CAPITULO I

Introducción

La evolución se consideró una nueva rama de la Ciencia en el siglo XIX, bajo el impulso de Darwin, principalmente. Darwin propuso, en su teoría de la Selección Natural, que todos los organismos vivientes se desarrollaron a partir de otros más simples y que se estableció una selección basada en la competencia por sobrevivir (Darwin, 1859). Fue Darwin uno de los primeros en estudiar el origen de la vida y la evolución de las especies. El basaba sus estudios en la observación de las características físicas de las especies, y así fue como construyó el primer árbol evolutivo. Después, con la finalidad de aclarar y mejorar los datos evolutivos, se añadieron resultados provenientes de otras áreas de estudio como la Anatomía Comparada, la Paleontología, la Embriología Comparada, la Inmunología y la Bioquímica, mismos que permitieron afinar más los conocimientos sobre la evolución de las especies. Actualmente, se cuenta con una herramienta muy valiosa para el estudio de la evolución: la Biología Molecular, la cual permite obtener secuencias aminoacídicas y nucleotídicas de los genes y hacer comparaciones a nivel del material genético de cada organismo; gracias a estos estudios ha sido posible aclarar y corregir los datos de los cuales se disponía anteriormente y así surgió una nueva rama de la ciencia: La Evolución Molecular (Li y Graur, 1991).

El reto de la evolución molecular es identificar los eventos evolutivos, ordenarlos y descifrar su significado. Los datos moleculares nos permiten reconstruir la cronología de los cambios a nivel del material genético e identificar fuerzas involucradas en el proceso evolutivo.

La evolución molecular abarca tres áreas de estudio: la evolución de las macromoléculas, la filogenia molecular y la evolución prebiótica (Li y Graur, 1991). La Evolución de las Macromoléculas estudia los cambios ocurridos en el material genético y sus productos durante el tiempo de evolución y los posibles mecanismos responsables de estos cambios. La Filogenia Molecular reconstruye la historia evolutiva de organismos y macromoléculas a partir de datos moleculares, lo cual ha hecho que sea una de las áreas de la evolución molecular que ha generado mayor interés, principalmente porque el análisis de un conjunto de genes permite complementar y aclarar las relaciones filogenéticas en casos dificiles. Finalmente, la Evolución Prebiótica o el origen de la vida estudia los posibles eventos y mecanismos que pudieron originar la vida (Li y Graur, 1991).

El estudio de la filogenia molecular inició a principios del siglo XX. Los primeros estudios moleculares realizados en los años 60 s y 70 s utilizaban principalmente las secuencias de las proteínas, pero la acumulación de secuencias nucleotídicas no se realizó sino a finales de los años 70 s, teniendo un gran impacto en la filogenia molecular, lo que ha permitido en la actualidad que las secuencias nucleotídicas constituyan el material básico de los estudios filogenéticos. Mas sin embargo, los métodos tradicionales para el estudio de la evolución tales como la morfología, la anatomía, la fisiología y la paleontología, siguen siendo herramientas importantes para el estudio de la filogenia y complementan los estudios moleculares.

1.1 Las Familias Multigénicas

La duplicación del DNA está considerada como una fuerza mayor en la evolución. Las duplicaciones en tandem pueden surgir por errores en la replicación o por recombinación. Cuando un gen completo está involucrado en la duplicación, se generan dos genes con

actividades idénticas manteniendo ambos su función original, sin embargo, después ambos genes divergen entre sí acumulando mutaciones lo que origina que a la vez adquieran diferentes funciones. Se considera que los genes que provienen de la duplicación de un mismo gen ancestral integran una familia multigénica (Singer y Berg, 1991). Las familias multigénicas pueden estar formadas por tan solo dos genes o estar constituidas por cientos de ellos. Cada familia multigénica es distintiva y frecuentemente sus características varían de un grupo de especies a otro, algunos ejemplos de familias multigénicas son: los genes de la actina, los de la hormona del crecimiento y los de las globinas, entre otras (Ohta, 1991). Los miembros de la familia pueden permanecer juntos o dispersarse a diferentes cromosomas. Por lo general, los miembros de una familia de genes tienen funciones relacionadas o idénticas, aunque se pueden expresar en diferentes tiempos y en diferentes tipos de células. La organización del conjunto de genes en una familia es clave para dilucidar la serie de eventos que la originaron, por lo que el estudio de las familias multigénicas es importante para inferir sobre la historia de los genomas.

1.2 La familia GH/PRL/SL

Las hormonas del crecimiento (GHs), las prolactinas (PRLs) y las somatolactinas (SLs) constituyen una familia de hormonas polipeptídicas hipofisiarias. Se cree que estas hormonas pudieron haberse originado de un gen ancestral común (aún desconocido), antes del surgimiento de los peces (May D y cols., 1999). Y hasta el momento representan uno de los grupos más diversos generados por duplicación génica.

1.2.1 Expresión de los miembros de la familia GH/PRL/SL

Estas hormonas se expresan principalmente en la hipófisis, sin embargo, cada hormona se expresa en diferentes tipos celulares. Así, la GH se expresa específicamente en los somatotrofos, una subclase de células acidofilicas que son las más abundantes de la hipófisis y que se localizan en la pars distalis ventral de la glándula. La PRL es secretada por los lactotrofos, que son células acidofilicas de la pars ditalis proximal, mientras que la SL se produce en unas células que se encuentran en la pars intermedia de la hipófisis (Figura 1), las cuales son positivas para la tinción de PAS en la mayoría de los peces, excepto en los salmónidos (Kaneco y cols.,1996). A este respecto existen diversos trabajos realizados en peces en los cuales se reporta la expresión de GH, PRL y SL en tejidos extrapituitarios; por ejemplo la GH se ha detectado en cerebro, corazón, branquias e hígado, entre otros. Además, estos estudios revelaron que las tres hormonas presentan expresión en larvas en la etapa de organogénesis (Yang y cols.,1999).

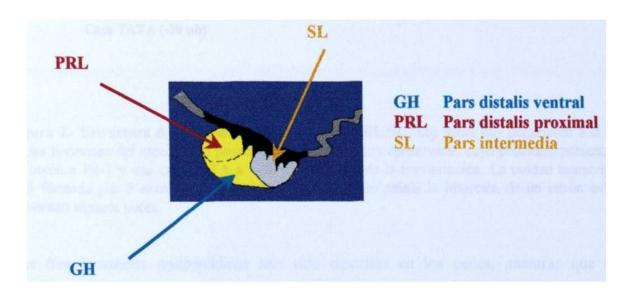


Figura-1.-Localización de las células productoras de GH, PRL y SL en la hipófisis. La GH es producida en la pars distalis, la PRL en la pars ditalis proximal y la SL en la pars intermedia de la hipófisis de los peces.

1.2.2 Estructura génica de las GHs, PRLs y SLs

Los genes de las hormonas que pertenecen a esta familia poseen una estructura que se ha conservado a lo largo de la evolución. Tienen como particularidad el estar formados por un promotor que posee sitios de unión a Pit 1, el cual es un factor transcripcional específico de tejido (Ingraham y cols., 1998). Pit 1 es el responsable de la expresión de estos genes en la hipófisis. La unidad transcripcional de los genes de GH, PRL y SL posee 5 exones y 4 intrones (Figura 2), a excepción de algunos peces como la tilapia y el salmón, en los que un quinto intrón se introdujo en el exón 5 y dio lugar a la formación de un sexto exón (Agellon y cols., 1988, Takayama y cols., 1991, Swennen y cols., 1992).

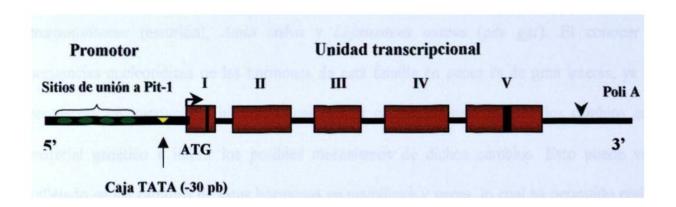


Figura 2.- Estructura de los genes de la familia GH/PRL/SL. Los genes que pertenecen a la familia de las hormonas del crecimiento poseen una estructura muy conservada, cuyo promotor presenta sitios de unión a Pit-1 y una caja TATA a -30 pb del inicio de la transcripción. La unidad transcripcional está formada por 5 exones y 4 intrones, en el exón V se señala la inserción de un intrón extra que presentan algunos peces.

Las tres hormonas polipeptídicas han sido descritas en los peces, mientras que en los mamíferos únicamente se han detectado la GH y la PRL, pero no se descarta la posibilidad de que exista la SL.

En la actualidad se han clonado los genes de esta familia en una gran cantidad de peces (Tabla 1), siendo los mas estudiados los de las GHs de aquellos peces que son de interés para la acuacultura, ya que las GHs recombinantes han sido utilizadas con éxito en las granjas de peces (Zhu y Sun, 2000, de la Fuente y cols., 1999, Jeh y cols., 1998). Es importante hacer notar que la mayoría de los peces en los que se han estudiado estas hormonas, pertenecen a la familia de los teleósteos (peces óseos modernos), contrastando con la minoría (7%), los cuales pertenecen a familias como la de los Lepisosteidae, Amiiformes, Acipenseridae y Torpedinoidei. Estas últimas presentan un gran valor para estudios filogenéticos, va que son peces ancestrales. En la actualidad se cuenta tan solo con la identificación de hormonas de esta familia en tres peces pertenecientes a estas familias, los cuales son, el Acipenser transmontanus (esturión), Amia calva y Lepisosteus osseus (pez gar). El conocer las secuencias nucleotídicas de las hormonas de esta familia en peces es de gran interés, ya que representa un instrumento invaluable para hacer comparaciones, analizar los cambios en el material genético e inferir los posibles mecanismos de dichos cambios. Esto puede verse reflejado en los estudios de estas hormonas en mamíferos y peces, lo cual ha permitido realizar estudios de filogenia molecular y aclarar ciertos mecanismos evolutivos (Bernardi y cols., 1993; Argenton y cols., 1993; Wallis, 1996, 2000).

Tabla 1.- Número de reportes de secuencias nucleotídicas de la familia GH/PRL/SL.

Hormona	Especies de peces en las que se	han reportado secuencias nucleotídicas de
	GHs, PRLs, y SLs.	
	Teleósteos	No teleósteos
GH	73	4
PRL	15	1
SL	13	2

En varias especies de peces se han encontrado dos genes que codifican para GHs y/o dos genes que codifican para PRLs. En algunas especies estos genes son altamente similares en su estructura y codifican para una misma proteína (Yasuda y cols., 1992), mientras que en otros peces se generan dos proteínas que pudieran tener diferente función (Auperin y cols., 1994).

1.2.3 Evolución de la familia

Estas proteínas por la semejanza que presentan en su secuencia y estructura, fueron agrupadas en una misma familia. Se supone que los genes aparecieron por duplicación de una secuencia ancestral con mayor similitud a la prolactina (Niall, 1971) (Figura 3). Por otra parte, Takayama y cols (1991) sugirieron que también participó un intercambio de exones independientes y de una secuencia reguladora en la divergencia de los tres genes. Las hormonas más estudiadas de esta familia desde el punto de vista evolutivo son las GHs y las PRLs, en contraste las SLs ha sido poco estudiadas por ser las más recientemente caracterizadas y por que solo han sido encontradas en algunas especies de peces.

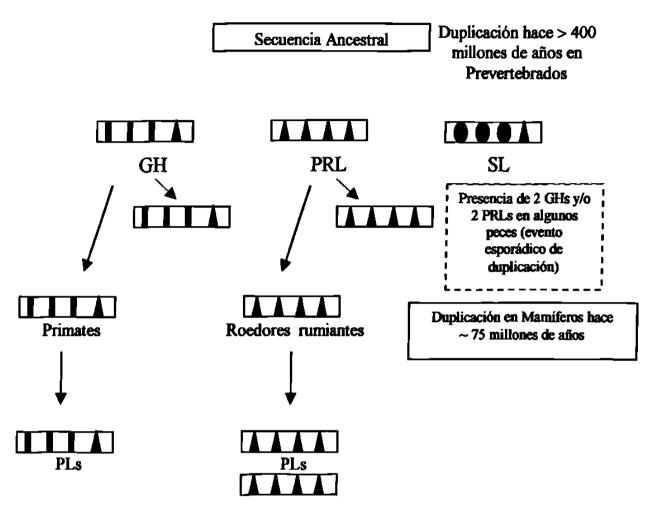
Se estima que la divergencia de la PRL y la GH del gen ancestral ocurrió hace más de 400 millones de años, lo que concuerda con la presencia tanto de PRLs como de GHs en los peces primitivos (Niall y cols., 1971). La evolución de las PRLs y de las GHs es muy semejante, con una estructura fuertemente conservada y con períodos de cambios rápidos que parecen

asociarse más a cambios sutiles que a cambios marcados en la función, ya que ésta quedó globalmente conservada, sobre todo en el caso de la GH.

Aunque la evolución de estas dos hormonas es muy semejante, los estudios moleculares indican que las PRLs presentan en promedio una velocidad de cambio más lenta que la de las GHs (Wallis, 2000).

Los genes de las GHs parecen variar más en peces que en mamíferos (Treviño, 1999), incluyendo su estructura, ya que en la trucha, salmón y tilapia, están formados por 6 exones y 4 intrones.

La familia se expandió nuevamente en los mamíferos y se originaron los lactógenos placentarios. Los lactógenos placentarios (PLs) son hormonas que pertenecen también a esta familia y son secretados preferencialmente en la placenta. La clonación de diferentes genes de PLs indica que en el orden de los primates surgieron a partir del gen de la GH, mientras que los PLs de otros órdenes surgieron del gen de la PRL (Figura 3).



Proteínas placentarias relacionadas a Prolactina

Figura 3.- Evolución de la familia GH/PRL/SL. En el esquema se representan los eventos de duplicación que ocurrieron a lo largo de la evolución para generar esta familia de genes.

1.2.4 GHs

Las hormonas del crecimiento son polipéptidos de cadena sencilla de aproximadamente 22 kDa. La hormona madura típica consta de aproximadamente 190 aminoácidos.

Las GHs son esenciales para el crecimiento embrionario postnatal, así como para el metabolismo normal de carbohidratos, lípidos, nitrógeno y minerales de los vertebrados. Sus efectos relacionados con el crecimiento, son mediados primariamente por la somatomedina, llamada factor de crecimiento I semejante a la insulina (IGF-I) (Mullis y cols., 1991).

Se han realizado esfuerzos por entender la filogenia molecular de las GHs, enfocándose más a la caracterización de éstas en mamíferos y teleósteos, ya sea por el análisis de la secuencia primaria de aminoácidos o de nucleótidos (obtenidas gracias a la tecnología del DNA recombinante). Para identificar tendencias o cambios de la secuencia primaria de las GHs, es indispensable obtener sus secuencias en un amplio número de especies. En la actualidad, a pesar de haber sido clonadas las secuencias de genes de GHs en algunos peces, se carece de un gen ancestral que permita servir como referencia para reconstruir las relaciones entre mamíferos y teleósteos, de aquí que la reconstrucción de los árboles filogenéticos se haya llevado a cabo de manera insatisfactoria.

La conservación de la GH en peces del mismo orden varía de un 82 a un 100% de similitud, mientras que entre órdenes varía de un 49 a un 68% y en peces y tetrápodos puede llegar a variar de un 37 a un 58% (Chang y cols., 1992).

Estudios recientes enfocados en un fragmento del intrón 4a de la GH indican que en los peces mas ancestrales (*Amia calva*, *Lepisosteus osseus*, *Acipenser sp*), este fragmento del intrón no está presente, a diferencia de los peces más evolucionados, lo cual parece representar un parteaguas en la evolución de la GH en estos vertebrados (Venkatesh y cols, 1999).

1.2.5 PRLs

Las Prolactinas constituyen el segundo miembro de la familia. Son hormonas proteínicas que poseen una masa molecular de aproximadamente 23 kDa y una estructura muy semejante a la de las GHs. Las PRLs se encuentran en todos los vertebrados, desde los peces más primitivos hasta los mamíferos más evolucionados. Diferentes trabajos experimentales indican que las PRLs son unas de las hormonas más variables en su función, según la especie de que se trate (Narnaware y cols., 1998, Kelly y cols., 1999), están involucradas en fenómenos como la lactación, reproducción, osmoregulación e inmunomodulación. En varias especies de vertebrados las PRLs tienen acción sobre diferentes órganos blanco. Así, por ejemplo en hembras de mamíferos estimulan el crecimiento de las glándulas mamarias y la lactación (Sandrina y cols., 1999), igualmente, estimulan la producción de progesterona; mientras que en los peces pueden provocar un ligero cambio de color actuando sobre las células pigmentadas; y dentro de sus principales funciones destaca la de osmorregulación (Baccari y cols., 1996, Kelly y cols., 1999).

Actualmente, las secuencias para las PRLs en diferentes especies de mamíferos han permitido la formulación de árboles filogenéticos mas confiables, lo cual no ocurre con los peces, para los cuales aún son pocas las secuencias que se han reportado (Wallis., 2000). Por tal motivo, el aumentar el número de secuencias para la PRL en peces contribuiría a aclarar la relación que tienen estas hormonas con las GHs y las SLs y permitiendo a su vez un acercamiento más estrecho a la secuencia ancestral.

1.2.6 SLs

Las SLs son hormonas pituitarias recientemente caracterizadas que pertenecen a la familia de la GH, el nombre de la Somatolactina proviene de la unión de los nombres de somatostatina y prolactina. Su DNAc fue reportado por primera vez en 1990 en una librería de DNAc de hipófisis del pez platija (Ono v cols., 1990). Por su similitud estructural con las GHs v las PRLs, se le agrupó dentro de esta familia de genes. El tamaño de esta hormona puede variar de 24.5 a 28 kDa. A diferencia de las GHs que se encuentran en forma no glicosilada, las SLs, al igual que las PRLs, se pueden encontrar en forma glicosilada y no glicosilada, dependiendo de la especie. Una particularidad de la mayoría de los teleósteos es que poseen SLs glicosiladas. Las características moleculares y bioquímicas de estas hormonas se han estado esclareciendo. pero su función fisiológica aún no es bien conocida. Se han sugerido diversas funciones fisiológicas para las SLs incluyendo su participación en maduración sexual, regulación de calcio, respuesta al estrés, regulación acido-base, metabolismo de las grasas y adaptación a los cambios de salinidad (Kaneko T, 1996). Aunque se carece de evidencia directa de las funciones de esta hormona, la regulación ácido-base parece ser la más probable (Kaneko T, 1996). Estas evidencia ponen de manifiesto la necesidad de más estudios para conocer las funciones que estas hormonas desempeñan, aunque lo más probable es que se trate de hormonas multifuncionales, las cuales están involucradas en diferentes eventos biológicos bajo condiciones fisiológicas diferentes.

Las SLs han sido reportadas en diferentes grupos de peces y en un anfibio, pero no en otra clase de vertebrados (Kaneko y cols., 1996), aunque no se descarta la posibilidad de que esté presente en otras especies.

Hasta 1999, esta hormona había sido identificada solo en peces teleósteos y se postuló que las

SLs solo estaban presentes en este tipo de peces, pero su aislamiento en el esturión blanco y en un pez pulmonado, demostró que las SLs se encuentran presentes en diferentes lineages de vertebrados tales como los Actinopterigios y los Sarcopterigios. Algunos de los peces en los que se han descrito las SLs son: el pez dorado (Astola y cols., 1996), anguila (May y cols., 1997), trucha (Yang y cols., 1997), salmón (Rand-Weaver y cols., 1991), lenguado (Pendon y cols., 1994), esturión (Amemya y cols., 1999) y en algunos peces pulmonados (May y cols., 1999). De aquí se desprende que la SL se encuentra conservada desde los peces más ancestrales, como el esturión, hasta los más evolucionados.

La conservación de las SLs en las diferentes especies de peces va desde un 52 a un 91 % y si se comparan las secuencias de las SLs de peces con la secuencia de SL del anfibio *Bufo* marinus, la similitud varía del 41 al 63 %.

1.3 El Catán (Atractosteus spatula)

1.3.1 Características físicas

El catán (Atractosteus spatula) es uno de los peces más distintivos de agua dulce, es el más grande de los peces lepisosteidos, pudiendo llegar a pesar hasta 136 Kg. Este pez presenta una cabeza muy parecida a la de un cocodrilo, de donde deriva su nombre en inglés "Alligator gar". Se caracteriza por un crecimiento sumamente importante, lo que les permite alcanzar una talla de 80 cm/año, y los adultos pueden llegar a medir hasta 3 metros de largo, aunque el tamaño promedio de los adultos en condiciones de cautiverio es de alrededor de dos metros (Figura 4). El cuerpo es largo, delgado, de color oliva o café verdoso (raramente negro) en la parte superior, mientras que su abdomen es de color amarillo o blanco. Ocasionalmente, se observan manchas con pigmento café en el pedúnculo caudal y las aletas, particularmente en

especimenes pequeños. Los huesos superiores del cráneo tienen pequeños tubérculos redondos cubiertos de esmalte. Posee aletas sin espinas, fosas nasales en la punta de la nariz que le permite respirar aire atmosférico y dos hileras de dientes de cada lado. Además, los adultos poseen colmillos dermopalatinos lo cual los dota de un equipo masticatorio ideal para una alimentación omnívora (http://www.fcn.state.fl.us/gfc/fishing/Fishes/gar.html). Esta especie se alimenta mayormente de peces y cangrejos, pero algunas veces de pájaros o incluso deshechos que se encuentren en la superficie del agua. El cuerpo del catán está completamente revestido de escamas romboideas únicas en la especie (Figura 5). Una de las características importantes en este pez es que posee una vejiga natatoria muy vascularizada que le permite respirar aire atmosférico por medio de la faringe, pudiendo sobrevivir durante horas fuera del agua. El catán puede diferenciarse el resto de las especies de lepisosteidos por sus dos filas de dientes la mandibula superior, hocico ancho tamaño en su corto su gran (http://www.arch.dcr.state.nc.us/subsist/zooarch.htm).



Figura 4.- Tamaño del Catán. En esta foto podemos observar el tamaño tan importante que alcanzan unos individuos. Este espécimen mide 3 metros de longitud.

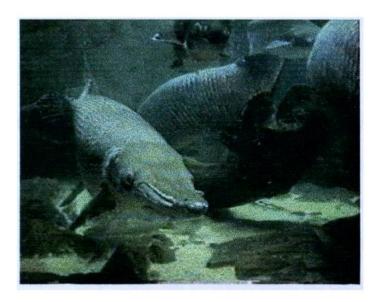


Figura 5.- Características del catán. En esta imagen del catán se observan sus principales características fisicas, su cuerpo largo y delgado, su cabeza semejante a la de un cocodrilo y su hocico ancho, entre otras.

1.3.2 Distribución

El catán es un pez que habita en ríos de agua dulce o lagos, aunque se llega a encontrar en aguas salobres, e incluso es capaz de sobrevivir largos períodos en agua marina; de hecho existen reportes de acuarios en los que se menciona que algunos catanes que han sobrevivido en estanques de agua salada por tiempo indefinido.

Generalmente vive en lugares de aguas abiertas y prefiere los hábitats grandes con aguas profundas y con frecuencia se le encuentra en la superficie del agua. La localización del catán se restringe a la vertiente del Golfo de México y específicamente, en el estado de Tamaulipas, aunque esporádicamente puede ser encontrado en algunos ríos de Tabasco y San Luis Potosí (Mendoza y cols, 1999). En México, se encuentra en el estado de Veracruz una especie cercana al catán, el pegelagarto (*Atractosteus tropicus*), el cual se distingue del catán por poseer un hocico mas ancho con una sola hilera de dientes a cada lado, es mas pequeño en tamaño y comúnmente tiene el dorso moteado (Mendoza y cols, 1999).

1.3.3 Filogenia

Es común que a esta especie se le asigne el género Lepisosteus. No obstante, Skuttus en 1963 lo reconoció como un Atractosteus, el cual actualmente es un subgénero de Lepisosteus. Por otra parte, Wiley, basado en la presencia de un Lepisosteido, Atractosteus strausi, consideró que la separación de los dos géneros (Atractosteus y Lepisosteus) había ocurrido en el inicio o a mitad del Cretácico, antes de la separación del rompimiento del continente Pangea. Debido a lo antiguo de la divergencia, él concluyó que Atractosteus debería desaparecer de la sinonimia de Lepisosteus, en la cual se le había colocado originalmente. Se emitió la hipótesis de que ambos géneros datan de hace 180 millones de años (Wiley, op.cit).

En la actualidad se reconocen siete especies de Lepisosteidos como los únicos representantes vivientes de estos dos géneros, las cuales se encuentran restringidas a ciertas zonas del Norte de México, Centro América y el Caribe.

Cuatro especies se encuentran en el género Lepisosteus:

- L. osseus
- L. platyrhinchus
- L. platostomus
- L. oculatus

Y tres en el género Atractosteus:

- A. spatula
- A. tropicus
- A. tristoechus

Ambos géneros pertenecen a la familia Lepisosteidae.

1.3.4 El catán, una especie en peligro de extinción

El catán es muy apreciado por su carne y los estados de Nuevo León y Tamaulipas cuentan con un comercio bien establecido, además el catán es considerado un trofeo de pesca debido a su gran tamaño y a lo dificil que resulta ser su captura (Mendoza y cols, 1999).

En la actualidad no existen normas que regulen su captura, lo cual ha ocasionado una disminución alarmante en el número de ejemplares. En algunos ríos de Estados Unidos este pez ha desaparecido y en otros se le encuentra muy escasamente, esto parece deberse a la canalización de grandes ríos y la eliminación de las aguas tranquilas preferidas por el catán. Una de las ventajas que presenta el catán sobre otras especies es su capacidad de sobrevivir a

cambios de salinidad, lo que le permite emigrar hacia otros lugares buscando aguas tranquilas.

Es importante señalar la gran importancia de esta especie, debido a su valor faunístico, por ser endémica, por encontrarse en peligro de extinción y principalmente por su valor científico, por tratarse de organismos pancrónicos, de aquí se deriva la importancia de buscar medidas

1.4 Justificación del Trabajo

eficaces para su conservación y aprovechamiento.

Hasta la fecha, las tres secuencias de las hormonas de la familia GH/PRL/SL no han sido reportadas para una misma especie primitiva; además son escasos los conocimientos sobre los mecanismos que se llevaron a cabo para formar la familia génica y sobre la supuesta secuencia ancestral.

De esta manera, el estudio molecular de la familia GH/PRL/SL en una especie pancrónica como *Atractosteus Spatula* (catán) permitiría contribuir a aclarar las relaciones filogenéticas entre estas proteínas, así como inferir sobre los mecanismos moleculares que se llevaron a cabo para formar esta familia de genes. Adicionalmente la obtención de la secuencia de la hormona del crecimiento en un pez ancestral, aportaría datos relevantes para realizar comparaciones nucleotídicas y aproximarse más al gen ancestral.

Finalmente, el reporte de las secuencias de hormonas que presentan un papel fisiológico clave en una especie en peligro de extinción como el catán permitiría complementar los estudios biológicos y fisiológicos que se han venido efectuando sobre este pez y contribuyendo al rescate de la especie.

CAPITULO II

OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GENERAL

Estudiar los genes de la familia GH/PRL/SL en el catán.

2.20BJETIVOS ESPECÍFICOS

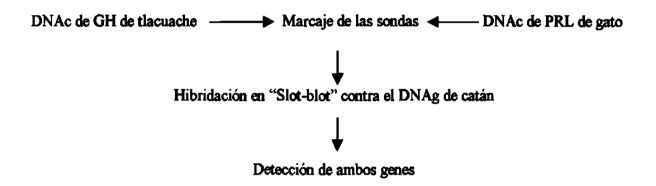
- 2.2.1.- Investigar la presencia en el genoma del catán de los genes de GH y PRL.
- 2.2.2.- Partiendo de las secuencias conocidas de los DNAcs de GH, PRL y SL en peces, diseñar iniciadores consenso para el gen de la GH del catán.
- 2.2.3.- Obtener la secuencia del DNAc de la GH del catán.
 - 2.2.3-1 Amplificar por RT-PCR el DNAc.
 - 2.2.3-2 Clonar y secuenciar el producto amplificado.
- 2.2.4.- Analizar y comparar las secuencias obtenidas con las presentes en el GenBank.

CAPITULO III

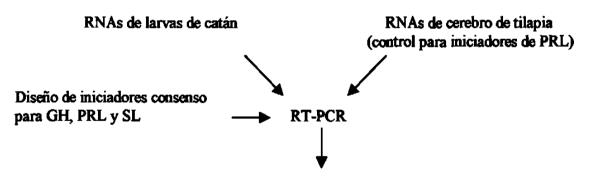
Estrategia General

La estrategia general comprendió las siguientes etapas:

1. Identificación de los genes de GH y PRL en el DNAg del catán.



2. Obtención de los DNAcs de la familia GH/PRL/SL del catán



Clonación y/o secuenciación de los PA

3. Análisis de las secuencias y reconstrucción de los árboles filogenéticos.

Comparaciones de las secuencias nucleotídicas y formulación de árboles filogenéticos a través del programa Phylip

CAPITULO IV MATERIAL Y MÉTODOS

4.1 Material

4.1 1 Origen de los reactivos

Los reactivos utilizados para realizar la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) fueron obtenidos de las siguientes casas comerciales: la enzima DNA polimerasa Taq y el MgCl₂ de Promega Corporation (Madison,Wi, EUA) y los dNTPs de GIBCO-BRL (Gaithersburg, MD, EUA,). Los reactivos para la RT-PCR y las enzimas de restricción y de modificación que se utilizaron fueron de GIBCO.BRL y de New England Biolabs (Beverly, MA, EUA). Las enzimas RNAsa y Proteinasa K provinieron de SIGMA (St.Louis, MO, EUA).

La extracción de RNA total a partir de tejido se realizó con el estuche comercial "Totally RNA Extraction Kit" de la compañía Ambion, Inc. (Austin, Tx, EUA). El RNAsin (Inhibidor de la RNAsa) utilizado para la conservación del RNA fue adquirido de la casa comercial Promega.

Para la eliminación del DNA contaminante de las muestras de RNA se utilizó el estuche comercial de QIAGEN: RNA/DNA kit con las columnas QIAGEN-tip 20 (Valencia, CA, EUA).

Par la realización de las hibridaciones se utilizaron membranas de nylon de Amersham International (Buckinghamshire,UK). El marcaje de las sondas se realizó con el estuche comercial "Rad labelling system" de GIBCO-BRL.

La secuenciación se llevó a cabo con el estuche comercial "Amplicycle Sequencing Kit" de Perkin Elmer. Los nucleótidos radiactivos utilizados se obtuvieron de Amersham International, mientras que los oligonucleótidos utilizados fueron sintetizados por la compañía GIBCO-BRL.

4.1.2 Material Biológico

Para la realización de las clonaciones se utilizaron plásmidos pBlue-Script (pBS-SK+) y las cepas de *E. coli* XL1-Blue y Top 10 de la colección de plásmidos y cepas de la ULIEG, respectivamente.

Las muestras de los diferentes tejidos de catán, pegelagarto, tilapia y tiburón, así como las larvas de catán fueron proporcionadas por el Grupo de Ecofisiología de la Facultad de Biología de la UANL. Todas las muestras se almacenaron a -70°C o en nitrógeno líquido.

4.2 Equipo

Para la realización de este trabajo se utilizó el siguiente equipo: un horno de microondas LG modelo MS-70IC, microcentrífugas Eppendorf modelos 5402 y 5415, fuentes de poder ISCO 494 (ISCO, Nebraska, EUA), EC 600 (E-C Aparatus Corporation, St. Petersburg, Florida) y BRL 250 (Gibco-BRL), una centrífuga Beckman allegraTM 21R, modelo 367570, un agitador de tubos Barnstead Termolyne modelo Maxi Mix (Bubuque, IOWA, EUA), una placa agitadora con control de temperatura marca Corning modelo PC320 (N.Y., EUA), un secuenciador automático GX100 (Genomyx, California, EUA), un secuenciador automático dNA sequencer Long Reader 4200 (LI-COR,

California, EUA), un congelador So-Low Enviromental (Cincinnati, Ohio, EUA), un secador de geles (Labconco, Ca, EUA), un termomixer 5436 (Eppendorf), un baño de agua 188 (Precision, Chicago, EUA), una placa de agitación modelo 3520, una incubadora Shell Lab modelo 1525, un baño de agua giratorio (New Brunswick Scientific Co, inc. Edison, N.J. USA), una campana de luz ultravioleta modelo p-036-02 (CBS Scientific Co), una balanza analítica marca OHAUS modelo AP110S, una balanza granataria OHAUS modelo TS4KD (Camibb, Göttingen, Alemania), un horno con vacío (Precision Scientific Group, Chicago, EUA), una incubadora de hibridación modelo 310 (Robbins Scientific Co. Sunnyvale, Ca, EUA).

El seguimiento del crecimiento bacteriano se realizó con un espectofotómetro de la marca Beckman modelo DU-70 (Scientific Instruments División Fullerton, CA, EUA).

Los reactivos se almacenaron en un congelador marca TorRey (Mty, Mex). Los termocicladores utilizados fueron de los modelos de MJ Research PT 150 y PT100 (Watertown, Mass, EUA), el Perkin-Elmer 2400, Hybaid PCR Express y el RoboCycler 96 (Stratagene, La Jolla, Ca. EUA).

El procesamiento de los datos se realizó en computadoras IBM modelos G42.

Los procesadores de texto utilizados fueron: *Microsoft Word* Versión 200(© 1983-1999 Microsoft Corparation), procesadores de gráficos *Microsoft Power Point* Versión 2000 (© 1983-1999 Microsoft Corparation), *Adobe Photoshop Limited Edition* 2.5.1 (© 1989-1993 Adobe Systems Incorporated) y *UMAX Scan* (© 1990-1991 UMAX Scanner Driver, Impact Research Inc).

Los programas de análisis en Biología Molecular utilizados fueron: Amplify Versión

1.2b (Bill Engels © 1992 University of Wisconsin Genetics M. Madison, WI, EUA),

DNA Strider TM 1.1 (© Ch. Merck and C.E.A 1989, Service de Biochimie-Département de Biologie- Institut de Recherche Fondamentale-CEA-FRANCE), Clustal W Version 1.5 (Multiple Sequence Alignments) y Phylip (Phylogeny Inference Package, version 3.5c, Department of Genetics, University of Washintong, Seattle, EUA).

Para la cuantificación del DNA y la determinación de los tamaños se utilizó el aparato Gel Doc 1000 de Bio-Rad (Hercules, CA, EUA).

4.3 Métodos:

4.3.1 Obtención y cuantificación del DNA y el RNA

4.3.1.1 Extracción y cuantificación de DNAg de Tejido

Las muestras de músculo de catán, tiburón y pegelagarto y el de placenta humana se procesaron utilizando la técnica descrita por Gross-Bellard y cols (Gross-Bellard y cols., 1974). Los tejidos fueron macerados en un mortero en presencia de nitrógeno líquido, se agregaron 1.2 ml de buffer frío (Tris-HCl a 10 mM y pH=8, NaCl a 100 mM, EDTA a 25 mM pH=8, SDS 0.5% y Proteinasa K a 0.1mg/ml) por cada 100 mg de tejido, se transfirió todo en un tubo Falcon y se colocó en baño de agua a 50°C durante 12 a 18 horas. Después de la incubación, se procedió a realizar una extracción con fenol Sevag (½ volúmen de fenol: ½ volúmen de Sevag, el cual consiste de cloroformo y alcohol isoamílico 24:1), se agitó vigorosamente en el vórtex y se centrífugo a 17000g durante 10 min (9000 rpm durante 15 min). Si las fases no se separaban bien, se agregaba otro volumen de buffer sin proteinasa K y se repetía la centrifugación. Se recuperó la fase acuosa, el DNA se precipitó con ½ volumen de acetato de amonio 7.5M y 2 volúmenes de etanol al 100%, luego se centrifugó a 9000 rpm por 15 min y la pastilla se lavó con

etanol al 70%. La pastilla se dejó secar al aire y se resuspendió en agua mili Q. El RNA residual se eliminó agregando SDS a una concentración final del 0.1% y 1μg/ml de RNAsa, e incubando 1 hora a 37°C. Se realizó nuevamente una extracción fenol:sevag como la antes descrita, se precipitó el DNA con ½ volumen de acetato de amonio 7.5 M y 2 volúmenes de etanol al 100%, se lavó la pastilla, se secó y se resupendió en agua mili Q.

El DNAg obtenido se cuantificó por espectrofotometría, mezclándose de cada muestra de DNA 1 µl con 999 µl de agua mili Q, se utilizó agua mili Q como blanco y se midió la absorbancia a 260 nm. La fórmula que se utilizó para calcular la concentración de los DNAs fue la siguiente:

Concentración de DNAg (ng/µl)= (factor de dilución)(50)(DO 260nm)

4.3.1.2 Extracción y cuantificación de RNA total

Las extracciones de los RNAs de hipófisis de pegelagarto y catán, de las cabezas de las larvas de catán y de las cabezas de juveniles de tilapia se realizaron con el estuche comercial de Ambión. En el caso de cabezas de tilapia, se trabajó con tejido fresco, a diferencia de todos los demás tejidos que estuvieron conservados en nitrógeno líquido o a -70°C antes de realizar la extracción. El tejido se homogenizó en 10 volúmenes de la solución de desnaturalización, se transfirió a un tubo nuevo y se midió el volumen inicial (Vi), se adicionó 1/10 del Vi de la solución de acetato de sodio 3M y se mezcló por inversión. Enseguida se agregó un Vi de fenol/CHCl₃ (Solución 1), se agitó vigorosamente durante 1 min en el vórtex, se almacenó en hielo durante 5 min y se

centrifugó 5 min a 12000 rpm. Se transfirió el sobrenadante a un tubo nuevo, se agregó un Vi de fenol/CHCl₃ (Solución 2), se agitó vigorosamente por 1 min en el vórtex y se colocó en hielo durante 5 min. Después de una centrifugación de 5 min a 12000 rpm, se transfirió la fase acuosa a un tubo libre de RNAsa, se agregó un volumen de isopropanol, mezclando bien. Se dejó precipitando a -70°C durante 30 min y se centrifugó por 15 min a 12000 rpm. Una vez eliminado el sobrenadante, la pastilla se lavó con etanol al 70%, se repitió la última centrifugación y la pastilla se dejó secar al aire libre durante aproximadamente 10 min, antes de resuspenderse en agua libre de RNAsa.

El DNA contaminante se eliminó por medio de columnas del estuche comercial de QIAGEN RNA/DNA, siguiendo el protocolo del proveedor.

Los RNAs se conservaron en agua con DEPC estéril, RNAsin (1U/μl) y DTT (5mM) a -70°C.

Mediante el programa computacional *Molecular Analyst* del Gel Doc se pudo cuantificar el RNA por la intensidad de fluorescencia de las bandas teñidas con bromuro de etidio. Este compuesto se intercala entre las bases del RNA y emite una fluorescencia al ser excitado por la luz ultravioleta. La fluorescencia emitida es proporcional a la cantidad de bromuro de etidio que se intercala, dependiendo así de la cantidad de RNA. Se realizó una curva de calibración de diferentes concentraciones de RNA y de esta manera se determinó la concentración del RNA de larvas de catán y de tilapia.

4.3.1.3 Análisis electroforético del DNA y RNA

Las muestras de DNA se corrieron en un gel de agarosa al 0.8%. La electroforesis se realizó a 100 V y las bandas se visualizaron tiñendo el gel en una solución de bromuro de etidio a 2 μg/ml. El gel se colocó en el Gel Doc para ser analizado y observar la calidad del DNA.

Para observar la calidad del RNA extraído, las muestras se corrieron en un gel desnaturalizante preparado con 50 ml de agarosa al 1%, 250 µl de Isotiocianato de guanidina 1 M y 5 µl de Bromuro de etidio 100x.

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

Para la identificación de los genes de la GH y de PRL en catán, tiburón y pegelagarto, se realizaron hibridaciones del DNAg con sondas disponibles en el laboratorio. Para el gen de la GH se utilizó una clona del DNAc de la GH del tlacuache que incluye los exones IV y V (Sifuentes Rincón, 2000), mientras que para la identificación de la PRL se utilizó una clona con el DNAc de la PRL del gato que incluye los exones Π al V (Sifuentes Rincón, 2000).

4.3.2.1 Preparación de la membrana.

Se utilizaron membranas de Nylon Hybond-NX de la Compañía Amersham, las cuales se remojaron durante 1 hora en solución SSC 20X (NaCl 7.6 M, C₆H₅Na₃O₇ 0.3 M, PH =7.0). Se colocó sobre 5 papeles humedecidos con SSC 20X, se montó en el aparato de vacío y cada pozo se lavó 3 veces con SSC 10X. Se desnaturalizaron alícuotas de 10 y 1 µg de cada DNAg de interés (catán, pegelagarto y tiburón) a 95°C durante 5 min.

además de los testigos positivos (PRL de gato y GH de DNAg de humano) y del control negativo (pBS-SK). Se depositaron las muestras y se fijaron al vacío a 80°C durante 2 horas.

4.3.2.2 Marcaje de las sondas

Las sondas fueron marcadas con el estuche comercial RadPrime Labeling System de GIBCO-BRL de la siguiente manera:

Se disolvieron 25 ng de DNA en 10 µl de H₂O miliQ, se desnaturalizaron a 95°C durante 5 min, se colocaron en hielo inmediatamente y se agregaron los siguientes reactivos:

dCTP (500 μM) 1 μl

dGTP (500 μ M) 1 μ l

 $dTTP (500 \mu M)$ 1 μ l

Solución de Random Primers (3 μg/μl) 20 μl

 $[\alpha-^{32}P]dATP$, a 3000 Ci/mmol 5 μ l

Agua destilada 11 μl

Los reactivos se mezclaron y se agregó 1μl del fragmento Klenow de la DNA polimerasa de Escherichia coli (40U/μl), el volumen final fue de 50 μl. La reacción desarrolló durante 2 horas a 37°C y la se detuvo con 5 μl de solución Stop. Una vez marcada la sonda, se purificó por filtración sobre una columna de Sephadex G50 (Sambrook y cols, 1989).

4.3.2.3 Hibridación

La prehibridación se realizó utilizando un volumen de 1ml de solución de hibridación (SSC 6X, reactivo de Denhardt 5X y SDS 0.5%) por cm² de membrana de nylon utilizada, la membrana y la solución se colocaron en un frasco de hibridación y se dejaron agitando a 50°C durante 4 horas, al finalizar se removió la solución y se agregó la solución de hibridación junto con la sonda marcada (GH de tlacuache o PRL de gato). La hibridación se realizó con 0.5 ml de solución de hibridación por cm² de membrana y se dejó agitando toda la noche a 50°C (18 h). Al día siguiente se removió la solución de hibridación y se realizaron los lavados de la membrana; 2 lavados de 15 min con una solución SSC 2X, SDS 0.1% a temperatura ambiente, otros 2 lavados con SSC 1X, SDS 0.1% a temperatura ambiente, otros 2 lavados de 15 min a 50°C con SSC 0.1X, SDS 0.1%. Una vez terminados los lavados, la membrana se sacó del frasco de hibridación, se envolvió en papel Saran Wrap, se colocó en un chasis y se expuso a una película ultrasensible durante 5 días.

4.3.3 Amplificación de las secuencias de GH, PRL y SL

4.3.3.1 Diseño de los iniciadores.

Los iniciadores se diseñaron a partir de secuencias reportadas de los DNAc de las tres hormonas. Las secuencias se obtuvieron del GenBank vía Internet (http://www2.ncbi.nlm.nih.gov/) y fueron alineadas utilizando el programa CLUSTAL W para evidenciar las zonas más conservadas. Para facilitar el diseño de los iniciadores se eligieron las especies de peces que se relacionaran más a los peces primitivos para alinear las secuencias correspondientes. Los iniciadores se diseñaron sobre las regiones

conservadas, y dando preferencia a las secuencias de peces considerados ancestrales. Para el diseño de los iniciadores se utilizaron los programas Oligo 4.0 y Amplify 5.1. Estos programas permitieron controlar los factores como: las temperaturas de alineamiento (Tm), los malos apareamientos, los dímeros entre los pares de iniciadores, entre otros factores. Adicionalmente, la especificidad de los iniciadores se probó con el programa Blast.

4.3.3.2 Reacción de RT.

Los iniciadores diseñados se utilizaron para tratar de amplificar los DNAcs correspondientes a la familia GH, PRL y SL a partir de RNA de cabezas de larvas de catán y de RNA de cabezas de juveniles de tilapia. Este último se utilizó como control positivo para los iniciadores de PRL.

Los DNAcs se sintetizaron a partir de RNA total (RNAt) utilizando hexámeros al hazar. Se utilizaron reactivos de GIBCO-BRL para preparar la reacción mostrada en la Tabla 2.

Tabla 2.- Condiciones para la RT

	Concentración final
RNA de larvas de catán	50ng/μl
(200ng/μl)	
Hexámeros al azar	2.5μΜ
Agua miliQ	cbp12µl

La reacción se incubó 10 min a 70°C, el tubo se centrifugó 3 segundos y se agregaron los siguientes reactivos:

Concentración final
1 X
0.01M
0.5Mm

La reacción se incubó 2 min a 42°C, se agregó 1µl de la enzima SuperScript II (200U/µl), quedando el volumen final de 20 µl y se realizó el siguiente programa: 10 min a 25°C, 50 min a 42°C y 15 min a 70°C.

4.3.3.3 PCR.

Una vez sintetizados los DNAs, las PCRs se realizaron utilizando los oligonucleótidos diseñados, bajo las condiciones descritas en la Tabla 3.

Tabla 3 .- Condiciones estándar para la PCR.

Componentes	Concentración final	
Amortiguador de la reacción	1X	
MgCl ₂ , (25mM)	2 mM	
DNTPs	0.2 mM	
Iniciador 5'	0.15μΜ	
Iniciador 3'	0.15μ M	
DNA polimerasa Taq	0.05U/µl	
Agua miliQ estéril cbp	50µl	

(Volumen final de la reacción = 50 μl)

Después de un paso inicial de desnaturalización a 94°C por 5 min, las amplificaciones se llevaron a cabo durante 40 ciclos. Aunque se utilizó el mismo programa para todas las amplificaciones, la temperatura de alineamiento (Tm) fue específica para cada juego de iniciadores; las temperaturas utilizadas para GH de catán fueron de 55°C para CN1 y CN2 y 52°C para CT5 y CT3; en el caso de PRL la Tm fue de 56°C para PRL1 y PRL2 y para SL se utilizó una Tm de 57°C para SL1 y SL2. Los ciclos consistieron en un primer paso de desnaturalización a 94°C durante 1 min, un segundo paso de apareamiento a la Tm de cada juego de iniciadores durante 1 min y un tercer paso de extensión a 72°C

durante 1 min. Al finalizar los 40 ciclos, se llevó a cabo un paso de extensión a 72°C durante 5 min.

4.3.3.4 Análisis electroforético.

Una vez obtenidos los PA, éstos se analizaron por electroforesis en geles de agarosa al 2%. Los geles prepararon con TBE 0.5X (Tris-borato 0.089 M. ácido bórico 0.089M). El gel solidificado se colocó en una cámara de electroforesis, la cual contenía el mismo buffer. Las muestras se mezclaron con jugo azul 6X (azul de bromofenol al 0.25 %, xilencianol al 0.25 % y glicerol al 30%) y fueron depositadas en el gel. La electroforesis se corrió a 95 V y una vez terminada, el gel se tiñó con bromuro de etidio durante 5 a 10 min, se lavó con agua y se procedió a observarlo en el Gel Doc.

El tamaño de los PA se determinó con el programa Molecular Analyst del Gel Doc, utilizando un marcador de tamaño adecuado.

4.3.3.5 Caracterización de los productos de PCR.

Los PA fueron caracterizados por digestión enzimática. Para los de PRL y SL se tomaron en cuenta las enzimas que tuvieran cortes en zonas conservadas del DNAc de diferentes especies de peces, mientras que en el caso de la GH de catán se tomó como referencia el DNAc del pez *Lepisosteus osseus*, el cual se eligió por pertenecer a la misma familia del catán. Se realizaron cortes con las enzimas *Pst* I y *Bgl* II, siguiendo las instrucciones de la casa comercial (NEB).

4.3.4 Clonación y análisis de los PA

4.3.4.1 Preparación del vector T

La técnica utilizada para la clonación de los PA fue la del vector T (Marchuk y cols, 1990), la cual está basada en la actividad de transferasa terminal independiente del templado de la enzima Taq DNA polimerasa, que permite la adición de un deoxiadenosina monofosfato (A) en los extremos 3' de los productos de PCR. Al vector de clonación se le agregaron residuos de timina en los extremos 3' complementarios a los de adenina de los productos amplificados.

Las clonaciones se realizaron utilizando el vector de clonación pBS-SK de la compañía Stratagene. Par la preparación del vector T se utilizaron 2.5 μg de DNA plasmídico previamente linearizado con la enzima *Eco* RV, que fueron incubados con 1.25 U/μg de la enzima DNA polimerasa Taq, 2 mM de dTTP y 2mM de MgCl₂ en un volumen final de 20μl. La reacción se realizó durante 3 horas a 72°C. Una vez preparado, el vector T se almacenó a -20°C hasta su utilización.

4.3.4.2 Ligación y transformación

Los productos de PCR y el vector T se sometieron a ligación en un volumen final de 25 µl con una relación inserto:vector de 1:3. La reacción se incubó durante toda la noche a 16°C y los 25 µl se utilizaron para transformar 100µl de células Top 10 Ca⁺⁺ competentes.

Para preparar las células competentes se utilizó una modificación del método de Inoue (Inoue y cols, 1990) que se describe a continuación. Se inocularon 4 ml de medio LB (bactotriptona 1%, extracto de levaduras 0.5%', NaCl al 1% y tetraciclina 5 μg/ml), con

100 μl de bacterias de *E. coli* Top 10 y se dejaron crecer toda la noche. Al día siguiente, se inoculó 1 ml del medio LB en 50 ml de medio SOB (bactotriptona 2%, extracto de levadura 0.5%, NaCl 10 mM, KCl 2.5 mM, MgCl₂ 10 mM, Mg SO₄ 10 mM, pH 6.7-7.0) y se dejó crecer a 37°C hasta alcanzar una DO₆₀₀ de 0.4, después se colocó en hielo durante 10 min, el medio se centrifugó a 2500g (5000 rpm) durante 10 minutos a 4°C y las células se resuspendieron gentilmente en 20 ml de CaCl₂ 0.1 M frío. Se colocaron en hielo durante 20 min, después de una centrifugación a 2500 g (5000 rpm) por 10 min a 4°C, se removió el CaCl₂ y las células se resuspendieron gentilmente en 2 ml de CaCl₂. Para transformar se incubaron 100 μl de bacterias con los 25 μl de la reacción de ligación a 4°C por 30 min, se realizó un choque térmico a 42°C por 90 s, se agregaron 900 μl de medio LB a las células y se incubaron (en agitación) a 37°C por 1 h. Las bacterias que recibieron el inserto se seleccionaron por su fenotipo AMP^R, β-gal, siendo las colonias blancas posibles portadoras de los insertos.

4.3.4.3 Extracción del DNA plasmídico

Para seleccionar las clonas portadoras de los insertos se extrajo el DNA plasmídico por el método de lisis alcalina (Sambrook y cols, 1989). Se creció una colonia de bacterias en 3 ml de medio LB + antibiótico (tetraciclina 10 μg/ml) y se mantuvo con agitación vigorosa de 250 rpm durante la noche. Al día siguiente se centrifugaron 1.5 ml del medio de cultivo durante 30 seg a máxima velocidad (14 000 rpm) y se removió el medio del tubo manteniéndolo en hielo. La pastilla resultante se resuspendió en 100 μl de solución I (glucosa 50mM, Tris-Cl 25 mM, pH 8, EDTA 10 mM, pH 8) utilizando el vórtex. Se agregaron 200 μl de solución II (0.2 ml de NaOH 10 N, 1.0 ml de SDS 10% y

8.8 ml de agua) recién preparada (8.8 ml de agua + 0.2 ml de NaOH 10 N + 1 ml de SDS 10%), la solución se mezcló rápidamente por inversión (5 veces), y se incubó 5 min en hielo.

Se agregaron también rápidamente 150μl de solución III fría, el tubo tapado invertido se agitó al vórtex o con la mano rápidamente y se incubó en hielo 5 min. Se centrifugó 5 min a 4 °C y el sobrenadante se transfirió a un tubo nuevo. El DNA plasmídico se extrajo con un volumen de fenol:cloroformo (1:1), aproximadamente 190 μl de cada uno, mezclando al vórtex 1 min. Después de centrifugar 2 min a 4°C, el sobrenadante se transfirió a un tubo nuevo. Se precipitó el DNA plasmídico con 2 volúmenes de etanol (95-100%) a temperatura ambiente, mezclando al vórtex y dejando reposar 2 min. Se centrifugó a 12,000 g por 5 min a 4°C. Se removió completamente el sobrenadante por aspiración y se dejó el tubo invertido sobre una toalla de papel. Se lavó la pastilla con 1 ml de etanol al 70% frío y se centrifugó medio minuto. Se removió el etanol y se dejó secar la pastilla al aire por 10 min. Por último el DNA plasmídico se disolvió en 50 μl de TE con RNAsa pancreática (20 μg/ml).

4.3.4.4 Análisis de las clonas recombinantes

Los DNAs se analizaron por electroforesis en un gel de agarosa al 0.8 %. Las clonas que tuvieron menos desplazamiento que el pBS-SK se cortaron con las enzimas Sac I y Kpn I, para liberar los fragmentos clonados. Los productos de la digestión se corrieron en un gel de agarosa al 1%. Una vez identificados los fragmento por el peso molecular, las clonas se caracterizaron con las enzimas seleccionadas, los fragmentos se observaron en un gel de agarosa al 2%.

4.3.4.5 Determinación de las secuencias nucleotídicas

La secuencia de las clonas resultantes se determinó por secuenciación cíclica con una adaptación de terminación en cadena (Sanger y Nicklen., 1977). Los iniciadores que se utilizaron fueron los primers universales (M13 forward y reverso) que se aparean en el plásmido pBS-SK. La secuenciación enzimática se realizó con el Kit de LiCor. Los fragmentos sintetizados se marcaron al incorporar el análogo marcado con un cromógeno IR y se resolvieron en un gel de acrilamida al 6%- urea 50%, utilizando el secuenciador LiCor DNA 2000.

4.3.4.6 Análisis de las secuencias nucleotídicas

Una vez obtenidas, las secuencias se compararon en Internet mediante el programa BLAST con las secuencia reportadas en el GenBank. Se realizaron también alineamientos utilizando el programa Clustal W. En el caso del catán se construyó un árbol filogenético con la secuencia de la clona de GH comparándola con las secuencias de peces ancestrales utilizando el método de la Máxima Parsimonia, en el programa DNApars (del paquete Phylip).

CAPITULO V

RESULTADOS

5.1.- Extracción de DNAg

Los DNAg se extrajeron de tejido muscular de los diferentes peces y de placenta humana a partir de muestras conservadas a en nitrógeno líquido o a -70°C. Como se puede apreciar en la Figura 6, los DNAg de tiburón y catán presentaron degradación parcial, mientras que los de placenta humana y pegelagarto fueron de buena calidad. Además, en cada preparación se cuantificó el DNA por espectrofotometría. Del tejido de placenta humana se lograron obtener 0.328 mg, de pegelagarto 0.18 mg, del tejido de catán 0.231 mg y de tiburón 0.331 mg.

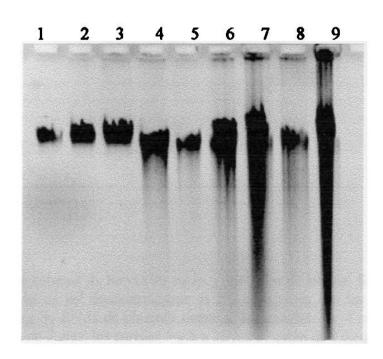


Figura 6.- DNAg de las diferentes especies de peces. Se depositó 1 µl de cada muestra de DNAg en un gel de agarosa al 0.8%. Los carriles 1, 2 y 3 corresponden al DNAg extraído de placenta, los carriles 4 y 5 al DNAg de pegelagarto, los carriles 6 y 7 al DNAg de catán y los carriles 8 y 9 corresponden al DNAg de tiburón.

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

Los RNA totales (RNAt) fueron extraídos de tejidos frescos, de cada muestra se realizaron dos extracciones y los RNAt obtenidos se observaron en geles desnaturalizantes de agarosa. Una vez que se observó la calidad de los RNAs obtenidos, éstos fueron cuantificados por espectrofotometría. De las larvas de catán de 3 días se obtuvieron en promedio 0.1 mg, de las larvas de 7 días 0.15 mg y de las muestras de tilapia 0.11 mg de RNA total. (Figura 7).

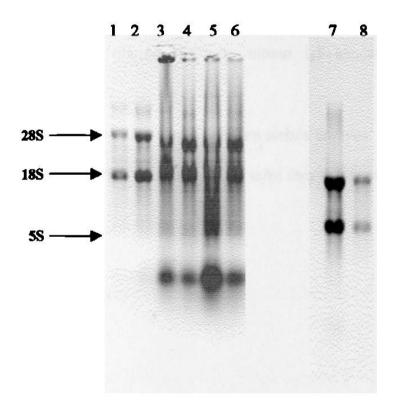


Figura 7.- RNA total de cabezas de larvas de catán y juveniles de tilapia. Se depositó 1 μl de cada muestra de RNAt en un gel desnaturalizante al 1% de agarosa. En los carriles 1 y 2 se depositaron 200 y 500 ng de RNAt de placenta humana, los carriles 3 y 4 corresponden a los RNAs de larvas de catán de 3 días, los carriles 5 y 6 a larvas de catán de 7 días, y los carriles 7 y 8 a RNAs de juveniles de tilapia.

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

Mediante la técnica de hibridación de Slot-Blot se evidenciaron los genes de GH y PRL en el DNAg del catán, pegelagarto y tiburón. En un primer paso se realizó la hibridación con la sonda de GH (DNAc de tlacuache). Una vez obtenida la autorradiografia (Figura 8A), la membrana fue lavada con SDS hirviendo al 1%, se dejó enfriar y se reutilizó para la hibridación con la sonda de PRL (exón III-V del gato)(Figura 8B). En la membrana se lograron observar, con la sonda de GH, manchas radiactivas para los DNAg de catán, pegelagarto y tiburón, así como en el control positivo. Después de la hibridación con la sonda de PRL de gato se obtuvo señal para los DNAg de catán, pegelagarto, humano y tiburón. En este último las bandas se observaron muy débilmente.

Los controles negativos no presentaron señal en ambos ensayos. Los PA de PRL dieron positivo con la sonda de PRL y se observa una señal muy débil con la sonda de GH.

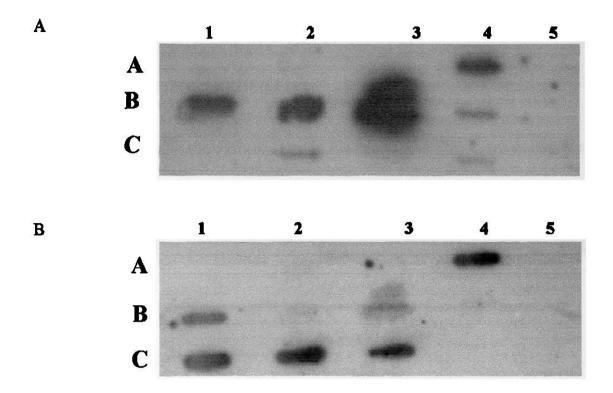


Figura 8.- Hibridaciones en Slot-Blot de los genes de GH y PRL. En la figura A se observan señales de radiactividad con la sonda de GH para los DNAg de catán (B1 y B2), de pegelagarto (B3 y B4) y débilmente para el del tiburón (C4 y C5). En la figura B se muestra el ensayo con la sonda de PRL, se observan señales en catán (B1 y B2), pegelagarto (B3 y B4) y humano (A4). Los carriles C1, C2 y C3 corresponden a 4, 2, y 1 ng de PA de PRL de gato. Como testigos positivo y negativo se utilizaron el DNAg humano (A4) y el plásmido pBS-SK (B5), respectivamente.

5.4 Diseño de los iniciadores

5.4.1 Iniciadores de PRL.

Se realizó la búsqueda de secuencias de PRL en peces y se obtuvieron solamente 13 secuencias reportadas a la fecha. Todas las secuencias pertenecen a los peces óseos evolucionados. Por lo tanto, para el diseño de los iniciadores de PRL se utilizaron secuencias de peces teleósteos (Salmo salar, Anguilla anguilla, Tilapia nilotica y Cyprinus carpio), ya que no se han reportado secuencias nucleotídicas para peces que pertenzcan a la familia del catán. Los iniciadores fueron diseñados sobre zonas

Estudio Molecular de la Familia GH/PRL/SL en el Catán

conservadas de los DNAc en los exones II y V (Figura 9) y fueron los siguientes:

5' GTC AAA CTT CAC TCT CTC AGC 3' PRL1

5' TGT CAA TTT TGT GGG AGT C 3' PRL2

Estos primers amplifican, teóricamente, un fragmento de 480pb en peces teleósteos.

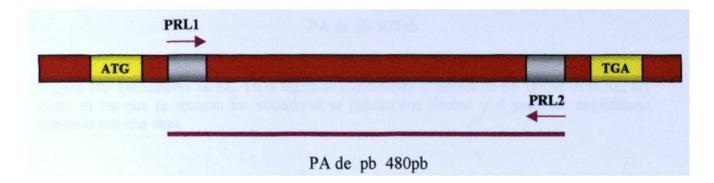


Figura 9.-. Iniciadores de PRL- En la figura se esquematiza la estructura del DNAc de la PRL. Los sitios en los que se aparean los iniciadores se muestran con flechas y el producto amplificado esperado con una linea.

5.4.2 Iniciadores de SL.

En la búsqueda de secuencias de la SL en el GenBank se encontraron 15 secuencias de SL en peces; 14 de ellas pertenecen a peces óseos evolucionados y una a un pez óseo no teleósteo (Acipenser transmontanus). Para diseñar los iniciadores de SL en peces, se alinearon las secuencias de algunos peces teleósteos (Carassius auratus, Anguilla anguilla, Solea seleganensis) y la de un pez no teleósteo ancestral (Acipenser transmontanus). Los iniciadores se diseñaron en zonas conservadas del DNAc de SL en los exones II y V (Figura 10) y fueron los siguientes:

5' GCT CCC TGG AGA AGC TCC TGG 3' SL1

5' TGG GCG TCT TTC CTG AAG CAG 3' SL2

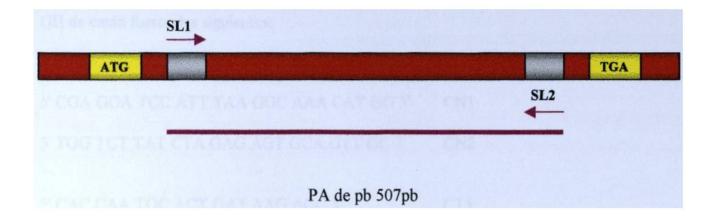


Figura 10.- Iniciadores de SL. En la figura se esquematiza la estructura del DNAc de la SL, los sitios en los que se aparean los iniciadores se indican con flechas y el producto amplificado esperado con una línea.

5.4.3 Iniciadores de GH.

Para realizar el análisis de las secuencias de GHs en peces se realizó la búsqueda en el GenBank y se encontraron 88 secuencias de GHs de peces reportadas a la fecha, de las cuales 84 correspondían a peces óseos evolucionados (teleósteos), una a peces cartilaginosos y 3 a peces óseos no teleósteos (Amia calva, Acipenser transmontanus y Lepisosteus osseus). Al alinear todas las secuencias mediante el programa Clustal W, las regiones conservadas fueron escasas; por lo tanto para el diseño de los iniciadores GH de catán se tomaron en cuenta los peces mas cercanos a este pez (Amia calva, Anguilla anguilla y Lepisosteus osseus), dando preferencia a la secuencia del pez Lepisoteus osseus que pertenece a la misma familia del catán. Se diseñaron dos juegos de oligonucleótidos (Figura 11). El primero (CN1 y CN2) amplifica toda la secuencia codificante, desde el codón de inicio (CN1), hasta el de terminación (CN2) y el segundo (CT5 y CT3) se alinea en zonas más conservadas, del exón II (CT5) y del exón V (CT3) (Figura 9).

Las secuencias de los oligonucleótidos que se diseñaron para amplificar el DNAc de la GH de catán fueron las siguientes:

5' CGA GGA TCC ATT TAA GGC AAA CAT GG 3' CN1
5' TGG TCT TAT CTA GAG AGT GCA GTT GC 3' CN2

5' CAC CAA TGC ACT GAT AAG AGC 3' CT5

5' AAG TCT CCA CTT TGA GCA TGT C 3' CT3

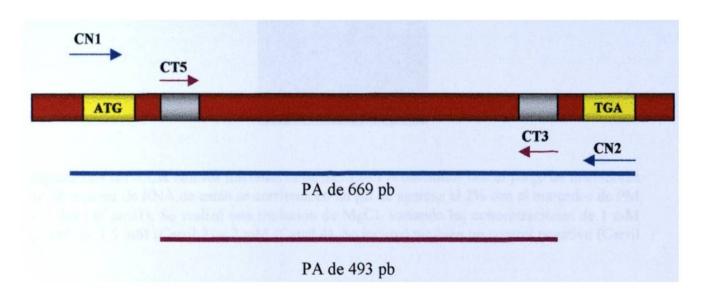


Figura 11.- Iniciadores diseñados para GH en catán. En la figura se esquematiza el DNAc de la GH del catán, se indican con flechas los sitios en los que se aparean los iniciadores y los PA esperados.

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

5.5.1 SL

5.5.1.1 Ensayos de RT-PCR

Una vez sintetizados los DNAcs, se optimizó la reacción de PCR realizando titulaciones de MgCl₂. En el caso del catán, se obtuvieron PA del tamaño esperado (Figura 12), mientras que para la tilapia no se logró obtener ningún PA.

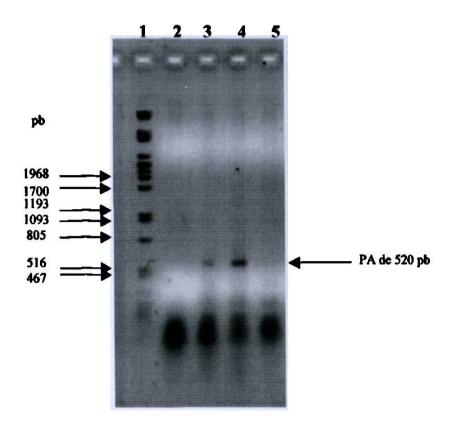


Figura 12.- RT-PCR con los iniciadores de SL. Los PA obtenidos con el juego de iniciadores de SL a partir de RNA de catán se corrieron en un gel de agarosa al 2% con el marcador de PM λ + Pst I (Carril1). Se realizó una titulación de MgCl₂ variando las concentraciones de 1 mM (Carril 2), 1.5 mM (Carril 3) y 2 mM (Carril 4). Se incluyó también un control negativo (Carril 5).

5.5.1.2 Clonación y secuenciación del PA.

Una vez obtenidos los PA de SL, se procedió a su clonación y secuenciación. De las cinco clonas levantadas, cuatro de ellas tuvieron un desplazamiento menor que el pBS-SK. Al cortarlas con las enzimas *Eco* RI y *Hin*d III, tres clonas liberaron un fragmento del tamaño esperado (520 pb) (Figura 13), la última presentó un sitio interno para una de las enzimas y liberó dos fragmentos de menor tamaño. Se secuenció un ejemplar de cada tipo de clona.