

**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

C. 17
TM

QH 445

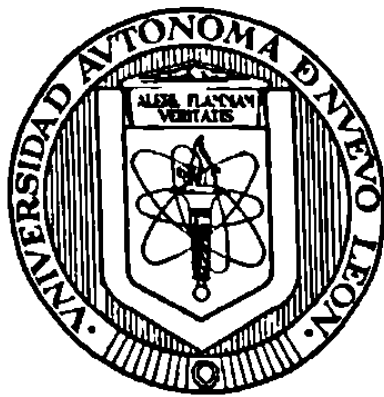
ING. VICTOR MANUEL TRIVINO ALVARADO



1080087874

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

FACULTAD DE MEDICINA



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

Por

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
9445
T7

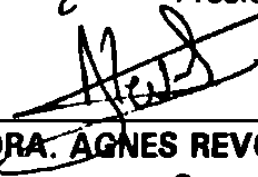


**OBTENCION DE NUEVOS GENES DE LA HORMONA DEL CRECIMIENTO
(GH) EN VERTEBRADOS**

Aprobación de la Tesis:



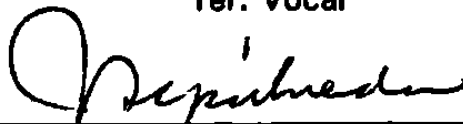
DRA. HERMINIA G. MARTÍNEZ RODRIGUEZ
Presidente



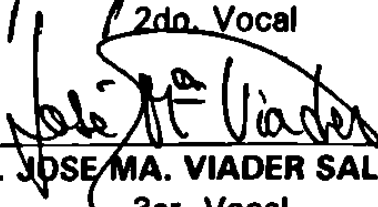
DRA. AGNES REVOL DE MENDOZA
Secretario



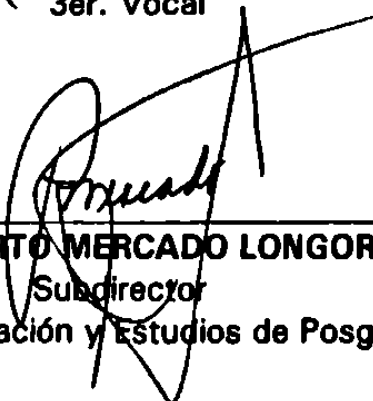
DR. HUGO ALBERTO BARRERA SALDAÑA
1er. Vocal



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

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 Ezquivel 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.

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?

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 JIRAFAS Y ANÁLISIS DE LAS CLONAS RECOMBINANTES.....	20
3.10.4 SECUENCIACIÓN DE LAS CLONAS RECOMBINANTES DE JIRAFAS.....	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 JIRAFAS	47
4.7.3 SECUENCIACIÓN DE LAS CLONAS RECOMBINANTES DE JIRAFAS.....	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

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

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1.1 ESTRUCTURA TRIDIMENSIONAL DE LA GH PORCINA 4

FIGURA 3.1 ESTRATEGIA GENERAL..... 11

FIGURA 3.2 VISTA DE *BIOCODE EXPLORER* 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 *MAXPROBE*..... 30

FIGURA 4.5 INFORME DEL APAREAMIENTO DE LA SONDA *GH-EXPLORER I* CON LAS
SECUENCIAS DEL *GENBANK* 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 *GH-EXPLORER I* CON DNAG DE VARIAS ESPECIES... 35

FIGURA 4.10 HIBRIDACIÓN DE *GH-EXPLORER 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 *GIRAFFA CAMELOPARDALIS* (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 *GH-EXPLORER 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
RNAm	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

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 aminoacídicas, 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. Agnès Revol de Mendoza
ASESORA


Dr. Hugo A. Barrera Sakdafia
COASESOR