

UNIVERSIDAD AUTONOMA DE NUEVO LEON

FACULTAD DE MEDICINA



**ESTUDIO MOLECULAR DEL GEN DE LA PROLACTINA
EN EL GATO DOMESTICO (*Felis Catus*)**

Por

L.A.Q.B. RAFAEL GONZALEZ ALVAREZ

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

Octubre del 2001

C.1

G6

.P74

.8

TM

QH447

L.A.O.B.

RAFAEL GONZALEZ

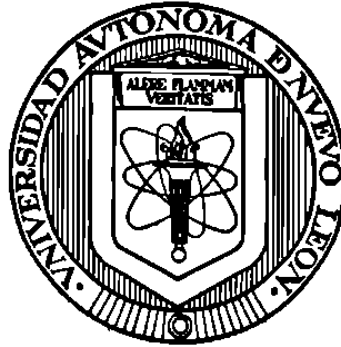
ALVARO REZ



1080094702

UNIVERSIDAD AUTONOMA DE NUEVO LEON

FACULTAD DE MEDICINA



**ESTUDIO MOLECULAR DEL GEN DE LA PROLACTINA EN EL
GATO DOMÉSTICO (*Felis catus*)**

Por

L.A.Q.B. RAFAEL GONZÁLEZ ALVAREZ

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

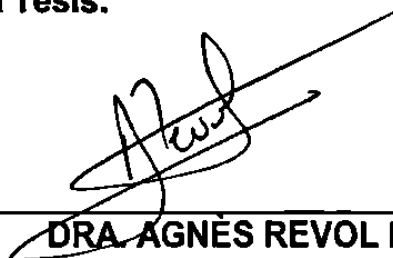
Octubre del 2001

TM
QH447
.8
.P24
C26
C4

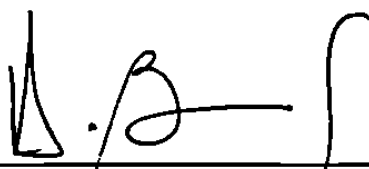


**ESTUDIO MOLECULAR DEL GEN DE LA PROLACTINA EN EL GATO
DOMÉSTICO (*Felis catus*)**

Aprobación de la Tesis:



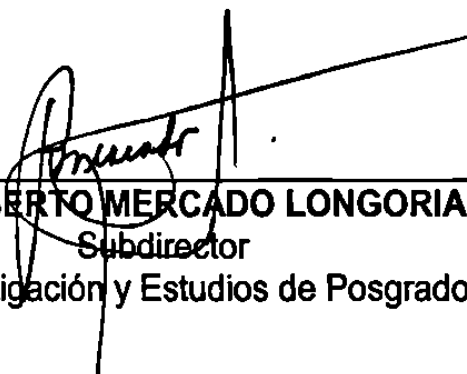
DRA. AGNÈS REVOL DE MENDOZA
Director de Tesis



DR. HUGO ALBERTO BARRERA SALDAÑA
Co-Director de Tesis



M. en C. DOLORES CARMEN ESQUIVEL ESCOBEDO
Comisión de Tesis



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

El presente trabajo titulado “Estudio molecular del gen de la prolactina en el gato doméstico (*Felis catus*)”, se llevó a cabo por el L.A.Q.B. Rafael González Álvarez en el Laboratorio de Biología Molecular de la Unidad de Laboratorios de Ingeniería y Expresión Genéticas del Departamento de Bioquímica de la Facultad de Medicina de la UANL, bajo la dirección de la Dra. Agnès Revol de Mendoza y la co-dirección del Dr. Hugo Alberto Barrera Saldaña.

DEDICATORIA

A DIOS

A MIS PADRES

Rafael y Arcelia, por su apoyo, confianza, dedicación y amor; por ser los mejores padres del mundo.

A MIS DOS AMORES

Ana Isabel mi esposa mi gran compañera, el amor de mi vida, por darme todo su amor, tiempo y dedicación. Mi hija Karen Arcelia por ser lo mejor que me ha pasado en la vida.

A MI HERMANA

Irene por su apoyo incondicional en todo momento a pesar de la distancia.

A MI ABUELO

Muy en especial, en memoria de ese gran hombre; mi abuelo Nacho, por todos sus sabios consejos, sus enseñanzas sobre la vida, su apoyo incondicional en todos momentos, todo cuanto soy y tengo se lo debo a el.

AGRADECIMIENTOS

A la Dra. Agnès Revol, por todo su apoyo y dedicación que me brindó durante la realización de este trabajo. Sinceramente muchas gracias.

Al Dr. Hugo A. Barrera Saldaña, por haberme brindado la oportunidad de pertenecer a la ULIEG.

A la M. en C. Dolores Esquivel por sus consejos y la secuenciación de las clonas.

A mis compañeros del laboratorio de Biología Molecular: Claudio, Letty, Lulú e Iram por su amistad.

A mi prima Norma Leticia, por su amistad y ayuda.

Al Dr. Jaime Campos, por haberme dado su amistad y asilo durante mis primeros días en Monterrey.

A mi abuela Irene, por su ejemplo de tenacidad y voluntad ante las adversidades de la vida.

Muy en especial a mis primos: Fidel y Aarón por su amistad incondicional de toda la vida, llegándonos a considerar como los mejores hermanos. Por todas nuestras experiencias vividas a lo largo de la vida, desde aquella nuestra primera travesura juntos en el rancho hasta hoy.

A mis demás primos: Nacho, Oscar, Héctor, Lolo, Pascual, German, César y Moisés por su amistad y apoyo.

A todo el personal del departamento de Bioquímica y personal de la ULIEG por haber hecho grata mi estancia en la ULIEG.

INDICE

Contenido	Página
LISTA DE FIGURAS	i
NOMENCLATURA	iii
RESUMEN	vi
CAPITULO I. INTRODUCCIÓN	
1.1 Las familias multigénicas	1
1.2 La familia GH/PRL/PL	2
1.3 Evolución de la familia GH/PRL/PL	2
1.4 Prolactina	3
1.4.1 Fisiología de la prolactina	4
1.4.1.1 Equilibrio hídrico y electrolítico	5
1.4.1.2 Crecimiento y desarrollo	5
1.4.1.3 Endocrinología y metabolismo	7
1.4.1.4 Cerebro y conducta	8
1.4.1.5 Reproducción	8
1.4.1.6 Inmunoregulación y protección	9
1.4.2 Prolactina extrapituitaria	10
1.4.3 Expresión del gen de la prolactina	11
1.5 Lactógenos placentarios y proteínas relacionadas a prolactina	11

1.5.1 La familia de proteínas relacionadas a prolactina en roedores	14
1.5.2 La familia de proteínas relacionadas a prolactina en rumiantes	16
1.5.3 La familia de proteínas relacionadas a prolactina en carnívoros	16
1.6 Justificación del trabajo	17
CAPITULO II. OBJETIVOS	
2.1 Objetivo general	19
2.2 Objetivos específicos	19
CAPITULO III. ESTRATEGIA GENERAL	20
CAPITULO IV. MATERIALES Y MÉTODOS	
4.1 Material	21
4.1.1 Origen de los reactivos	21
4.1.2 Material biológico	22
4.2 Equipo	22
4.3 Métodos	24
4.3.1 Obtención del DNA fágico	24
4.3.1.1 Titulación de las partículas fágicas	24
4.3.1.2 Producción a gran escala	25
4.3.1.3 Extracción de DNA fágico	27
4.3.2 Extracción de DNA genómico	27
4.3.3 Análisis y cuantificación de los DNAs	28
4.3.3.1 Análisis electroforético del DNA fágico y genómico	

de gato	28
4.3.3.2 Cuantificación del DNA fágico y genómico de gato	28
4.3.4 Amplificación del gen de la PRL de gato	29
4.3.4.1 Diseño de los iniciadores	29
4.3.4.2 Estandarización del PCR largo	29
4.3.4.3 Caracterización del producto amplificado	31
4.3.5 Subclonación de los fragmentos fágicos	32
4.3.5.1 Preparación del vector	32
4.3.5.2 Preparación del inserto	32
4.3.6 Clonación del PA del gen de la PRL de gato	32
4.3.6.1 Preparación del vector	32
4.3.6.2 Preparación del inserto	33
4.3.7 Ligación	33
4.3.7.1 Ligación de los fragmentos fágicos	33
4.3.7.2 Ligación de los fragmentos del PA del gen	33
4.3.8 Transformación	34
4.3.9 Análisis de las clonas recombinantes	35
4.3.9.1 Extracción del DNA plasmídico	35
4.3.9.2 Análisis de los insertos	36
4.3.10 Determinación y análisis de las secuencias nucleotídicas	36
4.3.10.1 Determinación de la secuencia de las clonas	36
4.3.10.2 Análisis de los intrones	37
4.3.10.3 Subclonación de los intrones	37
4.3.10.4 Análisis de las secuencias nucleotídicas	37

4.3.11 Identificación de PLs y/o PRPs en el gato	38
4.3.11.1 Estandarización del PCR largo	38
4.3.11.2 Hibridación de los PA con sondas de PRL de gato y bPLII	40
4.3.11.2.1 Obtención de la sonda de PRL	40
4.3.11.2.2 Obtención de la sonda del PL II bovino	41
4.3.11.2.3 Marcaje de las sondas	42
4.3.11.2.4 Preparación del gel	44
4.3.11.2.5 Condiciones de hibridación	44

CAPITULO V. RESULTADOS

5.1 Obtención de los DNAs	46
5.1.1 Extracción de DNA fágico	46
5.1.2 Extracción de DNAg de gato	47
5.2 Obtención del gen de la PRL de gato	48
5.2.1 A partir del fago λ PRP-1	48
5.2.2 Por PCR largo	49
5.2.2.1 Diseño de los iniciadores	49
5.2.2.1.1 Iniciadores para PCR largo	49
5.2.2.1.2 Iniciadores de secuenciación	50
5.2.2.2 Amplificación y caracterización del gen de PRL	50
5.3 Clonación del producto amplificado de PRL	52
5.4 Análisis del gen y determinación de su secuencia	53

5.4.1 Caracterización y análisis de los intrones	53
5.4.2 Subclonación de los intrones	55
5.4.3 Secuenciación	56
5.4.4 Análisis del promotor proximal y extremo 5' no traducible	57
5.4.5 Análisis del DNAC de la PRL	59
5.4.6 Análisis de los intrones	60
5.5 Identificación de genes relacionados a PLs y/o PRPs en el gato	61
5.5.1 Diseño de los iniciadores	61
5.5.2 Amplificación de los genes por PCR largo	61
5.5.3 Hibridación de los productos amplificados con la sonda de PRL hipofisiaria de gato	62
5.5.3.1 Marcaje de la sonda	62
5.5.3.2 Hibridación	63
5.5.4 Hibridación de los productos amplificados con sonda de lactógeno placentario bovino II (bPLII)	64
5.5.4.1 Marcaje de la sonda	64
5.5.4.2 Hibridación	65

CAPITULO VI. DISCUSIÓN

6.1 Obtención del gen de la PRL	67
6.2 Análisis del gen	70
6.2.1 Análisis del promotor	71
6.2.2 Análisis del DNAC	73
6.2.3 Análisis de los intrones	73

6.3 Genes relacionados a PRL en carnívoros	74
CAPITULO VII. CONCLUSIONES	78
CAPITULO VIII. BIBLIOGRAFÍA	79

LISTA DE FIGURAS

Figura	Página
1. Origen de los PLs	3
2. Estructura de los genes de PRL y PrIs-like	15
3. Purificación de las partículas fágicas	46
4. DNA fágico	47
5. DNAg de gato	47
6. Análisis de las subclonas derivadas del fago λ PRP-1	49
7. Diseño de los iniciadores a lo largo del gen de PRL	50
8. Amplificación del gen de la PRL de gato por PCR largo	51
9. Caracterización del producto amplificado de PRL	52
10. Selección de las clonas recombinantes	53
11. Análisis de los intrones	54
12. Estrategia de subclonación de los intrones 1 y 2	55
13. Determinación de la secuencia del gen de PRL	57
14. Secuencia nucleotídica del promotor proximal del gen de la PRL de gato	58
15. Árbol filogenético del promotor y extremo 5' no traducible	59
16. Árbol filogenético del DNAC	60
17. Iniciadores consenso	61
18. Amplificación de las secuencias relacionadas a PRL utilizando los iniciadores consenso	62

19. Preparación de la sonda de PRL	63
20. Identificación de los genes de PRL por hibridación	64
21. Obtención y caracterización de la sonda del bPLII	65
22. Identificación de los genes relacionados a PL por hibridación	66
23. Avance de la secuenciación del gen	71

NOMENCLATURA

AMPc	Adenosina monofosfato cíclico
Amp ^r	Gen para β-lactamasa
β-Gal	Gen para β-galactosidasa
° C	Grados centígrados
cbp	Cuanto baste para
cm ²	Centímetros cuadrados
dATP	Desoxiadenosina trifosfato
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DNAc	DNA complementario al RNA
DNAg	DNA genómico
dNTPs	Desoxirribonucleosidos trifosfato
DO	Densidad óptica
EDTA	Ácido etilen-diamino-tetra-acético
g	Gramos
GH	Hormona del crecimiento
IPTG	Isopropil-tio-β-D-galactosa
kDa	Kilodaltons
Kpb	Kilopares de bases
L	Litros
LH	Hormona leutinizante
M	Concentración molar
mg	Miligramos

min	Minuto(s)
ml	Mililitros
mM	Concentración milimolar
μg	Microgramos
μl	Microlitros
μM	Concentración micromolar
N	Concentración normal
ng	Nanogramos
nm	Nanómetro
PA	Producto amplificado
pb	Pares de bases
PCR	Reacción en Cadena de la Polimerasa
pH	$-\log[H^+]$
PL	Lactógeno placentario
PRL	Prolactina
RNA	Ácido ribonucleico
rpm	Revoluciones por minuto
RT	Retrotranscripción
s	Segundo(s)
SDS	Lauril sulfato de sodio
Taq	DNA polimerasa de <i>Thermus aquaticus</i>
Tm	Temperatura de alineamiento
U	Unidades internacionales de enzima

V	Voltios
X	Veces la concentración
X-Gal	5-bromo-4-cloro-3-indolil- β -D-galactósa

RESUMEN

Facultad de Medicina de la U.A.N.L.

L.A.Q.B. Rafael González Alvarez

Título del Estudio: ESTUDIO MOLECULAR DEL GEN DE LA PROLACTINA EN EL GATO DOMÉSTICO (*Felis catus*).

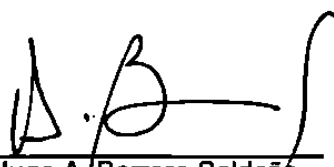
Número de páginas: 88

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

Objetivo y método del estudio. La familia de la GH/PRL/PL incluye a los genes de hormona del crecimiento (GH), lactógeno placentario (PL), prolactina (PRL), proteínas relacionadas o semejantes a PRL (PRP ó PLP), proliferina (PLF) y somatolactina (SL); así como también algunos pseudogenes. La Prolactina (PRL) es una hormona hipofisiaria presente en todos los vertebrados. Originalmente, la PRL fue caracterizada por su habilidad de estimular el crecimiento y desarrollo de la glándula mamaria, así como la producción de leche en las hembras de mamíferos. Sin embargo, la PRL es la hormona hipofisiaria que más funciones tiene por sí sola. En las diferentes especies de vertebrados, se le han atribuido aproximadamente 85 funciones diferentes agrupadas en 6 categorías. Además de expresarse en hipófisis, la PRL se expresa también en: placenta, varias regiones del cerebro, glándulas lagrimales y sudoríparas. Poco se sabe de la existencia de proteínas relacionadas a la familia GH-PRL en tejido placentario de órdenes de mamíferos, con excepción de los roedores y bovinos. En estos dos grupos, el gen de la PRL se duplicó varias veces, generando más de 15 genes relacionados, de los cuales los PLs y las PLPs han sido los más estudiados. Poco se conoce hasta la fecha sobre los eventos de duplicación que generaron esta familia multigénica en roedores y rumiantes. Además, no existe reporte de genes completos de PRL, en mamíferos parte del gen humano, por lo cual el reporte de nuevas secuencias en mamíferos no primates permitirá completar y precisar la evolución de este gen. Este trabajo se enfocó a describir el gen de la PRL y evidenciar o descartar la presencia de genes relacionados a PRL en el gato doméstico (*Felis catus*).

Conclusiones y contribuciones. De una clona fágica previamente aislada en la ULIEG, se logró obtener una subclona que incluye 506 pb del promotor proximal hasta el segundo intrón del gen. Por PCR-largo se amplificó una banda de entre 9 y 10 Kpb que corresponde a la totalidad de la unidad transcripcional, ésta se clonó en dos fragmentos en pBS-SK+. A partir de las clonas obtenidas se amplificaron los intrones, los cuales tienen un tamaño homogéneo de alrededor de 2 Kbp, mientras que los intrones del gen humano presentan tamaños más heterogéneos, por la inserción de secuencias repetitivas *Alu*. La comparación de la región promotora del gen de PRL del gato con las previamente reportadas para el bovino y el humano, mostró una gran similitud, lo cual sugiere la conservación de los mecanismos de regulación de la expresión de estos genes. Este trabajo constituye el primer reporte de un gen completo de PRL para una especie de mamífero no primate. Al hibridar los productos amplificados con la sonda de PL se obtuvo señal con varios amplicones de rumiantes, lo que confirmó que estos iniciadores permiten amplificar genes de PL. Además se observaron también varias bandas alrededor de 3 y 5 Kpb que hibridaron en el caso de los carnívoros. Estos resultados confirman la evidencia de que existen genes relacionados a PL en carnívoros, y demuestran que en el orden Carnívora hubo también duplicación del gen de la PRL. Este estudio abre una amplia línea de investigación sobre la expresión de estos genes y su función en el desarrollo de la placenta y del feto.


Dra. Agnès Revol de Mendoza
Director


Dr. Hugo A. Barrera Saldaña
Co-Director