UNIVERSIDAD AUTONOMA DE NUEVO LEON
FACULTAD DE MEDICINA

ESTUDIO MOLECULAR DE LA FAMILIA GH/PRL/SL EN EL CATAN

Por

Q.C.B. MARIA DE LOURDES GARZA RODRIGUEZ

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

Abril del 2001

Q.C.B. MARIA DE LOURDES GARZA RODRIGUEZ

TM
QP572
.S6
G3
c.1

1080092880

BMU RAUL RANGEL FRIAS
U.A.N.L.
22 MAYO 2001
RECIBIDO

QP 572
.S6
G3
c.1

UNIVERSIDAD AUTONOMA DE NUEVO LEON
FACULTAD DE MEDICINA

ESTUDIO MOLECULAR DE LA FAMILIA GH/PRL/SL EN EL CATAN

Por

Q.F.B. MARIA DE LOURDES GARZA RODRIGUEZ

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

Abril del 2001

B U Raúl Rangel Frías
UANL
FONDO
TESIS MAESTRIA

UNIVERSIDAD AUTONOMA DE NUEVO LEON

FACULTAD DE MEDICINA

ESTUDIO MOLECULAR DE LA FAMILIA GH/PRL/SL EN EL CATAN

Por

Q.C.B. MARIA DE LOURDES GARZA RODRIGUEZ

Como requisito parcial para obtener el Grado de
MAESTRIA EN CIENCIAS
Con especialidad en Biología Molecular e Ingeniería Genética.

Abril del 2001

El presente trabajo, titulado "Estudio Molecular de la Familia GH/PRL/SL en el catán", lo llevó a cabo la Q.C.B. María de Lourdes Garza Rodríguez 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 UANL, bajo la dirección de la Dra. Agnès Revol de Mendoza y la co- dirección del Dr. Hugo A. Barrera Saldaña.

AGRADECIMIENTOS

A Dios por la vida

A Marco por su comprensión y cariño

A mis padres y hermanos por su amor y apoyo incondicional

A mis asesores: la Dra. Agnès Revol, el Dr. Hugo Barrera y el Dr. Roberto Mendoza por sus enseñanzas y todo el apoyo que me brindaron a lo largo de mi trabajo

Al Departamento de Ecofisiología de la UANL

A las Maestras: Dolores, Eddy, Celia y Alma

A mis compañeros del laboratorio de Biología Molecular: Letty, Claudio, Rafa e Iram por su amistad y por hacer los días tan especiales

A la Dra. Ana María Sifuentes por los consejos y el apoyo en mi trabajo práctico

A la generación de los 12

A Malena, Nancy, Sandra, Irma, el Chaparro, Martín y Luis Miguel por su amistad, sus consejos y sus palabras de aliento

A todo el Departamento de Bioquímica

INDICE

Contenido	Página
LISTA DE TABLAS	**i**
LISTA DE FIGURAS	**ii**
NOMENCLATURA	**iii**
RESUMEN	**iv**
CAPITULO I. INTRODUCCIÓN	**1**
1.1 Las Familias Multigénicas	**2**
1.2 La familia GH/PRL/SL	**3**
1.2.1 Expresión de los miembros de la familia GH/PRL/SL	**4**
1.2.2 Estructura génica de las GHs, PRLs y SLs	**5**
1.2.3 Evolución de la familia	**7**
1.2.4 GHs	**10**
1.2.5 PRLs	**11**
1.2.6 SLs	**12**
1.3 El Catán (*Atractosteus spatula*)	**13**
1.3.1 Características Físicas	**13**
1.3.2 Distribución	**16**

1.3.3 Filogenia 16

1.3.4 El catán, una especie en peligro de extinción 17

1.4 Justificación del Trabajo 18

CAPITULO II

Objetivo General 19

Objetivos específicos 19

CAPITULO III. ESTRATEGIA GENERAL 20

CAPITULO IV. MATERIAL Y METODOS

4.1 Material 21

4.1 1 Origen de los reactivos 21

4.1.2 Material Biológico 22

4.2 Equipo 22

4.3 Métodos 24

4.3.1 Obtención y cuantificación del DNA y el RNA 24

4.3.1.1 Extracción y cuantificación de DNAg de Tejido 24

4.3.1.2 Extracción y cuantificación de RNA total 25

4.3.1.3 Análisis electroforético del DNA y RNA 27

4.3.2 Identificación de los genes de GH y PRL en el catán. 27

4.3.2.1 Preparación de la membrana. 27

4.3.2.2 Marcaje de las sondas 28

4.3.2.3 Hibridación 29

4.3.3 Amplificación de las secuencias de GH, PRL y SL 29

4.3.3.1 Diseño de los iniciadores. 29

4.3.3.2 Reacción de RT. 30

4.3.3.3 PCR. 32

4.3.3.4 Análisis electroforético 33

4.3.3.5 Caracterización de los productos de PCR. 33

4.3.4 Clonación y análisis de los PA 34

4.3.4.1 Preparación del vector T 34

4.3.4.2 Ligación y transformación 34

4.3.4.3 Extracción del DNA plasmídico 35

4.3.4.4 Análisis de las clonas recombinantes 36

4.3.4.5 Determinación de las secuencias nucleotídicas 37

4.3.4.6 Análisis de las secuencias nucleotídicas 37

CAPITULO V. RESULTADOS

5.1 Extracción de DNAg 38

5.2 Extracción del RNA total a partir de cabezas de larvas de catán y de juveniles de tilapia. 39

5.3 Identificación de los genes de GH y PRL en el catán 40

5.4 Diseño de los iniciadores 41

5.4.1 Iniciadores de PRL. 41

5.4.2 Iniciadores de SL. 42

5.4.3 Iniciadores de la GH. 43

5.5 Ensayos de RT-PCR con los iniciadores de SL y PRL 44

5.5.1 SL 44

5.5.1.1 Ensayos de RT-PCR 44

5.5.1.2 Clonación y secuenciación del PA. 45

5.5.2 PRL 46

5.5.2.1 Ensayos de RT-PCR con los iniciadores de PRL en Catán. 46

5.5.2.2 Clonación y secuenciación del PA 47

5.5.2.3 RT-PCR con los iniciadores de PRL en tilapia. 49

5.6. Obtención de la GH de catán 52

5.6.1 Ensayos de RT-PCR 52

5.6.2. Clonación del PA 53

5.6.3. Determinación y análisis de la secuencia 54

CAPITULO VI. DISCUSIÓN 59

CAPITULO VII. CONCLUSIONES 64

CAPITULO VIII. PERSPECTIVAS 65

CAPITULO IX. BIBLIOGRAFÍA 66

LISTA DE TABLAS

Tabla	Página
1. Número de reportes de secuencias nucleotídicas de la familia GH/PRL/SL	7
2. Condiciones para la RT	31
3- Condiciones estándar para la PCR.	32

LISTA DE FIGURAS

Figura	Página
1. Localización de las células productoras de GH, PRL y SL en la hipófisis.	4
2. Estructura de los genes de la familia GH/PRL/SL	5
3. Evolución de la familia GH/PRL/SL.	9
4. Tamaño del Catán.	15
5. Características del catán.	15
6. DNAg de las diferentes especies.	38
7. RNA total de cabezas de larvas de catán y juveniles de tilapia.	39
8. Hibridaciones en Slot-Blot de los genes de GH y PRL.	41
9. Iniciadores de PRL.	42
10. Iniciadores de SL.	43
11. Iniciadores diseñados para GH en catán.	44
12. RT-PCR con los iniciadores de SL.	45
13. Clonas candidatas para SL de catán.	46
14. Productos de amplificación obtenidos por RT-PCR con los primers de PRL(PRL1 y PRL2) en catán.	47
15. Clonas candidatas para PRL de catán.	48
16. Secuencia de la Clona 11 y resultados del BLAST	48
17. Estandarización de la PCR para PRL en *Tilapia nilotica*.	49

18. Purificación de los PA. 50

19. Secuencia de PRL de *Tilapia nilotica.* 51

20. Caracterización del PA de GH de catán. 52

21. Liberación de los fragmentos clonados. 53

22. Caracterización de las clonas con la enzima *Pst I.* 54

23. Análisis de la secuencia de GH de catán. 56

24. Árbol filogenético de GH en peces ancestrales. 58

NOMENCLATURA

aa	Aminoácido
cm^2	Centímetros cuadrados
°C	Grados centígrados
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DNAc	DNA complementario al RNAm
DNAg	DNA genómico
dNTPs	Desoxirribonucleósidos trifosfatos
DO	Densidad Óptica
EDTA	Acido etilen-diaminotetracético
GH	Hormona del crecimiento
g	Gramos
h	horas
kDa	Kilodaltons
µg	Microgramos
µM	Concentración micromolar
mM	Concentración milimolar
M	Concentración molar
mg	Miligramos
min	Minutos
ml	Mililitros

ng	Nanogramos
pb	Pares de bases
PCR	Reacción en Cadena de la Polimerasa
pH	$-\log[H^+]$
PM	Peso molecular
RNA	RNA mensajero
RNAt	RNA total
PRL	Prolactina
RNA	Ácido ribonucleico
RT	Retrotranscripción
s	Segundos
SL	Somatolactina
Taq	DNA polimerasa de *Thermus aquaticus*
UV	Ultravioleta
X	Veces la concentración

RESUMEN

Q.C.B. María de Lourdes Garza Rodríguez

Título del Estudio: ESTUDIO MOLECULAR DE LA FAMILIA GH/PRL/SL EN EL CATAN

Número de páginas: 70

Candidato al grado de Maestría en Ciencias con especialidad en Biología Molecular e Ingeniería Genética.

Objetivo y método de estudio. Las hormonas del crecimiento (GHs), las prolactinas (PRLs) y las somatolactinas (SLs) constituyen una familia de hormonas polipeptídicas hipofisiarias, las cuales pudieron haberse originado de un gen ancestral común antes del surgimiento de los peces, permaneciendo este precursor aún desconocido. Esta familia de hormonas representa uno de los grupos más diversos en tamaño generado por duplicación génica. Los estudios de estas hormonas en mamíferos y peces han permitido realizar estudios de filogenia molecular y aclarar eventos evolutivos. Sin embargo, la falta de datos en peces primitivos no permite precisar la historia evolutiva de esta familia e inferir así la secuencia del potencial gen ancestral. En este estudio se trabajó con la especie *Atractosteus spatula*, el cual es un pez pancrónico localizado en la vertiente del Golfo de México, más específicamente en el estado de Tamaulipas. Una de sus características más importantes es su crecimiento importante ya que los adultos pueden llegar a medir hasta 3 metros de largo. En la actualidad se conoce muy poco acerca de la biología de esta especie, la cual se encuentra en peligro de extinción debido a la pérdida de su hábitat natural y de la pesca indiscriminada por el hombre. Este trabajo se enfocó en la identificación de los genes de GH y PRL en el DNAg del catán y en el diseño de iniciadores de GH, PRL y SL para realizar estudios de RT-PCR con RNA total de cabezas de larvas de catán.

Conclusiones y contribuciones. Se evidenciaron los genes de GH y PRL en el DNAg del catán por medio de la técnica de Slot-Blot. Aunque los iniciadores diseñados para PRL y SL permitieron obtener productos de RT-PCR, éstos no correspondieron a genes de la familia GH/PRL/SL. El DNAc de GH de catán fue clonado y secuenciado, el análisis de la secuencia reveló que la proteína madura de la GH se encuentra muy conservada entre los géneros *Atractosteus* y *Lepisosteus* a pesar de que divergieron hace aproximadamente 180 millones de años. Finalmente, se realizó la reconstrucción de un árbol filogenético que permitió analizar la secuencia del catán y compararla con la de los peces ancestrales.

Dra. Agnès Revol de Mendoza
Director

Dr. Hugo A. Barrera Saldaña
Co-Director