

CAPITULO I

INTRODUCCIÓN

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, ambos pueden divergir 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 una misma secuencia ancestral integran una familia multigénica (1). 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 actina, los de hormona del crecimiento y los de globinas, entre otras (2).

Los miembros de la familia pueden permanecer juntos o dispersarse en diferentes cromosomas. Por lo general, los miembros de una familia de genes tienen funciones relacionadas o idénticas, aunque se pueden expresar a 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/PL.

La familia de la hormona del crecimiento (GH) y la prolactina (PRL) incluye a los genes del lactógeno placentario (PL), proliferina (PLF), proteínas relacionadas a prolactina (PRP), proteínas semejantes a prolactina (PLP), somatolactina (SL) y algunos pseudogenes. Esta familia multigénica representa uno de los grupos proteicos fisiológicamente más diversos que han evolucionado por duplicación génica (3). En la mayoría de las especies de vertebrados, la GH y la PRL son expresadas en la hipófisis, así como también la SL, pero a la fecha solo se ha reportado la existencia de esta última en algunas especies de peces (4). El resto de los genes que conforman la familia han sido reportados solo en mamíferos y su expresión se restringe a la placenta. Por tal razón, esta familia es un excelente modelo para realizar estudios evolutivos y de expresión específica de tejido (5).

1.3 Evolución de la familia GH/PRL/PL.

En mamíferos, son tres los órdenes (primates, rumiantes y roedores), en los cuales esta familia ha sido ampliamente estudiada. El análisis de la secuencia de estos genes ha permitido establecer que al menos dos series de duplicaciones fueron necesarias para la formación de esta familia (Figura 1). En la primera, la GH y la PRL divergieron de un gen ancestral común hace >400 millones de años y ambos genes evolucionaron independientemente

segregándose en cromosomas diferentes. Un segundo evento de duplicación dio lugar a la formación de los lactógenos placentarios, siendo el origen evolutivo de éstos de particular interés, ya que en primates estas hormonas están más relacionadas al gen de GH, en tanto que en roedores y rumiantes, tienen una estrecha similitud con el de la PRL. Nuevamente, la co-localización cromosómica de estos genes ya sea con los genes GH o PRL apoya el origen diferente de los genes PLs en diferentes órdenes (6).

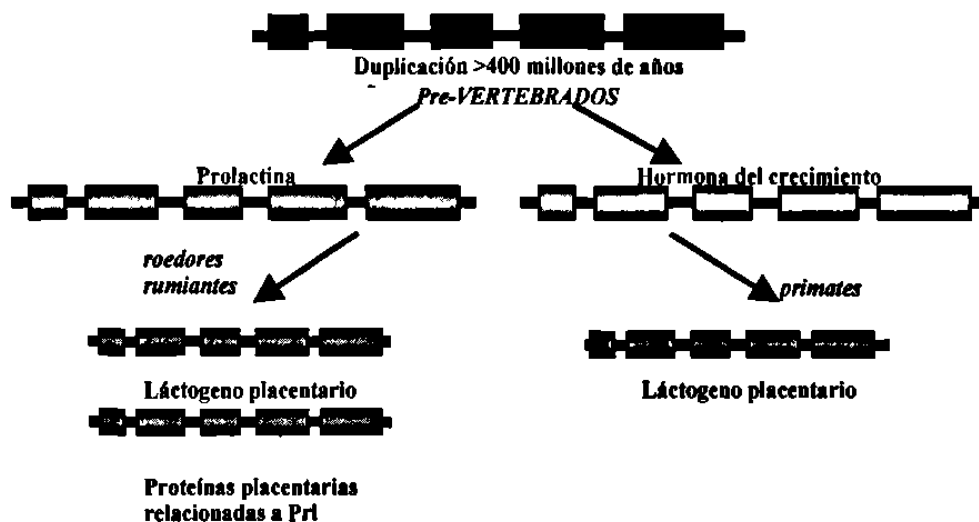


Figura 1. Orígenes de los PLs. En la figura se esquematizan los eventos de duplicación que dieron origen a la familia multigénica en diferentes órdenes de mamíferos. Los PLs derivaron del gen de la PRL en roedores y rumiantes, mientras que en primates se generaron a partir del gen de la GH.

1.4 Prolactina.

En el humano el gen que codifica para la prolactina (PRL) se encuentra localizado en el cromosoma 6, está compuesto por 5 exones y 4 intrones y se extiende sobre una longitud de aproximadamente 10 Kpb (7). El DNAC de la PRL consta de 914 nucleótidos, incluye una secuencia codificante de 681

nucleótidos que codifican para una prehormona de 227 residuos de aminoácidos con un péptido señal de 28 aminoácidos (8). La proteína madura contiene 199 residuos de aminoácidos y tiene una masa molecular de aproximadamente 23 KDa.

Los estudios de la estructura secundaria de la PRL indicaron que esta hormona está compuesta aproximadamente en un 50% por hélices- α , mientras que el resto no tiene una organización estructural definida (9). Los estudios de cristalografía de rayos X para definir la estructura tridimensional de la PRL a la fecha han sido infructuosos, sin embargo en base a su relación con la GH se propone un modelo similar (10).

La PRL está presente en todos los vertebrados y en varias especies sus DNAs han sido clonados y secuenciados (11). Todas las PRLs identificadas contienen entre 197 y 199 residuos de aminoácidos a excepción de los peces, cuyas PRLs son más cortas que las de los mamíferos (12).

1.4.1 Fisiología de la prolactina.

La PRL es la hormona hipofisiaria que más funciones tiene por sí sola. Originalmente la PRL fue caracterizada por su habilidad a estimular el crecimiento y desarrollo de la glándula mamaria, así como la producción de leche (13). Estudios subsecuentes le atribuyeron a lo largo de los vertebrados aproximadamente 85 funciones diferentes agrupadas en 6 categorías: 1) equilibrio hídrico y electrolítico, 2) crecimiento y desarrollo, 3) endocrinología y

metabolismo, 4) cerebro y conducta, 5) reproducción y 6) inmunoregulación y protección.

1.4.1.1 Equilibrio hídrico y electrolítico.

El balance hídrico y la regulación de la concentración de sales es un aspecto esencial en la homeostasis de todos los seres vivos y en especial de aquellos que viven en ambientes muy secos como también para los que viven dentro del agua. Está claramente demostrado que la PRL está involucrada en el proceso del balance electrolítico, aun en el caso de los mamíferos terrestres, en los que el receptor de PRL (PRLR), se encuentra en el riñón y otros tejidos involucrados en el balance hídrico, donde actúa reduciendo la excreción de Na^+ y K^+ .

El problema de la osmoregulación es crítico para los peces que migran de agua dulce al océano. En el ambiente marino los peces beben enormes cantidades de agua para reemplazar iones y líquido perdido por ósmosis a través de las branquias. En agua dulce los fluidos corporales de los peces son hipertónicos respecto al ambiente exterior, trayendo como consecuencia una entrada de agua en los tejidos y una disminución en la concentración de iones. El proceso de adaptación requiere que las branquias retengan más sales y además que el riñón elimine el exceso de agua. El papel de la PRL es reducir la pérdida de sodio y la entrada de agua por las branquias (14).

1.4.1.2 Crecimiento y desarrollo.

Una larga lista de funciones relacionadas con el desarrollo y crecimiento se ha asociado a la PRL en vertebrados inferiores, mientras que en mamíferos la

hormona se relaciona más con la proliferación celular. A continuación se ejemplifica esta variedad de funciones, las cuales varían de una especie a otra (15).

Crecimiento corporal y metamorfosis.

Si bien en humanos este fenómeno está más asociado a la hormona del crecimiento, en aves tratadas con la PRL se ha observado un aumento en el tamaño y peso del animal respecto a las aves que no recibieron el tratamiento (16).

Crecimiento y metamorfosis.

En anfibios la PRL presenta un efecto antimetamorfótico ampliamente estudiado (17), siendo la responsable del desarrollo y crecimiento de las branquias en larvas de peces (18).

Proliferación celular.

Son muchos los efectos de la PRL relacionados con la proliferación celular y la diferenciación, siendo la piel el principal tejido blanco. En reptiles y anfibios, la PRL es la principal responsable de la mudación de piel, mientras que en peces y mamíferos esta hormona estimula el crecimiento de los melanocitos. En venados, cabras y hámster, la PRL ha sido implicada en el crecimiento y caída de pelo en las diferentes estaciones del año (19).

Diferenciación y desarrollo.

Adicionalmente al efecto antimetamorfótico de la PRL, se ha demostrado que ésta induce la maduración de los pulmones estimulando la producción del factor surfactante, maduración de las células germinales y desarrollo de células dopaminérgicas hipotalámicas (20).

Crecimiento de tumores.

La PRL se asocia de manera directa o indirecta en el desarrollo de algunos tumores, como es el caso del cáncer de mama (21).

1.4.1.3 Endocrinología y metabolismo.

En cerebro de mono se ha demostrado que la PRL estimula la modulación de la actividad de las ATPasas. Las ATPasas dependientes de Na^+ y K^+ son estimuladas por la hormona, mientras que ATPasas dependientes de Mg^{++} y Ca^{++} son reprimidas.

En el metabolismo de lípidos, a nivel del feto, la PRL estimula la síntesis de fosfolípidos en el pulmón mientras que en hígado promueve la actividad de las lipasas (22). En varias clases de vertebrados la PRL tiene un efecto en el metabolismo de los carbohidratos, en especial en la actividad de las enzimas involucradas en la vía de la glucólisis (23). Finalmente, la PRL tiene efecto directo sobre la función pancreática, estimulando la secreción de insulina (24).

1.4.1.4 Cerebro y conducta.

Existen receptores de PRL en diferentes áreas del cerebro y se le han atribuido funciones de neurotransmisor. La PRL está relacionada con la conducta de peces, aves y mamíferos. En peces está implicada con la agitación de las aletas sobre los huevecillos con el fin de proveer a éstos agua fresca y de estimular la producción de moco. En aves se asocia con el fenómeno de migración. Finalmente en mamíferos, durante el embarazo uno de los cambios del sistema endocrino mas notorios es el aumento en la circulación de PRL y PL, que se asocia con el desarrollo del instinto materno (25).

1.4.1.5 Reproducción.

Las funciones de la PRL relacionadas con la reproducción, encabezan la lista de las más ampliamente estudiadas y mejor comprendidas. Estas se han agrupado en diferentes subcategorías.

Lactación.

La función mejor entendida de la hormona es la relacionada con el crecimiento, desarrollo y función de la glándula mamaria, así como con el inicio y establecimiento de la lactación. Aunque los requerimientos hormonales para el mantenimiento de la producción de leche varían de una especie a otra, la PRL es el factor común para la síntesis de proteínas y carbohidratos de la leche (26).

Funciones en el sistema reproductor.

En general, la PRL actúa sobre el cuerpo lúteo estimulando la síntesis de progesterona, la cual es un factor determinante para la fertilización, implantación y mantenimiento del embarazo (27). Paralelamente en el útero, la PRL incrementa la cantidad de receptores de progesterona potenciando todas las funciones de esta hormona esteroidea. Adicionalmente, la PRL promueve la implantación del blastocisto (28). En la mayoría de los mamíferos machos, la PRL incrementa la actividad testicular, mantiene la morfología celular, aumenta el número de receptores para LH y aumenta la síntesis de esteroides y andrógenos. A nivel de las células germinales, la PRL aumenta la cantidad de lípidos y acelera la conversión de espermatocitos a espermatozoides (29).

1.4.1.6 Inmunoregulación y protección.

En general, la PRL induce la proliferación de linfocitos donde potencia la respuesta inmune celular y humoral mediante la producción de anticuerpos de las clases IgG e IgM, aumenta la cantidad de receptores para interleucina 2 (IL-2) y finalmente inhibe la apoptosis (30).

La PRL induce la producción del factor XII de la coagulación (31), participando así en los mecanismos de protección del organismo. Cabe mencionar que la PRL juega un papel muy importante en la inmunoregulación y defensa, ya que la neutralización de la hormona es letal (32).

1.4.2 Prolactina extrapituitaria.

El gen de la PRL además de expresarse en hipófisis, se expresa adicionalmente en varios sitios como: cerebro, decidua, miometrium, glándula lacrimal, timo, baso, linfocitos circulantes, células linfoides de medula ósea, células epiteliales de glándula mamaria, tumores de glándula mamaria, fibroblastos de la piel y glándulas sudoríparas. Adicionalmente, la PRL puede encontrarse en diferentes fluidos corporales como: suero, líquido amniótico, lagrimas, leche y sudor (33).

Las ratas a las que se les practicó una resección hipofisiaria, mantienen aproximadamente el 20% de las funciones relacionadas con la PRL y llegan a recuperar el 50% de dichas funciones con el paso del tiempo. A estas mismas ratas, un tratamiento con anticuerpos anti-PRL provoca una disfunción inmune y la muerte, quedando así de manifiesto que la PRL extrapituitaria es importante y puede suplir la PRL producida en la pituitaria (32). La PRL que se produce en la pituitaria actúa por la vía endocrina clásica, es decir, es secretada por la glándula, transportada por el sistema circulatorio y actúa en sus células blanco mediante la unión a su receptor localizado en la membrana plasmática. Al contrario, la PRL extrapituitaria puede actuar en forma autocrina o parácrina, ya sea como un factor de crecimiento, neurotransmisor o inmunomodulador. Independientemente de la vía de acción que use, la PRL extrapituitaria finalmente desencadena las funciones antes mencionadas (34).

1.4.3 Expresión del gen de la prolactina.

El gen de la PRL se expresa principalmente en la pituitaria, específicamente en las células llamadas lactótrofos de esta glándula. Pit-1 es el factor transcripcional específico de tejido responsable de la transcripción de los genes de la PRL y de la hormona del crecimiento (GH) en pituitaria durante el desarrollo de ésta, así como en el organismo maduro.

El promotor del gen de la PRL contiene múltiples sitios de unión a Pit-1 implicados en la expresión específica del gen, además de elementos de respuesta a hormonas y otros factores. Los sitios de unión a Pit-1, más particularmente el sitio proximal 1P, también han sido involucrado en la respuesta del gen a hormonas (TRH) y a otros factores como Ca^{++} y AMPc (35).

En el humano, la PRL también se expresa en placenta y en células de las glándulas mamarias y linfoides. En estas células la transcripción inicia en el exón 1A localizado aproximadamente a 5.7 Kpb río arriba del sitio de inicio del transcrito hipofisiario de PRL. En estas células la expresión de la PRL no requiere de la unión de Pit-1, por lo que tal vez la expresión esté regulada por elementos localizados en el intrón 1A que reclutan factores transcripcionales específicos de tejido o por las características de la cromatina de las células que la expresan (36).

1.5 Lactógenos Placentarios y Proteínas Relacionadas a Prolactina.

La duplicación del gen de la prolactina durante la evolución de los mamíferos ha dado lugar a una amplia variedad de proteínas relacionadas a prolactina y de

lactógenos placentarios (PLs), ambos expresados principalmente en placenta (37).

La clonación y el análisis de los genes de la familia de la PRL en especies ubicadas en órdenes diferentes al de primates, permitió establecer que los PLs, en al menos dos de los órdenes estudiados (roedores y rumiantes-artiodáctilos), se derivaron del gen de la PRL (38). Uno de los primeros indicios fue el reporte de la identificación, clonación y caracterización a partir de placenta de rata de una nueva proteína de 29 kDa perteneciente a la familia GH/PRL, que presentaba reacción cruzada con anticuerpos dirigidos contra prolactina de rata y contra prolactina humana (39). Poco se sabe de las funciones que estos miembros de la familia de la PRL pudieran tener.

En el humano existe una fuerte asociación entre la concentración de PL humano (HPL), el peso de la placenta y el peso del producto al nacer (40). El nombre del PL proviene de su capacidad lactogénica al ser inyectado a conejas (41), pero en humanos no se ha observado tal capacidad, aunque se sabe que produce proliferación celular *in vitro* en tejido de glándulas mamarias (42). La liberación de HPL por el sincitiotrofoblasto es regulada por diferentes factores como la insulina, el factor de crecimiento epidérmico y el factor parecido a insulina del tipo I (IGF-I) (43 y 44). También se ha demostrado que las lipoproteínas de alto peso molecular influyen en los mecanismos de liberación de la hormona (45).

HPL tiene actividad sobre el metabolismo materno como antagonista de la insulina y produce intolerancia a la glucosa, causando retención de nitrógeno durante el embarazo (41 y 46). También puede acelerar la lipólisis (47 y 48), por

lo que se piensa que pueden servir para liberar ácidos grasos durante la gestación, para asegurar el suministro de energía al feto (49 y 50).

A nivel del feto en fibroblastos dérmicos, mioblastos, hepatocitos y explantes pancreáticos, se observó que HPL promueve la liberación de IGF-I e IGF-II y esto acompaña la síntesis de DNA (51, 52 y 53). *In vitro*, esta hormona aumenta la secreción de insulina pancreática y el transporte de aminoácidos en fibroblastos fetales (54).

En ovejas, los PLs estimulan la ornitina descarboxilasa y la síntesis de glucógeno. Estas hormonas inhiben la glucogenólisis en explantes fetales de hígado y hepatocitos aislados de rata o borrego (55 y 56). Adicionalmente, se ha observado que los PLs ovinos tienen la capacidad de estimular la secreción de progesterona del cuerpo lúteo de útero de porcinos (57).

La familia de proteínas relacionadas a prolactina, representa un amplio grupo de hormonas expresadas en pituitaria anterior, útero, placenta y células linfoides, cuya importancia radica en el establecimiento y mantenimiento del embarazo. En base a su papel biológico y regulación de su expresión, los miembros de esta familia, se clasificaron en dos grupos. El primero agrupa a las "Prl-like clásicas", cuya función está relacionada con el desarrollo y función de la glándula mamaria (58). El segundo grupo incluye las "Prl-like no clásicas", que contribuyen a la modulación vascular en la interfase materno-fetal, al control del origen de las células hematopoyéticas y en los mecanismos inmunes e inflamatorios (58).

1.5.1 La familia de proteínas relacionadas a prolactina en roedores.

En roedores, la familia de las proteínas relacionadas a prolactina está integrada por 15 miembros diferentes, los cuales se expresan en pituitaria, útero y placenta. Estas proteínas presentan un patrón de expresión diferencial en cuanto a las células que las producen y al período de gestación. La mayoría de ellas aumenta su producción en forma gradual desde el implante del embrión hasta el parto. Mientras que las células productoras son, en la primera mitad de la gestación las pertenecientes a la decidua, en la segunda mitad del embarazo, son las del corion (59).

Por ejemplo, los niveles de expresión de PLP-L aumentan durante los días 11 al 20, mientras que PLP-M se expresa en mayor cantidad durante los días 11 al 13. Ambos genes son expresados por las células invasivas de los trofoblastos y su expresión en los vasos de la placenta es un marcador molecular del proceso de placentación, abriendo así un amplio campo de estudio del papel fisiológico de estas proteínas en el desarrollo de la gestación (60). PLP-J es una de las excepciones al patrón de expresión antes descrito, ya que, los niveles más altos se observan en el inicio de la gestación hasta el día 7, luego alrededor del día 9 la expresión decae considerablemente, hasta hacerse indetectable el día 11 de la gestación (61).

Los genes de las proteínas relacionadas a PRL están integrados por 5 exones y 4 intrones, a excepción de la subfamilia Prl-like tipo C (PLP-C), cuyos miembros poseen 6 exones y 5 intrones (62).

El gen de PLP-A miembro "no clásico de las prolactinas-like", se localiza en el cromosoma 13 y contiene 5 exones con 4 intrones, midiendo 6.9 Kpb (Figura 2).

Se expresa en los trofoblastos durante el desarrollo del corion de la placenta y su producto proteico participa en el control de la respuesta inmune materna como prerrequisito del establecimiento del embarazo, mediante interacciones específicas con las células NK del útero (63).

PLP-C α , un miembro más de las PRPs en ratas, se localiza en el cromosoma 17, tiene 6 exones y 5 intrones, su longitud es de 5.7 Kpb y se expresa en el corion de la placenta a partir del día 13 hasta el día 19 del embarazo. El exón adicional codifica para un dominio aromático, es decir, una región rica en aminoácidos aromáticos, conservado en todos los miembros de la familia de las PLP-C α s(62). En la actualidad se cuenta únicamente con estas 2 secuencias completas de proteínas relacionadas y semejantes a prolactina (Figura 2).

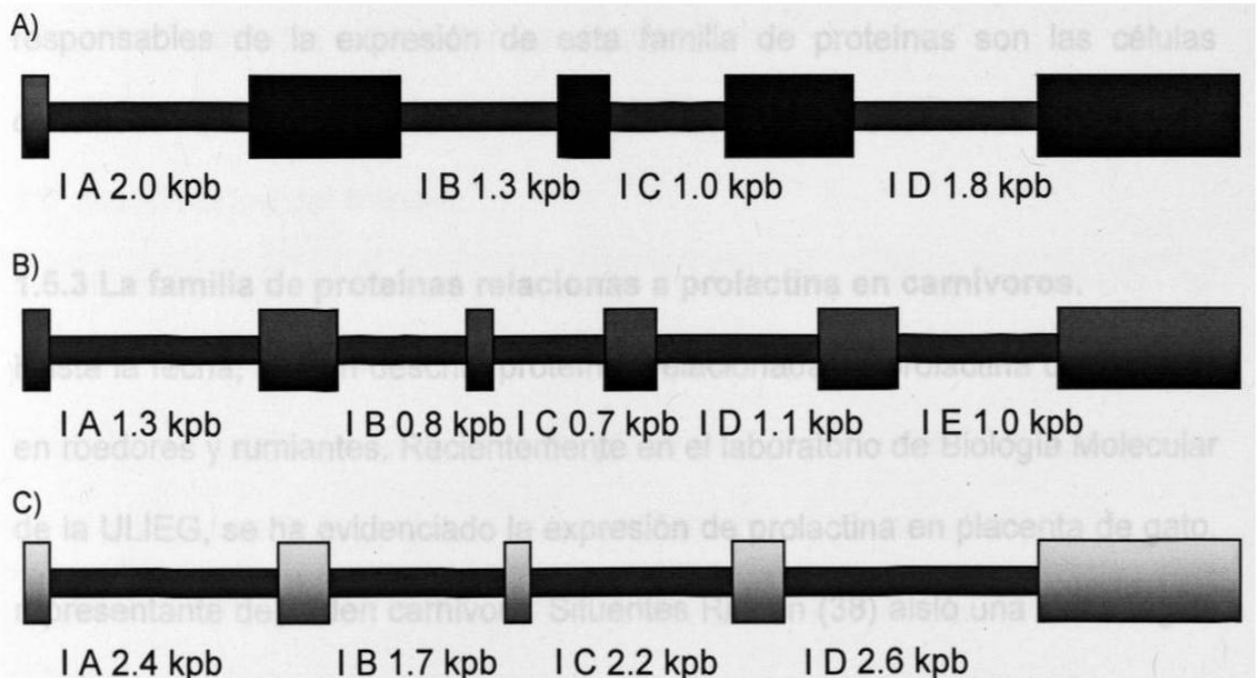


Figura 2. Estructura de los genes de PRL y Prls-like. Se esquematiza la organización exón-intrón de los genes reportados para A) PLP-A (63), B) PRP-C α (58) y C) el gen de la PRL humana.

1.5.2 La familia de proteínas relacionadas a prolactina en rumiantes.

Al igual que en roedores, existen reportes de miembros de la familia de proteínas relacionadas a prolactina en rumiantes. Las secuencias provinieron de tamizajes de bibliotecas de DNAs de placenta bovina. Estas proteínas muestran una similitud aminoacídica entre 43 a 51% con respecto a la propia PRL (64). En un principio se describió la organización génica de 4 miembros de esta familia, que fueron nombrados PRP1, PRP3, PRP6 y PRP10. Estas tienen un alto grado de similitud entre ellas mismas y con los lactógenos placentarios (PLs).

En ovinos, una especie más de rumiantes, también hay proteínas relacionadas a prolactina en placenta. Al igual que en bovinos, las Prl-like ovinas presentan un alto grado de similitud entre sí y con los propios PLs. Las células responsables de la expresión de esta familia de proteínas son las células coriónicas binucleadas, pero su función continua siendo desconocida (65).

1.5.3 La familia de proteínas relacionadas a prolactina en carnívoros.

Hasta la fecha, se han descrito proteínas relacionadas a prolactina únicamente en roedores y rumiantes. Recientemente en el laboratorio de Biología Molecular de la ULIEG, se ha evidenciado la expresión de prolactina en placenta de gato, representante del orden carnívora. Sifuentes Rincón (38) aisló una clona fágica (λ PRP-1) a partir de una biblioteca genómica del gato, que hibridaba con el DNAc de PRL. Del inserto de 17 Kpb, se subclonó en el pBS-SK+ un fragmento de 2.9 Kpb que correspondió al exón IV del gen de PRL y parte de los intrones

flanqueantes (66). Además, el análisis por RT-PCR de los RNAs de placenta de gato permitió clonar una pequeña secuencia nucleotídica (de aproximadamente 200 pares de bases), que híbrida con una sonda de PRL hipofisiaria de gato y presenta cierta similitud con el lactógeno placentario bovino II (bPL II). Sin embargo, a la fecha, no se han evidenciado genes de proteínas relacionadas a PRL y mucho menos existe reporte de alguna secuencia de este tipo, en los carnívoros (38).

Aunque son varios los reportes de DNAs de PRLs y PRPs, los reportes de secuencias de genes completos se limitan sólo al de PRL humana y dos de PRPs en roedores.

El factor común en la anatomía de estos genes es el gran tamaño de los intrones, respecto a los exones (Figura 2), lo cual podría explicar el número pequeño de reportes que existen para estos genes.

1.6 Justificación del trabajo.

La familia GH-PRL-PL constituye un buen modelo para estudiar la evolución del genoma. La clonación y análisis de los genes de esta familia en especies ubicadas en órdenes diferentes al de primates, permitió establecer que los PLs en al menos dos de los órdenes estudiados (roedores y rumiantes-artiodáctilos), se derivaron del gen de la PRL. Sin embargo, poco se sabe de la existencia de proteínas relacionadas a la familia GH-PRL en tejido placentario de órdenes de mamíferos diferentes a los antes descritos.

Los resultados obtenidos por Sifuentes Rincón (38) sugieren que los eventos de duplicación del gen de la prolactina se dieron también en los carnívoros. Para

complementar el trabajo anterior se propuso estudiar la familia de la prolactina en el gato, para evidenciar o descartar la duplicación del gen en los carnívoros. Además, poco se conoce sobre la estructura de los genes de la familia de la prolactina, ya que solamente se han reportado tres secuencias completas de estos genes, siendo sólo uno de prolactina, por lo cual, el reporte de otros genes de prolactina en especies de mamíferos no primates permitirá completar el estudio evolutivo de este gen y de esta familia génica.

CAPITULO II

OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GENERAL.

Estudiar la familia del gen de la prolactina en el gato doméstico (*Felis catus*).

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.

2.2.1. Obtener y caracterizar el gen de la prolactina del gato.

2.2.1.1 Determinar la secuencia nucleotídica del gen.

2.2.1.2 Definir su organización génica.

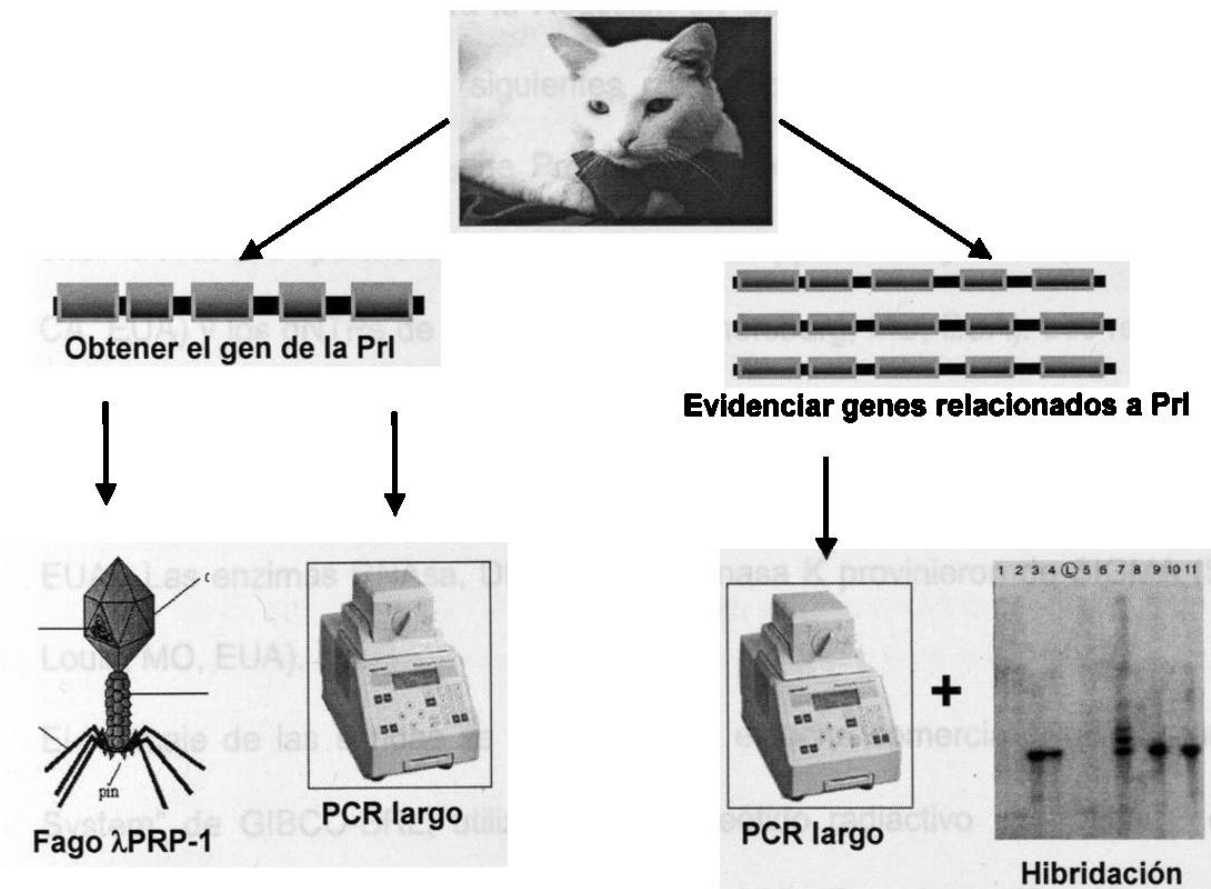
2.2.1.3 Realizar un análisis comparativo de la secuencia obtenida con las reportadas en el GenBank.

2.2.2. Investigar la posible existencia de genes relacionados a PRL en el gato doméstico.

CAPITULO III

ESTRATEGIA GENERAL

La estrategia general comprendió las siguientes etapas:



CAPITULO IV

MATERIALES Y METODOS

4.1 Material

4.1.1 Origen de los reactivos

Los reactivos utilizados para la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) fueron obtenidos de las siguientes casas comerciales: la enzima DNA polimerasa Taq y el $MgCl_2$ de Promega Corporation (Madison, Wi, EUA), la enzima rTth DNA polimerasa y el $Mg(OAc)_2$ de Applied Biosystems (Foster City, CA, EUA) y los dNTPs de GIBCO-BRL (Gaithersburg, MD, EUA). Los reactivos para la RT-PCR, enzimas de restricción y los iniciadores M13 forward y reverso que se utilizaron fueron de GIBCO-BRL y New England Biolabs (Beverly, MA, EUA). Las enzimas RNAsa, DNAsa y Proteinasa K provinieron de SIGMA (St. Louis, MO, EUA).

El marcaje de las sondas se realizó con el estuche comercial "Rad Labeling System" de GIBCO-BRL, utilizando el nucleótido radiactivo $[\alpha\text{-P}^{32}]\text{dATP}$ de Amersham International (Buckinghamshire, UK). Para la purificación de la sonda se utilizó como coprecipitante Vivid Violet (CHIMERx LiCor, California, EUA).

La secuenciación se llevó a cabo con el estuche comercial de LiCor (California, EUA).

4.1.2 Material Biológico.

Los RNAs de hipófisis de gato y placenta de bovino, se obtuvieron del laboratorio de Biología Molecular de la ULIEG.

Para las clonaciones se utilizaron el plásmido 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.

El tejido de gato fue proporcionado por el Departamento de Fisiología y el laboratorio de Biología Molecular de la ULIEG.

La clona fágica λ PRP-1, había sido previamente obtenida por Sifuentes (38) a partir de una biblioteca genómica de gato. Su inserto es de aproximadamente 17 kpb e híbrida con una sonda de PRL hipofisiaria. Al digerirlo con las enzimas *Eco* RI y *Bam* HI, se producen 6 fragmentos de los cuales uno corresponde al exón 4, que fue subclonado en pBS-SK+ por Pérez Rodríguez (66).

La cepa de *E. coli* LE392 en la que se propago el fago provino del cepario de la ULIEG.

4.2 Equipo.

Para la realización de este trabajo se utilizó el siguiente equipo: un horno de microondas LG modelo MS-701C, microcentrífugas Eppendorf modelos 5402 y 5415 (Brinkmann Instruments, Inc. NY EUA), fuentes de poder ISCO 494 (ISCO, Nebraska, EUA), EC 600 (E-C Aparatus Corporation, St Petersburg, Florida) y BRL 250 (GIBCO-BRL), centrífuga Beckamnn allegra TM 21R modelo

367570, centrífuga Beckman modelo J2-M1, ultracentrífuga Beckman modelo TLX 120 (Beckman Scientific Instruments División Fullerton, CA, EUA), un agitador de tubos Bamstead Termolyne modelo Maxi Mix (Bubuque, IOWA, EUA), una placa agitadora con control de temperatura marca Corning modelo PC320 (N.Y. EUA) un secuenciador automático dNA sequencer Long Reader 4200 (LI-COR, CA, 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. EUA), una incubadora de hibridación modelo 310 (Robbins Scientific Co. Sunnyvale, CA, EUA).

El seguimiento del crecimiento bacteriano se realizó con un espectrofotómetro de la marca Beckman modelo DU-70 (Scientific Instruments Division Fullerton, CA, EUA). Los reactivos se almacenaron en un congelador marca TorRey (Mty, Mex). Los termocicladores utilizados fueron los modelos MJ Research PT150 y PT100 (Watertown, Mass, EUA), el de Perkin Elmer 2400, Hybaid PCR Express y 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 2000 (©1983-1999 Microsoft Corporation), procesador de graficos *Microsoft Power Point* versión 2000 (©1983-1999 Microsoft Corporation), *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 1.3 (Ch Merk and C.E.A. 1999, Service de Biochimie-Département de Biologie, Institut de Recherche Fondamentale, CEA, France), OLIGO versión 4.0 (© 1992 Wojciech Rychlik, National Bioscience Inc., Plymouth, MN, EUA), CLUSTAL W versión 1.5 (Multiple Sequence Alignments) y Phylip (Phylogeny Inference Package, version 3.5c Department of Genetics, University of Washington, Seattle, EUA).

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

4.3 Métodos.

4.3.1 Obtención del DNA fágico.

El DNA fágico de la clona λ PRP-1, se obtuvo a partir de una producción a gran escala de las partículas (67).

4.3.1.1 Titulación de las partículas fágicas.

Se tomaron 0.3 ml de bacterias *E. coli* de la cepa LE392 crecidas la noche anterior en medio NZCY (NZ amina 10 g/L, casamino ácidos 1 g/L, extracto de levadura 5g/L, cloruro de sodio 5 g/L, sulfato de magnesio heptahidratado 2g/L, pH 7.5), se mezclaron con 100 μ l de $MgSO_4$ 1 M y 10 μ l del stock de fago λ PRP-1 y se incubaron a 37 °C durante 30 min. Después de agregar 50 ml de medio NZCY, la infección se dejó desarrollar toda la noche a 37 °C con

agitación constante. Al día siguiente (cuando el lisado de células se veía flotar en el medio) se agregaron 5 gotas de cloroformo y los restos celulares se centrifugaron a 10,000 rpm durante 30 min para recuperar los fagos en el sobrenadante.

Las partículas fágicas se titularon realizándose una serie de diluciones de 10^{-3} a 10^{-9} del sobrenadante, usando el medio NZCY como diluyente hasta ajustar a un volumen de 100 μ l. Las diluciones se mezclaron con 4 ml de top agar (NZ amina 10 g/L, bacto-agar 15 g/L, casamino ácidos 1 g/L, extracto de levadura 5g/L, cloruro de sodio 5 g/L, sulfato de magnesio heptahidratado 2g/L, pH 7.5), manteniéndolo líquido a una temperatura de 50 °C. La mezcla (top-agar/fago) se vació sobre placas al medio NZCY sólido, se dejó solidificar el top agar sobre la placa y finalmente se dejaron crecer las bacterias junto con el fago a 37 °C durante toda la noche.

Al siguiente día se contaron las colonias lisadas (zonas claras) y se calculó el número de partículas fágicas por μ l.

4.3.1.2 Producción a gran escala.

Se utilizaron 10^6 partículas fágicas para infectar 2.5 ml de bacterias crecidas durante la noche anterior. La suspensión bacterias-fago se incubó durante 15 min a 37 °C. Transcurrido este tiempo, la suspensión se agregó a 500 ml de medio NZCY y se dejó crecer durante 12 horas a 37 °C en agitación constante. Al finalizar el tiempo se agregaron 15 g de NaCl a las bacterias lisadas y el frasco se dejó en agitación durante 20 min más, después se agregaron 1.5 ml

de cloroformo, continuando en agitación durante 5 min. Se dejó reposar el frasco durante 12 horas a 4 °C. Las bacterias se centrifugaron a 10,000 rpm durante 10 minutos a 4 °C, en el rotor JA-10 Beckman, al sobrenadante se le agregaron 50 g de polietilenglicol 8000 (PEG 8000) y se agitó constantemente hasta disolver el PEG 8000. La suspensión se dejó reposar durante 12 horas a 4 °C, y las partículas fágicas se centrifugaron a 8,000 rpm durante 15 min a 4 °C en el rotor JA-10 Beckman. La pastilla se colocó en hielo y ahí mismo se resuspendió en 20 ml de amortiguador (Tris-HCl 10 mM pH 7.6, NaCl 0.1 M). Los 20 ml de suspensión fueron mezclados con 20 ml más, del mismo amortiguador y centrifugados una vez más durante 10 min a 10,000 rpm a 4 °C. El sobrenadante fue recuperado y centrifugado durante 2 horas a 17,000 rpm a 4 °C en el rotor JA-17 Beckman. La pastilla se guardó en hielo y fue resuspendida en 1 ml de solución (NaCl 0.1 M, Tris-HCl 10 mM pH 7.6 y MgSO₄ 10 mM). La suspensión se dejó reposar toda una noche a 4 °C. Se lavó el tubo con la misma solución en que se resuspendió y se transfirió a un tubo Quick-Seal de Beckman de modo tal que el volumen total de la suspensión fuera de 1.5 ml. Se añadieron 1.5 ml de CsCl al 61% (p/p) y se mezcló por inversión, finalmente se agregó una sobrecapa de CsCl al 61 % y se selló el tubo. Se procedió a centrifugar durante 18 horas a 52,000 rpm a 20 °C en el rotor TLA 100.4 de Beckman.

La banda de fagos se observó aproximadamente a 1/3 del fondo del tubo. Se colectó perforando el tubo con una jeringa y succionando la banda fágica. Las partículas fágicas se almacenaron a 4 °C hasta la posterior extracción del DNA fágico.

4.3.1.3 Extracción de DNA fágico.

La suspensión de partículas fágicas se dializó a temperatura ambiente contra 100 veces su volumen original de una solución amortiguador (Tris-HCl 12.5 mM pH 7.4, NaCl 0.25 M y EDTA 1.25 mM). Se estimó el volumen de los fagos dializados, se agregó SDS a una concentración final de 0.1% y 1/100 volumen de proteinasa K (10 mg/ml). Se mezcló por inversión para dejar en digestión a 37 °C durante 30 minutos en agitación constante. Terminada la digestión, se realizó una extracción fenol/sevag (1/2 volumen de fenol y ½ de sevag, el cual consiste de cloroformo y alcohol isoamilico 24:1) del DNA fágico, la fase acuosa se separó por centrifugación. El DNA fágico se precipitó agregando dos volúmenes de etanol al 100% dejándolo 1 hora a – 70 °C y se colectó por centrifugación a 14,000 rpm durante 30 min. Se decantó el etanol, la pastilla se lavó con etanol al 70% y se resuspendió en TE al 1X (Tris-HCl 10 mM pH 8, EDTA 1 mM pH 8) y se guardó a – 20 °C hasta su posterior uso.

4.3.2 Extracción de DNA genómico.

Aproximadamente 100 mg de músculo de gato fueron triturados con un pistilo y 1 ml de solución de lisis (Tris-HCl 10 mM pH 8, NaCl 100 mM, EDTA 25mM pH 8, SDS 0.5 % y proteinasa K a 0.1 mg/ml). La digestión se llevó a cabo en el termomixer a 50 °C durante 18 horas con agitación constante. Después de la incubación, se procedió a realizar la extracción fenol/sevag, se agitó en el vortex y se centrifugo a 14,000 rpm durante 10 min. Se recupero la fase acuosa, el DNA se precipitó con ½ volumen de acetato de amonio al 7.5 M y 2 volúmenes de etanol al 100% frío. Se dejó reposar el DNA 1 hora a – 70 °C y el

tubo se centrifugó a 14,000 rpm por 30 min. La pastilla se lavó dos veces con etanol al 70%. La pastilla se dejó secar al aire, se resuspendió en TE 1X y se guardó a -20°C hasta su posterior uso.

4.3.3 Análisis y cuantificación de los DNAs.

4.3.3.1 Análisis electroforético del DNA fágico y genómico de gato.

Las muestras de DNA fágico y genómico de gato se corrieron en geles de agarosa al 0.8 %. La electroforesis se realizó a 100 V en TBE 1X (Tris-borato 45 mM, EDTA 1 mM) y las bandas fueron observadas tiñendo el gel en solución de bromuro de etidio a 2 $\mu\text{g/ml}$. El gel se analizó en el equipo Gel Doc para observar la calidad y cantidad de las muestras de DNA.

4.3.3.2 Cuantificación del DNA fágico y genómico de gato.

La cuantificación del DNA se realizó mediante el programa computacional *Molecular Analyst* del Gel Doc. La cantidad de DNA es cuantificada por la intensidad de fluorescencia de las bandas teñidas con bromuro de etidio. Este compuesto se intercala entre las bases del DNA y emite fluorescencia al ser excitado con luz ultravioleta. La fluorescencia emitida es proporcional a la cantidad de bromuro de etidio que se intercala, dependiendo así, de la cantidad y del tamaño del DNA. Se realizó una curva de calibración con diferentes cantidades de DNA estándar y de esta manera se determinó la concentración del DNA fágico y DNA genómico de gato.

4.3.4 Amplificación del gen de la PRL de gato.

4.3.4.1 Diseño de los iniciadores.

Varios iniciadores específicos se diseñaron a partir de la secuencia del DNAC de la PRL de gato previamente reportada en el GenBank (número de acceso U25974). El primer par flanqueando la unidad transcripcional, se diseñó especialmente para PCR largo, siendo los oligonucleótidos de una longitud entre 28 y 30 nucleótidos y con una Tm alrededor de los 70 °C.

Adicionalmente se diseñaron 5 iniciadores más para secuenciación, que se alinean sobre los exones 2, 3 y 4.

Otro par de iniciadores consenso, para PCR largo se diseñó a partir de secuencias reportadas de los DNACs de PRL, PL y PRPs de bovino, así como de la PRL de gato. Las secuencias se alinearon utilizando el programa CLUSTAL W para evidenciar las zonas más conservadas. Para el diseño de iniciadores consenso y específicos, respectivamente se utilizaron los programas computacionales OLIGO 4.0 y Amplify 5.1.

4.3.4.2 Estandarización del PCR largo.

La estandarización del PCR largo se realizó variando las concentraciones de DNA genómico, Mg⁺⁺, temperatura de alineamiento de los iniciadores y los tiempos de extensión, logrando así establecer las condiciones y el programa de amplificación siguiente:

Composición de la mezcla de reacción.

Mezcla inferior.

Componente de la PCR	Concentración final
Buffer II XL 3.3X	1X
dNTPs 10 mM	200 μ M
Iniciador 5PrlgatoC 5 μ M	0.4 μ M
Iniciador 3PrlgatoC 5 μ M	0.4 μ M
Mg(OAc) ₂ 25 mM	1.5 mM
H ₂ O MiliQ	cbp 20 μ l

Arriba de la mezcla inferior se depositó una perla de cera a cada tubo, para dar el "Hot Start" y se agregó la mezcla superior.

Mezcla superior.

Componente de la PCR	Concentración final
Buffer II XL 3.3X	1X
rTth pol. 2 U/ μ l	0.08 U/ μ l
DNAg	100 ng/50 μ l
H ₂ O MiliQ	cbp 30 μ l

Los tubos se sometieron al programa siguiente:

- | | |
|------------------------------|--|
| 1. Desnaturalización previa | 80 °C por 5 min "Hot Start" |
| 2. Desnaturalización inicial | 94 °C por 5 min |
| 3. 12 ciclos | 94 °C por 30 s
64 °C por 10 min |
| 4. 16 ciclos | 94 °C por 30 s
64 °C por 10 min, con incrementos de
15 s en cada ciclo |
| 5. Extensión prolongada | 72 °C por 15 min |

Los productos amplificados se corrieron en un gel de agarosa al 0.8% y se tiñeron con bromuro de etidio con la finalidad de visualizarlos y estimar el tamaño del producto amplificado, utilizando λ cortado con *Pst* I como marcador de peso molecular.

4.3.4.3 Caracterización del producto amplificado.

El producto amplificado (PA) fue caracterizado por digestión enzimática y amplificación añadida. La caracterización enzimática se llevó a cabo con diferentes enzimas de restricción (*Bam* HI, *Eco* RI, *Kpn* I, *Hinc* II, *Acc* I, *Xba* I y *Xma* I) siguiendo las instrucciones de la casa comercial (NEB). El PA se sometió a un segundo PCR largo utilizando el juego de iniciadores consenso que se aparean en el exón II (sentido) y exón V (antisentido).

4.3.5 Subclonación de los fragmentos fágicos.

4.3.5.1 Preparación del vector.

Las clonaciones se realizaron en el vector de clonación pBS SK + linearizado mediante una doble digestión con las enzimas *Eco* RI y *Bam* HI. La digestión se realizó en un volumen total de 20 μ l, utilizando 1 μ g de vector y siguiendo las indicaciones de la casa comercial (NEB). La digestión se incubó durante 12 horas a 37 °C.

4.3.5.2 Preparación del inserto.

De igual manera, el DNA fágico se sometió a una doble digestión con las enzimas *Eco* RI y *Bam* HI. Esta digestión produce 6 fragmentos, de los cuales dos, son los que hibridan con una sonda de PRL hipofisiaria de gato (38 y 66). La digestión se llevó a cabo en un volumen total de 20 μ l, durante 12 horas a 37 °C. Tanto la digestión del vector como la del DNA fágico se verificaron en un gel de agarosa al 0.8 %.

4.3.6 Clonación del PA del gen de la PRL de gato.

4.3.6.1 Preparación del vector.

2.5 μ g de vector pBS SK + fueron cortados mediante una doble digestión con las enzimas de restricción *Eco* RV y *Bam* HI. La reacción se realizó en un volumen de 50 μ l, a 37 °C durante 12 horas. Transcurrido este tiempo, se colocaron 5 μ l en un gel agarosa al 0.8% para verificar el corte.

4.3.6.2 Preparación del inserto.

El PA (1.5 µg), del gen de la PRL de gato fue digerido con *Bam* HI. La reacción se realizó en un volumen de 30 µl a 37 °C durante 12 horas. Terminada la incubación, se depositaron 10 µl en un gel de agarosa al 0.8% para verificar la digestión.

4.3.7 Ligación.

4.3.7.1 Ligación de los fragmentos fágicos.

Vector e inserto, productos de las dobles digestiones, se sometieron a una reacción de ligación con una relación vector:inserto de 3:1 respectivamente. El volumen total de la digestión fue de 20 µl y se usaron 2 U de T4 DNA ligasa. La reacción se incubó a 16 °C durante 14 horas. 10 µl de esta reacción se utilizaron para transformar 100 µl bacterias Top-10 Ca⁺⁺ competentes.

4.3.7.2 Ligación de los fragmentos del PA del gen.

El producto de PCR largo digerido con *Bam* HI y el pBS SK + (linearizado con *Bam* HI y *Eco* RV) se sometieron a ligación en un volumen final de 20 µl, con una relación vector: inserto de 1:1. La reacción se incubó a 16 °C durante toda la noche y la mitad de reacción se utilizó para transformar 100 µl de bacterias XL-1Blue Ca⁺⁺ competentes.

4.3.8 Transformación.

Para preparar las bacterias Ca^{++} competentes se utilizó una modificación del método de Inoue *et al.* (68) que se describe a continuación.

Una colonia de células Top-10 o XL-1Blue se inoculó en 4 ml de medio LB (bactotripton 1%, extracto de levadura 0.5%, NaCl 1% y en el caso de las XL-1Blue tetraciclina a $5\mu\text{g/ml}$). Las bacterias se dejaron crecer toda la noche a 37°C en agitación constante. Al día siguiente, se inoculó 1 ml de la semilla en 50 ml de medio LB fresco y las células se pusieron a crecer a 37°C en agitación constante hasta alcanzar una DO entre 0.4 y 0.6 a 600 nm. Una vez alcanzada la densidad óptica deseada, las bacterias se colocaron en hielo durante 30 min y se centrifugaron a 4,000 rpm durante 10 min a 4°C . El sobrenadante se desechó y las células se resuspendieron suavemente en 25 ml de CaCl_2 0.1 M frío. Las células se dejaron reposar en hielo durante 30 min y después se volvieron a centrifugar a 4,000 rpm por 10 min a 4°C . Se removió el sobrenadante y las células se resuspendieron suavemente en 2 ml de CaCl_2 frío.

Para la transformación se utilizaron 100 μl de bacterias y 10 μl de las reacciones de ligación, la mezcla se incubó durante 30 min a 4°C y el tubo se transfirió por 90 s a 42°C . Finalmente se agregaron 900 μl de medio LB y las células se incubaron en agitación a 37°C por 1 hora. Después el tubo se centrifugó por 1 min a 5,000 rpm, se descartó el medio dejando solo lo suficiente para resuspender la pastilla. A las células se les adicionaron 50 μl de X-gal 20 mM y 20 μl de IPTG 100 mM, se mezclaron completamente y se

plaquearon sobre placas con medio LB más ampicilina (60 $\mu\text{g/ml}$) y tetraciclina (10 $\mu\text{g/ml}$) para las bacterias XL-1 Blue, incubándolas a 37 $^{\circ}\text{C}$ por 16 horas. Las bacterias que recibieron el vector recombinante se seleccionaron por su fenotipo Amp^r, β -Gal^r, siendo las colonias blancas las de posible interés.

4.3.9 Análisis de las clonas recombinantes.

4.3.9.1 Extracción del DNA plasmídico.

La selección de las clonas recombinantes se realizó por el análisis de los insertos. Para eso las colonias seleccionadas se crecieron individualmente en 4 ml de medio LB + antibióticos (tetraciclina 10 $\mu\text{g/ml}$ y ampicilina 60 $\mu\text{g/ml}$ para las XL-1Blue y para las Top-10 solamente este último) a 37 $^{\circ}\text{C}$ con agitación durante toda una noche. Al día siguiente, se centrifugaron 3 ml del medio durante 2 min a 14,000 rpm y se removió el medio por aspiración, manteniendo el tubo en hielo. El DNA plasmídico se extrajo por el método de la lisis alcalina (69). Las células se resuspendieron en 100 μl de solución I (glucosa 50 mM, Tris-HCl 25 mM pH 8, EDTA 10 mM pH 8) con el vortex. 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. La solución se mezcló por inversión y se incubó en hielo por 5 min. Pasado este tiempo se agregaron 150 μl de solución III (acetato de amonio 7.5 M), se mezcló por inversión y se incubó por 5 min en hielo. El tubo se centrifugó a 14,000 rpm por 5 minutos, se recuperó el sobrenadante en un tubo nuevo donde se le hizo una extracción fenol/sevag ($\frac{1}{2}$ volumen de fenol y $\frac{1}{2}$ volumen de sevag). Se centrifugó a 14,000 rpm por 2 min, el sobrenadante se

transfirió un tubo donde el DNA plasmídico se precipitó con 2 volúmenes de etanol al 100% frío. Después de centrifugar a 14,000 rpm por 10 min, la pastilla se lavó dos veces con 1 ml de etanol al 70% frío y se dejó secar a temperatura ambiente durante 30 minutos, finalmente se resuspendió en 50 μ l de TE 1X.

4.3.9.2 Análisis de los insertos.

Los DNAs plasmídicos se corrieron en un gel de agarosa al 0.8%. Las clonas que presentaron una migración retardada respecto al pBS-SK+ se seleccionaron como posibles candidatas. Las clonas que contenían un inserto derivado del fago se pusieron a cortar con las enzimas *Eco* RI y *Bam* HI para liberar el fragmento clonado. Mientras que las clonas que contenían fragmentos provenientes del PCR largo se caracterizaron por PCR utilizando los iniciadores universales de pBS-SK+ (M13 forward y reverso) que se aparean en el plásmido flanqueando el inserto. Los productos de la digestión y de la PCR se corrieron en un gel de agarosa al 0.8 % para estimar el tamaño de los insertos.

4.3.10 Determinación y análisis de las secuencias nucleotídicas.

4.3.10.1 Determinación de la secuencia de las clonas.

La secuencia se determinó por secuenciación cíclica adaptando el método enzimático de Sanger (70). Los iniciadores que se utilizaron fueron el M13 reverso y forward que se aparean en el plásmido pBS-SK+ y los iniciadores internos diseñados sobre los exones del gen. 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 3.7 % - urea 50 %, utilizando el secuenciador LiCor DNA 2000.

4.3.10.2 Análisis de los intrones.

Para estimar el tamaño de los intrones se realizó un PCR con las clonas portadoras del gen de la PRL de gato, utilizando los iniciadores internos que se aparean sobre los exones. Los PA de los intrones fueron los que se subclonaron como se menciona a continuación.

4.3.10.3 Subclonación de los intrones.

Debido al tamaño muy grande de los intrones 1 y 2, se procedió a subclonarlos en el plásmido pBS-SK+. La estrategia que se siguió fue mediante sitios de restricción *Xba* I y *Xma* I para el intrón 1, mientras que para el intrón 2 fueron los sitios *Acc* I y *Eco* RI. Los sitios de restricción de los intrones se conocieron a medida que se avanzaba en la secuenciación.

4.3.10.4 Análisis de las secuencias nucleotídicas.

Una vez obtenidas las secuencias, éstas se mandaron a comparar vía Internet mediante el programa computacional BLAST con las secuencias reportadas en el GenBank. Se realizaron también alineamientos utilizando el programa computacional CLUSTAL W para organizar las secuencias que se iban generando y así definir la estructura del gen de la PRL de gato. La construcción de los árboles filogenéticos se realizó utilizando el método de la máxima parsimonia mientras que las distancias del promotor, DNAC e intrones se

calculó con la fórmula de Kimura, en todos los casos se utilizó el programa computacional Phylip (71).

4.3.11 Identificación de PLs y/o PRPs en el gato.

Los posibles genes de gato relacionados a PRL o PL se trataron de amplificar por PCR largo utilizando los iniciadores consenso descritos en la sección 4.3.4.1.

4.3.11.1 Estandarización del PCR largo.

La estandarización del PCR largo se realizó variando las concentraciones de DNA genómico de gato, Mg^{++} , temperatura de alineamiento de los iniciadores y los tiempos de extensión logrando así establecer las condiciones de reacción siguientes:

Composición de la mezcla de reacción.

Mezcla inferior.

Componente de la PCR	Concentración final
Buffer II XL 3.3X	1X
dNTPs 10 mM	200 μ M
Iniciador 5ConsPrl 5 μ M	0.4 μ M
Iniciador 3ConsPrl 5 μ M	0.4 μ M
Mg(OAc) ₂ 25 mM	1.5 mM
H ₂ O MilliQ	cbp 20 μ l

Arriba de la mezcla inferior se depositó una perla de cera a cada tubo, para dar el “Hot Start” y se agregó la mezcla superior.

Mezcla superior.

Componente de la PCR	Concentración final
Buffer II XL 3.3X	1X
rTth pol. 2 U/ μ l	0.08 U/ μ l
DNAg	100 ng/50 μ l
H ₂ O MiliQ	cbp 30 μ l

Como controles positivos se utilizaron los DNAs genómicos de bovino y borrego. Los productos amplificados junto con un marcador de peso molecular se corrieron en un gel de agarosa al 0.8% y se tiñeron con bromuro de etidio con la finalidad de visualizarlos y estimar el tamaño del producto amplificado.

Los tubos se sometieron al programa siguiente:

Programa de amplificación.

- | | |
|------------------------------|---|
| 1. Desnaturalización previa | 80 °C por 5 min “Hot Start” |
| 2. Desnaturalización inicial | 94 °C por 5 min |
| 3. 12 ciclos | 94 °C por 30 s |
| | 62 °C por 7 min |
| 4. 16 ciclos | 94 °C por 30 s |
| | 62 °C por 7 min, con incrementos de
15 s en cada ciclo |
| 5. Extensión prolongada | 72 °C por 15 min |

4.3.11.2 Hibridación de los PA con sondas de PRL de gato y de bPLII.**4.3.11.2.1 Obtención de la sonda de PRL.**

La sonda de PRL se obtuvo por RT-PCR a partir de RNAs de tejido hipofisiario de gato, utilizando los mismos iniciadores que se usaron para la obtención del gen completo por PCR largo. Las condiciones para la RT fueron las siguientes:

Componente de la RT	Concentración final
RNA de hipófisis de gato	250 ng/ μ l
Hexámeros al azar	2.5 μ M
Agua miliQ	cbp 12 μ l

El tubo se incubó 10 min a 70 °C, se centrifugó por 3 s y se guardó en hielo hasta agregar los siguientes reactivos:

Componente de la RT	Concentración final
Buffer 5X de primera cadena	1X
DTT 0.1 M	0.01 M
dNTPs 10 mM	0.5 mM

El tubo se incubó 2 min a 42 °C y se agregó 1 μ l de la enzima M-MLV (200 U/ μ l) quedando un volumen final de 20 μ l. La reacción se llevó a cabo con el siguiente programa:

10 min a 25 °C, 50 min a 42 °C y 15 min a 70 °C.

Los DNAs obtenidos se utilizaron para la reacción de PCR, la cual se preparó de la siguiente manera:

Componentes de la PCR	Concentración final
Buffer 10 X	1X
MgCl ₂ 25 mM	1.5 mM
dNTPs 10 mM	200 μM
Oligo 5PrigatoC 5μM	0.3 μM
Oligo 3PrigatoC 5 μM	0.3 μM
Taq polimerasa 5 U/μl	0.1 U/μl
DNAc	3.0 μl
Agua MiliQ	cbp 25 μl

Después de un paso inicial de desnaturalización a 94 °C por 5 min, las amplificaciones se llevaron a cabo por 30 ciclos, los cuales incluyeron un paso inicial de desnaturalización a 94 °C por 1 min, un segundo paso de apareamiento a 60 °C por 1 min y un tercer paso de extensión a 72 °C por 1 min. Terminados los 30 ciclos, se dio un paso de extensión a 72 °C durante 5 min. El producto amplificado se visualizó en un gel de agarosa al 2 %.

4.3.11.2 Obtención de la sonda del PL II bovino.

La sonda del PL II bovino se obtuvo por RT-PCR de RNAs de placenta de vaca, utilizando los iniciadores consenso, mismos que se usaron en el PCR largo para

la identificación de PLs y/o PRPs en el gato. Las condiciones para la RT fueron las mismas que para la obtención de la sonda de PRL, a excepción de la concentración de RNA, que fue de 200 ng/ μ l y que se utilizó el oligo dT 2.5 μ M como iniciador.

Las condiciones de la PCR fueron las siguientes:

Componentes de la PCR	Concentración final
Buffer 10 X	1X
MgCl ₂ 25 mM	1.5 mM
dNTPs 10 mM	200 μ M
Oligo 5ConsPrl 5 μ M	0.3 μ M
Oligo 3ConsPrl 5 μ M	0.3 μ M
Taq polimerasa 5 U/ μ l	0.1 U/ μ l
DNAc	3.0 μ l
Agua MiliQ	cbp 25 μ l

El programa de amplificación fue el mismo que el anterior (4.3.11.2.1), pero el alineamiento de los iniciadores se realizó a 55 ° C.

4.3.11.2.3 Marcaje de las sondas.

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

25 ng de cada una de las sondas se llevaron a un volumen de 20 μ l con agua.

Se desnaturalizaron a 94 $^{\circ}$ C por 5 min, se colocaron inmediatamente en hielo y ahí mismo se les agregaron los siguientes reactivos:

dCTP (500 μ M)	1 μ l
dGTP (500 μ M)	1 μ l
dTTP (500 μ M)	1 μ l
Solución de random primers (2.5X)	20 μ l
[α -P ³²]dATP a 6,000 Ci/mmol	5 μ l
Agua destilada	1 μ l

Los reactivos se mezclaron y se agregó 1 μ l del fragmento Klenow de la DNA polimerasa de *E. coli* (40 U/ μ l). El volumen final de la reacción fue de 50 μ l. La reacción se incubó a 37 $^{\circ}$ C durante 2 horas, se detuvo agregando 5 μ l de solución "Stop". Una vez marcada la sonda se purificó mediante precipitación con Vivid Violet, agregando los siguientes reactivos en el orden y cantidades que se describen a continuación: 5 μ l de acetato de sodio 3 M pH 5.8, 1 μ l de Vivid Violet 10 mg/ml y 100 μ l de etanol al 100% frío. Se mezcló y la reacción se dejó reposar por 30 minutos a temperatura ambiente. La sonda se empastilló por centrifugación a 14,000 rpm por 30 min a temperatura ambiente. Después de quitar el sobrenadante la pastilla se resuspendió en 50 μ l de TE 1X.

4.3.11.2.4 Preparación del gel.

Las hibridaciones se realizaron directamente en el gel, de acuerdo al siguiente protocolo (72). Los productos amplificados provenientes del PCR largo con los iniciadores consenso (gato, vaca y borrego), se separaron por electroforesis en un gel de agarosa al 0.8%. El gel se secó en el secador de vacío a temperatura ambiente por 30 min, seguidos por otros 30 min a 60 °C, haciendo un total de secado de una hora. Posteriormente el gel se lavó tres veces por 30 min con las siguientes soluciones. 1) Depurinación (HCl 0.1 N), luego 2) desnaturalización (NaCl 1.5 M y NaOH 0.5 M) y finalmente 3) neutralización (NaCl 1.5 M y Tris-HCl 0.5 M pH 7.5).

4.3.11.2.5 Condiciones de hibridación.

El gel preparado se prehibridó durante 1 hora a 53 °C con 1 ml/cm² de solución de hibridación 5X SSC (NaCl 0.75 M y Tris 0.18 M pH 8), 5X solución de Denhardt y 0.5% de SDS. Al terminar este paso, la solución de prehibridación se desechó y se sustituyó por la solución de hibridación 1 ml/cm² que contenía la sonda marcada (previamente desnaturalizada por calor a 94 °C por 5 min).

El gel se hibridó toda la noche a 53 °C. Al día siguiente se removió la solución de hibridación y se dieron los siguientes lavados: dos de 5 min cada uno con una solución 2X SSC, 0.1% SDS a temperatura ambiente, otros dos lavados por 15 min con una solución 1X SSC, 0.1% SDS a temperatura ambiente y finalmente dos lavados por 20 min con una solución 0.1X SSC 0.1% SDS a 55 °C. El volumen de los lavados en todos los casos fue de 5 ml/cm² de gel. Al terminar los lavados, el gel se secó a temperatura ambiente, se envolvió en

papel "Saran Wrap", se colocó en un chasis y se expuso en una película ultrasensible por 4 días a -70°C .

CAPITULO V

RESULTADOS

5.1 Obtención de los DNAs.

El DNA fágico se extrajo a partir de una producción a gran escala de las partículas fágicas, mientras que el DNA genómico se obtuvo de tejido muscular.

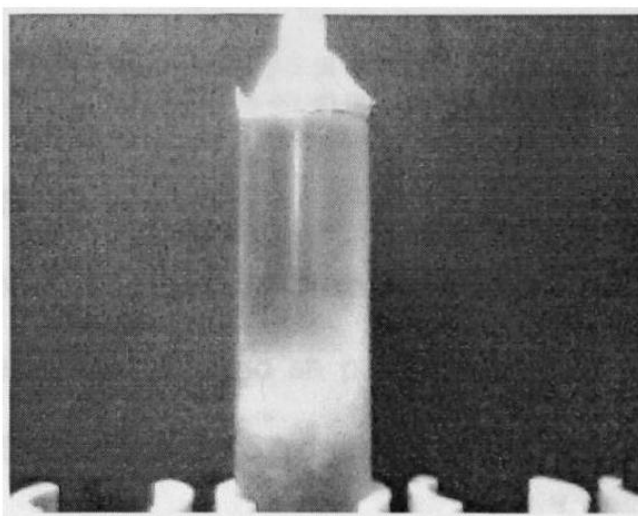


Figura 3. Purificación de las partículas fágicas. Las partículas fágicas se separaron por centrifugación en un gradiente de CsCl. La banda blanca corresponde a los fagos.

5.1.1 Extracción de DNA fágico.

Con el fin de tener una cantidad suficiente de DNA fágico y poder realizar la subclonación del inserto, se propagó y purificó en gradiente de CsCl la clona fágica λ PRP-1. Como se muestra en la figura 3, después de la centrifugación se observó una banda gruesa de color blanco correspondiente a los fagos. El DNA se extrajo y se analizó por electroforesis para determinar su calidad y su concentración (Figura 4). Se obtuvieron 5 mg de DNA a partir de 1 L de medio de cultivo.

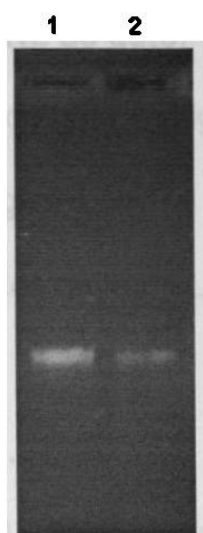


Figura 4. DNA fágico. Se depositaron 10 μ l y 5 μ l del DNA fágico de la misma producción a gran escala, en el carril 1 y 2, respectivamente en un gel de agarosa al 0.8 %.

5.1.2 Extracción de DNAg de gato.

El DNA genómico (DNAg) se extrajo de músculo de gato conservado a -70° C.

El DNAg fue de buena calidad como se puede observar en la figura 5. Se obtuvieron 75 mg de DNA a partir de 5 g de tejido muscular de gato.

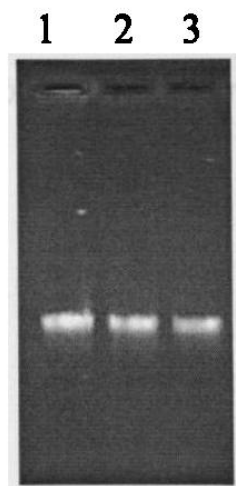


Figura 5. DNAg de gato. Se depositaron 3, 2 y 1 μ l del DNA genómico extraído de tejido muscular de gato en los carriles 1, 2 y 3 respectivamente, en un gel de agarosa al 0.8 %.

5.2 Obtención del gen de la PRL de gato.

Para obtener el gen de la PRL de gato se siguieron dos estrategias en paralelo:

1) subclonación de la clona fágica λ PRP-1 cuyo inserto contiene el exón IV y parte de los intrones flanqueantes de la PRL y 2) amplificación por PCR largo.

5.2.1 A partir del fago λ PRP-1.

El DNA fágico y el plásmido pBS-SK+, una vez digeridos con *Eco* RI y *Bam* HI, se ligaron sin purificar los productos de interés. Bacterias Top-10 Ca⁺⁺ competentes fueron transformadas con la ligación y se seleccionaron las clonas cuyo plásmido mostró una migración retardada respecto al pBS-SK+. Estas se pusieron a digerir con las enzimas *Eco* RI y *Bam* HI para que liberaran su inserto (Figura 6). Se obtuvieron tres clonas cuyos tamaños de insertos fueron de 2954, 900 y 3294 pb. La clona A (2954 pb) correspondió a la previamente obtenida por Pérez Rodríguez (65) que incluye el exón IV y parte de los intrones flanqueantes. La clona B (900 pb) correspondió a una secuencia no identificada, y la clona C (3294 pb) incluyó desde el promotor proximal, hasta el intrón 2 del gen de PRL.

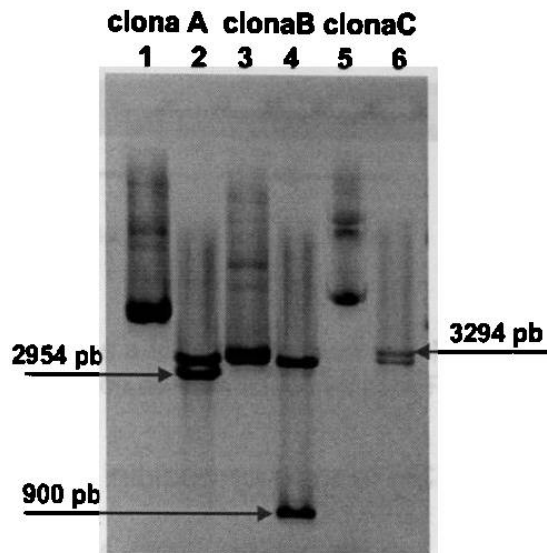


Figura 6. Análisis de las subclonas derivadas del fago λ PRP-1. Las subclonas obtenidas a partir del fago λ PRP-1 fueron digeridas con las enzimas *Bam* HI y *Eco* RI. Cada clona se muestra sin digerir (carriles 1, 3 y 5) y digerida (carriles 2, 4 y 6). Los productos de la digestión se analizaron en un gel de agarosa al 0.8 %.

5.2.2 Por PCR largo.

5.2.2.1 Diseño de los iniciadores.

5.2.2.1.1 Iniciadores para PCR largo.

Se diseñó un juego de iniciadores para PCR largo, con un tamaño de alrededor de 30 bases, una T_m próxima a los $72^{\circ}C$ y específicos para el gen de la PRL de gato. Un iniciador se diseñó sobre el ATG y, el otro en la región de la señal de poliadenilación, permitiendo así la amplificación de toda la unidad transcripcional (Figura 7).

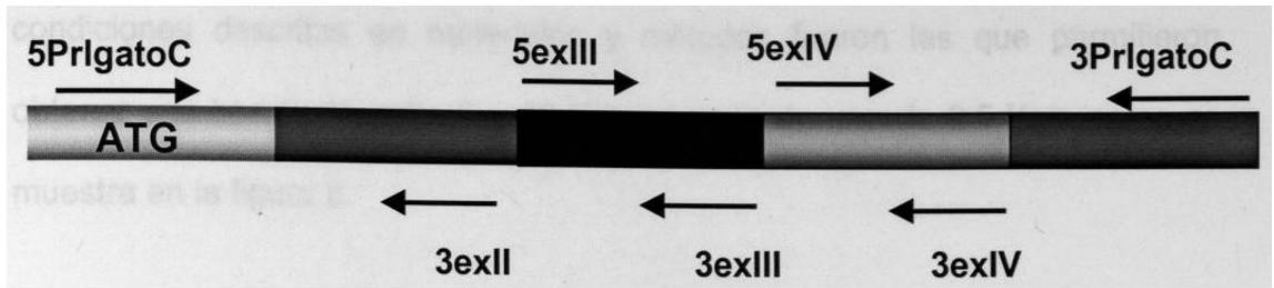


Figura 7. Diseño de los iniciadores a lo largo del gen de PRL. En la figura se esquematizan el DNAc de la PRL y los sitios de unión de los iniciadores para PCR largo y para secuenciación.

La secuencia de 5' a 3' de los iniciadores para el PCR largo es la siguiente:

CAC CAA CAT GGA CAA CAA GGG GTG GTC G 5PrIgadoC

TGG GAC GGA TAC GGG CTT AGC AGT TGC TG 3PrIgadoC

5.2.2.1.2 Iniciadores de secuenciación.

Se diseñaron 5 iniciadores más, sobre los exones II, III y IV con el objeto de facilitar la secuenciación de los intrones. Los sitios de unión se muestran en la figura 7. Estos iniciadores no tienen las características para PCR largo.

La secuencia de 5' a 3' de los iniciadores de secuenciación es la siguiente:

AGG ACA GGT TGT GGA TGT AG 3exII

ATC AGC TCT CAC ACT TCC TC 5exIII

CAG GGG TAG GGA GGG AGG AAG 3exIII

CTT CGT GCA GTC CTC GCA CTT CCG TGA C 3exIV

AGT GTT GCG GTC CTG GAA TGA CCC CCT G 5exIV

5.2.2.2 Amplificación y caracterización del gen de PRL.

A partir de DNAg de gato y utilizando los iniciadores específicos para la PRL, se estandarizaron las condiciones del PCR largo para amplificar el gen. Las

condiciones descritas en materiales y métodos fueron las que permitieron obtener una banda de entre 9 y 10 Kpb además de una de 2.5 Kpb, como se muestra en la figura 8.

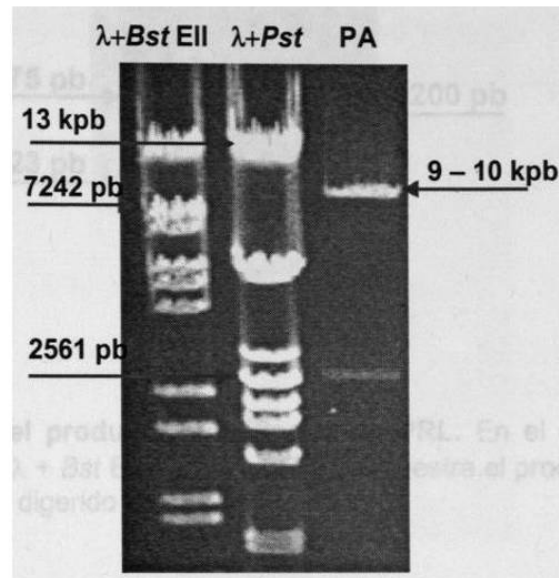


Figura 8. Amplificación del gen de la PRL de gato por PCR largo. Los productos de la amplificación del DNA genómico de gato con los iniciadores específicos se resolvieron en un gel de agarosa al 0.8% y se tiñeron con bromuro de etidio. Los marcadores de peso molecular fueron $\lambda + Pst$ I y $\lambda + Bst$ EII.

Para confirmar la identidad del producto, éste se digirió con *Bam* HI, conociendo la existencia de un sitio único *Bam* HI a nivel del intrón 3. En la figura 9 se muestra el gel correspondiente a esta digestión. El producto digerido, generó dos fragmentos de 6.5 kpb y 3.2 kpb, respectivamente; mientras que la banda de 2.5 kpb no fue digerida por la enzima. Además, la identidad del producto se confirmó mediante una reamplificación con iniciadores consenso (5.5.1) cuyos sitios de unión son más internos, generando así un PA de aproximadamente 7 kpb, que incluye desde el exón II hasta el exón V.

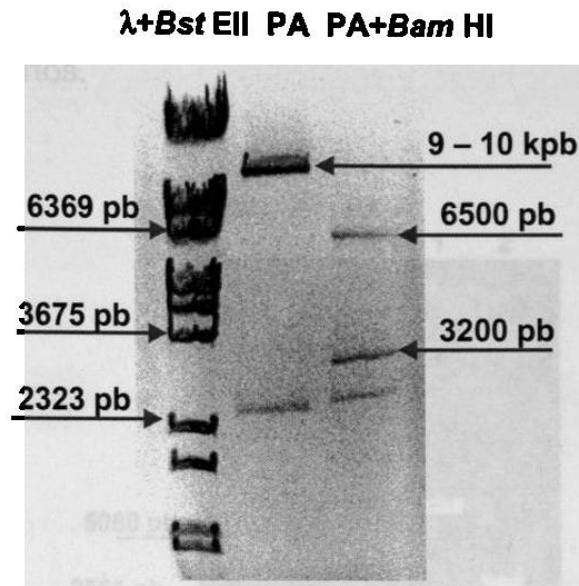


Figura 9. Caracterización del producto amplificado de PRL. En el carril 1 se observa el marcador de peso molecular (λ + *Bst* EII), en el carril 2 se muestra el producto amplificado (PA) sin digerir y en el carril 3 el PA digerido con *Bam* HI.

5.3 Clonación del producto amplificado de PRL.

Para facilitar la clonación del gen de PRL, el PA se clonó en dos partes en el vector pBS-SK+ aprovechando el sitio *Bam* HI único. Como la rTth no agrega A en los extremos del PA. Los sitios de clonación fueron *Bam* HI y un sitio romo, cortando el plásmido en *Bam* HI y *Eco* RV. El primer fragmento incluyó del exón I hasta el sitio *Bam* HI ubicado en el intrón 3, y la segunda parte incluyó desde el sitio *Bam* HI hasta el exón V. Se realizaron las ligaciones y las transformaciones correspondientes y se levantaron las colonias blancas.

Aquellas clonas que mostraron un retraso electroforético respecto al pBS-SK+, se analizaron por PCR con los iniciadores M13 (forward y reverso), que son específicos del vector y que flanquean el sitio de policlonación. El tamaño del producto amplificado de las clonas se comparó con los productos de la

digestión del PA, con *Bam* HI, como se muestra en la figura 10. Se obtuvieron clonas con ambos insertos.

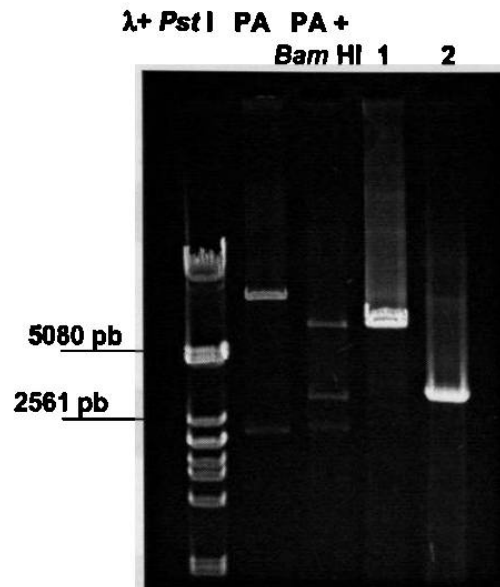


Figura 10. Selección de las clonas recombinantes. Se observa en el gel el PA de PRL digerido y sin digerir, junto con los productos amplificados de las clonas cuyos tamaños coinciden con los esperados.

5.4 Análisis del gen y determinación de su secuencia.

5.4.1 Caracterización y análisis de los intrones.

Para determinar la longitud de los intrones, éstos se amplificaron utilizando los iniciadores que se aparean en los exones flanqueantes. De las dos clonas que corresponden al fragmento completo del gen de PRL, se amplificaron los intrones correspondientes, como se observa en la figura 11. Cabe mencionar que en el caso del intrón 3, su extremo 5' se amplificó de la clona 1, utilizando los iniciadores 5exIII y M13 reverso; mientras que su extremo 3' se obtuvo amplificando la clona 2 con los iniciadores M13 forward y 3 exIV. En la figura 11 se observa el esquema de las clonas junto con los sitios de unión de los iniciadores, mientras que en el gel se observan los productos correspondientes

a los intrones amplificados. El intrón 1 se amplificó con los iniciadores 5 PrlgatoC y 3 ExII, el intrón 2 con el 5 PrICons y 3ExIII y finalmente el intrón 4 con el 5exIV y 3 PrlgatoC

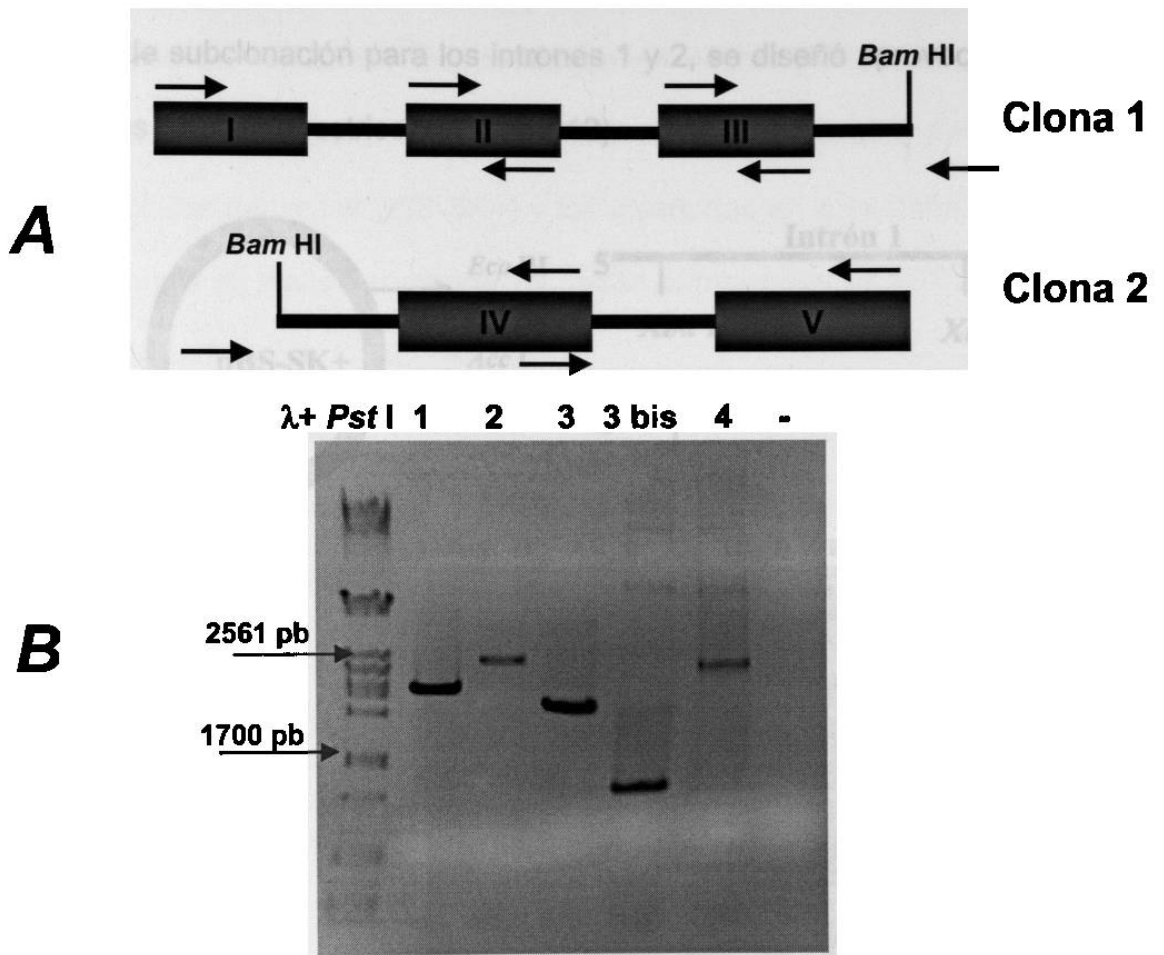


Figura 11. Análisis de los intrones. (A) Esquema donde se representa la estructura de las dos clonas obtenidas a partir del PA de PRL. Se indican los sitios de unión de los iniciadores. (B) Gel de agarosa al 0.8 % donde se resolvieron los productos amplificados de los intrones. Los carriles están numerados de acuerdo al PA del intrón correspondiente. Para el intrón 3 se muestran dos carriles el primero corresponde al PA desde el exón III hasta el sitio *Bam* HI mientras que el segundo corresponde al PA que inicia en el sitio *Bam* HI y termina en el exón IV. Se incluyó un testigo negativo de PCR (-).

El tamaño aproximado de los intrones se dedujo de los productos amplificados, sustrayendo la longitud amplificada de los exones. Se determinó un tamaño de

2100 pb para el primer intrón, 2600 pb para el segundo, 2400 pb para el tercero y finalmente 2190 pb para el cuarto intrón.

5.4.2 Subclonación de los intrones.

La estrategia de subclonación para los intrones 1 y 2, se diseñó aprovechando sitios cohesivos únicos de restricción (Figura 12).

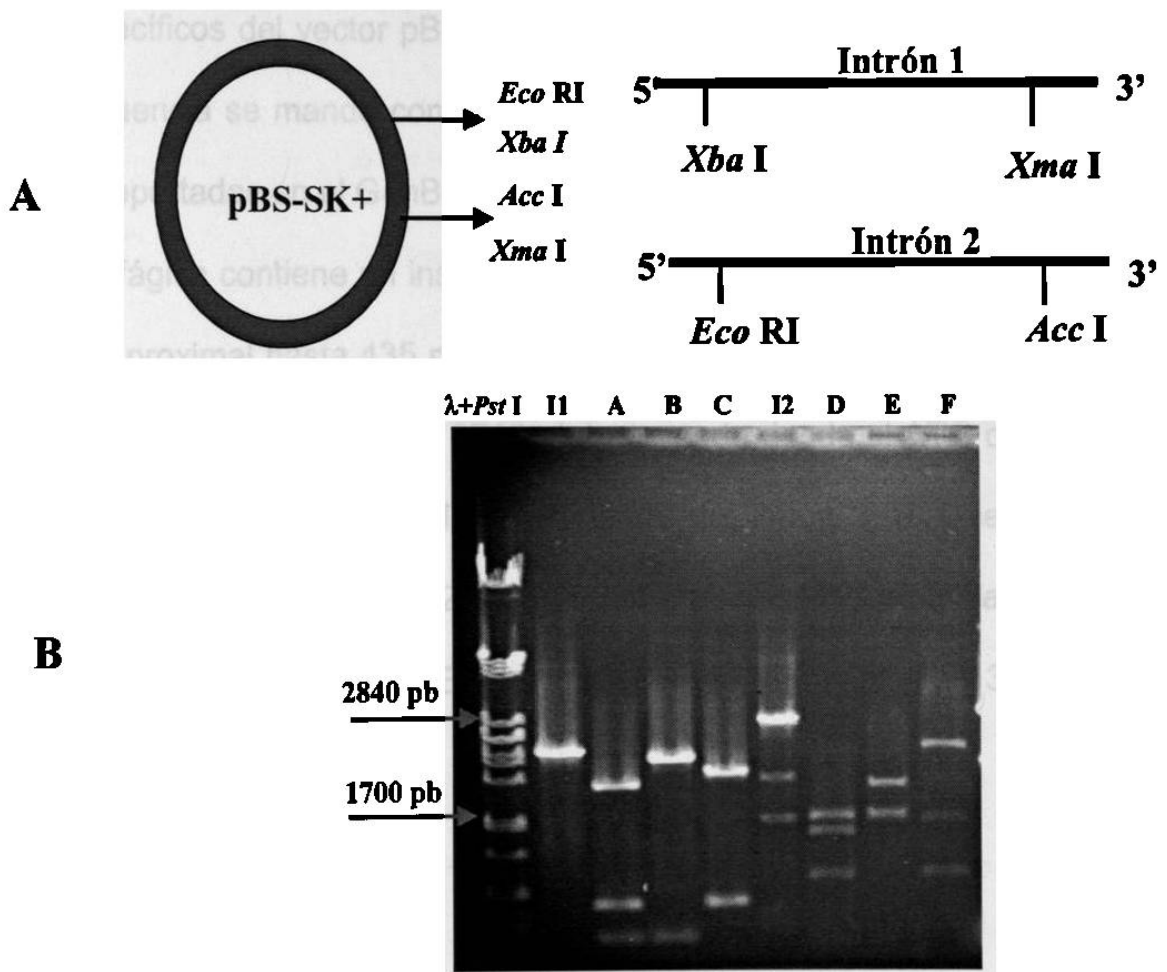


Figura 12. Estrategia de subclonación de los intrones 1 y 2. (A) El esquema representa los sitios de restricción usados para subclonar cada uno de los intrones. (B) Los PA de los intrones 1 y 2 se pusieron a digerir con las enzimas de restricción mencionadas anteriormente, los productos de la digestión se resolvieron en un gel de agarosa al 0.8 %. El carril nombrado como I1 contiene el PA del intrón 1, los carriles A, B y C contienen el intrón 1 digerido con *Xba* I+*Xma* I, *Xba* I y *Xma* I respectivamente; mientras que el carril I2 contiene el PA del intrón 2 y los carriles D, E y F contienen el PA del intrón 2 digerido con *Acc* I+*Eco* RI, *Acc* I y *Eco* RI, respectivamente.

5.4.3 Secuenciación.

La determinación de la secuencia se realizó a partir de una subclona derivada del fago λ PRP-1, las dos clonas del producto amplificado y de las subclonaciones derivadas de los intrones 1 y 2.

La secuenciación de las clonas seleccionadas se realizó por secuenciación cíclica con el kit de LiCor, utilizando los iniciadores universales M13 forward y reverso (específicos del vector pBS-SK+) y los diseñados en este trabajo para PRL. La secuencia se mandó comparar mediante el programa BLAST con las secuencias reportadas en el GenBank.

La subclona fágica contiene un inserto de 3294 pb, incluyendo desde – 506 pb del promotor proximal hasta 435 pb del intrón 2. La primera clona (clona 1) del PA de PRL contiene un inserto de 6718 pb incluyendo desde el ATG del exón I hasta el sitio *Bam* HI ubicado a 1700 pb dentro del intrón 3. El inserto de la segunda clona del PA es de 3202 pb que incluyen desde el sitio *Bam* HI del intrón 3 hasta 135 pb del exón V. En la figura 13 se esquematizan las 3 clonas.

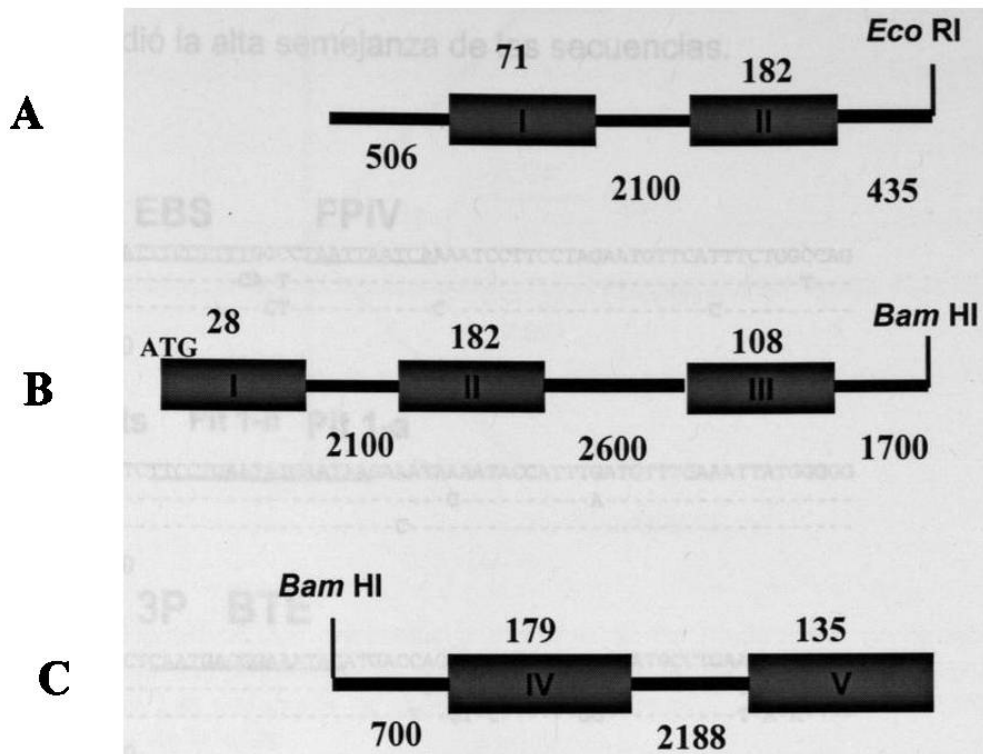


Figura 13. Determinación de la secuencia del gen de PRL. (A) esquema que representa el contenido de la subclona fágica. (B) Representación de una de las clonas del PA de PRL denominada clona 1 ó extremo 5'. (C). La segunda clona del PA de PRL llamada clona 2 ó extremo 3'.

5.4.4 Análisis del promotor proximal y extremo 5' no traducible.

La secuencia del promotor proximal del gen de PRL de gato se alineó mediante el programa CLUSTAL W, junto con los promotores proximales de PRL humana (número de acceso X00368) y bovina (número de acceso X01452.1) para comparar dichas secuencias e identificar sitios de unión a factores transcripcionales. Se lograron secuenciar 506 pb del promotor proximal. Como se observa en la figura 14, se identificaron múltiples sitios de unión a factores transcripcionales perfectamente conservados, incluyendo la caja TATA a - 30

pb y los sitios de unión a Pit-1, entre otros. En la parte más distal de los promotores se perdió la alta semejanza de las secuencias.

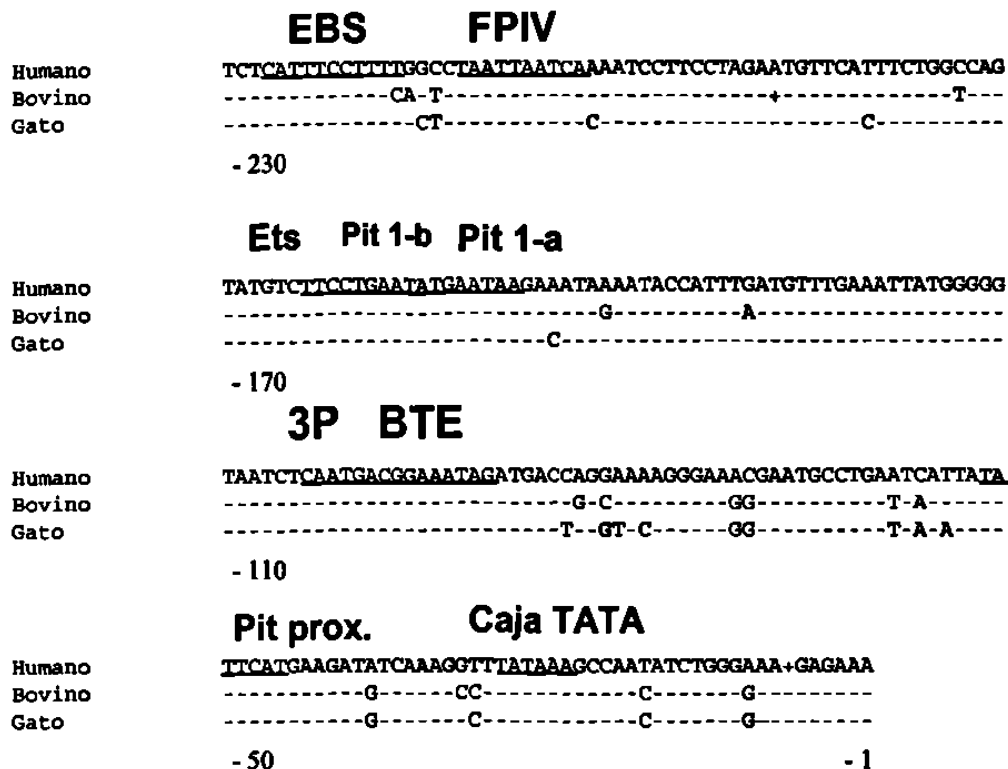


Figura 14. Secuencia nucleotídica del promotor proximal del gen de la PRL de gato. Las secuencias de los promotores proximales de los genes de PRL humana, bovina y de gato se alinearon mediante el programa CLUSTAL W. Los cambios nucleotídicos en comparación a la primera secuencia, se resaltan, mientras que los guiones indican los nucleótidos conservados. Los sitios de unión a los principales factores transcripcionales se encuentran subrayados. El + indica una delección.

Con el promotor proximal y el extremo 5' no traducible se calcularon las distancias que separan las secuencias de gato, bovino y humano y se derivó un árbol filogenético (figura 15). La secuencia correspondiente a la rata fue tomada como grupo fuera. El árbol se construyó utilizando el método de la máxima parsimonia y las distancias fueron calculadas con la fórmula de Kimura (71).

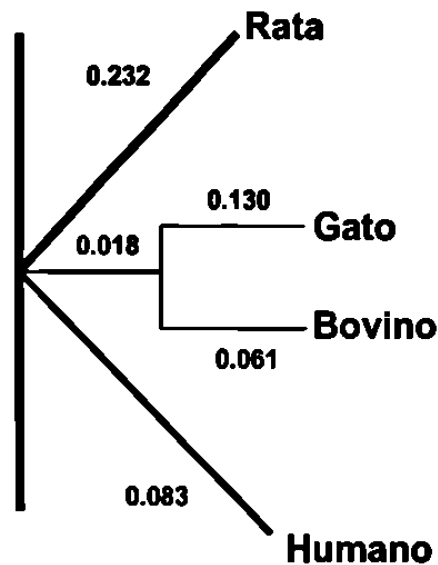


Figura 15. Árbol filogenético del promotor y extremo 5' no traducible. En la figura se muestran los resultados del programa Phylip, con el cual se compararon las secuencias de gato, humano y bovino. Las distancias se indican sobre las ramas. Las de rápida evolución se distinguen por el grosor de la línea.

La secuencia del promotor y extremo 5' no traducible del gato es muy similar a la del bovino y cercana al ancestro común, mientras que la correspondiente a la rata difiere más de éste, indicando que tuvo una evolución más rápida. La secuencia del humano está también parecida a la secuencia ancestral, pero no se agrupa con las del gato y bovino.

5.4.5 Análisis del DNAC de la PRL.

Una vez alineadas las secuencias del DNAC de PRL de gato, humano, bovino y rata, tomando a esta última como grupo de comparación, se procedió a la construcción del árbol filogenético (Figura 16) utilizando el método de la máxima parsimonia y el programa Phylip.

La PRL de gato está más relacionada a la de humano. Se observaron menos cambios entre las secuencias del gato y humano, siendo ambas más cercanas

al ancestro común, mientras que la del bovino difiere, sugiriendo que hubo una especialización de la PRL en este último.

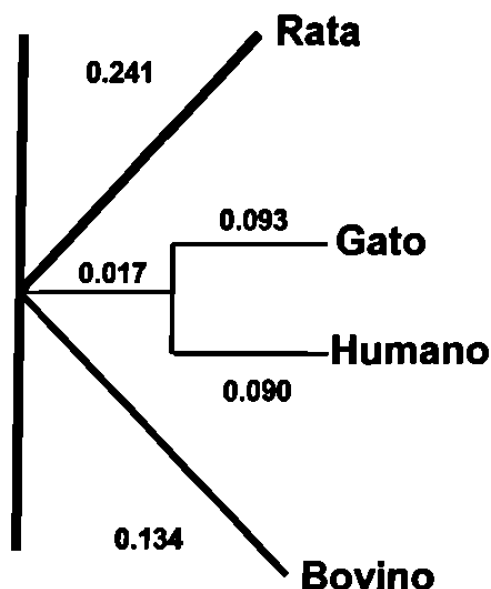


Figura 16. Árbol filogenético del DNAc. Se observan los resultados del programa Phylip, con el cual se compararon las secuencias de humano, bovino y gato. Las de rápida evolución se hacen resaltar por el grosor de la línea, mientras que la distancia se indica sobre la línea.

5.4.6 Análisis de los intrones.

Utilizando el método de Kimura se calcularon las distancias entre los intrones 3 y 4 de los genes de PRL de gato y humano. Para el intrón 3 se analizaron 1446 pb del extremo 3', la distancia calculada fue de 0.5466. El intrón 4 se analizó en su totalidad (2190 pb), siendo la distancia calculada de 0.9150. En este último, la distancia es muy grande (casi el doble del otro intrón) y este resultado se puede atribuir a la inserción de una secuencia *Alu* en el intrón humano de 180 pb, lo que aumenta su tamaño a 2581 pb.