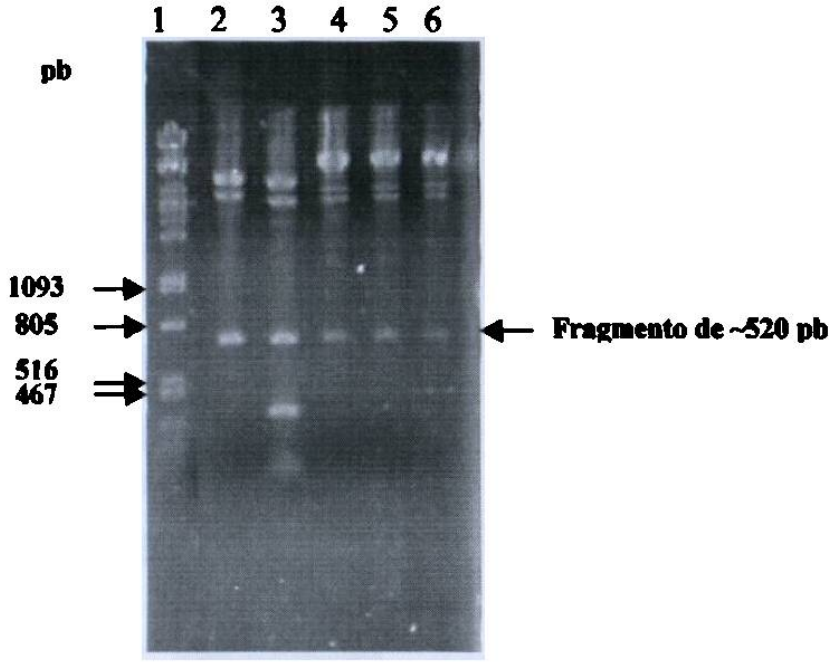

Figura 13.- Clonas candidatas para SL de catán. Las clonas obtenidas a partir de los PA obtenidos con los iniciadores de SL se caracterizaron con las enzimas *Eco* RI y *Hind* III. Los productos de la digestión se analizaron en un gel de agarosa al 0.8%. Tres de las clonas liberaron un fragmento del tamaño esperado (carriles 2, 4, 5 y 6), la clona 2 (carril 3) liberó dos fragmentos. El marcador de PM es λ + *Pst* I (carril 1).

Las secuencias obtenidas se compararon mediante el BLAST con las secuencias reportadas en el GenBank. Ninguna de las dos secuencias correspondió a SL o alguna hormona relacionada con la familia GH/PRL/SL, no se pudieron tampoco relacionar con otra secuencia ya reportada.

5.5.2 PRL

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

Los iniciadores fueron probados con los DNAcs de larvas de catán, utilizando una temperatura de alineamiento de 50°C. Se amplificaron dos bandas, una de ellas que correspondía al tamaño esperado (480 pb) y otra banda más pequeña que se amplificó

débilmente. Los PA del tamaño esperado fueron clonados y secuenciados para verificar que correspondían a PRL (Figura 14).

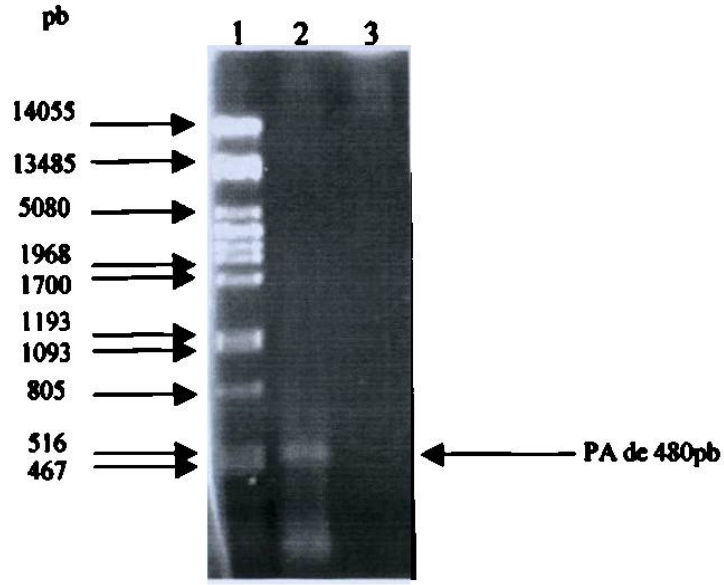

Figura 14.- Productos de amplificación obtenidos por RT-PCR con los primers de PRL (PRL1 y PRL2) en catán. Los PA se obtuvieron utilizando concentraciones de 2 mM de $MgCl_2$ (carril 2), se corrieron en un gel de agrosa al 2%. Se incluyeron en la electroforesis un control negativo de la reacción (carril 3) y el marcador de PM λ + *Pst* I (carril 1).

5.5.2.2 Clonación y secuenciación del PA

Una vez obtenidos los PA en catán, se procedió a clonarlos por medio de la técnica de vector T en el plásmido pBS-SK. Se levantaron 11 colonias y cuatro de ellas liberaron un inserto con las enzimas *Eco* RI y *Hin*d III.

Las cuatro clonas presentaron un inserto del mismo tamaño (593 pb), que era el esperado (Figura 15). Se secuenció la clona 11 (Figura 16A) y la secuencia se mandó comparar mediante el BLAST en el GenBank, los resultados indicaron que la clona no correspondía a PRL, ya que no tenía semejanza con las secuencias de PRLs de otros peces ya reportadas. Como en el caso de la SL, el PA no se pudo relacionar a otra secuencia reportada, como lo indica el reporte del BLAST (Figura 16B).

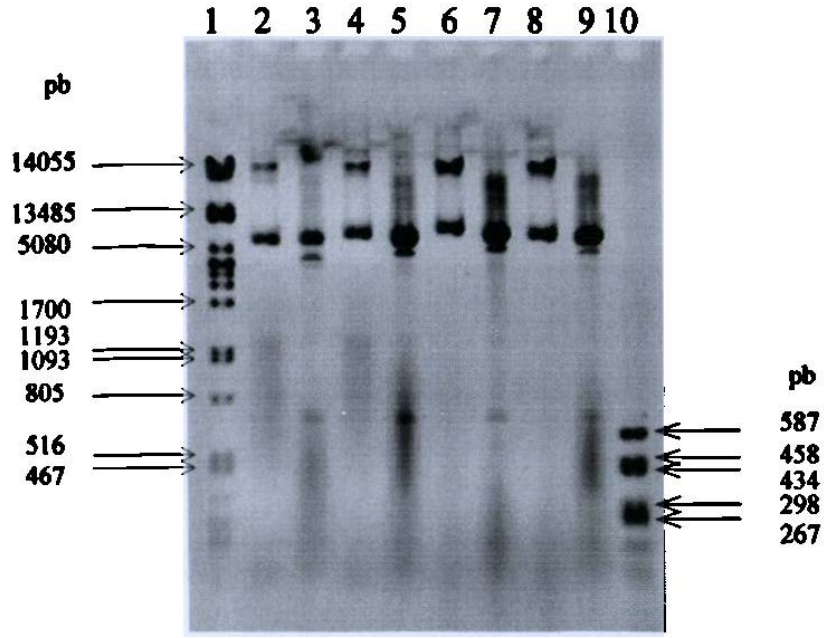

Figura 15.- Clonas candidatas para PRL de catán. En el gel se muestran las clonas 5, 7, 9 y 11 sin digerir (carriles 2, 4, 6 y 8 respectivamente) y digeridas (carriles 3, 5, 7 y 9 respectivamente), se incluyeron también los marcadores de PM λ + *Pst* I (Carril 1) y pUC + *Hae* III (carril 10).

(A)
Secuencia de la Clona 11

gggagacaggatggacggtgttgataaacggctgaatgtgcggtggattgtcgattttcgttataagagtagtaccagt gcagttagtgttccagtctatcttgtgctgactgttgctttgctgatgctgtgcagttgtgctgtacaaggtttatgggtctc aggatgagtccagggccatgaagaaacagtcctgatagtgtcaggaaagatagcgcattgacacattcttcgcaggac agctttggaggtaaacgctgtgcagtgtttttcaagtacagtgacctgctcaccgtaagactgtgttgtgatgctagtcac caatccatctgaaggattatactca

(B)
BLAST

Secuencias que producen alineamientos significativos	(bits)	Valor
gb|AC005237.2|AC005237 Homo sapiens BAC clone RP11-556H17 f...	36	6.0
gb|AC009405.3|AC009405 Homo sapiens BAC clone RP11-175M21 f...	36	6.0
gb|AC006161.2|AC006161 Arabidopsis thaliana chromosome II s...	36	6.0
gb|AF067132.1|HSPPPR3 Homo sapiens protein phosphatase-1 re...	36	6.0
gb|AF033856.1|AF033856 Agrobacterium tumefaciens glycogen o...	36	6.0
emb|AL445208.11|AL445208 Human DNA sequence from clone RP11...	36	6.0
emb|AL133305.2|CNS01DUO Human chromosome 14 DNA sequence **	36	6.0
emb|AL022158.1|HS326I13Homo sapiens DNA sequence fromPAC	36	6.0

Figura 16.- Secuencia de la Clona 11 y resultados del BLAST. Se muestra la secuencia de la clona 11 para PRL de catán (A), la secuencia se mandó comparar mediante el BLAST y los resultados indicaron que no está relacionada a PRL (B).

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

La *Tilapia nilotica* es una especie que pertenece a los peces óseos modernos y se encuentra fácilmente en la región. La reacción de RT se realizó a partir de RNA de cabezas de juveniles. Una vez realizada la estandarización de la PCR, se amplificaron dos bandas de tamaño muy semejante (Figura 17). Las mejores condiciones de amplificación fueron a 56°C, con 1 µl de DNAc de la RT y 2 mM de $MgCl_2$. Las bandas se resolvieron en un gel de agarosa al 2 % y la banda superior (458 pb) fue purificada con el estuche de Quiaex II (Figura 18). Una vez purificada, la banda superior se secuenció.

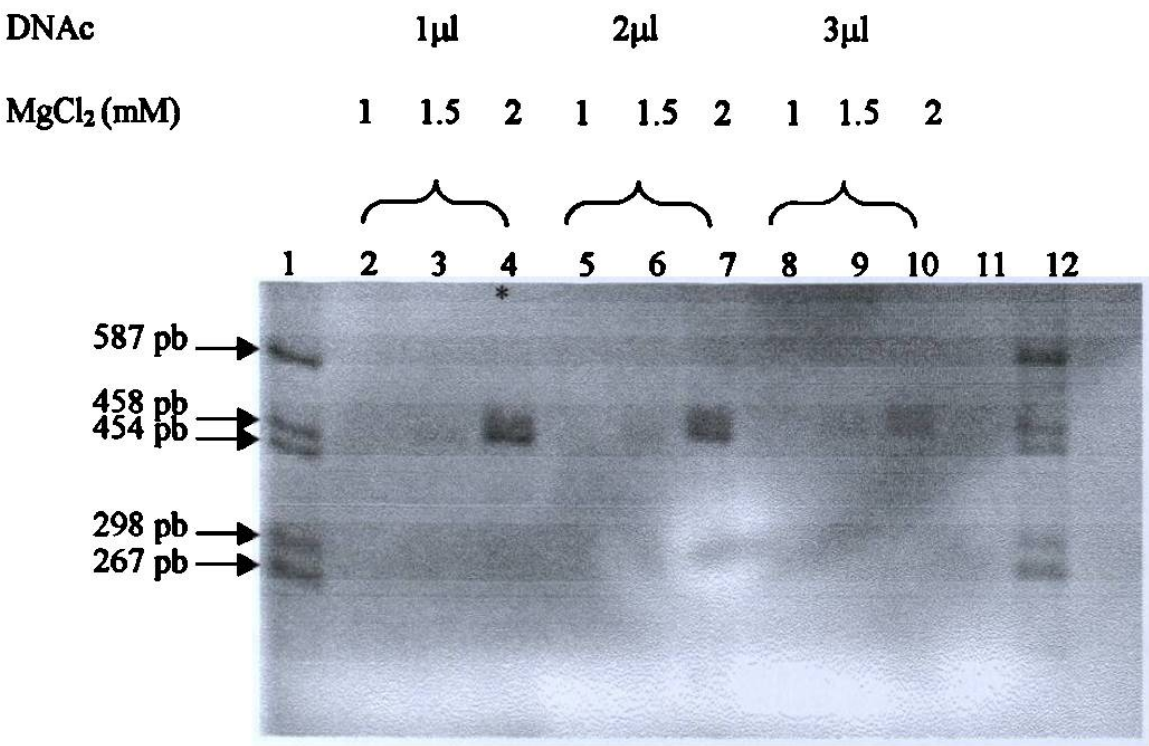

Figura 17.-Estandarización de la PCR para PRL en *Tilapia nilotica*. Para la obtención de la secuencia de PRL de tilapia se realizó la estandarización de la PCR con titulaciones de DNAc (1, 2 y 3 µl) y de $MgCl_2$ (1, 1.5 y 2 mM), así como variando la temperatura de alineamiento. Se muestra el resultado de las amplificaciones a 56°C con las titulaciones correspondientes, el marcador de PM fue pUC + *Hae* III (M) y se incluyó en el gel el control negativo de la reacción de PCR (Carril 11). El asterisco muestra la reacción de PCR que dio los mejores resultados y de la cual se purificaron las bandas para la secuenciación.

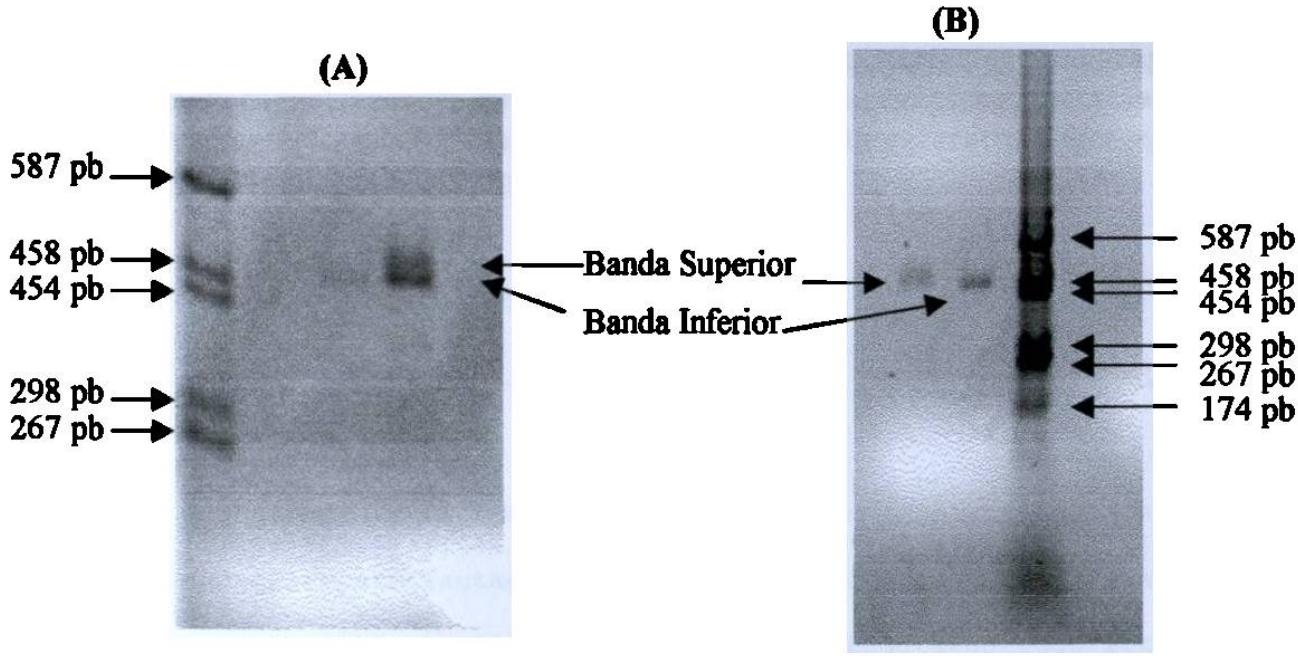

Figura 18.- Purificación de los PA. Las 2 bandas obtenidas de la amplificación con los iniciadores para PRL en Tilapia fueron purificadas. En el gel A, se muestran el marcador de peso molecular (M) y las 2 bandas obtenidas durante la PCR (Carril 3) y en el gel B se muestran el marcador de peso molecular y las bandas superior e inferior purificadas con el estuche comercial Quiaex II. Ambos geles fueron de agarosa al 2% y en los 2 se utilizó el marcador de peso molecular pUC + *Hae* III.

La secuencia se mandó comparar con el BLAST en el GenBank y comparte alta similitud con la secuencia de PRL de tilapia reportada previamente (número de acceso gb|M27010.1), así como a menor grado con otras secuencias de PRL de peces tales como el salmón, la trucha, el pez dorado, la carpa, entre otros (Figura 19). Este resultado permitió corroborar la eficacia de los iniciadores.

(A)

PA de 458 pb

aggtgagnntagggctcctcngtttaaagngaagngatgyccccgaggtgaacccatcttactagatagtacatcc aggcatccttgagacttttggagtactgctgcatctcctggatcttgttgaatatagtgctttgtgctgggtgaggcagggt actagcggaggaggacaggactacgagagggtctgaccaggcttggaggagggagcgagccagggacatcaaatc tgactctgacacttgaagtgcttggcccttgtcaatgggcgtctgtagagaggaggtgtggcacattgcaggccgcggc atgatcaccctgcctataggagggaagcgagagctcagctcctggg

(B) **Alineamiento**

```
>gb|M27010.1|TILPROLACA Tilapia nilotica prolactin mRNA, complete cds,
clone ptiPRL-I

Query: 48   aggtgaacccatcttactagatagtacatccaggc-atccttgagacttttggagtactg 106
            ||||||||||||||||||||||||||||||||||| |||||||||||||||||||||||||
Sbjct: 497  aggtgaacccatcttactagatagtacatccaggccatccttgagacttttggagtactg 438

Query: 107  ctgcatctcctggatcttgttgaatatagtgctttgtgctgggtgaggcagggtactagc 166
            |||||||||||||||||||||||||||| |||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct: 437  ctgcatctcctggatcttgttgaatatggtgctttgtgctgggtgaggcagggtactagc 378

Query: 167  ggaggaggacaggactacgagagggtctgaccaggcttggaggagggagcgagccaggga 226
            ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct: 377  ggaggaggacaggactacgagagggtctgaccaggcttggaggagggagcgagccaggga 318

Query: 227  catcaaatctgactctgacacttgaagtgcttggcccttgtcaatgggcgtctgtagaga 286
            |||||||||||||||||||||||||||||||||| |||||||||||||||||||||||||
Sbjct: 317  catcaaatctgactctgacacttgaagtgcttggtccttgtcaatgggcgtctgtagaga 258

Query: 287  ggaggtgtggcacattgcaggccgcggcatgatcaccctgcctataggagggaagcgaga 346
            |||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||| ||||
Sbjct: 257  ggaggtgtggcacattgcaggccgcggcatgatcaccctgcctataggagggaagtgaga 198

Query: 347  gctcagctcctggg 360
            |  ||||||||||||
Sbjct: 197  gtccagctcctggg 184
```

Figura 19. Secuencia de PRL de *Tilapia nilotica*. (A) Se muestra la secuencia de 459 pb obtenida de la banda superior correspondiendo a la amplificación del DNAc de PRL con los iniciadores consenso diseñado. (B) La secuencia obtenida se alineó con la secuencia previamente reportada para la PRL de tilapia en el GenBank. Las diferencias se resaltan en rojo (B). La secuencia encontrada tiene una semejanza del 98 % con la reportada por Rentier-Delrue y cols en 1989.

5.6. Obtención de la GH de catán

5.6.1 Ensayos de RT-PCR

Con el primer juego de iniciadores que abarcaban toda la secuencia codificante de la GH (CN1 y CN2), no se logró obtener bandas de amplificación. Aun probando diferentes temperaturas de alineamiento, cantidades de DNAc y de MgCl2, las amplificaciones resultaron inespecíficas y las caracterizaciones de los PA no correspondían al patrón esperado. En un siguiente paso se probó el segundo juego de iniciadores diseñados sobre regiones conservadas de los exones II y V del gen de la GH. Con éstos se amplificó una banda del tamaño esperado (493 pb). El PA se caracterizó con las enzimas *Pst* I y *Bgl* II, que fueron seleccionadas a partir de la secuencia del DNAc de la GH del pez *Lepisosteus osseus* (Figura 20).

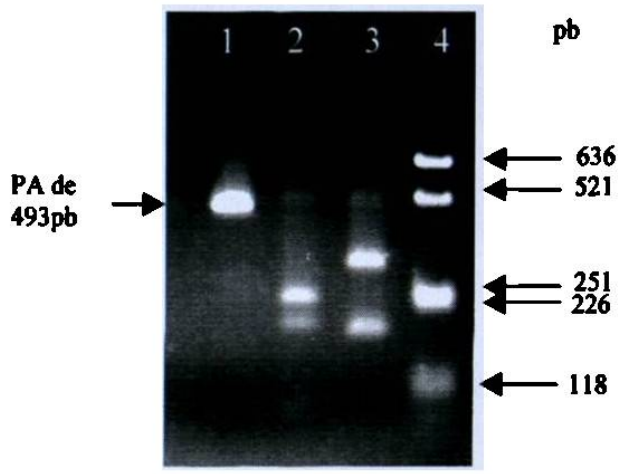

Figura 20.- Caracterización del PA de GH de catán. El PA obtenido con los iniciadores de GH (carril 1) se caracterizó con las enzimas *Pst* I (carril 2) y *Bgl* II (carril 3) y los productos de las digestiones se corrieron en un gel de agarosa al 2%. En el carril 4 se observa el marcador de PM pUC + *Alu* I.

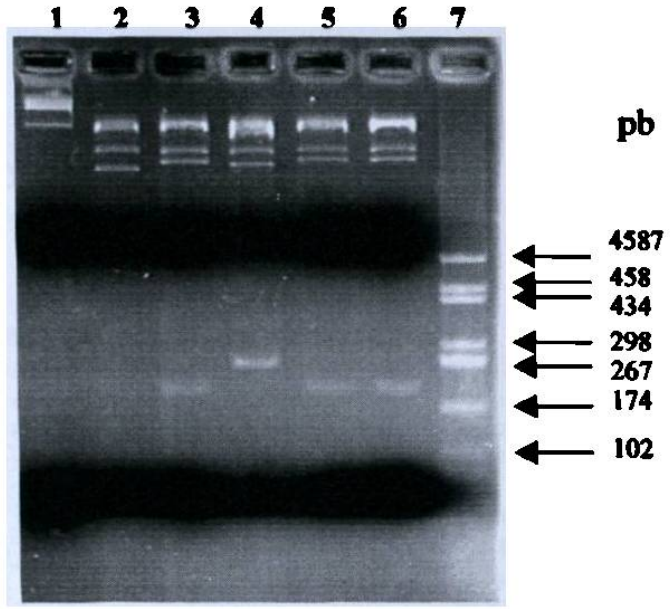

Figura 22.- Caracterización de las clonas con la enzima *Pst I*. Las clonas obtenidas se digirieron con la enzima *Pst* I. Las clonas 1, 3 y 4 (carriles 3, 5 y 6) presentaron un inserto invertido en comparación con la clona 2 (carril 4). En el gel también se muestran pBS-SK sin digerir (carril 1), una clona sin digerir (carril 2) y el marcador de PM, pUC + *Hae* III (Carril 7).

5.6.3. Determinación y análisis de la secuencia

Una vez seleccionadas las clonas candidatas, se procedió a la secuenciación de dos de ellas. Se eligieron las clonas 1 y 2 para obtener la secuencia del fragmento en sentido recto (Clona 2) e invertido (Clona 1). Se obtuvieron 2 secuencias de cada clona, ya que se secuenciaron cada una con 2 iniciadores del plásmido pBS-SK, permitiendo la secuenciación de ambas cadenas. Las cuatro secuencias se compararon entre sí y resultaron idénticas. Esto permitió establecer la secuencia completa del PA (493 pb). La secuencia determinada se mandó comparar con el BLAST en el GenBank. encontrando una similitud con la GH de *Lepisosteus osseus* (Figura 23A). El alineamiento de las secuencias de GH de catán y de *L. osseus* muestra sólo 7 cambios nucleotídicos que se

traducen en un solo cambio aminoacídico de una Valina por una Alanina (Figura 23B). La secuencia de la GH del catán se alinea además con GHs de diferentes especies de peces, como la Anguila, y Amia.

(A)

Resultado del BLAST para GH de Catán

Secuencias que producen alineamientos significativos	(bits)	Valor
gb|S82528.1|S82528 growth hormone [Lepisosteus osseus=long-...	902	0.0
gb|AF134596.1|AF134596 Lepisosteus osseus growth hormone (G...	264	4e-68
gb|S73969.1|S73969 growth hormone [Amia calva=bowfin, mRNA ...	131	4e-28
gb|AF052192.1|AF052192 Trichosurus vulpecula growth hormone...	74	7e-11
gb|AF312023.1|AF312023 Monodelphis domestica somatotropin p...	66	2e-08
gb|AF134597.1|AF134597 Amia calva growth hormone (GH) gene,...	56	2e-05
gb|M24066.1|ANGGROHOR Anguilla japonica growth hormone mRNA...	54	7e-05
gb|AF193797.1|AF193797 Xenopus laevis growth hormone A mRNA...	50	0.001
emb|AJ297562.1|NPY297562 Nycticebus pygmaeus gene for growt...	50	0.001
gb|AF231941.2|AF231941 Pseudosciaena crocea growth hormone ...	48	0.004
gb|AF065165.1|AF065165 Sciaenops ocellatus growth hormone p...	48	0.004
gb|AF193798.1|AF193798 Xenopus laevis growth hormone B mRNA...	48	0.004
gb|AF063834.1|AF063834 Sciaenops ocellata growth hormone pr...	48	0.004
gb|U89917.1|SSU89917 Sebastes schlegeli growth hormone (KrG...	48	0.004
emb|X14602.1|XLGHB Xenopus laevis mRNA for growth hormone B	48	0.004
gb|AF062746.1|AF062746 Bufo marinus growth hormone precurso...	46	0.016
gb|U02929.1|ECU02929 Equus caballus growth hormone (ecGH) m...	46	0.016
gb|U92533.1|CFU92533 Canis familiaris growth hormone (GH) g...	44	0.065
gb|AF069071.1|AF069071 Canis familiaris growth hormone (GH)...	44	0.065
gb|S78184.1|S78184 growth hormone [beagle dogs, mammary tis...	44	0.065
emb|X53325.1|SSPGH S.scrofa growth hormone mRNA	44	0.065
gb|U19788.1|SSU19788 Sus scrofa growth hormone mRNA, comple...	44	0.065
gb|U19787.1|SSU19787 Sus scrofa growth hormone mRNA, comple...	44	0.065
dbj|AB031298.1|AB031298 Siganus guttatus mRNA for growth ho...	44	0.065
gb|M22761.1|PIGGHMA Pig growth hormone mRNA	44	0.065
gb|M27326.1|PIGGHC Pig growth hormone mRNA, 3' end	44	0.065
emb|Z23067.1|CFGROHOR C.familiaris mRNA for growth hormone	44	0.065
gb|AY007303.1| Perca flavescens growth hormone (GH) mRNA, c...	42	0.26
gb|AF086217.1|HUMZC65D06 Homo sapiens full length insert cD...	42	0.26
gb|AF034386.1|AF034386 Bos indicus growth hormone mRNA, com...	42	0.26
emb|AL353713.7|AL353713 Human DNA sequence from clone RP5-1...	42	0.26
emb|X14601.1|XLGHA Xenopus laevis mRNA for growth hormone A	42	0.26
gb|L27835.1|PGSGHA Pangasianodon gigas growth hormone (GH) ...	42	0.26
gb|M63713.1|PNAGH Pangasius pangasius growth hormone mRNA, ...	42	0.26
gb|AC007749.3|AC007749 Homo sapiens BAC clone RP11-574O16 f...	40	1.0
gb|AC007767.3|F5D14 Sequence of BAC F5D14 from Arabidopsis ...	40	1.0
gb|AC004669.2|AC004669 Arabidopsis thaliana chromosome II s...	40	1.0
gb|L43628.1|SEQGHR Seriola dumerili growth hormone (GH) mRN...	40	1.0
gb|M35627.1|SEQPGH S.quinqueradiata growth hormone (GH) mRN...	40	1.0
dbj|AB001865.1|AB001865 Coregonus lavaretus DNA for growth ...	40	1.0
gb|AC006026.2|AC006026 Homo sapiens BAC clone GS1-96J14 fro...	38	4.0
gb|AC012085.4|AC012085 Homo sapiens 12 BAC RP11-887P2 (Rosw...	38	4.0
gb|AC009517.5|AC009517 Human Chromosome 7 clone RP11-181K7,...	38	4.0
gb|AF238493.1|AF238493 Cavia porcellus growth hormone mRNA,...	38	4.0
gb|AC024873.1|AC024873 Caenorhabditis elegans clone Y77E11A...	38	4.0
gb|AF233853.1|AF233853 Cavia porcellus growth hormone precu...	38	4.0

(B)

Alineamiento de GH de Catán con GH de *Lepisosteus osseus*

```
GH_de_catá      -------------------------------CACCAATGCACTGATAAGAGCACAGCAC
GH_de_L.os      GAAGTGGGAGCATTTCCACTGTACAGCCTCTTCACCAATGCAGTGATAAGAGCACAGCAC
                                                ********** *****************
                                                                   N  Q  H
GH_de_catá      CTCCACCAGCTTGCGGCTGATATTTACAAAGATTTTGAGCGCACCTATGTGCCAGAAGAG
GH_de_L.os      CTCCACCAGCTTGCGGCTGATATTTACAAAGATTTTGAGCGCACCTACGTGCCAGAAGAG
                ********************************************** ************
                 L  H  Q  L  A  A  D  I  Y  K  D  F  E  R  T  Y  V  P  E  E
GH_de_catá      CAGAGACAGTCAAGCAAAAGTTCTCCATCTGCCATATGCTATTCTGAGTCCATTCCTGCA
GH_de_L.os      CAGAGACAGTCAAGCAAAAGTTCTCCATCCGCCATATGCTATTCTGAGTCCATTCCTGCA
                ***************************** ******************************
                 Q  R  Q  S  S  K  S  S  P  S  A  I  C  Y  S  E  S  I  P  A
GH_de_catá      CCCACTGGCAAAGATGAAGCTCAGCAGAGATCTGATGTGGAGCTGCTGAGATTCTCCCTG
GH_de_L.os      CCCACTGGCAAAGACGAAGCTCAGCAGAGATCTGATGTGGAGCTGCTGAGATTCTCCCTG
                ************** *********************************************
                 P  T  G  K  D  E  A  Q  Q  R  S  D  V  E  L  L  R  F  S  L
GH_de_catá      GCTCTCATCCAGTCCTGGATCAGCCCTCTGCAGACTCTGAGCCGGGTGTTCTCCAACAGC
GH_de_L.os      GCTCTCATCCAGTCCTGGATCAGCCCTCTGCAGACTCTGAGCCGGGTGTTCTCCAACAGC
                ************************************************************
                 A  L  I  Q  S  W  I  S  P  L  Q  T  L  S  R  V  F  S  N  S
GH_de_catá      CTAGTCTTCGGCACTTCCGACAGGATCTTTGAGAAGCTGCAGGACCTTGAGCGGGGGATC
GH_de_L.os      CTAGTCTTTGGCACTTCCGACAGGATCTTTGAGAAGCTGCAGGACCTTGAGCGAGGGATC
                ******** ******************************************** ******
                 L  V  F  G  T  S  D  R  I  F  E  K  L  Q  D  L  E  R  G  I
GH_de_catá      GTGACCCTCACAAGGGAAATTGATGAGGGAAGCCCCAGAATTGCAGCCTTCCTGACTCTC
GH_de_L.os      GTGACCCTCACAAGGGAAATTGATGAGGGAAGCCCCAGAATTGCAGCCTTCCTGACTCTC
                ************************************************************
                 V  T  L  T  R  E  I  D  E  G  S  P  R  I  A  A  F  L  T  L
GH_de_catá      ACGTATGAGAAGTTTGACACCAACCTGAGAAATGACGACGTTCTGATGAAGAACTACGGG
GH_de_L.os      ACGTATGAGAAGTTTGACACCAACCTGAGAAACGACGACGCTCTGATGAAGAACTACGGG
                ******************************** ******* ******************
                 T  Y  E  K  F  D  T  N  L  R  N  D  D V-A L  M  K  N  Y  G
GH_de_catá      CTTTTAGCTTGTTTCAAGAAAGACATGCTCAAAGTGGAGACTT
GH_de_L.os      CTTTTAGCTTGTTTCAAGAAAGACATGCACAAAGTGGAGACTT
                **************************** **************
                 L  L  A  C  F  K  K
```

Figura 23.- Análisis de la secuencia de GH de catán. (A) El reporte obtenido con el BLAST indica que la secuencia corresponde a GH, ya que es muy similar a diferentes GHs de otras especies. (B) La secuencia se alineó con la GH de *Lepisosteus osseus* utilizando el programa Clustal W y muestra una similitud del 98.5 %, en azul se muestran los primers y en rojo los cambios nucleotídicos, también se señala, en verde, el cambio nucleotídico que da origen al cambio aminoacídico en la proteína. La traducción en aminoacidos de la secuencia obtenida se incluye en color morado.

Una vez analizada la secuencia se procedió a la reconstrucción de árboles filogenéticos utilizando el programa Philip y basándose en el método de la máxima parsimonia. La secuencia aminoacídica se alineó primero en el programa Clustal W con las secuencias de GHs reportadas a la fecha en peces considerados ancestrales (*Acipenser transmontaus*, *Amia calva*, *Lepisosteus osseus* y *Anguilla anguilla*), de los cuales solo la anguila pertenece a los peces óseos modernos (Teleósteos). Una vez alineadas las secuencias, se reconstruyó el árbol en donde se observa que la GH del catán está muy relacionada a la GH del *L. osseus*, lo cual se esperaba, ya que ambos peces pertenecen a la familia de los Lepisoteidos. El esturión fue tomado como grupo fuera, ya que dentro de los peces con GHs reportadas a la fecha, es considerado el mas ancestral (350 millones de años). *Amia calva* pertenece al orden de los Amiiformes y está relacionada con la GH de los peces del orden de los Semionotiformes (catán y *L. osseus*). Ambos ordenes de peces pertenecen al superorden de Neopteigios. La GH de la anguila presenta mayor número de cambios aminoacídicos, lo cual era de esperar, ya que este pez pertenece a la familia de los teleósteos o peces óseos modernos, que son considerados los más evolucionados (Figura 24).

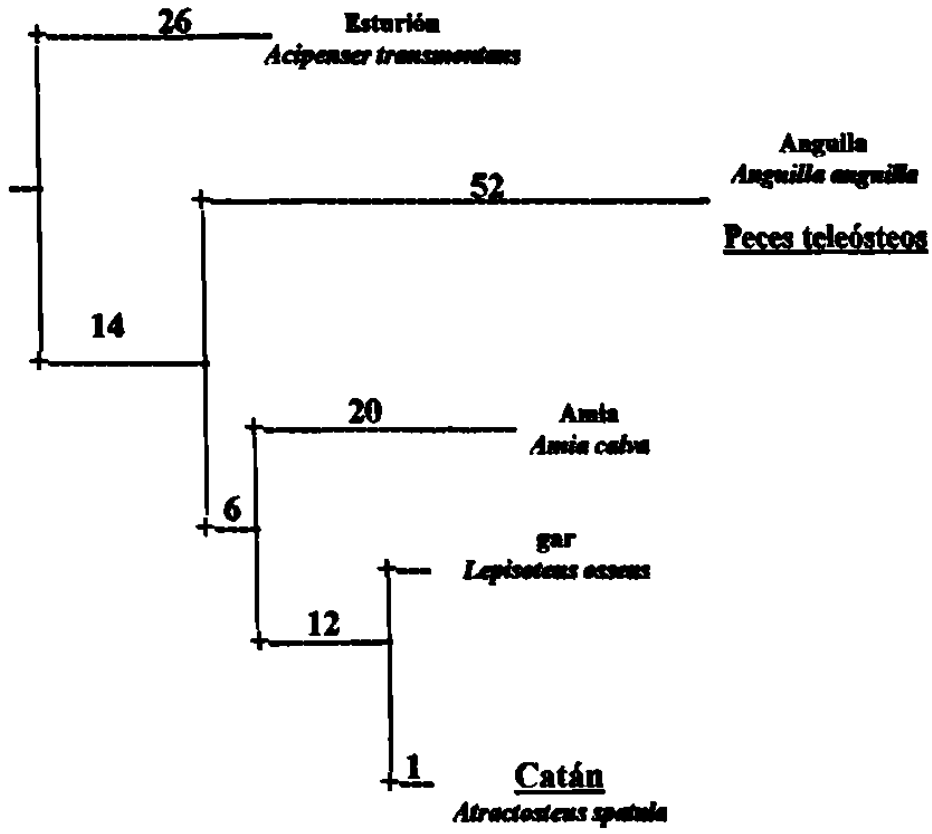

Figura 24.- Árbol filogenético de GH en peces ancestrales. En la figura se muestran los resultados del programa Philip con el cual se compararon las GHs reportadas a la fecha de peces ancestrales y la GH del catán. Los números indican los cambios aminoacídicos que han ocurrido en las diferentes GHs a lo largo de la evolución.

CAPITULO VI

DISCUSION

El estudio comparativo de las secuencias nucleotídicas está permitiendo aclarar los mecanismos de evolución del genoma, constituyendo así una herramienta importante para precisar los datos evolutivos. La familia de la hormona del crecimiento, prolactina y somatolactina representa un excelente modelo, ofreciendo la ventaja de analizar un gen o una familia multigénica en diferentes especies e inferir también sobre la filogenia de un grupo en particular, por ejemplo, los peces (Bernardi y cols., 1993, Wallis, 1996 y 2000). Sin embargo, existe cierta heterogeneidad entre el número de secuencias reportadas para los diferentes grupos. Dentro de los peces mas estudiados a la fecha se encuentran aquellos de interés en acuacultura, la mayoría de los cuales son teleósteos. Al contrario, en grupos como los peces cartilaginosos, óseos ancestrales y pulmonados, las secuencias reportadas de la familia GH/PRL/SL son aún escasas, por lo cual es importante la aportación de mas datos que permitan esclarecer las relaciones filogenéticas de este grupo de vertebrados, así como complementar el estudio evolutivo de esta familia génica.

Se eligió el catán como modelo de estudio por su interés evolutivo y por el interés biológico que presenta, ya que es un una especie nativa de la región Noreste del país que en la actualidad se encuentra en peligro de extinción (Mendoza y cols., 1999).

Al realizar la búsqueda de las hormonas de la familia GH/PRL/SL, se encontró que la GH ha sido la más estudiada en los peces ancestrales; aún así, son solamente tres los reportes existentes, habiéndose reportado sólo una secuencia de SL y ninguna de PRL en este tipo de peces. Por lo tanto, los iniciadores se diseñaron utilizando las secuencias disponibles reportadas para el gen de interés. En el caso de la SL y de la PRL, el escaso número de reportes para los peces ancestrales solo permitió diseñar los iniciadores sobre regiones conservadas del gen para los peces teleósteos. En el caso de la PRL, estos iniciadores permitieron amplificar por RT-PCR el DNAc de la tilapia, utilizado como control positivo.

Aunque se evidenció la presencia del gen de PRL en el DNAg del catán, no se logró obtener una amplificación específica en los ensayos de RT-PCR. La similitud entre las secuencias de PRL de peces teleósteos y no teleósteos es baja (entre un 30 y 57%), indicando que la secuencia ha variado mucho a lo largo de la evolución. No obstante es muy probable que los iniciadores diseñados sólo funcionen en peces teleósteos, como lo demuestra la amplificación del DNAc de PRL de tilapia, y no en peces ancestrales. Sin embargo, al obtener la secuencia de PRL en tilapia, se aporta una nueva sonda para la identificación de PRL, herramienta más apropiada para trabajar con la PRL en peces.

La SL ha sido el miembro de la familia menos estudiado hasta la fecha y solo se ha reportado un total de 14 secuencias para esta hormona. La similitud entre las secuencias de SL de peces teleósteos y del único pez ancestral para el que se ha reportado esta hormona (esturión), varía de un 56 a un 71%. Por lo tanto, la SL aparenta ser más conservada que la PRL, pero se requieren de más datos para aclarar esta relación. Los

iniciadores diseñados no permitieron amplificar el DNAc de la SL del catán. Un control positivo adecuado para comprobar su eficacia, hubiera sido esturión, ya que es el único pez no teleósteo en el que se ha descrito esta hormona, pero por carecer de material biológico no fue posible realizar esta prueba. Estos iniciadores fueron probados en tilapia, sin éxito, lo que probablemente se debe a que los iniciadores se diseñaron dando preferencia al esturión.

La GH ha sido el miembro de la familia más estudiado, aún así, la mayoría de las secuencias reportadas pertenecen a especies de los peces llamados peces óseos modernos o teléosteos. Para peces no teleósteos están reportadas a la fecha las secuencias de *Amia calva*, *Lepisosteus osseus* y *Acipenser transmontanus*. En peces teleósteos, las GHs presentan una similitud que va desde un 100 a un 33%, lo que indica que las secuencias han sufrido varios cambios a lo largo de la evolución en estos peces. Sin embargo, entre las tres secuencias de GH de peces no teleósteos la similitud aumenta entre 76 y 82%, por lo cual la conservación parece ser mayor, pero el hecho de que sean solo tres secuencias limita el análisis. Se diseñaron dos juegos de iniciadores en base a las mismas secuencias. El juego diseñado sobre el ATG y el codón de terminación no permitió amplificar la secuencia de GH, el análisis posterior de las secuencias indicó que la región del péptido señal es muy variable en peces y pudiera ser la causa de que los primeros iniciadores no funcionaran. Únicamente el segundo juego mas interno, diseñado sobre zonas conservadas, permitió obtener un amplicón de GH. La secuencia encontrada para la GH de catán es muy similar a la reportada para *Lepisosteus osseus*. Aunque ambos peces pertenecen a la misma familia (Lepisoteidae), estos géneros se

separaron hace aproximadamente 180 millones de años (Wiley, op.cit). Sin embargo, el DNAc de la proteína madura que se clonó se encuentra muy conservado. Esto indica que a pesar del tiempo transcurrido desde la divergencia de los dos géneros, la velocidad de cambios ha sido muy baja: de 3.7 X 10^{-11} substituciones de aa/sitio/año, y aún a nivel nucleotídico es de 7.9 X 10^{-11} substituciones /sitio/año. Este resultado apoya la alta conservación de la secuencia de la proteína madura observada entre los peces ancestrales. La GH del catán presenta un total de 33 cambios aminoacídicos con la secuencia ancestral inferida por el programa Philip, mientras que la secuencia de la anguila presenta 66 cambios, a pesar de considerarse un pez ancestral dentro de los teleósteos. Al comparar la secuencia obtenida se observó la conservación de los nucleótidos a nivel de las uniones entre los exones. Por lo cual se puede inferir que el DNAc consta de 5 exones y que el gen del catán presenta la estructura "clásica" de la GH con 5 exones y 4 intrones. Esta organización génica se ha conservado a lo largo de la evolución, con la excepción de algunos peces (salmónidos).

La longitud de la secuencia reportada abarca aproximadamente el 74% de la totalidad de la proteína madura. Es probable que el cambio aminoacídico que se encontró en la proteína madura (Valina → Alanina) no afecte la interacción con el receptor, ya que ambos aminoácidos pertenecen al grupo de los aminoácidos no polares. Cabe mencionar que los iniciadores fueron diseñados sobre secuencias conservadas de los exones II y V que resultan generalmente más conservados (Treviño, 1999) por estar involucrados en la unión con el receptor.

Al divergir los teleósteos ocurrió una aceleración en los cambios que sufrió la GH, tanto a nivel de los exones, como de los intrones (Wallis y cols., 1996, Venkatesh y cols.,

1999). Se cree que estos cambios fueron adaptativos, pero no existe evidencia de que estos cambios afecten directamente la función de la hormona (Wallis y cols., 1996).

En este trabajo, se obtuvo el DNAc de la GH de catán por RT-PCR a partir del RNA total de cabezas de larvas. En los artículos reportados a la fecha, las GHs de peces habían sido clonadas a partir de hipófisis, siendo éste, el primer trabajo en donde se clona una GH de pez a partir de cabezas de larvas. Además se demostró que en larvas de 7 días hay una expresión detectable por PCR del transcrito de la hormona. El complementar este trabajo con el análisis por RT-PCR de la expresión de la GH en las diferentes etapas larvarias, permitiría completar el perfil de expresión de esta hormona y contribuir al conocimiento de la fisiología de este pez.

Además la obtención de las secuencias de SL y PRL en esta misma especie primitiva permitiría esclarecer los mecanismos que dieron lugar a esta familia génica.

CAPITULO VII

CONCLUSIONES

En este trabajo se llegó a las siguientes conclusiones:

- Se evidenciaron los genes de GH y PRL en el DNAg del catán por medio de la técnica de Slot-blot.
- El diseño de iniciadores consenso sobre la secuencia codificante que corresponde a la proteína madura, permitió obtener por RT-PCR el DNAc de GH de catán.
- La secuencia de la proteína madura de la GH de catán se encuentra muy conservada entre los género *Atractosteus* y *Lepisosteus*, a pesar de haber divergido hace aproximadamente 180 millones de años.
- La reconstrucción de un árbol filogenético entre las GHs de diferentes especies, indicó claramente que la secuencia de la hormona se ha mantenido muy conservada entre los peces ancestrales, mientras que sufrió una evolución rápida en los teleósteos.
- Se encontró una expresión detectable de la GH en larvas de catán de 10 días.

CAPITULO VIII

PERSPECTIVAS

La obtención de la secuencia codificante de la GH de catán es un primer paso en el mejor conocimiento de la fisiología y del genoma de esta especie. Este pez es una especie en peligro de extinción que es uno de los sobrevivientes de la Pangea. Desafortunadamente, aún se conoce muy poco de esta especie que constituye un eslabón muy importante en la evolución. Esta especie también es fuente de ingresos para pescadores, que en la actualidad cuentan con un comercio bien establecido de carne de catán, aunque las poblaciones han disminuido mucho.

El tener el DNAc de la GH de catán, permitirá producir la hormona recombinante o construir un vector de expresión para tratar los catanes (o especies cercanas) acelerando su crecimiento, favoreciendo así su más rápida reproducción y sobrevivencia.

CAPITULO IX

BIBLIOGRAFIA

1) Agellon, LB., Davies, SL., Chen, T.T., Powers, D.A. (1988) Structure of fish (rainbow trout) growth hormone gene and its evolutionary implications. *Proc Natl Acad Sci USA.* **85**(14): 5136-40.

2) Amemya, Y., Sogabe, Y., Nozaki, M., Takahashi, A., Kawauchi, H. (1999) Somatolactin in the white sturgeon and African lungfish and its evolutionary significance. *Gen. Comp. Endocrinol.*114(2): 181-190.

3) Argenton, F., Vianello, S., Bernardini, S., Jacquemin, P., Martial, J., Belayew, A., Colombo, L., Bortolussi, M. (1993) The transcriptional regulation of the growth hormone gene is conserved in vertebrate evolution. *B.B.R.C.*;19(2):1360-6.

4) Astola, A ., Pendon, C., Ortiz, M., Valdivia, M.M.(1996) Cloning and expression of somatolactin, a pituitary hormone related to growth hormone and prolactin from gilthead seabream, *Sparua aurata. Gen. Comp. Endocrinol. 104(3)*:330-6.

5) Auperin, B., Rentier-Delrue, F., Martial, J.A., Prunet, P. (1994) Evidence that two tilapia (*Oreochromis niloticus*) prolactins have different osmoregulatory functions during adaptation to a hyperosmotic environment. *J.Mol.Endocrinol.* 12(1):13-24.

6) Baccari, GC., Di Mateo, L., Minucci, S. (1996). Effects of prolactin and cortisol on the Harderian gland of the terrapin, *Pseudemys scripta*, adapted to different salinities. *Anat. Rec.*244:225-34.

7) Bernardi, G., D'Onofrio, G., Caccio, S., Bernardi, G. (1993) Molecular phylogeny of bony fishes, based on the amino acid sequence of the growth hormone. *J. Mol. Evol*, 37(6): 644-9.

8) Chang, Y.S., Liu, C.S., Huang, F.L., Lo, T.B. (1992) The primary structures of growth hormones of the tree cyprinid species: goghead carp, silver carp and grass carp. *Gen Comp Endocrinol.* 87(3):385-93

9) Darwin, Charles Robert. (1859) *The origin of species.* Ed. Purrua México.

10) De la Fuente, J., Guillén, I., Martínez, R., Estrada, M.P. (1999) Growth regulation and enhancement in tilapia: basic research findings and their applications. *Genet Anal.* 15(3-5):85-90

11) Gross-Bellard, M., Oudet, P., Chambon, P. 1972. Isolation of high-molecular-weight DNA from mammalian cells. *Eur.J.Biochem.*32:36.

12) http://www.arch.dcr.state.nc.us/subsist/zooarch.htm

13) http://www.fcn.state.fl.us/gfc/fishing/Fishes/gar.html

14) http://www2.ncbi.nlm.nih.gov/

15) Ingraham, H.A., Chen, R., Mangalam, H.J., Elsholtz, H.P., Flynn, S.F., Lin, C.R., Simmons, D.M., Rosendfeld, M.G. (1998) A tissue specific transcription factor containing a homeodomain specifies a pituitary phenotype. *Cell* 55,519-529

16) Inoue, H., Nojima, H., Okamaya, H. (1999) High efficiency transformation of *E. coli* with plasmid. *Gene*. **96**:23-28.

17) Jeh, H.S., Kim, C.H., Leem H.K., Han, K. (1998) Recombinant flounder growth hormone from *Escherichia coli*: overexpression, efficient recovery, and growth-promoting effect on juvenile flounder by oral administration. *Biotechnol.* Feb **26**;60(3):183-93

18) Kaneko, T. (1996) Cell biology of somatolactin. *Int Rev Cytol.*169:1-24.

19) Kelly, SP., Chow, I.N., Woo, N.Y. (1999) Effects of prolactin and growth hormone on strategies of hypoosmotic adaptation in a marine teleost, *Sparus sarba*. *Gen. Comp. Endocrinol.* **113**(1): 9-22.

20) Li,W., Graur, D. (1991) *Fundamentals of Molecular Evolution*. **1**:1-19. Ed. Sinaver Associates, Inc.

21) Marchuk, D., Drumm, M., Saulino, A., Collins, S.C.(1990) Construction of T-vectors and general system for direct cloning of unmodified PCR products. *Nucleic Acids Research*. **19** (5): 1154-55.

22) May D., Alrubian J., Patel S., Dores R.M., Rnad-Weaver M.(1999) Studies on the GH/SL gene family: cloning of African Lungfish (*Protepteus annectens*) growth hormone and somatolactin and Toad (*Bufo marinus*) growth hormone. *Gen Comp Endocrinol* 113(1):121-35

23) May D., Todd, C.M., Rand-Weaver, M. (1997) cDNA cloning of eel (*Anguilla anguilla*) somatolactin. *Gene*. **25**;188(1):63-7.

24) May, D., Alrubaian, J., Patel, S., Dores, R.M., Rand-Weaver, M. (1999) Studies on the GH/SL gene family: cloning of African lungfish (*Protopterus annectens*) growth hormone and somatolactin and toad (*Bufo marinus*) growth hormone. *Gen. Comp. Endocrinol.* **113**(1):121-135.

25) Mendoza, R., Aguilera, C., Montemayor J., Rodríguez, G., Márquez, G. (1999) Biología de los lepisosteidos y estudios orientados hacia la recuperación de las poblaciones naturales del catán (*Atractosteus spatula*) In: Redes Nacionales de Investigación en Acuacultura. Instituto Nacional de Pesca-SEMARNAP Álvarez Torres, Guzmán Arroyo, Contreras Balderas y Silvia Loera (Eds.) pp 103-120.

26) Mendoza R., Aguilera C., Montemayor J., Rodríguez G., Márquez G. (1999) Aspectos reproductivos de los lepisosteidos, con, énfasis en las perspectivas para el control de la reproducción del catán. In: Redes Nacionales de Investigación en Acuacultura. Instituto Nacional de Pesca-SEMARNAP Álvarez Torres, Guzmán Arroyo, Contreras Balderas y Silvia Loera (Eds.) pp 103-120.

27) Mullis, P.E., Patel, M.S., Brickell, P.M., Brook, C.G.D. (1991) Constitutionally Short Stature: Analysis of the insulin-Like Growth Factor-I Gene and the Human Growth Hormone Gene Cluster. *Pediatric Research* **29**(4) 412-415

28) Narnaware, YK., Kelli, SP., Woo, NY. (1998) Stimulation of macrophage phagocytosis and lymphocyte count by exogenous prolactin administration in silver sea beam (*Sparua sarba*) adapted to hyper- and hypo- osmotic salinities. *Vet. Immunol. Immunopatol.* **61**(2-4):387-91.

29) Niall, H.D., Hogan, M.L., Sayer, R., Rosenblum, I.Y., Greenwood, F.C. (1971) Sequences of pituitary and placental lactogenic and growth hormones: evolution from a primordial peptide by gene duplication. *Proc Natl Acad Sci USA* **68**:866-869

30) Ohta, Tomoko 1991 Multigene families and evolution of complexity. *J. Mol. Evol.* **33**: 34-41.

31) Ono, M., Takayamam Y., Rand-Weaverm M., Sakatam S., Yasunagam T., Nososm T., Kawauchim H. (1990) cDNA cloning of somatolactin, a pituitary protein related to growth hormone and prolactin. *Proc Natl Acad Sci USA* **87**(11): 4330-4.

32) Pendon,C., Martinez-Barbera, JP., Valdivia, M.M. (1994) Cloning of a somatolactin-encoding cDNA from sole (*Solea seleganensis*). *Gene* **147**(2):227-230.

33) Rand-Weaver, M., Noso, T., Muramoto, K., Kawauchi, H. (1991) Isolation and characterization of somatolactin, a new protein related to growth hormone and prolactin from Atlantic cod (*Gadus morhua*) pituitary glands. *Biochemistry.* **12**;30(6):1509-15.

34) Rentier-Delrus, F., Swennwn, D., Prunet, P., Lion, M., Martial, JA. (1989) Tilapia prolactin: molecular cloning of two DNAs and expression in *Escherichia coli*. *DNA* 8(4): 261-270

35) Sanbrook J., Fritsh E. F. y Maniatis T.(1989) Molecular cloning a Laboratory manual. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York.

36) Sandrina K, Bernichtein S., Kelly P.A., Martial J.A. y Vincent G. (1999). Biological properties of human prolactin analogs depend not only on global hormone affinity, but also on the relative affinities of both receptor binding sites. *J. Biol. Chem.* 274:37:26033-26043.

37) Sanger, F.S., Nicklen, A.R. (1977) DNA sequencing with chain terminating inhibitors. *Proc.Natl.Acad.U.S.A.* 74:5463-5467

38) Sifuentes-Rincón (2000) Estudio de la Familia Génica GH-PL en el gato doméstico (*Felis catus*): Un modelo molecular para precisar la evolución de los carnívoros. Tesis Doctoral. Facultad de Medicina de la UANL.

39) Singer, M., y Berg, P. (1991) Genes and genomes. A changing perspective. *University Science Books. USA.*

40) Swennen, D., Poncelet, A.C., Sekkali, B., Rentier-Delrue, F., Martial, J.A., Belayewm A. (1992) Structure of tilapia (*Oreochromis mossambicus*) prolactin I gene. *DNA Cell Biol.* 11(9):673-84.

41) Takayama, Y., Rand-Weaver. M., Kawauchi, H., Ono, M. (1991) Gene structure of chum salmon somatolactin, a presumed pituitary hormone of the growth hormone/prolactin family. *Mol Endocrinol.* 5(6):778-86

42) Treviño, V.(1999) Obtención de nuevos genes de la hormona del crecimiento en vertebrados. Tesis de Maestría en Ciencias. Pg 14-18. Facultad de Medicina. Universidad Autónoma de Nuevo León.

43) Venkatesh, B., Ning, Y., Brener, S. (1999) Late Changes in spliceosomal introns define clades in vertebrate evolution. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 96:10267-10271.

44) Wallis M. (1996) The Molecular Evolution of vertebrate Growth Hormones: A Pattern of Near-Stasis Interrupted by Sustained Bursts of Rapid Change. *J Mol Evol* **43**:93-100

45) Wallis M. (2000): Episodic Evolution of Protein Hormones: Molecular Evolution of Pituitary Prolactin. *J Mol Evol* **50**:465-473

46) Wiley, E.O.(1976) The phylogeny and biogeography of fossil and recent gars (Actinopterygii:Lepisosteidae). *Misc.Publ.Univ.Kans.Mus.Nat.Hist.***64**:1-111.

47) Yang, B., Green,,M., Chen, T. (1999) Early Embryonic Expression of the Growth Hormone Family Protein Genes in the Developing Rainbow Trout, *Onchorhynchus mykiss. Mol Reprod Dev.* **53**(2):127-34

48) Yang, B.Y., Arab, M., Chen, T.T. (1997) Cloning and characterization of rainbow trout (Oncorhynchus mikiss) somatolactin cDNA and its expression in pituitary and nonpituitary tissues. *Gen Comp Endocrinol.* **106**(2): 271-80.

49) Yasuda, A., Yamaguchi, K., Noso, T., Papkoff , H., Polenov, A.L., Nicoll, C.S., Kawauchi, H. (1992) The complete amino acid sequence of growth hormone from sturgeon (*Acipenser guidenstadti*). *Biochim. Biophys. Acta* **1120**(3):297-304.

50) Zhu, Z.Y., Sun, Y.H. (2000) Embryonic and genetic manipulation in fish. *Cell Res. Mar*; **10**(1):17-27.

TIPO DE ADQUISICION
DONATIVO