media y disminuye la desviación estándar. Indirectamente algunos de los otros parámetros son “mejorados”. Sin embargo, en algunos casos, el método introduce un cambio tal que casi ninguna secuencia es igual en esa posición; esto es debido a que la forma de evaluar considera no solo la media sino también la desviación estándar y si algún cambio nucleotídico disminuye la desviación estándar lo suficiente como para que el estadístico *media - 2 desviaciones estándar* sea más alto que el antecesor, el cambio permanecerá. El método implementado aquí, no es un método optimizado para este propósito, sino solo un “acercamiento” a un mejor oligonucleótido. Si tomáramos en cuenta todos los parámetros en todas las posibilidades, el tiempo de cálculo en el mismo algoritmo crecería mucho. Para una búsqueda eficiente en todo el espacio tomando en cuenta todos los parámetros, habría que programar un método de búsqueda de soluciones mucho más complejo como algoritmos genéticos, redes neurales, simulated annealing o algún método montecarlo entre otros y que están muy lejos del alcance de este trabajo.

El analizar solo el 5% superiores de los grupos de mejor apareamiento promedio y mejor apareamiento menos dos desviaciones estándar fue suficiente para nuestro conjunto de datos. De hecho el resultado final no se ve afectado si solo se analiza el 0.5% superior (resultados no mostrados). Ninguno de los programas analiza los datos y determina la suficiencia del 5%, el valor de mínimo es responsabilidad del usuario. Esperaría en general, que las curvas mostradas en la Figura 4.3 representen las curvas típicas del comportamiento de los apareamientos y que la sonda final sea de las que originalmente tienen apareamiento alto; recomendaría usar un 5% en una corrida inicial y un 7.5% en otra corrida de comprobación.

Siete de los once oligonucleótidos reportados inicialmente por *MaxProbe* convergen a la misma secuencia de 42nt al extenderlos y recortarlos en ambos extremos. Solo el oligonucleótido 9 está totalmente inmerso en la secuencia de 42nt; si *MaxProbe* reporta los oligonucleótidos ordenados según el mejor apareamiento, entonces: ¿Por qué el oligonucleótido 9 no es el primero en ser reportado dado que es el único que está totalmente embebido en el oligonucleótido extendido?. Entre toda esta secuencia de 42 nucleótidos debe haber regiones que en promedio aparecen mejor que otras, así al observar la Figura 5.1, la secuencia 1 es la que abarca la mejor zona y por tal motivo es la primera en ser reportada, coincidiendo con la asignación del criterio de búsqueda inicial. Hay que recordar que la generación del índice fue de oligonucleótidos de 32nt y que al extenderlo el resultado es un “mejor” oligonucleótido de 42nt de longitud, que no tiene por qué estar en las mismas posiciones que de los mejores oligonucleótidos de 32nt. Por esto, la estrategia de desplazar y extender los oligonucleótidos fue exitosa. ¿Cómo sabemos cual es el oligonucleótido ideal? Y, ¿De qué tamaño es?. Tendríamos que correr el programa desde un tamaño mínimo, digamos 16, hasta casi la longitud de nuestras secuencias, algo así como 570 y si para cada cálculo se tarda aproximadamente 30 minutos (en nuestro caso), calcular el mejor se tardaría 16,650 minutos ó ¡12 días!, que para un proceso como éste es astronómicamente alto (sin tomar en cuenta requerimientos de espacio físico para almacenar los datos). La solución que aquí se presentó, es hacer un “acercamiento” usando los mejores oligonucleótidos de 32nt de longitud bajo la suposición de que el conjunto de

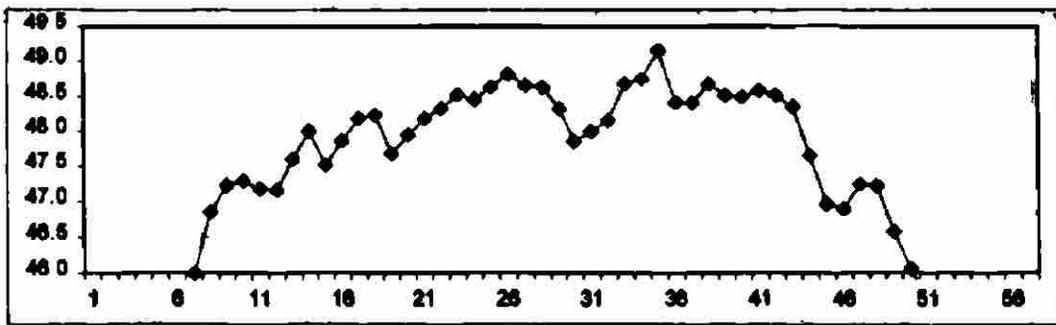


Figura 5.1 Apareamiento promedio de los oligonucleótidos de 32nt de longitud derivados de la sonda final. Calculado con todas las secuencias según Figura 4.5. Desde el punto 32 hasta el 56, se promediaron sumando el número de nucleótidos apareados desde 31 nucleótidos atrás de la posición marcada hasta ésta y dividido entre 32. Desde el punto 1 al 31 se promediaron según el número de nucleótidos disponibles. El punto máximo (posición 34) indica que el mejor apareamiento de 32nt de longitud, es desde la posición 2 hasta la 34 de la secuencia del oligonucleótido final correspondiente al oligonucleótido 1 del conjunto inicial de oligonucleótidos. Coincidiendo con el orden en que MaxProbe reporta los posibles oligonucleótidos.

éstos debe contener o estar cercano al oligonucleótido ideal. Lo cual toma en el peor de los casos, únicamente 30 minutos.

La zona identificada para el diseño de la sonda *GH-Explorer I* se encontró interrumpida por el 5° intrón presente en algunas especies de peces (posición 28 justo a la mitad de la sonda). Aunque es indeseable que el apareamiento de la sonda se encuentre interrumpido por un intrón, dado el bajo número de especies afectadas, se sacrificó la posible disminución del apareamiento en estos peces por aumentar el apareamiento global con todas las demás secuencias que no poseen el 5° intrón. Además, las secuencias de los extremos podrían ser suficiente para obtener una buena hibridación en estas especies. De hecho, tilapia es una especie con un 5° intrón, y no se aprecia decaimiento aparente de la hibridación. Cabe mencionar que tilapia es una de las especies que tienen el encadenamiento más alto (encadenamiento = 40) y aún en presencia del intrón (encadenamiento = 24) es equiparable al encadenamiento con gallo y todavía mejor que ratón.

Los resultados de los ensayos de hibridación de la sonda *GH-Explorer I* mostrados en la Tabla 4.3 (parte derecha), muestran diferencias de apareamiento relativo a gallo, principalmente en mamíferos. En peces los valores se encuentran alrededor de 1 relativo a gallo y tomando en cuenta el error experimental, solo se puede concluir que sí hay hibridación. En humano, el valor relativo es 1.83, era de esperarse un valor menor a 1 dado que el apareamiento con *GH-Explorer I* es 44/56 comparado con gallo que es 51/56, parece que hubiera más genes con los que hibrida. Para ciertas especies como gato y ratón, los valores obtenidos son más altos que los valores esperados. Este resultado podría deberse a problemas de cuantificación y calidad de los DNAG o a la presencia de otro gen con el cual hibrida la sonda.

En la Figura 4.10 se ve que sí hay hibridación con hPL-1, pero es 4 órdenes de magnitud menos y no debería afectar cuantitativamente al resultado; la explicación resulta de analizar el final del informe de BLAST (Anexo 3), donde en humano también se

reportan un gen placentario (hPL-4 ó hCS-3) y la hormona de crecimiento variante (hGH-V ó hCS-5), y de hecho con el mismo "score" que en la GH humana. Entonces el valor se distribuiría aproximadamente igual entre los tres genes (1.83 / 3) resultando en 0.61.

5.3 Diseño de Iniciadores

Una alternativa al tamizaje de bancos para obtener nuevas secuencias es la amplificación por PCR y diseñamos una serie de iniciadores que podrían amplificar por PCR el gen de GH de vertebrados. En los resultados mostrados en la Figura 4.14 se puede ver que en mamíferos prácticamente se puede usar un par de iniciadores en los extremos. Para aves no se encontró una región conservada en los fragmentos 3' reportados y por lo tanto el diseño se restringió a una región codificante al extremo carboxilo. En reptiles, desgraciadamente no hay secuencias nucleotídicas reportadas y por lo tanto no es posible saber con algo de certeza si pudiera haber amplificación o no. En anfibios, las secuencias nucleotídicas reportadas son regiones codificantes y tampoco es posible saber con certeza si hay amplificación. Sin embargo, dadas las características evolutivas propias de los anfibios, podría haber una combinación de iniciadores satisfactoria como se puede apreciar en el iniciador del extremo 3' diseñado para aves que también aparece en anfibios. En peces, es un poco más complejo dada la diversidad del grupo, un par de iniciadores abarca la mayoría de las especies, pero es recomendable tomar en cuenta la clasificación del pez en cuestión para escoger un par de iniciadores más específicos.

La metodología típica de diseño de iniciadores consenso está basada en alineamientos de múltiples secuencias, cuya labor es excelentemente desempeñada por *CLUSTALW* entre otros. A veces es necesario diseñar iniciadores a los extremos de regiones codificantes (como en parte de este trabajo). Éstas regiones se usan para hacer un alineamiento múltiple (incluyendo en ocasiones, fragmentos codificantes para "sincronizar" las secuencias) y diseñar iniciadores a partir del alineamiento múltiple identificando manual o automáticamente regiones conservadas. Sin embargo, cuando se trata de secuencias no codificantes y de divergencia evolutiva lejana, identificar las regiones conservadas con un alineamiento múltiple, es una tarea minuciosa y de alto conocimiento de las secuencias y especies involucradas. Si se tiene la intuición de que hay una región conservada que está distal en las secuencias, hay que extraer fragmentos de las secuencias y alinearlos con distintas combinaciones hasta encontrar algún fragmento positivo, que si no se encuentra, no se tendría la certeza de que existe. La estrategia de búsqueda utilizada en este trabajo y programada en *MaxProbe* y *MaxPrime*, no es dependiente de la posición dentro de cada una de las secuencias. De esta manera es posible encontrar regiones conservadas que en cada secuencia estén relativamente distales.

En los resultados de *BLAST* de cada iniciador (Tabla 4.4), es clara la diferencia entre el número de especies reportadas como positivas entre *MaxPrime* y *BLAST*. Estas diferencias son debidas al tipo de evaluación que realiza cada programa; en *MaxPrime* se considera

* Considerando además que se pueda "ver algo" en el alinamiento múltiple, ya que generalmente, las regiones no codificantes son más propensas a la preservación de mutaciones puntuales inserciones y deleciones.

entre otros, el peso proporcional a la posición respecto al extremo 3', en *BLAST*, todas las posiciones tienen el mismo valor, consecuentemente *BLAST* no considera algunas secuencias positivas si hay diferencias en el extremo 5' aunque el extremo 3' aparece bien. Hay que recordar, además, la incapacidad de *BLAST* de hacer búsquedas de secuencias que compartan menos de 7 nucleótidos consecutivos y que pueden salir positivas por el cálculo de iniciabilidad. Es decir, si una secuencia es altamente "inicializable" pero no tiene al menos 7 nucleótidos consecutivos iguales al iniciador, *BLAST* no podría encontrarlo.

En el proceso para probar los iniciadores en una "reacción" virtual de PCR (*in silico*), se usó inicialmente *Amplify 1.2*. Sin embargo, este programa no puede leer diferentes secuencias para distinguir en cada una las posiciones de los iniciadores ni los iniciadores usados. Debido a esto, el usuario debe introducir cada una de las secuencias, probar la reacción, desplegar las posiciones y los iniciadores y adjuntarlas en un informe para su análisis. En total deberían probarse poco más de 60 secuencias, proceso bastante tedioso, cansado y propenso a errores. Por tal motivo, se elaboró un programa llamado VPCR (Virtual PCR) inspirado en la misma metodología usada en *Amplify 1.2* que hace todo el trabajo en unos cuantos segundos. Los resultados de VPCR en al menos 5 secuencias se validaron usando *Amplify 1.2*. Aún así, en el texto se menciona a *Amplify 1.2* como la herramienta computacional utilizada debido a que es el propio proceso usado en *Amplify 1.2* el que está validado. VPCR simplemente se usó para facilitar el proceso de redacción.

Se diseñaron iniciadores para amplificar teóricamente el gen de GH de cualquier vertebrado. Adicionalmente si la amplificación no es posible, se puede utilizar la sonda *GH-Explorer I* para tamizar bancos de DNA. Sin embargo, siempre existe la posibilidad, aún contando con ambas herramientas, de no obtener la secuencia de DNA de la GH de algún vertebrado (¡precisamente con el que uno trabaja!, tal y como la predice la ley de Murphy). Para minimizar esta posibilidad y aprovechando las herramientas desarrolladas en este trabajo (*BioCode Explorer*, *MaxProbe*, *MaxPrime* y *VPCR*), se diseñaron iniciadores "internos" a la secuencia codificante de la GH incluidos en el Anexo 4. Todas estas herramientas pueden utilizarse, primero, para el análisis de cualquier otro grupo de secuencias agilizando el tratamiento de los informes del *GenBank* y segundo, facilitando el diseño de una sonda y de iniciadores consenso.

5.4 Importancia de la Región Conservada en el Exón 5 de GH

Durante el trabajo sobre la sonda de la GH, afortunadamente fue posible obtener una sola secuencia conservada dentro de todas las secuencias codificantes de la GH de las especies, consecuentemente, surge una pregunta interesante: ¿Cuál es la importancia de esta región como para ser la única altamente conservada?. De las dos regiones que tienen interacción con los receptores de la GH (GHR), la región del exón 5 de la GH es la que tiene más interacción (Souza y cols., 1995). Para ver las diferencias en la región, hicimos la traducción de la sonda *GH-Explorer I* en los tres marcos de lectura, se tomó el más parecido a las secuencias y se efectuó un alineamiento cuyo resultado se muestra en la Figura 5.2. Se observa también, que la zona conservada es la misma región donde se

encuentran dos de las cuatro cisteínas (C) típicas en las GH. Se sabe que éstas forman cistinas y son muy importantes para la conformación que adopta la proteína (Santomé y cols., 1973). Por lo tanto, no es una coincidencia que la sonda englobe las dos cisteínas centrales de la GH. Tal parece que las cisteínas flanquean y le dan la estructura tridimensional a esta región como si fuera la "combinación" que abre la "cerradura" del receptor (al menos en el plegamiento nativo ya que Graf y cols. en 1975 comprobaron que si se elimina el enlace disulfuro en BGH, la actividad biológica no se pierde). En peces, solo unos cuantos tienen una diferencia con respecto al consenso entre ellos, contrario a lo que sucede en vertebrados superiores donde las diferencias incrementan. Si comparamos las diferencias aminoacídicas y nucleotídicas, en peces hay variación en la secuencia nucleotídica, pero no en la aminoacídica, es decir, las mutaciones preservadas son únicamente mutaciones sinónimas. En general en esta región en vertebrados superiores también se observa esta tendencia de mutaciones sinónimas, por ejemplo, en primates y artiodáctilos, hay un cambio de una lisina (K) muy conservada hacia una arginina (R), ambos siendo aminoácidos básicos. Específicamente en esta región de la secuencia aminoacídica, la GH está más conservada en peces que en vertebrados superiores, contrastando con el alineamiento total ya discutido, donde la secuencia total de GH aparenta estar más conservada en vertebrados superiores que en peces. Como esta región está involucrada en la unión al receptor, una posible causa a este comportamiento es que el receptor de la GH en peces no haya ido mutando junto con la GH y que en vertebrados superiores el receptor de la GH sí fue cambiando con la GH. Hay estudios realizados donde se demostró que la GH bovina es funcional en peces, sin embargo, la GH de peces no es funcional en bovinos (Juskevich, 1988); nuestra hipótesis explicaría este caso, suponiendo que el receptor en bovinos fue mutando junto con la GH y se hicieron más específicos entre ellos, el receptor bovino podría ser incapaz de detectar la señal de la GH de un pez. Por el contrario, como el receptor en peces no mutó, los cambios en la GH bovina no fueron suficientes como para no ser detectado. Además es bien conocido que humanos y monos responden únicamente a hormonas derivadas de primates, pero la GH de primates es totalmente funcional en otros mamíferos y se ha demostrado también, que una Arg⁴³ en GHR humana (hGHR) es la responsable de la especificidad del GHR de primates por hGH (Souza y cols., 1995) y que una mutación a Asp¹⁷¹ en la GH de primates es la responsable de la especificidad por el GHR en primates (Behncken y cols., 1997). Estos dos últimos trabajos siguen apoyando la hipótesis. Aún así, si suponemos correcta nuestra hipótesis, queda una duda, si el receptor en peces no mutó y es capaz de detectar una señal de una GH bovina mutada con respecto de la propia, ¿Por qué entonces la GH en peces no mutó en esta región?. Una de las posibles causas es que el receptor de la GH en peces no es específico para la GH, de ser así, todas las moléculas "reconocidas" por el receptor tendrían que mutar convergentemente. Este hecho tiene una probabilidad muy baja de presentarse, favoreciendo a que ni el receptor ni la GH muten. Desgraciadamente no hay ni una sola secuencia del GHR en peces reportada[†] que pueda afectar la hipótesis. Otra posible causa sería la duplicación del receptor en animales superiores, aunque de igual manera no hay información al respecto. El dominio más conservado que en general describe esta región para todas las especies excepto primates es: CFxKDxHxETYxLxVxxC.

[†] Hasta el 4 de Enero de 1999 en la base de datos *GenBank*.

GH-ExplorerI	ACFKKDMhKVeTYLrVMK	c	taa	int
Consensus	11 aCFKkDmhKveTylevak	Crresp	taa	int
TILAPIAMT.A.....L..L..	89	
MORONESAT.A.....L..L..	89	84
CARANXDT.A.....L..TL..T	89	86
SERIOLAT.A.....L..L..	89	86
SERIOLAT.A.....L..L..	89	86
LATESCAT.A.....L..L..	89	88
TILAPIAT.A.....L..L..	89	88
TILAPIAT.A.....L..L..	89	88
CORYPHAT.A.....L..L..	89	86
DICENTRT.A.....L..L..	89	82
LATEOLAT.A.....L..L..	89	82
ACANTHOT.A.....L..L..	89	82
SPARUSAT.A.....L..L..	89	84
ACANTHOT.A.....L..L..	89	
CHRYSOPT.A.....L..L..	89	
EUTHYNNT.N.A.....L..L..	89	
THUNNUST.A.....L..L..	89	
THUNNUST.A.....L..L..	89	
PARALICT.A.....L.FL.F	89	82
HIPPOGLT.A.....L..L..	89	
PSEUDOPT.A.....L.FL.F	89	
SOLEASET.A.....L..L..	89	82
SEBASTET.A.....L..L..	89	86
SEBASTIT.A.....L..L..	89	82
FUGURUBT.A.....L..L..	89	80
GADUSMOT.A.....L..L..	89	
GADUSMOT.A.....L..L..	89	
ESOXLUCT.A.....K.LK.L	89	
COREGONT.A.....K.LK.L	89	86
ONCORHYT.A.....K.LK.L	89	88
ONCORHYT.A.....K.LK.L	89	
ONCORHYT.A.....K.LK.L	89	86
SALAOSAT.A.....K.LK.L	89	89
COREGONT.A.....K.LK.L	89	
CARASSIT.A.....ANAN	89	84
CTENOPHT.A.....ANAN	89	
CYPRINUT.A.....ANAN	89	84
ABRAMIST.A.....ANAN	89	
A HYPOPT.A.....ANAN	89	84
B HYPOPT.A.....ANAN	89	84
PANGASIS.S.A.....L.LS.S.A.....L.L	83	84
PANGASIS.S.A.....L.LS.S.A.....L.L	83	
ACIPENSES.S.R.....FVS.S.R.....FV	89	
AMIACALVK.....K.RK.....K.R	89	89
PRIONACK.....K.NK.....K.N	89	
LEPISOSTK.....K.TK.....K.T	94	84
ANGUILLAK.....K.TK.....K.T	89	86
XENOPUSS.....K.RS.....K.R	89	88
RANACATS.....K.RS.....K.R	89	88
ANASPLAS.....L.KS.....L.K	83	
MELEAGRS.....L.KS.....L.K	83	
GALLUSGS.....L.KS.....L.K	83	91
CROCODYS.....L.KLS.....L.KL	77	
CHELONIS.....L.KLS.....L.KL	77	
CANISFAS.....L.AS.....L.A	83	86
VULPESVS.....L.AS.....L.A	83	
ALOPEXLS.....L.AS.....L.A	83	
FELISCAS.....L.AS.....L.A	83	89
MUSTELAS.....L.AS.....L.A	83	88
BALAENOS.....L.AS.....L.A	83	
ORYCTOLS.....L.AS.....L.A	83	89
EQUUSCAS.....L.AS.....L.A	83	89
LOXODONS.....L.AS.....L.A	83	
MESOCRIS.....L.AS.....L.A	83	91
MUSMUSCS.....L.AS.....L.A	83	91
RATTUSNS.....L.AS.....L.A	83	91
SUSSCROS.....L.AS.....L.A	83	89
LAMAPACS.....L.AS.....L.A	83	
CAPRAHIS.....R.L.TS.....R.L.T	77	88
BOSTAURS.....R.L.TS.....R.L.T	77	86
BUBALUSS.....R.L.TS.....R.L.T	77	88
OVISARIS.....R.L.TS.....R.L.T	77	88
GIRAFFAS.....R.L.TS.....R.L.T	77	86
CERVUSES.....R.L.TS.....R.L.T	77	86
MACACAMY.....R.N.F.TVRY.....R.N.F.TVR	61	75
HOMOSAPY.....R.D.F.IVOY.....R.D.F.IVO	61	79
Consensus	ii aCFkKDMhKveTYLrVak	Crresp	taa	int
GH-ExplorerI	ACFKKDMhKVETYLrVMK	c		

Figura 5.2 Alineamiento aminoacídico con GH-Explorer I. Las diferencias están marcadas con respecto de GH-Explorer I. Se muestra el consenso y el porcentaje de parecido en las secuencias de aminoácidos y de nucleótidos. El aminoácido Cisteína (C) en el extremo 3' de la sonda solo está representado por 2 nucleótidos. Por comparación, se agregaron aminoácidos en ambos extremos que no forman parte de la sonda.

Capítulo 6

Conclusiones

- 1) Se elaboraron programas computacionales para facilitar el control de los informes obtenidos del GenBank, para buscar oligonucleótidos de alta similitud para el diseño de sondas y para buscar oligonucleótidos que puedan usarse como iniciadores (*BioCode Explorer*, *MaxProbe* y *Maxprime*, respectivamente).
- 2) La utilidad de *MaxProbe* se confirmó al diseñar una sonda consenso que puede hibridar con todas las hormonas de crecimiento conocidas y se comprobó la efectividad del oligonucleótido diseñado en ensayos de hibridación.
- 3) La utilidad de *MaxPrime* se confirmó al diseñar un conjunto de iniciadores que pueden amplificar por PCR el gen de la GH de varias especies. Se comprobó la utilidad del juego de oligonucleótidos diseñado para Artiodáctilos, amplificando a partir de DNAG de jirafa, el gen de la hormona del crecimiento. El cual se clonó y se secuenció.
- 4) Se diseñaron iniciadores para PCR de la región codificante de la hormona del crecimiento que aseguran la obtención de al menos un fragmento de la secuencia codificante en cualquier vertebrado.
- 5) Se confirmó que la secuencia total de la hormona del crecimiento en vertebrados, está más conservada entre mamíferos que entre peces, excepto en la región de diseño de la sonda sobre el exón 5; y se comprobó también que las regiones implicadas en la unión al receptor (fragmentos de los exones 2 y 5) son las más conservadas entre los vertebrados.
- 6) Este trabajo proporciona una valiosa herramienta para el estudio de la Evolución Molecular ya que permite obtener por PCR o tamizaje de bancos genéticos la GH de cualquier vertebrado, además, la metodología se puede generalizar al estudio de cualquier gen.

Capítulo 7 Anexos

7.1 Anexo 1

7.1.1 Informes (173) de Secuencias Nucleotídicas de la GH en GenBank.

Se resaltan los números de acceso (Accession) que se seleccionaron.

Accession	Definition
A00469	H.sapiens mRNA for growth hormone
A00490	Artificial gene for human growth hormone
A00501	H.sapiens mRNA for human growth hormone
A03992	Synthetic gene for growth hormone (partial)
A06745	S.scrofa mRNA for growth hormone-9D
A06834	B.taurus gene for growth hormone
A07830	O.niloticus TGH mRNA for growth hormone
A08487	Artificial gene for bovine somatotropin
A08489	B.taurus gene for somatotropin, partial
A08993	Tilapia sp. mRNA for growth hormone
A09118	O.aries mRNA for growth hormone 12
A15072	H.sapiens gene for growth hormone (hGH)
AB001865	Coregonus lavaretus DNA for growth hormone, complete cds
AF002110	Ovis aries growth hormone (GH) gene, complete cds
AF002111	Ovis aries growth hormone (GH) gene, exon 1
AF002112	Ovis aries growth hormone (GH) gene, exons 2 and 3
AF002113	Ovis aries growth hormone (GH) gene, exons 4 and 5 and complete cds
AF002114	Ovis aries growth hormone (GH) gene, exons 2, 3 and partial cds
AF002115	Ovis aries growth hormone (GH) gene, exon 3 and partial cds
AF002116	Ovis aries growth hormone (GH) gene, exon 4 and partial cds
AF002117	Ovis aries growth hormone (GH) gene, exon 5 and partial cds
AF002118	Ovis aries growth hormone (GH) gene, exon 2 and partial cds
AF002119	Ovis aries growth hormone (GH) gene, exon 3 and partial cds
AF002120	Ovis aries growth hormone (GH) gene, exons 4, 5 and partial cds
AF002121	Ovis aries growth hormone (GH) gene, exons 1, 2, 3 and partial cds
AF002122	Ovis aries growth hormone (GH) gene, exons 1, 4 and partial cds
AF002123	Ovis aries growth hormone (GH) gene, exon 5 and partial cds
AF002124	Ovis aries growth hormone (GH) gene, exon 1 and partial cds
AF002125	Ovis aries growth hormone (GH) gene, exon 2 and partial cds
AF002126	Ovis aries growth hormone (GH) gene, exon 2 and partial cds
AF002127	Ovis aries growth hormone (GH) gene, exon 3 and partial cds
AF002128	Ovis aries growth hormone (GH) gene, exon 4 and partial cds
AF002129	Ovis aries growth hormone (GH) gene, exon 5 and partial cds
AF02096	Felis catus growth hormone 1 (GH1) gene, partial cds
AF034386	Bos indicus growth hormone mRNA, complete cds
AF052192	Trichosurus vulpecula growth hormone precursor, mRNA, complete cds
AF062745	Protopterus annectens growth hormone precursor, mRNA, complete cds
AF062746	Bufo marinus growth hormone precursor, mRNA, complete cds
AF063834	Sciaenops ocellata growth hormone prohormone mRNA, complete cds
AF069398	Carassius auratus growth hormone I mRNA, complete cds
AF069399	Carassius auratus growth hormone II mRNA, complete cds
AJ000549	Bubalus bubalis DNA for growth hormone gene, exon 4
AJ005116	Bubalus bubalis gene encoding growth hormone, promoter region
AJ005819	Spalax ehrenbergi gene encoding growth hormone
D00476	Goat growth hormone gene, complete cds and franks [Capra hircus]
D10484	Chicken growth hormone gene [Gallus gallus]
D16297	Water buffalo gene for growth hormone precursor, promoter region
D16298	Japanese serow gene for growth hormone precursor, promoter region [Capricornis crispus]
D16299	Sika deer gene for growth hormone precursor, promoter region [Cervus nippon]
D29737	Flounder gene for growth hormone, complete cds [Paralichthys olivaceus]
D30713	Bovine gene for growth hormone C variant, partial sequence

Obtención de nuevos genes de la hormona del crecimiento (GH) en vertebrados

D50368	<i>Seriola quinqueradiata</i> gene for growth hormone, exon-6, complete cds [<i>Seriola quinqueradiata</i>]
J00148	Human growth hormone (somatotropin, GH1) gene, complete cds
J00739	Rat growth hormone gene, complete cds
J03071	Human growth hormone (GH-1 and GH 2) and chorionic somatomammotropin (CS-1, CS-2 and CS-5) genes, complete cds
J03797	<i>S.gairdneri</i> (rainbow trout) growth hormone (GH2) gene, complete cds
K00478	Human growth hormone variant (HGH-V) gene, complete cds
K03050	Salmon growth hormone mRNA, complete cds
L04688	Chum salmon growth hormone gene, complete cds [<i>Oncorhynchus keta</i>]
L16555	Monkey growth hormone-variant mRNA, complete cds and flanking regions
L16556	Monkey growth hormone mRNA, complete cds and flanking regions
L27835	Pangasianodon gigas growth hormone (GH) mRNA, complete cds
L43627	<i>Sebastes marmoratus</i> growth hormone (GH) mRNA, 3' end of cds
L43628	<i>Seriola dumerili</i> growth hormone (GH) mRNA, 3' end of cds
L43629	<i>Lateolabrax japonicus</i> growth hormone (GH) mRNA, 3' end of cds
M13438	Human growth hormone gene (HGH-N), complete cds [<i>Homo sapiens</i>]
M14398	Human precursor growth hormone mRNA, 3' end
M16253	Bovine alternative growth hormone mRNA, exon 4, and the boundaries of the normally excised intron D
M17704	Porcine growth hormone gene, complete cds [<i>Sus scrofa</i>]
M19999	<i>Oncorhynchus kisutch</i> (coho salmon) growth hormone mRNA, complete cds
M21573	Salmon (<i>S.salar</i>) growth hormone gene, complete cds
M22731	<i>S.gairdneri</i> (rainbow trout) growth hormone (GH1) mRNA, complete cds
M22732	<i>S.gairdneri</i> (rainbow trout) growth hormone (GH2) mRNA, complete cds
M23439	Flounder growth hormone (fGH) mRNA, complete cds
M24066	<i>Anguilla japonica</i> growth hormone mRNA, complete cds
M24683	<i>S.gairdneri</i> growth hormone (GH-I) mRNA, complete cds
M24684	<i>S.gairdneri</i> growth hormone (GH-II) mRNA, complete cds
M24768	Coho salmon growth hormone (GH) mRNA, 3' end [<i>Oncorhynchus kisutch</i>]
M26916	<i>O.niloticus</i> (tilapia) growth-hormone (tGH) mRNA, complete cds
M27000	<i>Cyprinus carpio</i> growth hormone (GH) mRNA, complete cds
M27094	<i>Ctenopharyngodon idella</i> growth hormone mRNA, complete cds
M27325	Bovine growth hormone mRNA, complete cds
M27326	Pig growth hormone mRNA, 3' end
M32243	Rat (spontaneous dwarf) mutant growth hormone mRNA, 3' end
M33697	<i>M.gallapavo</i> growth hormone mRNA, complete cds
M35609	Chicken growth hormone mRNA, complete cds
M35627	<i>S.quinqueradiata</i> growth hormone (GH) mRNA, complete cds
M36282	Synthetic human growth hormone gene, complete cds
M37310	Ovine growth hormone gene, complete cds [<i>Ovis aries</i>]
M38451	Human placenta-specific growth hormone mRNA, complete cds
M37764	Bovine growth hormone gene, complete cds [<i>Bos taurus</i>]
M62901	Mink growth hormone mRNA, 3' end
M63713	<i>Pangasius pangasius</i> growth hormone mRNA, complete cds [<i>Pangasius pangasius</i>]
M84774	<i>Tilapia nilotica</i> growth hormone gene, complete cds
M94348	<i>Hypophthalmichthys molitrix</i> growth hormone (scGH) gene, complete cds
850867	growth hormone [<i>Oncorhynchus tshawytscha</i> =chinook salmon, mRNA, 1138 nt]
850877	growth hormone [sheep, pituitary, mRNA Partial, 801 nt]
852027	growth hormone [<i>Rana catesbeiana</i> =bullfrogs, adenohypophyses, mRNA, 654 nt]
854890	growth hormone [<i>Sparus aurata</i> =gilthead seabream, mRNA, 958 nt]
866299	growth hormone [Syrian Golden hamsters, mRNA, 809 nt] [<i>Mesocricetus auratus</i>]
867119	BST-somatotropin...BST/beta-Gal fusion protein [<i>Escherichia coli</i> , LB844, plasmid pBT107, IS10L/R-1, PlasmidTransposonInsertionMutant, 3 genes, 1679nt]
868464	growth hormone [<i>Oncorhynchus tshawytscha</i> =chinook salmon, mRNA Partial, 61nt]
869215	GH-growth hormone [<i>Ictalurus punctatus</i> =channel catfish, Genomic, 3579 nt]
872386	growth hormone (exons 4 and 5) [swine, pituitary gland, Genomic, 227 nt]
873969	growth hormone [<i>Amia calva</i> =bowfin, mRNA Partial, 836 nt]
878184	growth hormone [beagle dogs, mammary tissue, mRNA Partial, 431 nt] [<i>Canis familiaris</i>]
878253	somatotropin [<i>Morone saxatilis</i> =striped bass, pituitary glands, mRNA, 928 nt]
882528	growth hormone [<i>Lepisosteus osseus</i> =long-nosed gar, pituitary, mRNA Partial, 1713 nt]
88Q_OAAGH	<i>Ovis aries</i> growth hormone, complete cds
88Q_OARGH	<i>Ovis aries</i> chromosome 11 strain romanov
88Q_OVAAGH	<i>Ovis aries</i> chromosome 11 strain avassii
88Q_OVARGH	<i>Ovis aries</i> growth hormone (GH) gene, partial cds
88Q_OVIAAGH	<i>Ovis aries</i> chromosome 11 strain avassii
U01143	<i>Solea senegalensis</i> growth hormone mRNA, complete cds
U01301	<i>Sparus aurata</i> growth hormone mRNA, complete cds
U02293	<i>Macaca mulatta</i> growth hormone-variant gene, complete cds
U02929	<i>Equus caballus</i> growth hormone (ecGH) mRNA, complete cds
U13390	<i>Felis catus</i> growth hormone precursor mRNA, complete cds

U16816	<i>Lates calcarifer</i> growth hormone gene, promoter region and complete cds
U19787	<i>Sus scrofa</i> growth hormone mRNA, complete cds
U19788	<i>Sus scrofa</i> growth hormone mRNA, complete cds
U21920	<i>Abramis brama</i> growth hormone (GH) gene, partial cds
U25973	<i>Felis catus</i> growth hormone mRNA, complete cds
U28156	<i>Oncorhynchus clarki</i> growth hormone type 2 (GH2) gene, partial cds
U28157	<i>Oncorhynchus tshawytscha</i> growth hormone type-2 (GH2) gene, partial cds
U28389	<i>Oncorhynchus kisutch</i> growth hormone type-2 (GH2) gene, exons 4 and 5, partial cds
U28360	<i>Oncorhynchus gorbuscha</i> growth hormone type-2 (GH2) gene, exons 4 and 5, partial cds
U28361	<i>Oncorhynchus masou</i> growth hormone type-2 (GH2) gene, exons 4 and 5, partial cds
U28362	<i>Oncorhynchus rhodurus</i> growth hormone type-2 (GH2) gene, exons 4 and 5, partial cds
U28388	<i>Carassius auratus</i> growth hormone mRNA, partial cds
U29954	<i>Salvelinus namaycush</i> growth hormone type-2 (GH2) gene, partial cds
U48221	<i>Sparus aurata</i> growth hormone gene, complete cds
U58113	<i>Sus scrofa</i> growth hormone (GH) gene, promoter region
U63803	<i>Arctothron maculatus</i> growth hormone (GH) gene, partial cds
U63804	<i>Colisa lalia</i> growth hormone (GH) gene, partial cds
U63805	<i>Poecilia reticulata</i> growth hormone (GH) gene, partial cds
U63806	<i>Carassius auratus</i> growth hormone (GH) gene, partial cds
U63807	<i>Fugu rubripes</i> growth hormone (GH) gene, complete cds
U73464	<i>Sus scrofa</i> growth hormone (pGH) gene, exon 2, partial cds
U89917	<i>Sebastes schlegelii</i> growth hormone (KrGH) mRNA, complete cds
V00111	Bovine mRNA for growth hormone
V00520	Human germ line gene for growth hormone (presomatotropin)
X02891	Mouse mRNA for growth hormone
X06735	Tuna mRNA for growth hormone
X07035	Goat mRNA for growth hormone
X07079	Duck mRNA for growth hormone
X12546	Ovine gene for growth hormone
X12408	Chicken mRNA for growth hormone
X12657	Bovine growth-hormone factor 1 (bGHF-1) mRNA, complete cds
X12658	Rat growth-hormone factor 1 (rGHF-1) mRNA, complete cds
X12887	Flounder mRNA fragment for growth hormone
X13670	<i>Cyprinus carpio</i> mRNA for growth hormone
X14305	<i>S. salar</i> mRNA for growth hormone
X14601	<i>Xenopus laevis</i> mRNA for growth hormone A
X14602	<i>Xenopus laevis</i> mRNA for growth hormone B
X15055	Flounder (<i>Paralichthys olivaceus</i>) mRNA for growth hormone precursor
X17618	<i>G. domesticus</i> growth hormone somatotropin mRNA
X51969	<i>Cyprinus carpio</i> growth hormone gene
X55176	<i>C. delicatissimus</i> mRNA for growth hormone
X56120	Mink mRNA for growth hormone [<i>Mustela vison</i>]
X59377	<i>A. butchari</i> mRNA for growth hormone
X59378	<i>L. calcarifer</i> mRNA for growth hormone
X60419	<i>C. idellus</i> gene encoding growth hormone
X60473	<i>H. nobilis</i> (Bighead carp) mRNA for growth hormone
X60474	<i>C. idellus</i> (Grass carp) mRNA for growth hormone
X60475	<i>H. nilitrix</i> (Silver carp) mRNA for growth hormone
X61938	<i>S. salar</i> gene for growth hormone I
X65716	<i>D. labrax</i> mRNA for growth hormone
X72947	<i>B. bubalis</i> mRNA for growth hormone
X77245	<i>C. autumnalis</i> growth hormone gene mRNA
X79002	<i>C. hippurus</i> mRNA for growth hormone.
Y12578	<i>C. elaphus</i> gene encoding growth hormone
Z09421	<i>A. alburnus</i> growth hormone gene, intron, partial.
Z23067	<i>C. familiaris</i> mRNA for growth hormone.
Z38127	<i>O. oenicularis</i> gene for growth hormone
Z46663	<i>M. musculus</i> DNA for growth hormone gene and promoter

7.2 Anexo 2

7.2.1 Informes (330) de Secuencias Aminoacídicas de la GH en GenBank.

Se resaltan los números de acceso (Accession) que se seleccionaron.

Accession	Description
1000419	(#78253) somatotropin, growth hormone, GH (Morone saxatilis-stripped bass, pituitary glands, Peptide, 204 aa) [Morone saxatilis]
103829	somatotropin precursor - grass carp
103912	somatotropin precursor I - rainbow trout
103913	somatotropin precursor II - rainbow trout
103957	somatotropin precursor - winter flounder
1041999	growth hormone, GH [Crocodylus novaeguineae-crocodiles, pituitary glands, Peptide, 190 aa] [Crocodylus novaeguineae]
1070552	somatotropin 1 precursor - human
1070553	somatotropin 2 precursor - human
1070554	somatotropin - alpaca
1070555	somatotropin 2 splice form 2 precursor - human
1071917	growth hormone precursor - rabbit
1079137	growth hormone - bullfrog
108101	somatotropin - sei whale (fragments)
1083902	growth hormone precursor - Acanthopagrus latus (yellowfin porgy)
1083903	growth hormone precursor - European sea bass
1085434	somatotropin precursor - pig (fragment)
1085460	somatotropin precursor - bovine
108923	somatotropin - bovine (fragments)
108924	somatotropin, variant - bovine (fragment)
1143869	(U28388) growth hormone [Carassius auratus]
1174393	SOMATOTROPIN PRECURSOR (GROWTH HORMONE)
1174394	SOMATOTROPIN PRECURSOR (GROWTH HORMONE)
1174395	SOMATOTROPIN PRECURSOR (GROWTH HORMONE) [Esox Lucius]
1174396	SOMATOTROPIN PRECURSOR (GROWTH HORMONE)
1174397	SOMATOTROPIN PRECURSOR (GROWTH HORMONE)
1174398	SOMATOTROPIN PRECURSOR (GROWTH HORMONE)
1174399	SOMATOTROPIN PRECURSOR (GROWTH HORMONE)
1174400	SOMATOTROPIN PRECURSOR (GROWTH HORMONE)
1174401	SOMATOTROPIN PRECURSOR (GROWTH HORMONE)
1178	(X56120) growth hormone [Mustela vison]
1208670	(U48221) growth hormone [Sparus aurata]
1246396	(D50348) growth hormone [Seriola quinqueradiata]
134691	SOMATOTROPIN I (GROWTH HORMONE I)
134692	SOMATOTROPIN I PRECURSOR (GROWTH HORMONE I)
134693	SOMATOTROPIN II (GROWTH HORMONE II)
134695	SOMATOTROPIN PRECURSOR (GROWTH HORMONE)
134696	SOMATOTROPIN I PRECURSOR (GROWTH HORMONE I)
134697	SOMATOTROPIN PRECURSOR (GROWTH HORMONE)
134698	SOMATOTROPIN PRECURSOR (GROWTH HORMONE)
134699	SOMATOTROPIN PRECURSOR (GROWTH HORMONE)
134701	SOMATOTROPIN PRECURSOR (GROWTH HORMONE)
134703	SOMATOTROPIN PRECURSOR (GROWTH HORMONE)
134705	SOMATOTROPIN (GROWTH HORMONE)
134706	SOMATOTROPIN (GROWTH HORMONE) [Loxodonta africana]
134707	SOMATOTROPIN PRECURSOR (GROWTH HORMONE)
134708	SOMATOTROPIN PRECURSOR (GROWTH HORMONE)
134709	SOMATOTROPIN PRECURSOR (GROWTH HORMONE)
134710	SOMATOTROPIN PRECURSOR (GROWTH HORMONE)
134711	SOMATOTROPIN PRECURSOR (GROWTH HORMONE)
134712	SOMATOTROPIN PRECURSOR (GROWTH HORMONE)
134713	SOMATOTROPIN PRECURSOR (GROWTH HORMONE) [Chrysophrys major]
134714	SOMATOTROPIN PRECURSOR (GROWTH HORMONE)
134715	SOMATOTROPIN PRECURSOR (GROWTH HORMONE)
134717	SOMATOTROPIN PRECURSOR (GROWTH HORMONE)
134718	SOMATOTROPIN PRECURSOR (GROWTH HORMONE)
134719	SOMATOTROPIN PRECURSOR (GROWTH HORMONE)
134720	SOMATOTROPIN PRECURSOR (GROWTH HORMONE)
134721	SOMATOTROPIN PRECURSOR (GROWTH HORMONE) [Thunnus thynnus]

134722	SOMATOTROPIN (GROWTH HORMONE) [Vulpes vulpes]
134723	SOMATOTROPIN A (GROWTH HORMONE A)
134724	SOMATOTROPIN B (GROWTH HORMONE B)
134728	GROWTH HORMONE VARIANT I PRECURSOR (GH-V) (PLACENTA-SPECIFIC GROWTH HORMONE)
134729	GROWTH HORMONE VARIANT II PRECURSOR (GH-V2)
1351088	SOMATOTROPIN 2 PRECURSOR (GROWTH HORMONE 2)
1351089	SOMATOTROPIN PRECURSOR (GROWTH HORMONE)
1363915	somatotropin precursor - barramundi perch
1377863	(U58113) growth hormone [Sus scrofa]
14936	(A00498) growth hormone [unidentified]
14539	(A00501) growth hormone [Homo sapiens]
1469320	(U28156) growth hormone type-2 [Oncorhynchus clarki]
1469322	(U28157) growth hormone type-2 [Oncorhynchus tshawytscha]
1469324	(U28360) growth hormone type-2 [Oncorhynchus gorbuscha]
1469326	(U28359) growth hormone type-2 [Oncorhynchus kisutch]
1469330	(U28361) growth hormone type-2 [Oncorhynchus masou]
1469334	(U28362) growth hormone type-2 [Oncorhynchus rhodurus]
1469340	(U29954) growth hormone type-1 [Salvelinus namaycush]
1566702	(A00469) growth hormone [Homo sapiens]
163090	(M27325) growth hormone precursor [Bos taurus]
163092	(M57764) growth hormone [Bos taurus]
163096	(M16253) growth hormone (alt.) [Bos taurus]
163097	(M16253) growth hormone (wt) [Bos taurus]
164254	(M62901) growth hormone [Mustela vison]
1644507	(U73464) growth hormone [Sus scrofa]
164476	(M17704) growth hormone [Sus scrofa]
164478	(M27326) growth hormone precursor [Sus scrofa]
165887	(M17310) growth hormone precursor [Ovis aries]
1699205	(S82528) growth hormone, GH [Lepisosteus osseus-long-nosed gar, pituitary, Peptide, 211 aa] [Lepisosteus osseus]
1793	(X12546) growth hormone [Ovis aries]
183146	(J00148) somatotropin [Homo sapiens]
183147	(J00148) somatotropin [Homo sapiens]
183149	(J03071) growth hormone GH-1 [Homo sapiens]
183152	(J03071) growth hormone GH-2 [Homo sapiens]
183157	(M14398) growth hormone [Homo sapiens]
183159	(M14398) growth hormone [Homo sapiens]
183175	(K00470) growth hormone [Homo sapiens]
183180	(M38451) growth hormone [Homo sapiens]
1836078	growth hormone, GH {N-terminal} [Clarias fariapinus-African catfishes, Burchell, pituitary glands, Peptide Partial, 50 aa] [Clarias fariapinus]
1877038	(D29737) growth hormone [Parasilichthys olivaceus]
1881773	(U89917) growth hormone [Sebastes schlegeli]
1932751	(U63803) growth hormone [Arothron maculatus]
1932753	(U63806) growth hormone [Carassius auratus]
1932755	(U63804) growth hormone [Colisa lalia]
1932757	(U63807) growth hormone [Fugu rubripes]
1932759	(U63805) growth hormone [Poecilia reticulata]
1943990	(A8001863) growth hormone [Coregonus lavaretus]
204307	(J00739) somatotropin [Rattus norvegicus]
2065033	(Y12578) growth hormone precursor [Carvus elapbus]
206884	(M32243) growth hormone [Rattus norvegicus]
208475	(M16282) growth hormone [synthetic construct]
210957	(M24066) growth hormone [Aquila japonica]
211809	(M35609) growth hormone [Gallus gallus]
2118581	somatotropin precursor - American mink
2118585	growth hormone - bowfin (fragment)
2118586	somatotropin - Japanese sea perch (fragment)
2118588	growth hormone - chinook salmon (fragment)
2118589	growth hormone precursor - sheep
2118590	somatotropin - common carp
2118591	somatotropin - cat
2118592	somatotropin - Escherichia coli
2118593	growth hormone - bovine (fragment)
2118594	growth hormone - noble carp
2118595	growth hormone 2 - rainbow trout
2118596	growth hormone - chinook salmon
2118597	growth hormone - bullfrog
2118598	growth hormone - rhesus macaque
2118599	growth hormone - rhesus macaque
2118600	growth hormone precursor - erctic eel
213310	(M94348) growth hormone [Kypophthalmichthys molitrix]
213416	(M19999) growth hormone precursor [Oncorhynchus kisutch]
213418	(K03050) growth hormone prepeptide [Oncorhynchus keta]
213424	(L04688) growth hormone [Oncorhynchus keta]
213500	(M26916) growth hormone precursor [Tilapia nilotica]

Obtención de nuevos genes de la hormona del crecimiento (GH) en vertebrados

213812	(M23439) growth hormone precursor [Paralichthys olivaceus]
213867	(M63713) growth hormone [Pangasius pangasius]
2138809	growth hormone precursor - pig (fragment)
213750	(M35627) growth hormone (GH) precursor (Seriola quinqueradiata)
213786	(M24683) growth hormone I precursor [Oncorhynchus mykiss]
213788	(M24684) growth hormone II precursor [Oncorhynchus mykiss]
213790	(M22731) growth hormone 1 precursor [Oncorhynchus mykiss]
213792	(J03797) growth hormone 2 [Oncorhynchus mykiss]
213794	(M22732) growth hormone 2 precursor [Oncorhynchus mykiss]
213798	(M21573) growth hormone [Salmo salar]
213890	(M84774) growth hormone [Tilapia nilotica]
213894	(M33697) growth hormone precursor [Meleagris gallopavo]
2147434	growth hormone - giant catfish
2147435	growth hormone - sole
2148057	somatotropin - dusky stingfish
2148058	somatotropin - greater amberjack
2148059	somatotropin - Morone saxatilis
217665	(D00476) growth hormone [Capra hircus]
222023	(D10484) growth hormone [Gallus gallus]
2250304	(AF002110) growth hormone [Ovis aries]
2250309	(AF002113) growth hormone [Ovis aries]
2281494	(AF002114) growth hormone [Ovis aries]
2281495	(AF002115) growth hormone [Ovis aries]
2281496	(AF002116) growth hormone [Ovis aries]
2281497	(AF002117) growth hormone [Ovis aries]
2281502	(AF002118) growth hormone [Ovis aries]
2281503	(AF002119) growth hormone [Ovis aries]
2281504	(AF002120) growth hormone [Ovis aries]
2281509	(AF002121) growth hormone [Ovis aries]
2281510	(AF002122) growth hormone [Ovis aries]
2281511	(AF002123) growth hormone [Ovis aries]
2281519	(AF002124) growth hormone [Ovis aries]
2281520	(AF002125) growth hormone [Ovis aries]
2281521	(AF002126) growth hormone [Ovis aries]
2281522	(AF002127) growth hormone [Ovis aries]
2281523	(AF002128) growth hormone [Ovis aries]
2281524	(AF002129) growth hormone [Ovis aries]
2292740	(AJ000549) growth hormone [Bubalus arnee bubalis]
235249	(S54890) growth hormone [Sparus aurata-gilthead seabream, Peptide, 204 aa] [Sparus aurata]
239356	(S66299) growth hormone [Syrian Golden hamsters, Peptide, 216 aa] [Mesocricetus auratus]
249110	growth hormone I, GH I [Acipenser guldenstadti-sturgeon, Peptide, 190 aa] [Acipenser guldenstadti]
2500853	SOMATOTROPIN (GROWTH HORMONE)
2500854	SOMATOTROPIN PRECURSOR (GROWTH HORMONE)
2500855	GROWTH HORMONE VARIANT I PRECURSOR (GH-V) (PLACENTA-SPECIFIC GROWTH HORMONE)
259070	growth hormone, cGH [N-terminal] [deer, pituitary glands, Peptide Partial, 43 aa] [Cervidae]
261623	(S50877) growth hormone, GH [sheep, pituitary, Peptide, 217 aa] [Ovis aries]
262191	(S50867) growth hormone, sGH [Oncorhynchus tshawytscha-chinook salmon, Peptide, 210 aa] [Oncorhynchus tshawytscha]
262922	(S52027) growth hormone, GH [Rana catesbeiana-bullfrogs, adenybypophyses, Peptide, 215 aa] [Rana catesbeiana]
264607	growth hormone, GH [N-terminal] [Bennett's wallabies, Peptide Partial, 40 aa] [Macropus rufogriseus]
267016	SOMATOTROPIN PRECURSOR (GROWTH HORMONE)
267017	SOMATOTROPIN PRECURSOR (GROWTH HORMONE)
267018	SOMATOTROPIN PRECURSOR (GROWTH HORMONE)
267019	SOMATOTROPIN PRECURSOR (GROWTH HORMONE)
2708611	(AF034386) growth hormone [Bos primigenius indicus]
2828571	(AF012096) growth hormone 1 [Felis catus]
283875	somatotropin precursor - chicken
284549	somatotropin - sei whale
293115	(L16556) growth hormone [Macaca mulatta]
293117	(L16555) growth hormone [Macaca mulatta]
295718	(X51969) growth hormone [Cyprinus carpio]
296143	(X72947) growth hormone [Bubalus arnee]
3002999	(AF052192) growth hormone precursor [Trichosurus vulpecula]
3024631	SOMATOTROPIN I PRECURSOR (GROWTH HORMONE I)
3024641	SOMATOTROPIN PRECURSOR (GROWTH HORMONE)
3024651	SOMATOTROPIN II PRECURSOR (GROWTH HORMONE II)
3116089	(AJ005819) growth hormone [Mannosialax shrenbergi]
312406	(V00520) growth hormone [Homo sapiens]
3135383	(AF063834) growth hormone prohormone [Aciaenops ocellatus]
3135387	(AF062745) growth hormone precursor [Protopterus annectens]
3135389	(AF062746) growth hormone precursor [Bufo marinus]
320148	somatotropin - guinea pig (fragment)

3202015	(AF069396) growth hormone I [Carassius auratus]
3202017	(AF069397) growth hormone II [Carassius auratus]
321065	somatotropin - blue shark
321071	somatotropin - Atlantic salmon (fragment)
321077	somatotropin - bullfrog (fragments)
321079	somatotropin - green sea turtle
321139	growth hormone variant, placental - human (fragments)
345577	somatotropin - Nile tilapia
389	(X12657) growth hormone factor I [Bos taurus]
398544	(U01301) growth hormone [Sparus aurata]
400	(V00111) growth hormone [Bos taurus]
406987	(U02293) growth hormone-variant [Macaca mulatta]
409963	(U02929) growth hormone [Equus caballus]
410759	(A06745) growth hormone-9D [Sus scrofa]
410770	(A06834) growth hormone [Bos taurus]
410774	(A08489) somatotropin [Bos taurus]
410776	(A09118) growth hormone 12 [Ovis aries]
411882	(A08993) growth hormone [Tilapia sp.]
412360	(A03992) growth hormone [unidentified]
413471	(A08487) somatotropin [unidentified]
417792	SOMATOTROPIN (GROWTH HORMONE)
419973	somatotropin - chum salmon (fragments)
422588	somatotropin - Acanthopagrus butcheri
423175	somatotropin - dog
425490	growth hormone, GH [Ictalurus punctatus-catfish, pituitary glands, Peptide, 178 aa] [Ictalurus punctatus]
430949	(U01143) growth hormone [Solea senegalensis]
435733	(866470) pregrowth hormone, pre-GH [Esox lucius-northern pike, pituitary glands, Peptide, 209 aa] [Esox lucius]
450295	(L27835) growth hormone [Pangasianodon gigas]
452386	(X77245) growth hormone [Coregonus autumnalis]
452872	growth hormone, GH [N-terminal] [Amia calva-holostean fish, pituitaries, Peptide Partial, 26 aa] [Amia calva]
455675	(867119) somatotropin, BST-fusion protein [Escherichia coli, LBB84, plasmid pXT107, IS10L/R-1, Peptide PlasmidTransposonInsertionMutant, 20 aa] [Escherichia coli]
455677	(867119) BST/beta-Gal fusion protein(somatotropin, BST, beta-galactosidase, beta-Gal) [Escherichia coli, LBB84, plasmid pXT107, IS10L/R-1, Peptide PlasmidTransposonInsertionMutant, 87 aa] [Escherichia coli]
464778	SOMATOTROPIN PRECURSOR (GROWTH HORMONE)
464779	SOMATOTROPIN (GROWTH HORMONE) [Chelonia mydas]
464780	SOMATOTROPIN PRECURSOR (GROWTH HORMONE)
464783	SOMATOTROPIN (GROWTH HORMONE)
464784	SOMATOTROPIN (GROWTH HORMONE) [Prionace glauca]
464785	SOMATOTROPIN (GROWTH HORMONE)
477892	growth hormone - golden hamster
478615	somatotropin - Russian sturgeon
479218	somatotropin - domestic water buffalo
482753	somatotropin - Mozambique tilapia
482758	somatotropin 20K - Atlantic cod [Gadus morhua]
482759	somatotropin - American plaice (fragment) [Hippoglossoides platessoides]
483102	somatotropin 22K - Atlantic cod [Gadus morhua]
483314	somatotropin alpha chain - turkey
484679	somatotropin precursor - pig (fragment)
490144	(A15072) growth hormone [Homo sapiens]
493010	(A07830) growth hormone [Tilapia nilotica]
493626	(D30713) growth hormone alpha variant [Bos taurus]
51068	(X02891) growth hormone precursor (aa 26 to 196) [Mus musculus]
529028	(M27000) growth hormone [Cyprinus carpio]
529476	(M24768) growth hormone [Oncorhynchus kisutch]
542619	somatotropin - silver carp
544569	(868464) growth hormone, sGH [Oncorhynchus tshawytscha-chinook salmon, Peptide Partial, 21 aa] [Oncorhynchus tshawytscha]
545073	(869215) growth hormone, GH [Ictalurus punctatus-channel catfish, Peptide, 200 aa] [Ictalurus punctatus]
558683	(E38127) growth hormone precursor [Oryctolagus cuniculus]
56219	(X12658) growth hormone factor I [Rattus norvegicus]
567042	(U13390) growth hormone precursor [Felis catus]
586010	SOMATOTROPIN (GROWTH HORMONE)
586011	SOMATOTROPIN PRECURSOR (GROWTH HORMONE)
586012	SOMATOTROPIN PRECURSOR (GROWTH HORMONE)
609444	(M27094) growth hormone [Ctenopharyngodon idella]
62400	(X59377) growth hormone [Acanthopagrus butcheri]
62437	(X07079) growth hormone precursor [Anas platyrhynchos]
62608	(X13670) growth hormone precursor (AA 23 to 186) [Cyprinus carpio]
62699	(X55176) growth hormone [Caranx delicatissimus]
62705	(X60419) growth hormone [Ctenopharyngodon idella]

Obtención de nuevos genes de la hormona del crecimiento (GH) en vertebrados

62711	(X60474) growth hormone [Ctenopharyngodon idella]
62770	(X65716) growth hormone [Dicentrarchus labrax]
62910	(X17618) growth hormone [Gallus gallus]
630928	somatotropin - silver carp
63407	(X12608) growth hormone precursor (AA -25 to 191) [Gallus gallus]
63978	(X60475) growth hormone [Hypophthalmichthys molitrix]
64034	(X59378) growth hormone [Lates calcarifer]
64230	(X15055) growth hormone precursor (AA -17 to [Paralichthys olivaceus])
64352	(X14305) growth hormone prepeptide [Salmo salar]
64358	(X61938) growth hormone I [Salmo salar]
64432	(X66735) growth hormone precursor (AA -17 to 187) [Trinectes thynnus]
64718	(X14601) growth hormone A [Xenopus laevis]
64720	(X14602) growth hormone B [Xenopus laevis]
65314	(X60473) growth hormone [Hypophthalmichthys nobilis]
69196	somatotropin precursor - rat
69197	somatotropin precursor - mouse
69198	somatotropin - horse
69199	somatotropin precursor - pig
69200	somatotropin precursor - bovina
69201	somatotropin precursor - sheep
69202	somatotropin precursor - goat
69203	somatotropin precursor - coho salmon
69204	somatotropin precursor - five-ray yellowtail
693788	(S73969) growth hormone, GH [Ania calva-howfis, Peptide, 195 aa] [Ania calva]
722276	(U21920) growth hormone [Abramis brama]
730764	SOMATOTROPIN PRECURSOR (GROWTH HORMONE)
806930	(S72386) growth hormone, pGH (axons 4 and 5) [swine, pituitary gland, Peptide Partial, 62 aa] [Sus scrofa]
825769	(U25973) growth hormone [Felis catus]
847751	(U19787) growth hormone [Sus scrofa]
85475	somatotropin I precursor - Japanese eel
85508	somatotropin precursor - common carp
85509	somatotropin precursor - common carp
85545	somatotropin II precursor - chum salmon
85546	somatotropin precursor - chum salmon
85582	somatotropin precursor - rainbow trout
85588	somatotropin precursor - Atlantic salmon
85589	somatotropin precursor - Atlantic salmon
85627	somatotropin precursor - red sea bream
85628	somatotropin precursor - gilthead sea bream
85649	somatotropin - skipjack tuna [Euthynnus pelamis]
85653	somatotropin - yellowfin tuna
85657	somatotropin precursor - bluefin tuna
85662	somatotropin precursor - Paralichthys olivaceus
85880	somatotropin A - African clawed frog (fragment)
85881	somatotropin B - African clawed frog (fragment)
85905	somatotropin precursor - bullfrog
86054	somatotropin precursor - duck [Anas platyrhynchos x Cairina moschata]
89010	somatotropin - Arctic fox [Alopex lagopus]
89109	somatotropin - African elephant
89296	somatotropin - pig (fragments)
897780	(E46663) growth hormone [Mus musculus]
903764	(L43629) growth hormone [Lateolabrax japonicus]
903877	(L43627) growth hormone [Sebastes marmoratus]
903879	(L43628) growth hormone [Seriola dumeril]
912486	(U19788) growth hormone [Sus scrofa]
93024	somatotropin - rhesus macaque (tentative sequence)
947115	(U16816) growth hormone [Lates calcarifer]
974	(X07035) growth hormone (AA 1-217) [Capra hircus]
999334	(S78184) growth hormone, GH [beagle dogs, mammary tissue, Peptide Partial, 143 aa] [Canis familiaris]

7.3 Anexo 3

7.3.1 Informe Resultado de la Consulta en BLAST de la Sonda GH-Explorer I

(189 secuencias, alineamientos parciales representativos se muestran al final).

BLASTN 2.0.5 [May-5-1998]
Query= goctgctcaRgaaggacatgcacaaggtggagacctacctgagggtcatgaagtg(GH-Explorer I)
 (56 letters)
Database: Non-redundant GenBank+EMBL+DDBJ+PDB
 sequences 368,044 sequences; 825,693,407 total letters

Distribution of 189 Blast Hits on the Query Sequence

Sequences producing significant alignments:

	Score (bits)	E Value
emb X07079 APGH Duck mRNA for growth hormone	83	4e-15
emb X06735 TTGHR Tuna mRNA for growth hormone	83	4e-15
gb M26916 ORNTIGH O.niloticus (tilapia) growth-hormone (tiGH) m...	77	3e-13
emb Z46663 MMGHGPRO M.musculus DNA for growth hormone gene and ...	75	1e-12
emb V01238 RNGROW2 Rat gene for growth hormone (presomatotropin...	75	1e-12
emb X17618 GDGHSOM G.domesticus growth hormone somatotropin mRNA	75	1e-12
emb AJ005819 SEH5819 Spalax ehrenbergi gene encoding growth hor...	75	1e-12
emb V01239 RNGROW3 Rat gene for growth hormone (presomatotropin...	75	1e-12
emb X59378 LCGHOR L.calcarifer mRNA for growth hormone	75	1e-12
gb M33697 TKYGRHO M.gallapavo growth hormone mRNA, complete cds.	75	1e-12
emb V01237 RNGROW1 Messenger RNA for rat growth hormone. >gi 20...	75	1e-12
dbj D10484 CHKGHG Chicken growth hormone gene	75	1e-12
gb M35609 CHKGHA Chicken growth hormone mRNA, complete cds.	75	1e-12
emb X02891 MMGHR1 Mouse mRNA for growth hormone >gi 193503 gb K...	75	1e-12

emb X79002 CHGROH	C.hippurus mRNA for growth hormone	75	1e-12
gb L25053 RATGNRHR	Rattus norvegicus Gonadotropin releasing hor...	75	1e-12
emb X12608 GGGH	Chicken mRNA for growth hormone	75	1e-12
gb U62779 RNU62779	Rattus norvegicus presomatotropin mRNA, comp...	75	1e-12
emb X77245 CAGHG	C.autumnalis growth hormone gene mRNA.	75	1e-12
emb X14305 SSALGHI	S.salar mRNA for growth hormone	75	1e-12
gb S69215 S69215	GH-growth hormone [Ictalurus punctatus-channel...	75	1e-12
gb S66299 S66299	growth hormone [Syrian Golden hamsters, mRNA, ...	75	1e-12
gb M29382 SYNGHSMHRC	S.gairdneri (rainbow trout)/E.coli beta-ga...	69	7e-11
emb X60419 CIGH	C.idellus gene encoding growth hormone	69	7e-11
gb M19999 ONHGHCOHO	Oncorhynchus kisutch (coho salmon) growth h...	69	7e-11
gb M24768 ONHGH	Coho salmon growth hormone (GH) mRNA, 3' end.	69	7e-11
gb S50867 S50867	growth hormone [Oncorhynchus tshawytscha-chin...	69	7e-11
gb AF069398 AF069398	Carassius auratus growth hormone I mRNA, c...	69	7e-11
emb X17593 OKGHI	O.keta RNA for growth hormone I, sGHI	69	7e-11
gb M27094 CTEGRH	Ctenopharyngodon idella growth hormone mRNA, c...	69	7e-11
emb X60988 CIGCGH	C.idella gcGH (grass carp growth hormone) gen...	69	7e-11
gb M22731 SMOGRHTA	S.gairdneri (rainbow trout) growth hormone (...	69	7e-11
gb X03050 ONHGHSAI	Salmon growth hormone mRNA, complete cds.	69	7e-11
gb U21920 ABU21920	Abraxis brama growth hormone (GH) gene, part...	69	7e-11
gb M24683 SMOGH1	S.gairdneri growth hormone (GH-I) mRNA, comple...	69	7e-11
gb U13390 FCU13390	Felis catus growth hormone precursor mRNA, c...	67	3e-10
gb AF002123 OVAAGH3	Ovis aries growth hormone (GH) gene, exon 5...	67	3e-10
emb X55176 CDGRHO	C.delicatissimus mRNA for growth hormone	67	3e-10
gb AF002113 QAAGH3	Ovis aries growth hormone (GH) gene, exons 4...	67	3e-10
gb AF062746 AF062746	Bufo marinus growth hormone precursor, mRNA...	67	3e-10
gb AF002120 SEG OVARGH3	Ovis aries growth hormone (GH) gene, ex...	67	3e-10
dbj D00476 GOTGHRA	Goat growth hormone gene, complete cds and f...	67	3e-10
gb S50877 S50877	growth hormone (sheep, pituitary, mRNA Partial...	67	3e-10
gb U49063 OAU49063	Ovis aries placental growth hormone mRNA, co...	67	3e-10
gb M17704 PIGGH	Porcine growth hormone gene, complete cds. >gi ...	67	3e-10
gb AF002110 OAGH1	Ovis aries growth hormone (GH) gene, complete...	67	3e-10
gb L43628 SEQGHR	Seriola dumerili growth hormone (GH) mRNA, 3' ...	67	3e-10
gb M22732 SMOGRHTC	S.gairdneri (rainbow trout) growth hormone (...	67	3e-10
gb M35627 SEOPGH	S.quinqueradiata growth hormone (GH) mRNA, com...	67	3e-10
dbj D30713 BOVGHCY	Bovine gene for growth hormone C variant, pa...	67	3e-10
gb AF002129 OVIAGHG6	Ovis aries growth hormone (GH) gene, exon ...	67	3e-10
gb M27326 PIGGHC	Pig growth hormone mRNA, 3' end.	67	3e-10
emb X15976 OOGHM6	Ovine GH mRNA for growth hormone	67	3e-10
gb AF002117 OARGH4	Ovis aries growth hormone (GH) gene, exon 5 ...	67	3e-10
gb M24684 SMOGH2	S.gairdneri growth hormone (GH-II) mRNA, compl...	67	3e-10
gb U89917 SSU89917	Sebastes schlegeli growth hormone (KrGH) mRNA...	67	3e-10
gb AF063834 AF063834	Sciaenops ocellata growth hormone prohormo...	67	3e-10
gb U25973 FCU25973	Felis catus growth hormone mRNA, complete cds.	67	3e-10
emb Y00767 CHGHR	Goat mRNA for growth hormone >gi 2170271 dbj E...	67	3e-10
gb U02929 BCU02929	Equus caballus growth hormone (ecGH) mRNA, c...	67	3e-10
emb X07035 CHGH	Goat mRNA for growth hormone	67	3e-10
emb Z38127 OCGRORHM	O.cuniculus gene for growth hormone	67	3e-10
emb X17594 OKGHII	O.keta RNA for growth hormone II, sGHII	67	3e-10
emb X12546 OOGH	Ovine gene for growth hormone	67	3e-10
emb X72947 BBGHMRNA	B.hubalis mRNA for growth hormone	67	3e-10
gb M37310 SHPGHOV	Ovine growth hormone gene, complete cds.	67	3e-10
emb X53325 SSPGH	S.scrofa growth hormone mRNA.	67	3e-10
gb M22761 PIGGHMA	Pig growth hormone mRNA.	67	3e-10
gb U28388 CAU28388	Carassius auratus growth hormone mRNA, parti...	63	1e-09
gb S73969 S73969	growth hormone [Amia calva-bowfin, mRNA Partia...	63	4e-09
gb M63713 FNAGH	Pangasius pangasius growth hormone mRNA, comple...	63	4e-09
gb L27835 PBGHHA	Pangasianodon gigas growth hormone (GH) mRNA, ...	63	4e-09
emb X60474 CIPGH	C.idellus (Grass carp) mRNA for growth hormone	61	2e-08
emb X13670 CCGH	Cyprinus carpio mRNA for growth hormone	61	2e-08
emb X60473 HNPGH	H.nobilis (Bighead carp) mRNA for growth hormone	61	2e-08
gb M27000 CYIGH	Cyprinus carpio growth hormone (GH) mRNA, compl...	61	2e-08
emb X51969 CCGHG	Cyprinus carpio growth hormone gene	61	2e-08

emb X60475 HMPGH	<i>H.mulitrix</i> (Silver carp) mRNA for growth hormone	61	2e-08
gb AF062745 AF062745	<i>Protopterus annectens</i> growth hormone precu...	61	2e-08
gb M94348 HYPSCGH	<i>Hypophthalmichthys molitrix</i> growth hormone (s...	61	2e-08
gb S58867 S58867	ypGH= growth hormone [<i>Acanthopagrus latus</i> -yell...	59	7e-08
gb U01301 U01301	<i>Sparus aurata</i> growth hormone mRNA, complete cds.	59	7e-08
emb X59377 ABGHOR	<i>A.butcheri</i> mRNA for growth hormone	59	7e-08
emb Y12578 CEGHGEM	<i>C.elaphus</i> gene encoding growth hormone	59	7e-08
emb X06962 PMPRGH	Red sea bream mRNA for pregrowth hormone (pr...	59	7e-08
gb S54890 S54890	growth hormone [<i>Sparus aurata</i> -gilthead seabrea...	59	7e-08
gb S52027 S52027	growth hormone [<i>Rana catesbeiana</i> -bullfrogs, ad...	59	7e-08
gb J00008 BOVGH	bovine growth hormone (presomatotropin) gene an...	59	7e-08
gb U01143 SSU01143	<i>Solea senegalensis</i> growth hormone mRNA, comp...	59	7e-08
gb AF034386 AF034386	<i>Bos indicus</i> growth hormone mRNA, complete cds	59	7e-08
emb V00111 BTGROW	Bovine mRNA for growth hormone.	59	7e-08
emb X14601 XIGHA	<i>Xenopus laevis</i> mRNA for growth hormone A	59	7e-08
gb M62901 MYIGH	Mink growth hormone mRNA, 3' end.	59	7e-08
emb X59786 MVRNAGF	<i>M.vison</i> gene for growth factor	59	7e-08
gb M27325 BOVGHC	Bovine growth hormone mRNA, complete cds.	59	7e-08
emb X56120 MYMKGH	Mink mkGH mRNA for growth hormone	59	7e-08
gb L43629 LALGHR	<i>Lateolabrax japonicus</i> growth hormone (GH) mRNA,...	59	7e-08
gb L43627 SEKGNR	<i>Sebasticus marmoratus</i> growth hormone (GH) mRNA...	59	7e-08
gb M57764 BOVGHGH	Bovine growth hormone gene, complete cds.	59	7e-08
gb M23439 PAIFGH	Flounder growth hormone (fGH) mRNA, complete cds.	59	7e-08
emb X12887 POGH	Flounder mRNA fragment for growth hormone	59	7e-08
gb M23813 BOVGROWP	<i>Bos taurus</i> adrenocorticotropic hormone (ACTH...	59	7e-08
emb X15055 POGHR	Flounder (<i>Paralichthys olivaceus</i>) mRNA for gro...	59	7e-08
gb AF052192 AF052192	<i>Trichosurus vulpecula</i> growth hormone precu...	59	7e-08
gb U16816 LCU16816	<i>Lates calcarifer</i> growth hormone gene, promot...	59	7e-08
gb S78253 S78253	somatotropin [<i>Morone saxatilis</i> -striped bass, p...	59	7e-08
gb U19788 SSU19788	<i>Sus scrofa</i> growth hormone mRNA, complete cds.	57	3e-07
gb AF069399 AF069399	<i>Carassius auratus</i> growth hormone II mRNA, ...	57	3e-07
emb X61938 SSGCH	<i>S.salar</i> gene for growth hormone I	57	3e-07
emb X65716 DLGRHO	<i>D.labrax</i> mRNA for growth hormone	55	1e-06
gb M24066 ANGGROHOR	<i>Anguilla japonica</i> growth hormone mRNA, comp...	53	4e-06
emb X12520 RCGHR	Bullfrog mRNA for growth hormone	53	4e-06
gb S66470 S66470	pregrowth hormone [<i>Esox lucius</i> -northern pike, ...	53	4e-06
gb L04688 ONHGROHOR	Chum salmon growth hormone gene, complete cds.	53	4e-06
gb M21573 SMOCHSAM	Salmon (<i>S.salar</i>) growth hormone gene, comple...	53	4e-06
gb U14535 ONU14535	<i>Oncorhynchus nerka</i> type-2 growth hormone gen...	53	4e-06
gb J03797 SMOCHRTS	<i>S.gairdneri</i> (rainbow trout) growth hormone (...	53	4e-06
gb AB001865 AB001865	<i>Coregonus lavaretus</i> DNA for growth hormon...	53	4e-06
emb Z23067 CFGROHOR	<i>C.familiaris</i> mRNA for growth hormone	51	2e-05
gb U14551 ONU14551	<i>Oncorhynchus nerka</i> type-1 growth hormone gen...	51	2e-05
gb D50368 SEOGH	<i>Seriola quinqueradiata</i> gene for growth hormone...	51	2e-05
gb M97765 TILGH2X	<i>Tilapia nilotica</i> growth hormone (GH2) gene, e...	51	2e-05
gb M84774 TILGROWHM	<i>Tilapia nilotica</i> growth hormone gene, comp...	51	2e-05
gb M97766 TILGH1X	<i>Tilapia nilotica</i> growth hormone (GH1) gene, e...	51	2e-05
gb M16253 BOVGHMT	Bovine alternative growth hormone mRNA, exon ...	51	2e-05
gb U19787 SSU19787	<i>Sus scrofa</i> growth hormone mRNA, complete cds.	51	2e-05
gb AF086787 AF086787	<i>Verasper variegatus</i> growth hormone precurs...	51	2e-05
emb Y11732 OMTIGHGEN	<i>Oreochromis mossambicus</i> tigh gene	51	2e-05
gb M15894 HUMCS3	Human chorionic somatomammotropin hCS-3 gene.	47	3e-04
emb V00573 HSPLAC	Human mRNA encoding placental lactogen hormone.	47	3e-04
gb M25118 HUMCS2	Human chorionic somatomammotropin (HCS) mRNA, ...	47	3e-04
gb J00118 HUMPLB	Human placental lactogen hormone (PL-4) mRNA, ...	47	3e-04
gb L16555 MACGHVAR	Monkey growth hormone-variant mRNA, complete...	47	3e-04
gb K90470 HUMGHV	Human growth hormone variant (HGH-V) gene, com...	47	3e-04
gb U02293 MMU02293	<i>Macaca mulatta</i> growth hormone-variant gene, ...	47	3e-04
gb M13438 HUMGHN	Human growth hormone gene (HGH-N), complete cds.	47	3e-04
gb J03071 HUMGHCSA	Human growth hormone (GH-1 and GH-2) and cho...	47	3e-04
emb V00520 HSGROW2	Human germ line gene for growth hormone (pre...	47	3e-04
gb AF006061 AF006061	<i>Homo sapiens</i> placental growth hormone isof...	47	3e-04
emb V00519 HSGROW1	Human messenger RNA for growth hormone (pres...	47	3e-04

gb J03756 HUMGHVA	Human growth hormone-variant (GH1) and growth...	47	3e-04
gb M15895 HUMCS5	Human chorionic somatomammotropin CS-5 pseudog...	47	3e-04
emb Y00593 HSSOMA	Human gene for somatomammotropin (hormone).	47	3e-04
gb AF006060 AF006060	Homo sapiens placental growth hormone 20kD...	47	3e-04
gb M38451 HUMGHVP	Human placenta-specific growth hormone mRNA, ...	47	3e-04
gb K02401 HUMCS1	Human chorionic somatomammotropin gene hCS-1, ...	47	3e-04
gb J00289 HUMPLA	Human placental lactogen hormone (CSH1) gene, ...	47	3e-04
gb U63807 FRU63807	Fugu rubripes growth hormone (GH) gene, comp...	45	0.001
dbj D29737 FAIGH	Flounder gene for growth hormone, complete cds	43	0.005
emb X14602 XLQHE	Xenopus laevis mRNA for growth hormone B	43	0.005
gb 882528 882528	growth hormone [Lepisosteus osseus=long-nosed ...	41	0.019
emb Z32691 ECT7DM1	E.coli (HM174) pT7T7/T7H DNA, 11271 bp	39	0.075
emb Z32693 ECT7DM3	E.coli pT7hGH_pl DNA, 6160bp	39	0.075
gb AF075648 AF075648	Equus caballus microsatellite LEX046	37	0.30
gb L16556 MACGHE	Monkey growth hormone mRNA, complete cds and fl...	37	0.30
gb U48221 SAU48221	Sparus aurata growth hormone gene, complete ...	37	0.30
gb L16552 MACCSOMAA	Monkey chorionic somatomammotropin-1 mRNA, ...	35	1.2
gb L16554 MACCSOMAC	Monkey chorionic somatomammotropin-3 mRNA, ...	35	1.2
dbj D10638 ONHSGSL3	Chum salmon gene for somatolactin, exon 4 a...	35	1.2
emb X75926 MMABC1	M.musculus abc1 mRNA	35	1.2
dbj D10640 ONHPSOL	Chum salmon mRNA for somatolactin, complete cds	35	1.2
emb Z83821 HS296K21	Human DNA sequence from PAC 296K21 on chrom...	35	1.2
emb X15000 MMIRX2	Mus musculus mRNA for iroquois homeobox prote...	35	1.2
emb AL020991 HS884M20	Homo sapiens DNA sequence from PAC 884M20...	35	1.2
gb L16553 MACCSOMAB	Monkey chorionic somatomammotropin-2 mRNA, ...	35	1.2
gb AF023258 MMFATP3	Mus musculus fatty acid transport protein (...	35	1.2
emb Z54336 HSL25G12	Human DNA sequence from cosmid L25G12, Hunt...	33	4.8
gb U63884 AAU63884	Anguilla anguilla somatolactin precursor mRN...	33	4.8
gb U37008 MXU37008	Nyctococcus xanthus socD (socD500 allele) and...	33	4.8
gb U63803 AMU63803	Arothron maculatus growth hormone (GH) gene, ...	33	4.8
gb AF029308 HTCRBCHR9	Homo sapiens chromosome 9 duplication of ...	33	4.8
gb U50932 PAU50932	Pseudomonas aeruginosa glucose uptake regula...	33	4.8
gb U90307 HSU90307	Human iroquois-class homeodomain protein IRX...	33	4.8

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

®

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

7.4 Anexo 4

7.4.1 Iniciadores en CDS de la GH.

Los iniciadores se muestran en la Tabla 8.4 y las posiciones en la Figura 8.4.

Tabla 7.4 Iniciadores en CDS (Internos) de la GH seleccionados.

Iniciador	Secuencia	Tm (°C)	ΔG Loop	ΔG Dim.	Máximo	Otros (+)
a)Exon2_5'(mam/p)	agcacctgcaccaactggctgc	67.7	-0.8	-8.9	TGCA ACGT	1
b)Exon2_5'(pez)	cagctgacaaaatgttctctgc	58.4	-0.5	-10.1	CAGCTG GTCGAC	2
c)Exon3_5'(mam)	agagatcagacctggagctgct	64.0	0.5	-8.3	AGCT TCGA	1
d)Exon3_5'(pez)	ttctctgctggatttctgtaact	58.4	-0.2	-4.7	TCC AGG	0
e)Exon4_5'(mam)	ctgctgctcatccagctcgtggc	67.7	-0.5	-5.0	CCA GGT	0
f)Exon4_5'(pez_1)	atcgactgattgagctcgtggga	60.3	-0.1	-8.8	TCGA AGCT	0
g)Exon4_5'(pez_2)	ctggcttgcttcaagaaggaca	62.1	-0.2	-5.4	CTTG GAAC	1
h)Exon5_5'	gcttcaagaaggacmtgcacaa	60.3	-1.0	-8.9	TCGA ACGT	8
i)Exon2_3'(mam)	gtgtcagcagccagttggtgca	65.9	-0.8	-8.9	TCGA ACGT	7
j)Exon2_3'(pez)	gcaggaatatttctcagctg	58.4	0.9	-10.1	CAGCTG GTCGAC	2
k)Exon2_3'(mix)	gagccagttggtgcaggtggtg	65.9	0.2	-8.9	TCGA ACGT	9
l)Exon3_3'(mam)	ccgggatggtctctgagaagca	65.9	0.4	-9.8	CCGG GCCC	0
m)Exon3_3'(pez)	cgatgtattcagagttacagaa	56.5	-0.1	-4.2	TGTA ACAT	0
n)Exon4_3'	cyttcaggtccttcagcttctc	62.1	0.5	-8.3	AGCT TCGA	>10
o)Exon4_3'(mam/a)	gccacagccacgactggatgag	67.7	-0.7	-5.0	CCA GGT	1
p)Exon4_3'(pez)	gactggggaactcccagactc	65.9	-3.7	-8.1	TGGG ACCC	1
q)Exon5_3'	tgtgcatgtccttcttgaarca	58.4	-1.7	-8.9	TCGA ACGT	3

Obtención de nuevos genes de la hormona del crecimiento (GH) en vertebrados

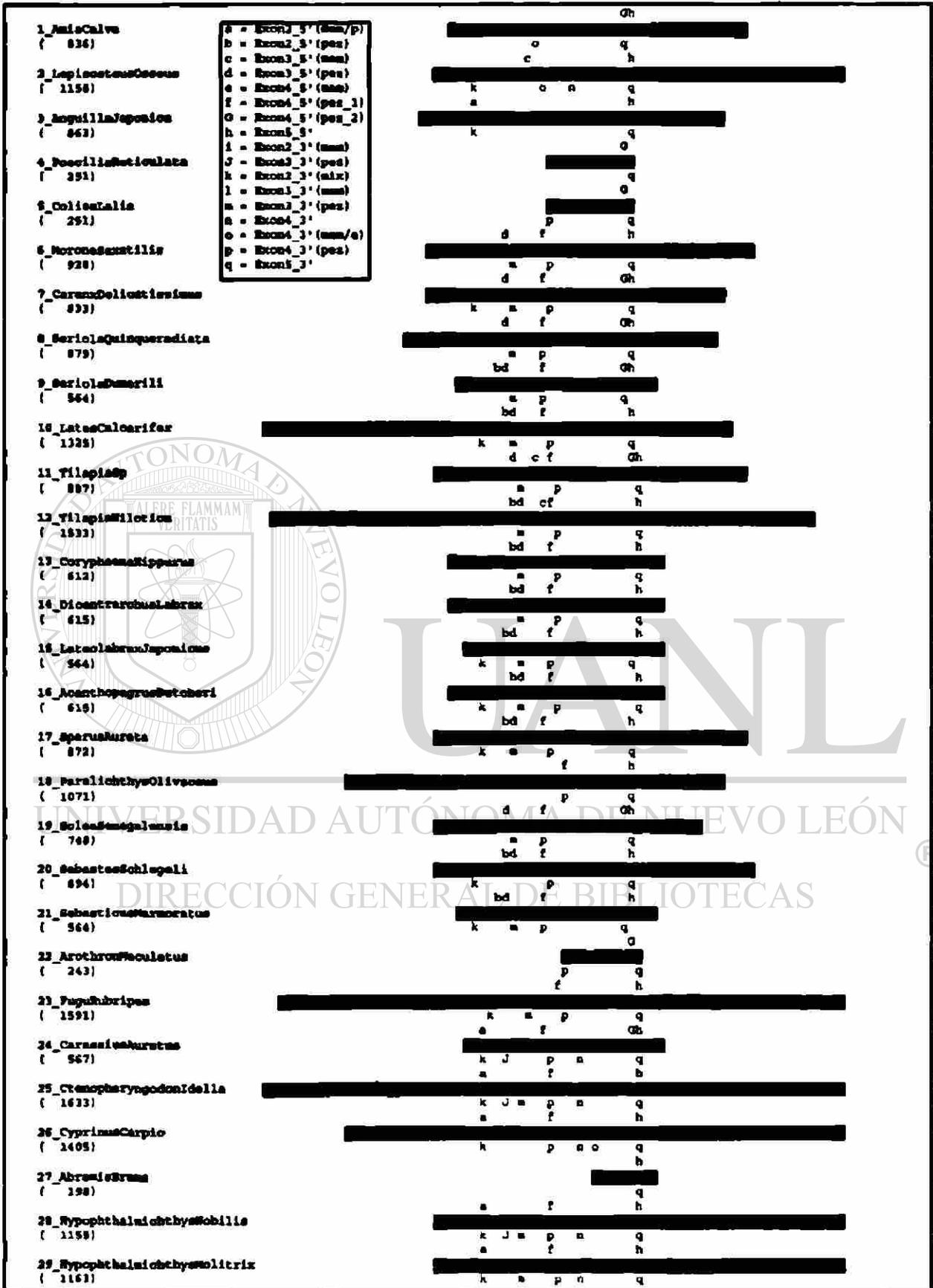
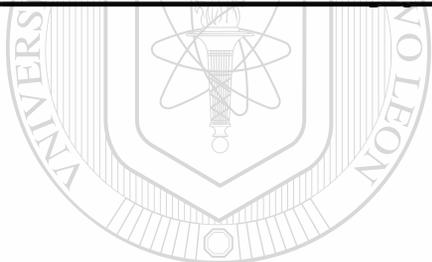
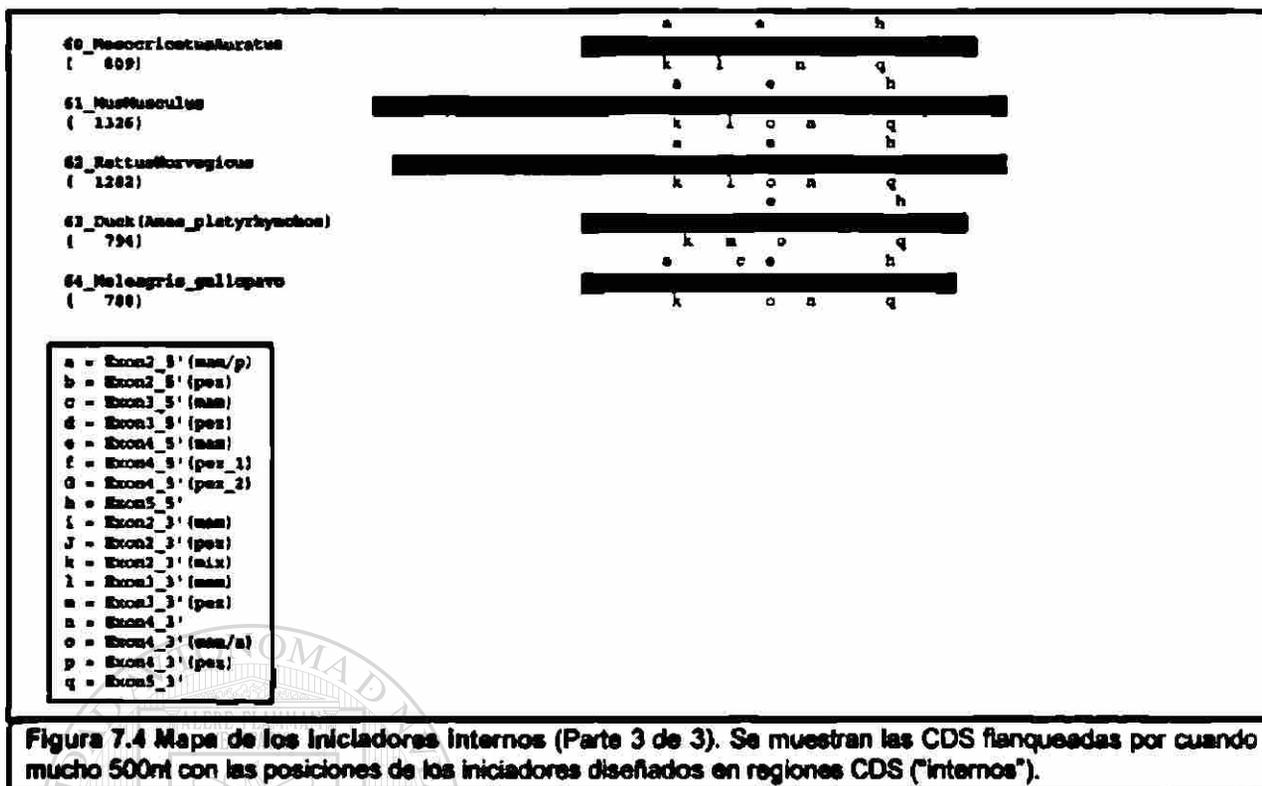


Figura 7.4 Parte 1 de 3 (Continua en la siguiente página).

Obtención de nuevos genes de la hormona del crecimiento (GH) en vertebrados

30_IctalurusPunctatus (1603)	[Redacted] a f Gh k J a p n q a f h
31_PangasiusodonBigas (1161)	[Redacted] k J a p n q
32_PangasiusPangasius (603)	[Redacted] a f b k J a p n q b d e Gh
33_CoregonusAutumnalis (742)	[Redacted] a n q d c f h
34_OncorhynchusKisutch (982)	[Redacted] a p n q d c f h
35_OncorhynchusTschawytzsch (1138)	[Redacted] a p n q a b d c f h
36_OncorhynchusEta (1622)	[Redacted] k n p n q b d c f h
37_SalmoGairdneri (1623)	[Redacted] a p n q b d c h
38_CoregonusLavaretus (1613)	[Redacted] a q Gh
39_XenopusLaevis (486)	[Redacted] q h
40_XenopusLaevis (420)	[Redacted] a a q Gh
41_RanaCatesbeiana (654)	[Redacted] k l n q a c e h
42_GallusGallus (1333)	[Redacted] k n c a n q a n c e h
43_CapraHircus (1545)	[Redacted] f k l o n q a n c e h
44_BosTaurus (1634)	[Redacted] f k l o n q a n c e h
45_BubalusArmenusBubalis (654)	[Redacted] k l n q
46_CapricornisCrispus (288)	[Redacted] a n c e h
47_OvisAries (1654)	[Redacted] f k l o n q a n c e h
48_GiraffaCamelopardalis (896)	[Redacted] k l o n q a n c e h
49_CervusElaphus (948)	[Redacted] f k l o n q
50_CervusElaphus (290)	[Redacted] a n c e h
51_BasScrofa (1333)	[Redacted] k l o n q a n c e h
52_CanisFamiliaris (720)	[Redacted] k l o n q a n c e
53_CanisFamiliaris (431)	[Redacted] k l n n c e h
54_FelisCatus (813)	[Redacted] k l o n q a n c e h
55_MustelaVison (783)	[Redacted] k l n q a n c e h
56_CrytolagusCuniculus (1339)	[Redacted] k l n q a n c e h
57_EquusCaballus (764)	[Redacted] k l n q c e l h
58_MacacaMullatta (1454)	[Redacted] k l q c e h
59_HomoSapiens (1634)	[Redacted] c e h

Figura 7.4 Parte 2 de 3 (Continúa en la siguiente página).



UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

®

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

Capítulo 8

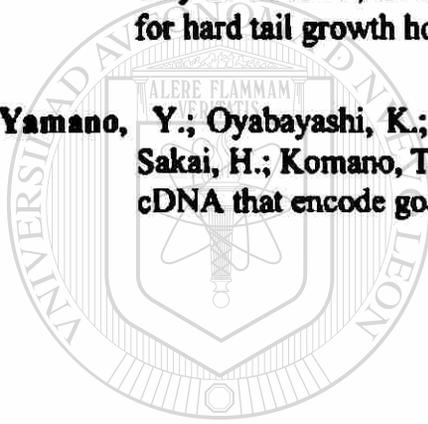
Referencias Bibliográficas

- Abdel-Mequid, S. S.; Shieh, H-S.; Smith, W. W.; Dayringer, H. E.; Violand,, B. N. y Bentle, L. A. 1987. Three dimensional structure of a genetically engineered variant of porcine growth hormone; *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*; 84 : 6434-6437.
- Agellon, L. B.; Chen, T. T. 1986. Rainbow trout growth hormone: molecular cloning of cDNA and expression in *Escherichia coli*. *DNA*, Dec;5(6):463-71 .
- Altschul, Stephen F., Thomas L. Madden, Alejandro A. Schäffer, Jinghui Zhang, Zheng Zhang, Webb Miller, and David J. Lipman (1997), "Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs", *Nucleic Acids Research* 25:3389-3402.
- Ascacio-Martinez, J. A. I. ; Barrera-Saldaña H. A. 1994. A dog growth hormone cDNA codes for a mature protein identical to pig growth hormone. *Gene*, 143:277-280.
- Ascacio-Martinez, J. A. I. ; Barrera-Saldaña H. A. 1994. Sequence of a cDNA encoding horse growth hormone. *Gene*, 143:299-300.
- Ausubel F. M., Brent R., Kingston R. E., Moore D. D., Seidman J. G., Smit J. A., Struhl K. 1992. Short Protocols in Molecular Biology 3rd Ed., John Wiley & Sons, Inc.
- Behncken Stuart, Rowlinson Scott, Rowland Jennifer, Conway-Campbell Becky, Monks Thea A. and Waters Michael. 1997. Aspartate 171 Is the Major Primate-specific Determinant of Human Growth Hormone. *The Journal of Biological Chemistry*. 272(43):27077-27083.
- Breslauer. Kenneth J.; Frank Ronald; Blöcker Helmut & Marky, Luis A. 1986. Predicting DNA duplex stability from the base sequence. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 83:3746-3750.
- Carlacci, L.; Kuo-Chen, C. y Maggiora, G. M. 1991. A heuristic approach to predict the tertiary structure of bovine somatotropin; *Biochemistry*, 30 : 4389-4398.
- Castro-Peralta, F. ; Barrera-Saldaña H. A. 1995. Cloning and sequencing of cDNA encoding the cat growth hormone. *Gene*, 143:277-280.

- Darwin, Charles Robert. 1859. *The Origin of Species*.
- De Voss, A. M.; Ultsch, M. y Kossiakoff, A. A. 1992. Human growth hormone and extracellular domain of its receptor : crystal structure of the complex; *Science*, 255 : 306-312.
- Engels Bill, University of Wisconsin Genetics M. Madison, WI, EUA. *Amplify* v1.2b.
- Escamilla, L.L, Barrera-Saldaña H.A. 1995. Biosíntesis de la hormona del crecimiento humano recombinante (HGHR) en *Pichia pastoris* y *Escherichia coli*. Tesis de Maestría. Facultad de Medicina de la UANL.
- Gallardo-Blanco, H. L.; Barrera-Saldaña H. A. 1998. Construcción de Cepas de *Pichia pastoris* sobreproductoras de hormona recombinante del crecimiento bovino. Tesis de Maestría. Facultad de Medicina de la UANL.
- Goetz Susan E., Hamilton Stanley R., Vogelstein Bert. 1985. Purification of DNA from Formaldehyde Fixed and Paraffin Embedded Human Tissue. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 130:118-126.
- Gordon D. F.; Quick, D.P.; Erwin, C. R.; Donelson, J. E. y Maurer, R. A. 1982. Nucleotide sequence of the bovine growth hormone chromosomal gene; *Mol. and Cel. Endocrinology* 33:81-95.
- Graf L, Li CH, Bewel TA. 1975. Selective reduction and alkylation of the COOH-terminal disulfide bridge in bovine growth hormone. *Int J Pept Protein Res.* 7:667.
- Harrison, J.; Molloy, P.L.; Clark, S.J. 1994. Direct cloning of polymerase chain reaction products in an XcmI T-vector. *Anal Biochem.* 216(1):236-236.
- Hertz, G.Z.; Hartzell, G.W. 3d; Stormo G.D. 1990. Identification of consensus patterns in unaligned DNA sequences known to be functionally related. *Comput. Appl. Biosci.* 6(2):81-92.
- Higgins DG, Thompson JD, Gibson TJ. 1994. CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Research* Nov 11;22(22):4673-4680
- Ingraham, H.A.; Chen, R.P.; Mangalam, H.J.; Elsholtz, H.P.; Flynn, S. E.; Lin, C.R.; Simmons, D.M.; Swanson L.; Rosenfeld, M.G. 1988. A tissue-specific transcription factor containing a homeodomain specifies a pituitary phenotype. *Cell.* 55(3):519-529.

- Juskevich, J.C. y Guyer, C.G. 1990. Bovine growth hormone ; Human food safety evaluation; *Science*, 249:875-884.
- Li, Wen-Hsiung & Graur, Dan. 1991. Fundamentals of Molecular Evolution. 1-2.
- Li, Wen-Hsiung & Graur, Dan. 1991. Fundamentals of Molecular Evolution. 69-98.
- Miller, W.L.; Eberhardt, N.L. . 1983. Structure and evolution of the growth hormone gene family. *Endocr. Rev.* Spring 4(2):97-130.
- Niall, H.D.; Hogan, M.L.; Sauer, R.; Rosenblum, I.Y. and Greenwood, F.C. 1971. Sequences of pituitary and placental lactogenic and growth hormone : Evolution from a primordial peptide by gene reduplication. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 68:866-869.
- Niall, H.D.; Hogan, M.L.; Tregear, G. W.; Segre, G.V.; Hwang, P. and Friesen, H. 1973. The chemistry of growth hormone and the lactogenic hormones; *Rec. Prog. Horm. Res.* 29:387-416.
- Nicoll, Charles S; Mayer Gregg L; Russell Sharon M. 1986. Structural Features of Prolactins and Growth Hormones That Can Be Related to Their Biological Properties. *Endocrine Reviews.* 7(2):169-203.
- O' Brien, S.J. & Clegg, M.T. 1993. Genomes and evolution; *Current Opinion in Genetics & Development*; 3(6) 835-836.
- Sambrook J., F. F. Fritsh and T. Maniatis. 1989. Molecular cloning: A laboratory manual 2nd Ed., *Cold spring harbor laboratory press.*
- Santomé, J. A.; Dellacha, J.M.; Paladini, A.C.; Peña, C.; Biscoglio, M.J.; Daurat, S.T.; Poskus, E. y Wolfstein, C. E. M. 1973. Primary structure of bovine growth hormone; *Eur. J. Biochem*, 37:164-170.
- Sato, N.; Watanabe, K; Murata, K.; Sakaguchi, M.; Kariya, Y.; Kimura, S.; Nonaka, M. y Kimura, A. 1988 Molecular cloning and nucleotide sequence of tuna growth hormone cDNA.; *Biochimi et Biophys Acta*, 949:35-42.
- Seeburg, P.H. 1982. The human growth hormone gene family: Nucleotide sequence show recent divergence and predict a new polipeptide hormone. *DNA.* 1:239-249.
- Sherwood L.S., Handwerber S., McLaurin W.E. and Lanner M. 1971. Aminoacid sequence of human placental lactogene. *Nature* 233:59.

- Souza Sandra C., Frick G. Petter, Wang Xinzhong, Kopchick John, Lobo Raysildo, Goodman H. Maurice. 1995. A single arginine residue determines species specificity of the human growth hormone receptor. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 92:959-963.
- van Helden, J.; Andre B.; Collado-Vides, J. 1998. Extracting regulatory sites from the upstream region of yeast genes by computational analysis of oligonucleotide frequencies. *J. Mol. Biol.* 281(5):827-842.
- White, C.T.; Hardies S.C.; Hutchison C.A. 3d, Edgell, M.H. . 1984. The diagonal-traverse homology search algorithm for locating similarities between two sequences. *Nucleic Acids Research.* Jun 11;12(1 Pt 2):751-766.
- Yamakawa, M.; Wathahiki, M.; Kamioka, Y.; Yamamoto, M.; Tanaka, M.; Nishiguichi, Y. y Nakashima, K. 1990. Nucleotide sequence of DNAC and primary structure for hard tail growth hormone; *Biochimi et Biophys Acta*; 1087:247-249.
- Yamano, Y.; Oyabayashi, K.; Okuno, M.; Yato, M.; Kioka, N.; Manabe, E.; Hashi, J.; Sakai, H.; Komano, T.; Utsumi, K. e Iritani, A. 1988. Cloning and sequencing of cDNA that encode goat growth hormone. *FEBS Lett*, Feb 15; 228(2), 301-304.



UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

®

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

RESUMEN AUTOBIOGRÁFICO

Víctor Manuel Treviño Alvarado

Candidato para el Grado de Maestro en Ciencias con
Especialidad en Biología Molecular e Ingeniería Genética

Tesis: OBTENCIÓN DE NUEVOS GENES DE LA HORMONA DE
CRECIMIENTO EN VERTEBRADOS

Campo de Estudio: Evolución Molecular

Biografía:

Datos Personales: Nacido en Monterrey Nuevo León, el 16 de Agosto de 1970, hijo de Bonifacio Arturo Treviño Neavez y María Rita Alvarado Martínez.

Educación:

Egresado del Instituto Tecnológico y de Estudios Superiores de Monterrey (1989-1994), grado obtenido Ingeniero en Sistemas Electrónicos. Egresado del Instituto Tecnológico y de Estudios Superiores de Monterrey (1986-1988), grado obtenido Técnico en Procesamiento de Datos.

Experiencia Profesional:

Programador, diseñador y asesor en sistemas computacionales desde marzo de 1988 hasta septiembre de 1998.

