

CAPITULO I

INTRODUCCIÓN

Una nueva era en el entendimiento de la evolución del genoma se ha abierto con la disponibilidad de numerosas secuencias génicas. Con estos datos ha sido posible estudiar los procesos evolutivos al nivel más detallado, estableciendo así las bases para entender en un futuro no tan lejano, los mecanismos moleculares que se llevaron a cabo para formar los genomas de las especies actuales (1).

El genoma haploide humano consta de aproximadamente 3×10^9 pb y su organización es el resultado de millones de años de evolución. A lo largo de la escala evolutiva, la complejidad del genoma se fue incrementando a través de la duplicación de genes y de la divergencia de sus secuencias. Finalmente, los mecanismos que se llevaron a cabo para distinguir una especie de otra, se reflejan en los cambios en la secuencia nucleotídica de sus genomas.

Un importante mecanismo de innovación funcional durante la evolución es la duplicación de genes. Está estrechamente asociada a la divergencia de las secuencias que permite a lo largo del tiempo, el surgimiento de un nuevo gen. Estos genes que comparten un ancestro común conforman familias génicas como la de las globulinas, entre otras. El intercambio de exones o "exon shuffling" tiene también un papel importante en el incremento de la diversidad génica, ya que fue fundamental en los procesos de formación tanto de genes ancestrales como de genes modernos (2). Estos

Evolución de las regiones intergénicas del locus GH-PL en los primates del viejo mundo

mecanismos moleculares son los responsables del incremento en tamaño y complejidad de los genomas.

1.1 Importancia de las secuencias repetitivas en el genoma eucariote

El genoma eucariote está compuesto de secuencias únicas y repetitivas. Entre las primeras se encuentran los genes, que pueden extenderse sobre una longitud muy variable y están formados por secuencias codificantes (exones) y no codificantes (intrones). Entre los genes, se localiza otro tipo de regiones no codificantes (regiones intergénicas), de longitud muy variable y que incluyen a las secuencias repetitivas, reguladoras y otras. Las secuencias repetitivas constituyen alrededor de un tercio del genoma y varían en número de copias desde 2 hasta 10^7 por célula, éstas se han clasificado en base a su patrón de distribución y a su frecuencia dentro del genoma (3).

1.1.1 Las secuencias altamente repetitivas

Las secuencias repetitivas agrupadas son DNA satélites que están compuestos por secuencias cortas altamente repetitivas, sin función conocida y ubicadas principalmente en los centrómeros y en los extremos de los cromosomas.

Las secuencias repetitivas altamente dispersas son copias que están distribuidas a través del genoma, se encuentran en intrones, flanqueando regiones de genes, o regiones intergénicas. Estas son de dos tipos: secuencias largas entremezcladas o LINEs y secuencias repetitivas cortas abreviadas como SINEs (4,5).

Evolución de las regiones intergénicas del locus GH-PL en los primates del viejo mundo

Las LINEs pueden tener una longitud de 6-7 kpb (4), aunque muchas de ellas son versiones truncadas por haber sufrido deleciones. El genoma humano aparentemente contiene únicamente una familia LINE: L1 (6). Las unidades LINE 1, a diferencia de los SINEs, no parecen ser versiones de pseudogenes que comparten un ancestro común. Se propone que pueden ser elementos móviles que son amplificados y pasados a nuevos sitios genómicos por medio de un proceso de retrotranscripción.

Las SINEs son secuencias cortas (100-150 pb) altamente repetidas, parecen ser genes procesados derivados de la clase III, que codifican para RNAs pequeños incluyendo tRNA y 7SL RNA. Las secuencias de las SINEs son homólogas a las secuencias de RNA y tienen un segmento 3' terminal rico en adenilatos. Frecuentemente, están rodeadas por repeticiones directas que son sitios blancos de duplicaciones. Cada especie u orden tiene su grupo característico de familias SINE. Una de las mejor estudiadas es la familia Alu (llamada Alu por el sitio de restricción *Alu* I típico de la secuencia) que es específica de los primates. Las unidades Alu son encontradas flanqueando genes, en intrones, dentro de DNA satélite y en grupos junto con otros tipos de secuencias repetitivas. Surgieron en el DNA del linaje humano hace aproximadamente 30 millones de años (7). Parece que existe una serie de genes conservados que fue la fuente primaria de la familia de repeticiones Alu, presumiblemente a través de retroposición (8). Estos genes fueron probablemente reemplazados uno a otro durante la evolución (7). Estos elementos tienen un tamaño de 300 pb de largo y existen más de un millón de copias por genoma (9). En promedio hay una secuencia Alu cada 5 kpb en los genomas de humanos y otros primates del viejo mundo. Las secuencias Alu son conocidas por

ejercer diversas funciones dependiendo del material genético dentro del cual están insertadas (9). Estas secuencias se encuentran ampliamente distribuidas a lo largo del genoma humano, y están involucradas en los procesos de recombinación (7). Los retroposones Alu juegan también un papel importante en la evolución de la regulación de la expresión génica de los primates(10), principalmente por inactivación de genes o alterando sus funciones y/o expresión. Las características de los elementos repetitivos Alu apuntan a que estos fragmentos sean la principal fuerza que dirige la evolución.

1.1.2 Las familias multigénicas

En el genoma existe otra clase de secuencias que se repiten con una baja frecuencia (2 hasta 100 copias). Las familias génicas pertenecen a esta clase y se pueden definir como un grupo de genes derivados de la duplicación de un gen ancestral, y que comparten una similitud de al menos el 50% (5).

A la fecha se conoce un gran número de familias multigénicas como: las inmunoglobulinas, los citocromos P450, y las globinas. Los miembros de una familia génica, pueden ser agrupados en la misma región del DNA, integrando un locus multigénico o dispersos sobre diferentes cromosomas, dependiendo de que tan reciente sucedió fue el evento de duplicación. Las diferencias nucleotídicas entre los miembros de una misma familia se pueden concentrar en las regiones codificantes, generando proteínas con funciones especializadas como es el caso de las inmunoglobulinas o del citocromo P450. En otros casos la diferenciación de las regiones reguladoras tales como promotores son más importantes que la de las regiones codificantes, como en las

Evolución de las regiones intergénicas del locus GH-PL en los primates del viejo mundo

familias de la lactato deshidrogenasa y esterasa. Por último, hay ejemplos de familias en las cuales, la diferenciación se presenta en ambas regiones como es el caso de la familia de la globina y de la hormona del crecimiento (GH), entre otras (11).

La compleja organización del material genético es el producto de una larga evolución, que afecta a todo el genoma. La historia evolutiva del genoma y de los organismos se podrá inferir de la comparación de su secuencia completa, pero todavía son pocos los genomas que han sido completamente secuenciados, sin embargo el estudio evolutivo de las familias multigénicas ofrece una buena alternativa para llevar a cabo estudios evolutivos, ya sea a partir de un gen específico o incluyendo todos los genes que la conforman.

1.2 El complejo multigénico GH-PL como modelo de estudio

Dentro del genoma, la familia multigénica GH-PL constituye un modelo muy adecuado para estudiar los mecanismos de regulación de la expresión génica, así como los eventos moleculares responsables de la evolución del genoma.

1.2.1 Organización del locus hGH-hPL

En humanos los genes de la hormona del crecimiento (GH) y del lactógeno placentario están todavía ligados y ocupan un área de aproximadamente 50,000 pb (Figura 1) localizada entre las bandas q22-24 del cromosoma 17 humano (12,13). La secuencia nucleotídica de estos genes se ha determinado (14), conociéndose con exactitud las secuencias codificantes, los promotores de los elementos de regulación de la

Evolución de las regiones intergénicas del locus GH-PL en los primates del viejo mundo

transcripción (potenciadores e inhibidores) y las secuencias que flanquean a los genes. La estructura de los cinco genes es muy similar entre sí, al contar todos con cinco exones y cuatro intrones, regiones promotoras de longitud similar (15,14) y en el caso de los tres genes hPL, una secuencia potenciadora o enhancer (16).

Los cinco genes del locus hGH-hPL comparten una similitud de entre 91-95% (14). Dos de estos codifican para hormonas del crecimiento: el gen hGH-N (Normal) con expresión específica en los somatotrofos de la pituitaria y el gen hGH-V, el cual codifica para una variante placentaria (17). Dos genes, hPL-2 y hPL-3 codifican para la misma hormona lactogénica placentaria (18,19) y finalmente el gen hPL-1 se considera un pseudogen, por contener una mutación en el segundo intrón que evita el procesamiento correcto de los transcritos (20).

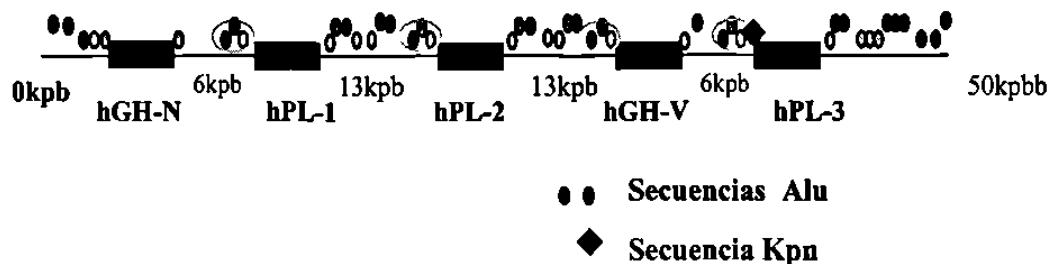


Figura 1. Organización del locus hGH-hPL. Los cinco genes están separados por cuatro regiones intergénicas de 6 a 13 kpb. Las secuencias Alu están distribuidas en todas las regiones intergénicas del complejo, mientras que una sola secuencia Kpn se encuentra en la región promotora distal de hPL3 (14).

El gen hGH-N genera a través de “splicing diferencial” del transcrito primario, tanto *in vivo* como *in vitro*, dos isoformas para HGH: una de 22 KDa (90%) y otra de 20 KDa (10%),(15). Del gen hGH-V, se derivan varias isoformas, aunque el RNAm más

Evolución de las regiones intergénicas del locus GH-PL en los primates del viejo mundo

abundante de este gen en la placenta a término es el que codifica para una proteína de 22 KDa. Sin embargo, codifica también para una proteína de membrana de 26 KDa, (21), y para una isoforma de 25 KDa por glicosilación en el residuo de asparagina 140 (17, 22). Recientemente se han reportado dos nuevos transcritos, uno de ellos se origina utilizando un sitio aceptor de splicing alternativo para producir una proteína de 20 KDa, mientras que el otro es generado por el uso de un sitio donador de “splicing alternativo” y origina una proteína de 24 KDa (23).

Los genes hPL-2 y hPL-3 son activos en la placenta y codifican pre-hormonas que difieren en la posición de un solo aminoácido en el péptido señal, sin embargo, las hormonas maduras son idénticas (18). hPL-1 se considera un pseudogen ya que ningún producto proteico derivado de éste se ha identificado, a la fecha.

Los cinco genes están separados por cuatro regiones intergénicas: dos de aproximadamente 6,000 pb y dos alrededor de 13,000 pb (14). Se conoce la secuencia nucleotídica de cada una, y se han identificado tanto elementos repetitivos como elementos que participan en la regulación de la expresión de estos genes.

Dentro de las regiones intergénicas se encuentran 48 elementos de secuencias repetitivas del tipo Alu y un miembro de la familia Kpn (Figura 1). Las inserciones Alu ocurren en ambas orientaciones y tres de ellas están truncadas. El único miembro de la familia Kpn se encuentra en el extremo 5' del gen hPL-3 (14). Más del 20 % de la secuencia nucleotídica del locus hGH corresponde a estos elementos Alu, que presentan un patrón de distribución semejante para los genes.

1.2.2 Regulación génica del locus hGH-hPL

El complejo multigénico hGH-hPL constituye un modelo ideal para investigar los mecanismos moleculares por los cuales, genes estrechamente relacionados entre sí expresan hormonas relacionadas en distintos tejidos y a niveles muy diferentes.

Dentro de las secuencias intergénicas del genoma se encuentran también los elementos que participan en la regulación de la expresión de los genes. La activación transcripcional de los genes eucarióticos durante el desarrollo o en respuesta a señales intracelulares involucra el ensamblaje regulado de complejos multiproteicos sobre las regiones reguladoras: promotores y regiones potenciadoras (enhancers) o inhibidoras (silenciadores). La iniciación de la transcripción es uno de los puntos de control más importantes de la regulación de la expresión genética, siendo el principal en procariotes.

Esta regulación está dada principalmente por interacciones entre secuencias específicas del DNA que pueden localizarse a distancias variables del sitio de iniciación, llamadas elementos *cis* y una colección de proteínas (factores de transcripción), muchas de las cuales se unen en *trans* a estas secuencias y actúan induciendo o reprimiendo la expresión.

El aparato de transcripción basal reconoce en el promotor de un gran número de genes, un elemento *cis* llamado “Caja TATA”, que se localiza a - 30 pb río arriba (o 5') del sitio de iniciación de la transcripción. Adicionalmente, casi todos los genes tienen secuencias de DNA regulatorias que son necesarias para prender el gen, apagarlo o modular los niveles de su transcripción. Las secuencias regulatorias tienen una longitud variable y actúan como microprocesadores moleculares respondiendo a una variedad de

Evolución de las regiones intergénicas del locus GH-PL en los primates del viejo mundo

señales que en conjunto, determinan la velocidad con la cual la transcripción es iniciada (25). Durante el estudio de los genes del complejo multigénico hGH-hPL se han descrito varias secuencias involucradas en la regulación de la expresión. Estas se encuentran en una región aproximada de 3000 pb previo al inicio de la transcripción y también en la región río abajo del gen.

Estudios recientes se han enfocado en los elementos reguladores involucrados en la expresión específica de tejido de los genes del locus hGH-hPL. Las 500 pb de la región promotora de todos los miembros de la familia multigénica hGH-hPL tienen una similitud en la secuencia nucleotídica de más del 90%, y son suficientes para dirigir la expresión del gen hGH-N en los somatotrofos de la pituitaria anterior. Esta es dirigida por el factor transcripcional Pit-1/GHF1 (26). Pit-1/GHF1 presenta dos dominios conservados entre los factores de transcripción específicos de tejido: un dominio homeobox (HB) y un dominio POU, ambos ubicados en el extremo (C) terminal de la proteína e intervienen en la unión de la proteína al DNA. Pit-1 se une a los promotores de los genes GH-PL en dos sitios que se encuentran altamente conservados en la secuencia nucleotídica de los promotores de los genes de la familia, con excepción de hGH-V. Existe una región (entre 1,500 y 2,000 pb del sitio de inicio de la transcripción según el gen), a la cual se unen proteínas que inhiben la unión de Pit-1 a los genes hPLs y hGH-V. Estas secuencias impiden la expresión de los genes placentarios en la hipófisis (27). Por ser Pit-1 un factor específico de tejido hipofisiario (28), aparentemente no está involucrado en la inducción de la expresión de los genes hPLs y hGH-V en la placenta (Figura 2).

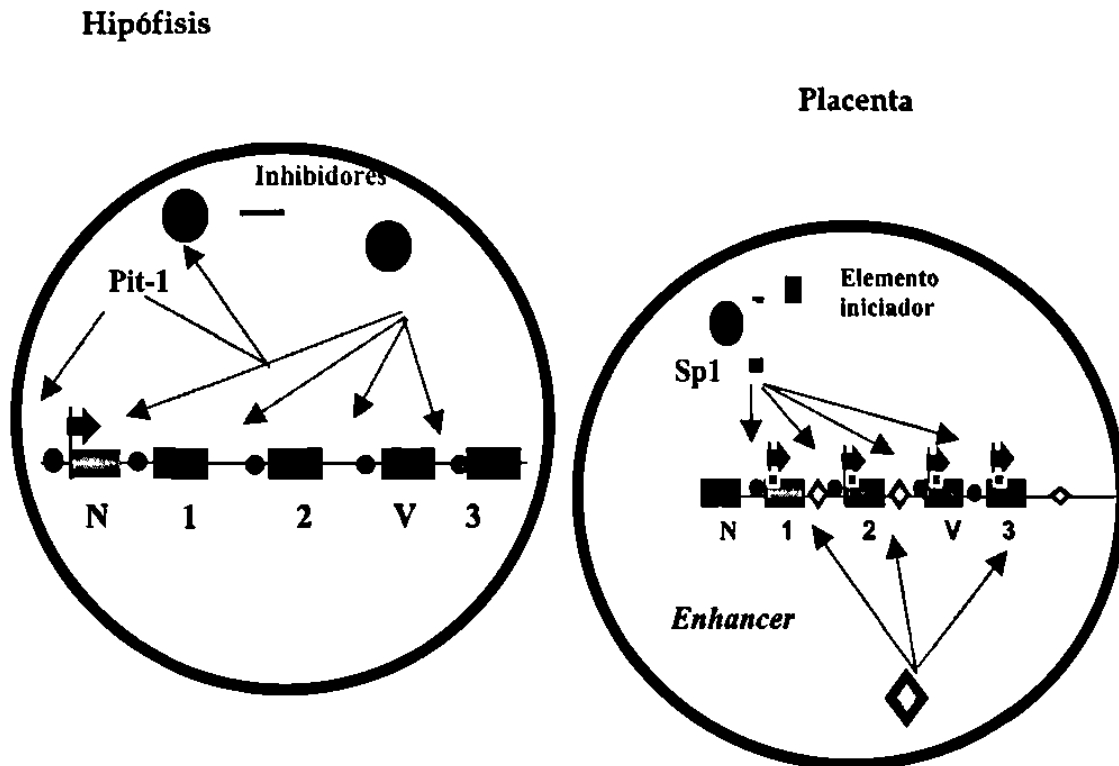


Figura 2. Regulación específica de tejido de los genes hGH-hPL. Los factores transcripcionales que participan en la especificidad de tejido son por un lado Pit-1, que determina la expresión de hGH-N en hipófisis, y por el otro el elemento iniciador Sp1 y el potenciador, que dirigen la expresión de los genes PLs y hGH-V en la placenta.

Otros factores han sido involucrados en la regulación de la expresión del gen hGH-N en la hipófisis, potenciando la acción de Pit-1. Algunos de ellos son: AP-2 (29), NF1 (30) y USF (31,32). Estos factores se unen al promotor en una región de 290 a 255 pb antes del sitio de inicio de la transcripción. Otro factor relacionado con Pit-1 es Zn-15 (descrito en rata), el cual funciona como potenciador de Pit-1 (33).

La regulación de la expresión de los genes PLs en la placenta empieza a aclararse ya que algunos estudios realizados, atribuyeron la expresión específica de los PLs y GH-V en la placenta a la interacción de un elemento iniciador específico de tejido (InrE), que se

Evolución de las regiones intergénicas del locus GH-PL en los primates del viejo mundo

localiza entre la caja TATA y el sitio de inicio de la transcripción, y de proteínas que se unen al potenciador (Figura 2),(34).

El factor Sp1 juega un papel muy importante en la regulación tanto de los genes hPL como de hGH-V, ya que la delección de su sitio de unión en los promotores de estos genes, disminuye de manera significativa su expresión en células BeWo (26,35), no siendo así para la delección de la región de unión a Pit-1, al menos en el gen hPL-2 (34).

Los genes GHs y PLs están también bajo el control de mensajeros como hormonas (T3, glucocorticoides), ácido retinoico y AMPc, entre otros. Las secuencias de respuesta a estos mediadores se encuentran en la parte distal del promotor (30, 36).

En conclusión, la regulación de los genes hGH-hPL involucra una región cercana al sitio de inicio de la transcripción que corresponde al promotor proximal, secuencias más distales río arriba (~ 3000 pb) que incluyen un silenciador y varios elementos de respuesta a hormonas; así como un elemento potenciador localizado río abajo de los genes hPLs.

1.2.3 Evolución molecular del complejo GH-PL en primates

1.2.3.1 Hipótesis actual sobre la formación del locus hGH-hPL

El complejo multigénico GH-PL constituye también un modelo interesante para estudiar la formación de una familia multigénica. El análisis de las secuencias evidenció que la aparición del locus hGH-hPL se basó en una serie de duplicaciones mediadas por secuencias repetitivas pertenecientes a la familia Alu (37,14). Los genes del complejo y sus secuencias flanqueantes se produjeron mediante tres eventos independientes de

Evolución de las regiones intergénicas del locus GH-PL en los primates del viejo mundo

duplicación (37). A partir de un gen ancestral (similar al actual gen hGH-N), aparecieron los precursores de los genes hPLs y hGHs. Algunas mutaciones en la secuencia de ambos genes dieron lugar a las diferencias ahora presentes entre ellos. Una posterior duplicación en tandem dio origen a los precursores de los genes hGH-V y hPL-3. El tercero y último evento se produjo mediante una duplicación del fragmento que contenía al gen hPL-1, de esta manera surgió el precursor del actual gen hPL-2 (14), (Figura 3).

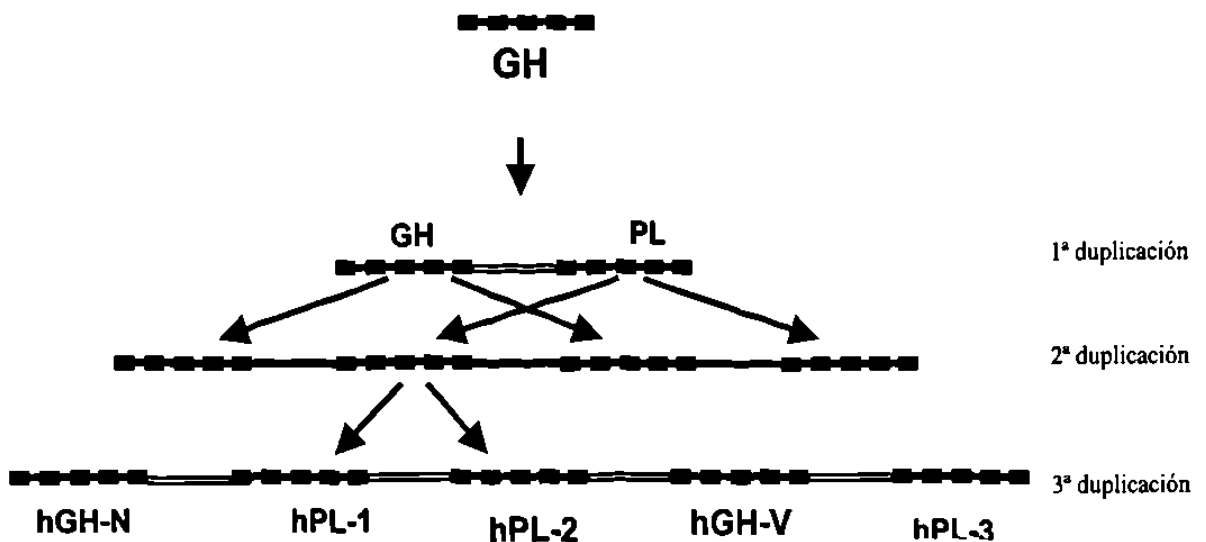


Figura 3. Evolución del locus hGH-hPL . La hipótesis actual para la formación del locus GH-PL en el humano, involucra a 3 eventos de duplicación sucesivos a partir de un gen ancestral (14).

1.2.3.2 El complejo GH-PL en primates

Se conoce muy poco sobre la organización del complejo GH-PL en primates. El estudio de este locus en otras especies diferentes al humano, permitirá aclarar las dudas que existen en cuanto a su formación y a contribuir así al conocimiento sobre la evolución de este locus.

Los primates se clasifican en seis grupos: lemur de Madagascar; lorises; tarsiers; monos del nuevo mundo, monos del viejo mundo; grandes monos y el hombre. Las opiniones difieren acerca de la relación entre estos grupos de especies y acerca de su semejanza con varios grupos fósiles. Sin embargo, la división básica de primates en estos seis grupos provee un punto de inicio útil para la reconstrucción de sus relaciones y mostrar como pueden interactuar la clasificación y reconstrucción filogenética.

Existe evidencia de que los primates son descendientes de un ancestro insectívoro (38).

Después de la divergencia en el paleoceno de los lémures, lorises y tarsiers, se presentó una segunda radiación que podría haber tenido lugar en la etapa eoceno superior y subsecuentes periodos geológicos (Figura 4). Estos últimos primates probablemente derivados del ancestro de los lemuridos, pueden ser incluidos en un segundo suborden, el antropeida y están representados por los monos, grandes monos y el hombre.

Evolución de las regiones intergénicas del locus GH-PL en los primates del viejo mundo

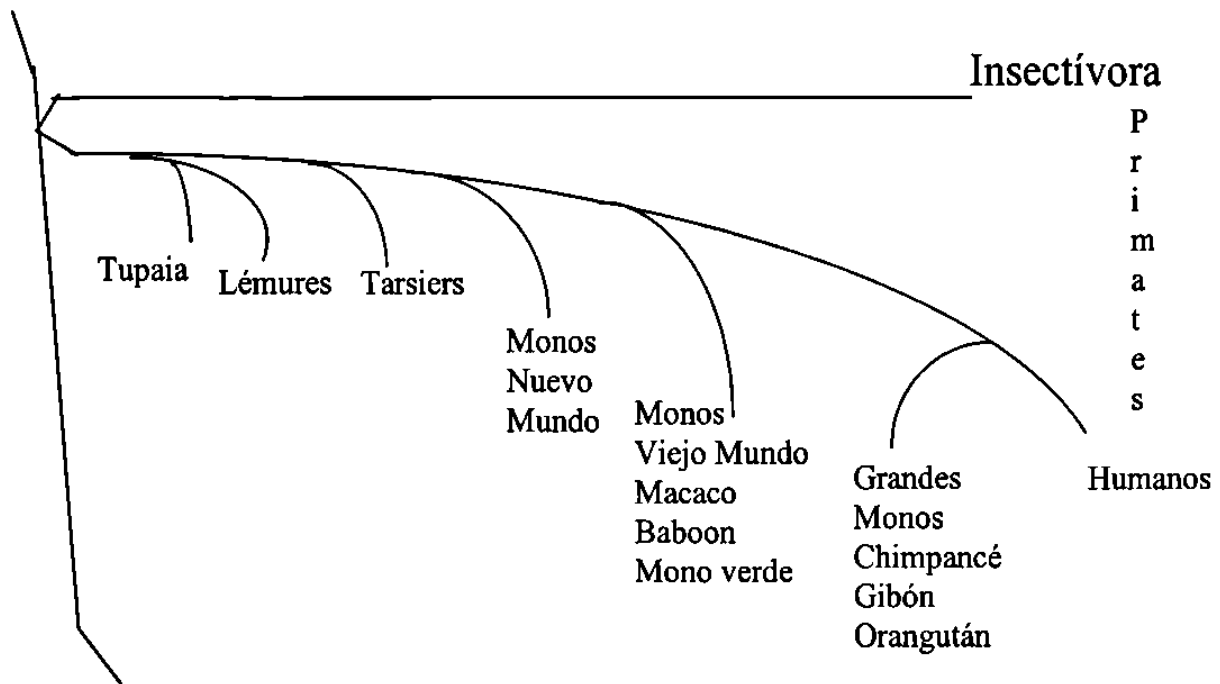


Figura 4. Evolución de los primates. A partir de un ancestro común divergieron los monos del nuevo mundo, los monos del viejo mundo, los grandes monos y el humano.

El locus GH-PL ha sido completamente secuenciado en una sola especie: el humano. En el macaco, especie representativa de los monos del viejo mundo, se han reportado las secuencias codificantes de cuatro genes que presentan una expresión placentaria (tres PLs y una GH) y el DNAC de GH-N (39). Sin embargo, la organización del locus no se ha determinado.

Estudios recientes realizados en nuestro laboratorio, han descrito la organización del locus GH-PL en dos especies de primates. En el mono araña, seis genes integran el complejo, de los cuales solamente tres se han podido clonar y pertenecen al tipo GH.

Las cinco regiones intergénicas han sido también obtenidas y clonadas, presentando todas el mismo tamaño aproximadamente de 3000 pb (40).

Evolución de las regiones intergénicas del locus GH-PL en los primates del viejo mundo

En el chimpancé, el mono más cercano al humano, se obtuvo también la organización parcial del locus GH-PL; siendo ésta más parecida a la del humano, aunque incluye a seis genes. Las regiones intergénicas son más heterogéneas en su tamaño ya que son de 13000, 10000, 7000 y 6000 pb, faltando por determinar el tamaño de una región. Tanto en el mono araña como en el chimpancé, no se han estudiado el patrón de expresión de estos genes.

1.3 JUSTIFICACIÓN:

El complejo GH-PL constituye un buen modelo para estudiar en los primates tanto la regulación de la expresión génica como la evolución de una familia multigénica.

Este complejo está integrado por un número variable de genes (entre cinco y seis) y por regiones intergénicas que presentan longitudes muy variables entre los monos del viejo mundo y los antropoideos. Sin embargo, poco se conoce todavía sobre la organización del locus de los monos del viejo mundo.

Este trabajo se enfocó en estudiar la organización del locus GH-PL, a partir de las regiones intergénicas en dos especies del viejo mundo, además de inferir los eventos de inserción que dieron lugar al incremento de las regiones intergénicas y a la adquisición de los elementos responsables de la especificidad de expresión.

CAPITULO II

OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL

Estudiar la evolución de las regiones intergénicas del locus GH-PL en los primates del viejo mundo.

OBJETIVOS ESPECIFICOS

1. Amplificar por medio de PCR-Larga las regiones intergénicas de la familia GH-PL del mono verde (*Cercopithecus aethiops*) y del macaco (*Macaca mulatta*).
2. Caracterizar los productos amplificados.
3. Analizar las secuencias promotoras por PCR, y determinar su secuencia.
4. En las regiones intergénicas, evidenciar la presencia de las secuencias potenciadoras (enhancer) e inhibidoras que participan en la especificidad de tejido.
5. Evidenciar la presencia de las secuencias repetitivas Alu y Kpn en las regiones intergénicas.
6. Inferir sobre la inserción de los elementos regulatorios, y la evolución de las regiones intergénicas del locus GH-PL.

CAPITULO III

ESTRATEGIA GENERAL:

Para cumplir con los objetivos planteados se propuso la estrategia general mostrada en la figura 5.

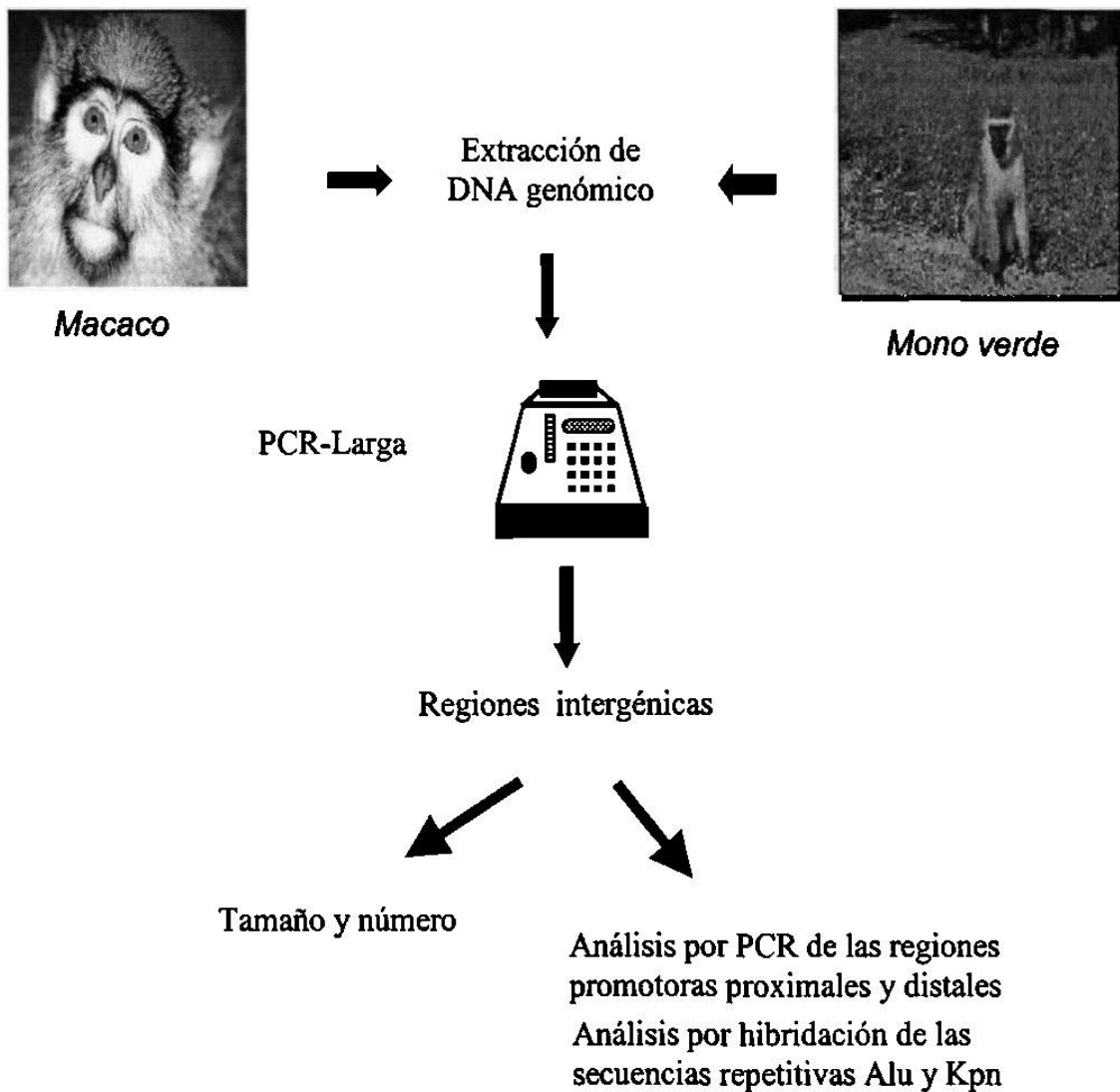


Figura 5. Estrategia General. Se muestran las etapas involucradas en el proyecto: extracción de DNA, amplificación de las regiones intergénicas por PCR-Larga, determinación del número y tamaño de las regiones intergénicas, obtención de regiones promotoras proximales y distales, y detección en éstas por hibridación de secuencias Alu y Kpn.

CAPITULO IV

MATERIAL Y METODOS

4.1 Material

4.1.1 Origen de los reactivos

Las enzimas de restricción fueron adquiridas de New England Biolabs (NEB, Beverly, MA, EUA) y Gibco-Bethesda Research Laboratories (Gibco-BRL, Gaithersburg, MD, EUA).

La enzima DNA polimerasa Taq, la T4 DNA ligasa, al igual que los dNTPs y los reactivos necesarios para realizar la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) provinieron de Promega (Madison, WI, EUA). Los estuches para PCR-Larga y de secuenciación fueron adquiridos de Perkin Elmer Cetus (Norwalk, CT, EUA), mientras que el kit de marcaje Radprime DNA Labeling System de Life technologies (Gibco-BRL).

La tripsina fue adquirida de la compañía DIFCO Laboratories (Detroit, MI, EUA). Los reactivos para elaborar las soluciones, amortiguadores, geles, medios de cultivo, etc., se obtuvieron de las compañías Sigma Chemical (St, Louis, Missouri), Merck (Monterrey, Mex.), Aldrich Chemical Company (Milwaukee, WI, EUA), y DIFCO Laboratories United States Biochemical (USB, Cleveland, OH, EUA).

Los nucleótidos radiactivos [γ - ^{32}P]dATP y [α - ^{32}P]dATP se compraron a la compañía Amersham International (Buckinghamshire, UK).

Los oligonucleótidos utilizados por la PCR, provinieron de la oligoteca de la ULIEG. A continuación se indican las secuencias y las regiones que amplifican.

Iniciador	Secuencia	Secuencia blanco
D11	ggggtctcgaggactggctatc	Región prom. Proximal (5')
ITG11	gactagtctggggagttgggccttgggat	Regiones intergénicas y Regiones promotoras (3')
ITG10	catggtcgacggcagctgtgggttcta	Regiones intergénicas (5')
111	ggtctcatctttgcggtacctaaca	Región potenciadora (3')
114	ggtggtctcgagatataactgaactgc	Región potenciadora (5')
5ED1	aacagaagtggagaggtgagaggagacact	Región prom. Distal (5')
5ED2	ctgaggtagctcatgcaatcagtctctcga	Región prom. Intermedia (5')

4.1.2 Material biológico

El vector utilizado para la clonación, pBlue-Script (pBS-SK+), pertenece a la plasmidoteca del laboratorio de Biología Molecular de la ULIEG.

El DNA de mono verde se extrajo de la línea celular Cos7 que fue proporcionado por el Laboratorio de Biología Celular de la ULIEG. El DNA de macaco fue donado por el Dr. Luis Villarreal de la Universidad de Irvine, Ca, EUA.

Los plásmidos phPL-3-*Bam*HI y phPL-3-*Nhe*I-*Cla*I, construidos por M. Canizales-Espinoza fueron proporcionados por el laboratorio de Biología Celular de la ULIEG. El plásmido phGHN *Bam*HI-*Eco*RI construido por H. Castillo-Ureta fue proporcionado por el laboratorio de Biología Celular de la ULIEG.

La cepa Top 10 de *Escherichia coli* empleada en los ensayos de transformación y propagación de los plásmidos recombinantes, se obtuvo del kit Topo^R XL, PCR CloningTM de Invitrogen (Carlsbad, Ca. EUA)

4.2 Equipo

Para la realización de este trabajo se utilizó lo siguiente: un horno de microondas LG modelo MS-70IC, microcentrifugas eppendorf modelos 5402 y 5415, fuentes de poder ISCO 494 (ISCO Nebraska EUA), EC 600 (E-C Aparatus Corporation, St. Petersburg, Florida) y BRL 250 (Gibco-BRL), una centrifuga Beckman allegraTM 21R, modelo 367570, un agitador de tubos Barnstead Termolyne modelo Maxi Mix (Bubuque, IOWA, EUA), una placa agitadora con control de temperatura marca Corning modelo PC320 (N.Y., EUA), un secuenciador automático GX100 (Genomyx, California, EUA), un secuenciador automático dNA sequencer Long Reader 4200 (LI-COR, California, EUA), un congelador So-Low Enviromental (Cincinnati, Ohio. EUA), un secador de geles (Labconco, Ca, EUA), un termomixer 5436 (Eppendorf), un baño de agua 188 (Precision, Chicago, EUA), una placa de agitación modelo 3520, una incubadora Shell Lab modelo 1525, un baño de agua giratorio (New Brunswick Scientific Co, inc. Edison, N.J. USA), una campana de luz ultravioleta modelo p-036-02 (CBS Scientific Co), una balanza analítica marca OHAUS modelo AP110S, una balanza granataria OHAUS modelo TS4KD (Camibb Göttingen Germany), un horno con vacío (Precision Scientific Group, Chicago, EUA), una incubadora de hibridación modelo 310 (Robbins Scientific Co. Sunnyvale, Ca, EUA).

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

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

El procesamiento de los datos fue realizado en las computadoras IBM modelos G42.

Los procesadores de texto utilizados fueron: *Microsoft Word* Versión 97(© 1987-1997 Microsoft Corporation), procesadores de gráficos *Microsoft Power Point* Versión 97 (© 1987-1997 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 fueron: Amplify Versión 1.2b (Bill Engels © 1992 University of Wisconsin Genetics M. Madison, WI, EUA), DNA Strider TM 1.1 (© Ch. Merck and C.E.A 1989, Service de Biochimie-Département de Biologie-Institut de Recherche Fondamentale-CEA-FRANCE), Clustal Versión 1.5 (Multiple Sequence Alignments) y Phylip (Phylogeny Inference Package, versión 3.5c, Department of Genetics, University of Washintong, Seattle, EUA).

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

4.3 Métodos

4.3.1 Obtención y cuantificación del DNA

4.3.1.1 Extracción de DNA genómico

La extracción de DNA genómico del mono verde se realizó a partir de cultivo de células de Cos 7, como se describe a continuación:

De las placas de cultivo se retiró primeramente el medio de cultivo, y se realizó un lavado con 3 ml de la solución de PBS (NaCl 0.136 M, KCl 2.68 M, Na₂HPO₄ 0.01 M, KH₂PO₄ 0.0017 M pH 7.4) se adicionaron 3 ml de tripsina 1X (tripsina 2.5 %, rojo fenol 1%, solución de antibióticos 1X (2000 UI/ml de penicilina G sódica, 5 mg/ml de sulfato de estreptomicina) en TD 1X estéril (NaCl 0.14 M, KCl 0.05M, Na₂HPO₄ 0.0006 M, Trizma base 0.24M, pH 7.4)) y se incubó 15 - 30 min (en caso de no observar las células desprendidas, se rasparon con un scraper). Después las células se colocaron en un tubo Falcon de 15 ml, se centrifugaron por 3 min a 2200 r.p.m. y se eliminó el sobrenadante.

La extracción del DNA se realizó siguiendo la técnica TSNT (41), que se describe brevemente a continuación. Se colocaron 5 ml del paquete celular en un tubo Falcon de 15 ml, se añadieron 2 ml de buffer de lisis TSNT (triton 2 %, SDS 1 %, NaCl 100 mM, Tris-HCl 10 mM , pH 8, EDTA disódico 1mM) y se mezcló por inversión. Se añadieron 5 ml de fenol saturado y se mezcló nuevamente por inversión. Se añadió 1 ml de SEVAG (cloroformo- alcohol isoamílico, 24:1), se agitó en el vortex hasta homogenizar completamente. Se añadieron 2 ml de TE 1X (EDTA 1mM, Tris-HCl 10 mM, pH 8) y se mezcló por inversión. La separación de las fases se realizó centrifugando a 14000 r.p.m por 5 min, la fase superior se recuperó y se transfirió a un nuevo tubo. Se precipitó el

DNA agregando 0.1 volumen de acetato de sodio 3M, pH 5.3, y 2.5 volúmenes de etanol al 100%, se colocó a -20°C por 1 h, después se centrifugó 15 min a 14000 r.p.m., se descartó el sobrenadante y se agregó 1 volumen de etanol al 70% para eliminar las sales, se dejó secar la pastilla y se resuspendió en 20 μl de agua miliQ estéril.

El DNA de macaco se obtuvo a partir de sangre y fue proporcionado precipitado por lo que únicamente se centrifugó y se lavó la pastilla con 1 volumen de etanol al 70%, después se dejó secar la pastilla y se resuspendió en 20 μl de agua miliQ estéril.

4.3.1.2 Extracción de DNA plasmídico

Las clonas recombinantes que se obtuvieron fueron procesadas para la obtención del DNA plasmídico utilizando el método de lisis alcalina descrito por Sambrook y cols (42).

Se hizo crecer una colonia en 4 ml de medio LB (bactotripton 10 g/L, extracto de levadura 5g/L, cloruro de sodio 10 g/L, pH 6.5-7.0) con 16 μl de ampicilina (400 μg), incubando a 37°C con agitación vigorosa toda la noche. Después 1.5 ml del medio se centrifugaron 30 s. a 14000 r.p.m., el sobrenadante se descartó completamente, y la pastilla se resuspendió en 100 μl de solución I (glucosa 50 mM, Tris-Cl 25 mM, pH 8, EDTA 10mM, pH 8). Se agitó vigorosamente en vortex hasta que la pastilla se disolviera completamente, y se incubó 5 min en hielo. Posteriormente se adicionaron 200 μl de la solución II (0.2 ml de NaOH 10 N, 1.0 ml de SDS 10 % y 8.8 ml de agua), se mezcló por inversión, se incubó 5 min en hielo, después se le agregaron 150 μl de

solución III (60 ml de acetato de potasio 5 M, 11.5 ml de ác. acético conc., 28.5 ml de agua), se agitó en un vortex y se incubó 5 min en hielo. Se centrifugó 5 min a 14000 r.p.m., el sobrenadante se colocó en un tubo nuevo, se agregó 1 volumen de fenol y 1 volumen de SEVAG, se mezcló al vortex, se centrifugó 5 min a 14000 r.p.m., el sobrenadante se colocó en un tubo nuevo. Al sobrenadante se le agregaron 0.1 volumen de acetato de sodio 3 M, pH 5.3 y 2.5 volúmenes de etanol al 100 %, dejándose precipitar a -20°C por 1 h. Posteriormente se centrifugó 15 min a 14000 r.p.m., se descartó el sobrenadante, la pastilla se lavó con 1 volumen de etanol al 70 %, se centrifugó 15 min se dejó secar la pastilla y ésta se resuspendió en 20 μl de agua miliQ estéril.

4.3.1.3 Análisis electroforético y cuantificación del DNA

Las muestras de DNA se analizaron por electroforesis en geles de agarosa a concentraciones variables, dependiendo del tamaño del fragmento y de la resolución requerida.

Los geles de agarosa se prepararon al porcentaje requerido en buffer TBE 0.5 X (Tris-borato 0.089 M, ácido bórico 0.089 M). El gel solidificado se colocó en una cámara de electroforesis, la cual tenía el mismo buffer. Las muestras se mezclaron con jugo azul 6X (azul de bromofenol al 0.25 %, xilencianol al 0.25 % y glicerol al 30 %) y se depositaron en el gel preparado. La electroforesis se llevó a cabo a 100 V, concluida ésta, el gel se colocó en una solución de bromuro de etidio a 2 $\mu\text{g}/\text{ml}$ por 5 min y

posteriormente se lavó con un exceso de agua para eliminar los residuos de bromuro y así proceder a su observación y análisis, mediante el programa computacional *Molecular Analyst* del Gel Doc. Utilizando un marcador de peso molecular adecuado se pudo determinar el tamaño del fragmento del DNA. Adicionalmente se pudo cuantificar el DNA por la intensidad de fluorescencia de la banda teñida con bromuro de etidio. Este compuesto se intercala entre las bases del DNA y emite una fluorescencia al ser excitado por la luz UV. La fluorescencia emitida es proporcional a la cantidad de bromuro de etidio que se intercala, dependiendo así de la cantidad de DNA y de la longitud del fragmento. Se realizó una curva de calibración a partir de diferentes concentraciones de DNA de λ comercial y de esta manera se determinó la concentración del DNA genómico de macaco y del mono verde.

4.3.2. Obtención por PCR-Larga y caracterización de las regiones intergénicas del locus GH-PL

Para obtener las regiones intergénicas se realizó la estrategia descrita en el siguiente esquema (Figura 6).

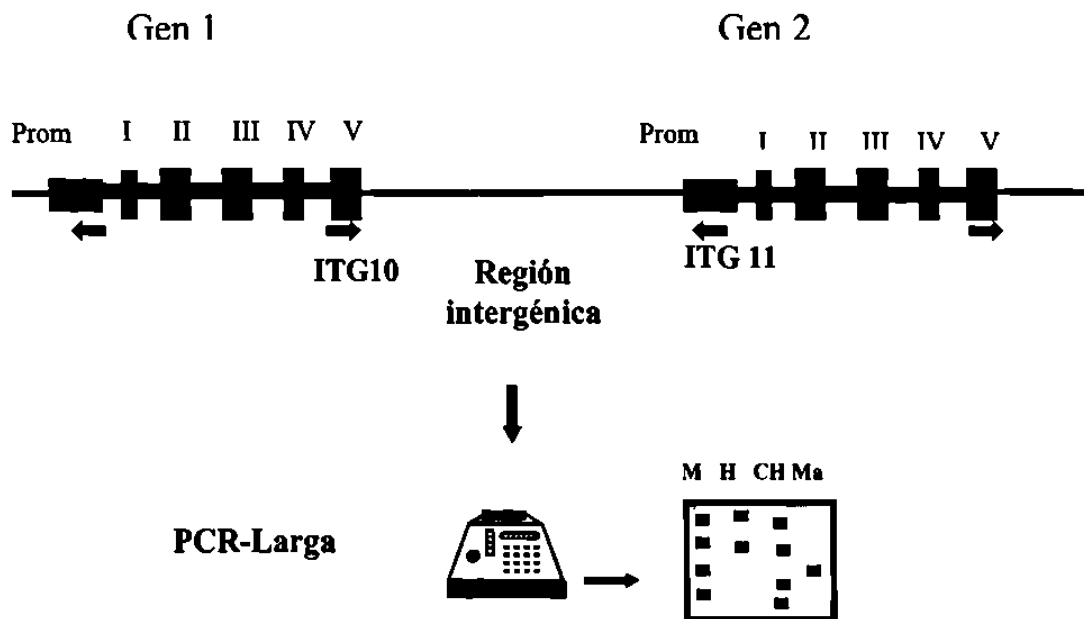


Figura 6. Estrategia para obtener las regiones intergénicas. A partir de iniciadores que ya estaban disponibles en el laboratorio y que se aparean en secuencias consenso del inicio y del final de los genes GH-PL del humano, se realizó una PCR-Larga para amplificar las regiones intergénicas del locus GH-PL. Los productos de amplificación se visualizaron por electroforesis y tinción del gel.

4.3.2.1 Optimización de las condiciones de amplificación por PCR-Larga

Se realizó la estandarización de la reacción a partir de los DNAs genómicos del macaco y del mono verde, variando las concentraciones de DNA y de $MgCl_2$ así como la temperatura de apareamiento de los iniciadores. El programa de amplificación fue el recomendado por el kit utilizado e incluye los pasos siguientes:

- | | |
|------------------------------|--|
| 1. Desnaturalización previa | 80°C por 5 min (Hot start) |
| 1. Desnaturalización inicial | 93°C por 30 s |
| 2. 16 ciclos: | 93°C por 30 s |
| | 68°C por 10 min |
| 3. 12 ciclos | 93°C por 30 s |
| | 68°C por 10 min, con incrementos de 15 s en cada ciclo |
| 4. Extensión prolongada | 72°C por 5 min |

La reacción se realiza con un “hot start”, teniendo dos capas en el tubo separadas por una perla de cera. La composición de estas dos capas se describe en la tabla 1.

Tabla 1. Condiciones de reacción para la PCR-larga

Componentes de la PCR	Conc. Final
Inferior	
Buffer 3.33X	1 X
Iniciador ITG 10, (5Ed1 ó 5ED2) 5 μ M	0.4 μ M
Iniciador ITG 11, 5 μ M	0.4 μ M
Mg(OAc) ₂ , 25 Mm	1.1 mM
dNTPs, 10 mM	200 μ M
H ₂ O mQ estéril cbp	10 μ l
Se le agregó a cada tubo una perla de cera para realizar el hot start	
Superior	
Buffer 3.33 X	1 X
rTth/Vent, 2 U/ μ l	0.128 U/ μ l
DNA, 25 ng/ μ l	1 ng/ μ l
H ₂ O mQ estéril cbp	14 μ l
Esta mezcla se adicionó arriba de la perla de cera, el volumen final siendo 25 μ l	

Se realizó una electroforesis en un gel de agarosa al 0.8%, el cual se tiñó con bromuro de etidio para visualizar los productos amplificados. Utilizando un marcador de peso molecular adecuado se pudo determinar el tamaño de las bandas obtenidas.

4.3.2.2 Caracterización enzimática de las regiones intergénicas

Las regiones intergénicas se caracterizaron con las enzimas: *Afl* II, *Sfl* I, *Xho* I, *Kpn* I, *Hind* III y *Eco* RV. Las digestiones se realizaron siguiendo las recomendaciones del proveedor (Tabla 2). Las incubaciones se realizaron en la mayoría de los casos a 37°C, por toda la noche. Posteriormente, los productos de la digestión se resolvieron en geles de agarosa al 0.8 % y se tiñeron con bromuro de etidio.

Tabla 2. Condiciones de digestión enzimática

Componentes de la reacción	Conc. Final
Buffer 10X	1X
BSA 10X	1X
Enzima 10U/ μ l	1U/ μ l
DNA 50 ng/ μ l	12 ng/ μ l
H ₂ O mQ estéril cbp	25 μ l

4.3.2.3 Purificación de las bandas amplificadas

Para purificar las bandas amplificadas, éstas se resolvieron por electroforesis en un gel de agarosa al 0.6 % para mejorar la separación, la migración se efectuó a 35 V durante toda la noche. Las bandas se tiñeron con violeta de genciana al 1% y las de interés se cortaron con un bisturí estéril. El DNA se purificó con el kit de extracción en gel de Qiaex II. Con el siguiente procedimiento:

Se adicionaron 3 volúmenes de buffer QX1 al fragmento del gel. Se mezcló al vortex por 30 s el reactivo Quiaex II y se adicionaron 10 μ l a la mezcla anterior. Esta se incubó a 50°C por 10 min, se centrifugó la muestra por 30 s y se quitó el sobrenadante cuidadosamente. La pastilla se lavó con 500 μ l de buffer QX1, centrifugando por 30 s para eliminar el sobrenadante. Posteriormente se lavó 2 veces la pastilla con 500 μ l de buffer PE, se centrifugó por 30 s y se secó la pastilla por 10-15 min a temperatura ambiente. Por último, el DNA se eluyó de la pastilla con 20 μ l de TE 1X. Después de 5 min de incubación a temperatura ambiente el tubo se centrifugó por 30 s y el sobrenadante se transfirió a un nuevo tubo.

El DNA purificado fue caracterizado con enzimas de restricción o sometido a PCR

4.3.3 Análisis de las regiones promotoras por PCR

Se realizó un análisis de las regiones promotoras del locus GH-PL amplificando tres longitudes diferentes de éstas, a partir del DNA genómico o de los productos amplificados y purificados de las regiones intergénicas. Estas amplificaciones se llevaron a cabo utilizando tres juegos de iniciadores previamente diseñados en el laboratorio sobre secuencias conservadas entre los cinco genes GH-PL del humano. Los sitios de alineamiento y los productos amplificados se esquematizan en la Figura 7.

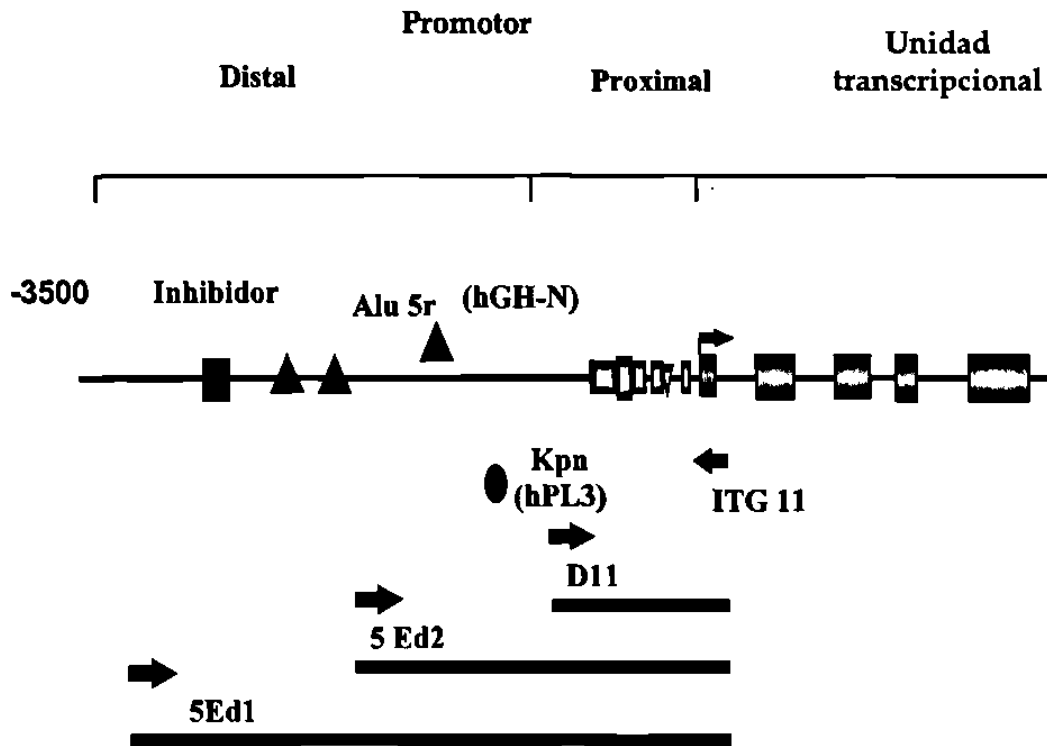


Figura 7. Obtención por PCR de diferentes longitudes de las regiones promotoras. A partir de iniciadores ya disponibles en el laboratorio, se obtuvieron la región promotora proximal con el juego de iniciadores D11-ITG11, una región de aproximadamente de 1054 pb (5Ed2-ITG11) y la región promotora distal (5Ed1-ITG11). Se localizan las secuencias repetitivas y los elementos reguladores en la región promotora.

4.3.3.1 Obtención de la región promotora proximal (380 pb)

A partir del DNA genómico de humano y de las regiones intergénicas del locus GH-PL de los monos del viejo mundo amplificadas y purificadas, se realizó una PCR utilizando los iniciadores D11-ITG11, bajo las condiciones estándar de reacción descritas en la tabla 3. Después de un paso de desnaturalización a 95°C por 5 min, se realizaron 30 ciclos, cada uno consistiendo de los 3 pasos siguientes: 94°C/1min, 60°C /1 min y 72°C/ 1 min y la amplificación se terminó con una extensión final de 5 min a 72°C.

Tabla 3. Condiciones estándar para la PCR de las regiones promotoras

Componentes de la PCR	Conc. final
Buffer 10X	1X
MgCl ₂ 25 mM	1.5 mM
dNTP s 10 mM	0.2 mM
Iniciador D11, 5 µM	0.4 µM
Iniciador IGT 11, 5 µM	0.4 µM
DNA polimerasa Taq	0.05 U/µl
DNA 100 ng/µl	4 ng/µl
H ₂ O mQ estéril cbp	25 µl

4.3.3.2 Obtención de la región promotora intermedia (1050 pb)

Para amplificar las regiones promotoras intermedias, la reacción fue realizada utilizando el kit de PCR-Larga y las condiciones exactas se presentaron en la tabla 1. Se siguió la misma estrategia, utilizando un primer 5' diferente (5Ed2).

- | | |
|------------------------------|---|
| 1. Desnaturalización previa | 80°C por 5 min (Hot start) |
| 3. Desnaturalización inicial | 93°C por 30 s |
| 4. 16 ciclos: | 93°C por 30 s |
| | 58°C por 1 min |
| 3. 12 ciclos | 93°C por 30 s |
| | 58°C por 1 min, con incrementos de 10 s en cada ciclo |
| 4. Extensión prolongada | 72°C por 5 min |

4.3.3.3 Obtención de las regiones promotoras distales (~ 3000pb)

Utilizando la misma estrategia se amplificaron por PCR-Larga, las regiones promotoras distales, cambiando el primer 5' por el 5Ed1. El programa de amplificación cambió ligeramente, como se indica a continuación, sin embargo las condiciones de la reacción fueron las mismas a las de la tabla 1.

1. Desnaturalización previa	80°C por 5 min (Hot start)
5. Desnaturalización inicial	93°C por 30 s
6. 16 ciclos:	93°C por 30 s
	60°C por 1 min
3. 12 ciclos	93°C por 30 s
	60°C por 1 min, con incrementos de 10 s en cada ciclo
4. Extensión prolongada	72°C por 5 min

4.3.4 Clonación de los productos amplificados de las regiones promotoras proximales y distales

La clonación de los productos amplificados se realizó en vector T, empleando la estrategia descrita en la Figura 8.

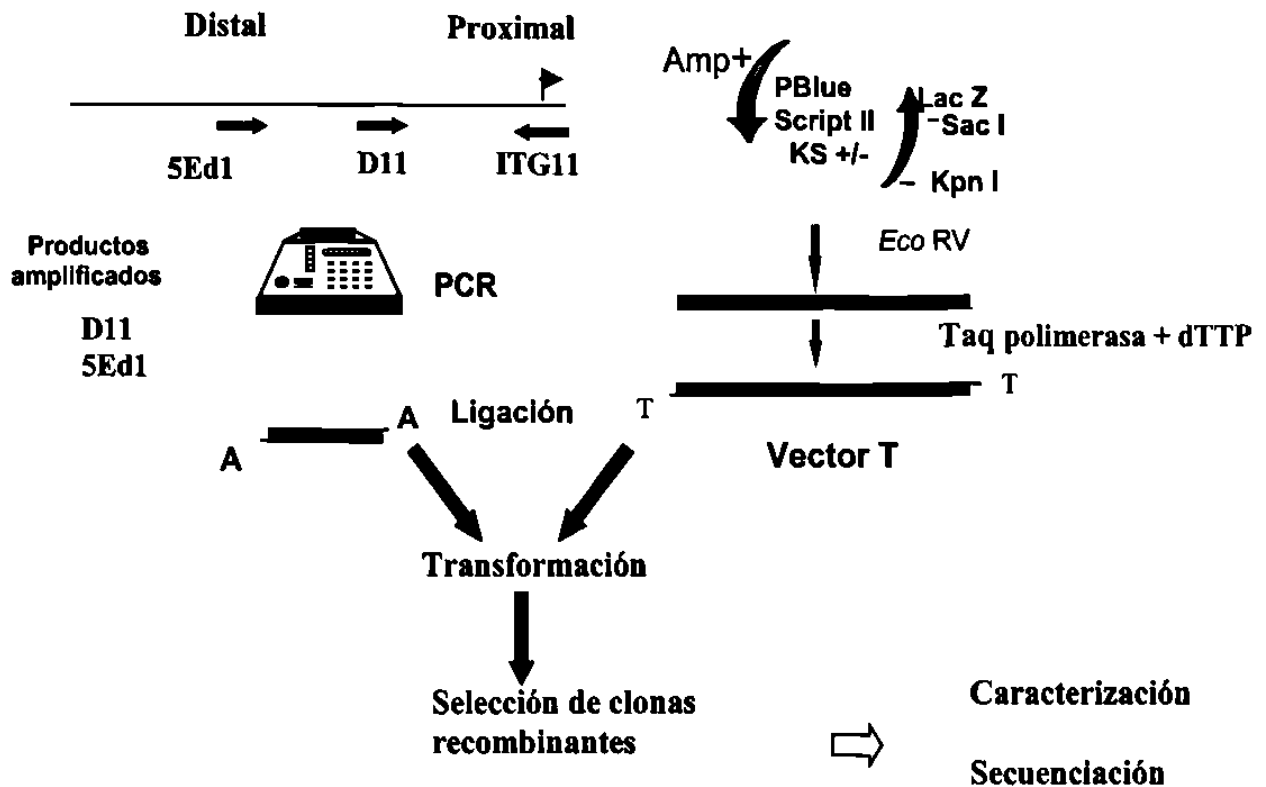


Figura 8. Estrategia general para realizar la clonación de las regiones promotoras. A partir de los productos amplificados y utilizando vector T se realizó una ligación y luego una transformación. Las clonas recombinantes se caracterizaron y se determinó la secuencia nucleotídica del inserto.

4.3.4.1 Preparación del vector T

Las clonaciones se realizaron en el vector de clonación pBS SK +. Primeramente una digestión con la enzima de restricción *Eco* RV, permitió linearizar el vector (Tabla 4) dejando extremos romos.

Tabla 4. Digestión de pBS- (SK +) con *Eco* RV

Componentes de la reacción	Conc final
Buffer 2 NEB, 10 X	1X
BSA, 10 X	1X
<i>Eco</i> RV, 10 U/ μ l	1 U/ μ l
DNA pBS-SK II, 1 μ g/ μ l	500 ng/ μ l
H ₂ O miliQ cbp	40 μ l

La reacción se incubó a 37°C durante toda la noche y una vez verificado que la digestión fuera total en un gel de electroforesis al 0.8%, se sintetizó el vector T utilizando la actividad de transferasa terminal de la DNA polimerasa Taq. El vector T se preparó con 2 μ g del DNA linearizado, 1.25 U/ μ l de la enzima DNA polimerasa Taq, 2mM de dTTP y 1.5mM de MgCl₂, en un volumen final de 40 μ l. La reacción se incubó durante 2 h a 72°C. El vector se mantuvo a -20°C hasta su utilización.

4.3.4.2 Ligación y transformación

Los productos de PCR de las regiones promotoras se sometieron a una ligación en un volumen final de 20 μ l con una relación inserto-vector 1:3. La reacción se incubó a 16°C toda la noche, la mitad del volumen fue utilizada para transformar células Top 10 Ca⁺⁺ competentes preparadas siguiendo el protocolo de Inoue H (43), que se describe a continuación.

Se inoculó el medio LB, con una colonia bacteriana y se dejó crecer toda la noche. Con 1 ml de este medio se inocularon 50 ml de medio SOB (bactotripton 2%, extracto de levadura 0.5 %, NaCl 10 mM, KCl 2.5 mM, MgCl₂ 10 mM, MgSO₄ 10 mM, pH 6.7- 7.0), las bacterias crecieron a 37°C con agitación vigorosa hasta alcanzar una DO a 600 nm de 0.4 – 0.6 y después se colocaron en hielo durante 10 min. Posteriormente, el medio de cultivo se centrifugó a 2500 g (5000 r.p.m.) durante 10 min a 4°C, se resuspendieron suavemente las células en 20 ml de CaCl₂ 0.1 M, y se colocaron en hielo 20 min. Se centrifugaron nuevamente a 2500 g (5000 r.p.m.) por 10 min a 4°C, se removió el sobrenadante y finalmente se resuspendieron las células en 2 ml de CaCl₂ 0.1 M. 100 µl de las células se transformaron con 10 µl de la reacción de ligación. Después de una incubación a 4°C por 30 min, se realizó un choque térmico a 42°C por 90 s, se agregaron 900 µl de medio LB a las células y se incubaron a 37°C por 1 h. Después se centrifugaron 1 min a 5000 r.p.m., se descartó el medio dejando solo lo suficiente para resuspender la pastilla, y a la suspensión se le adicionaron 50 µl de X-gal (20 mM) y 20 µl de IPTG (100 mM). Se homogeneizó completamente y las células finalmente se plaquearon, incubándolas a 37°C por 16 h. Las bacterias que recibieron el inserto se seleccionaron por su fenotipo: AMP^R y β-gal⁻. Las colonias blancas se crecieron en 4 ml de medio LB para posteriormente extraer de cada una de ellas el DNA plasmídico. Se realizó una electroforesis en gel de agarosa al 0.8 % para comparar la migración del DNA y el control fue el pBS –SK+. Solo las clonas que presentaban una migración retardada fueron seleccionadas para caracterizaciones posteriores.

Las clonas seleccionadas para las regiones promotoras proximales se caracterizaron con las enzimas de restricción *Hind* III y *Eco* RI que liberan al inserto, ya que lo flanquean. Las clonas de las regiones promotoras distales se caracterizaron por PCR utilizando las condiciones de PCR-Larga antes descritas (Tabla 1) y el producto amplificado se caracterizó con las enzimas de restricción *Bam* HI, *Apa* I y *Apa* LI. En el caso de las regiones promotoras cortas, las enzimas de restricción fueron *BstE* II y *Ssp* I.

4.3.4.3 Determinación de la secuencia nucleotídica

La técnica utilizada para la secuenciación es una adaptación de la descrita por Sanger y cols. en 1977. La secuenciación enzimática se realizó siguiendo las especificaciones del Kit AmpliCycle (Perkin-Elmer). Los fragmentos sintetizados se marcaron al incorporar [α -³²P] dATP y se resolvieron en un gel de acrilamida al 6% y urea al 50%. El gel secado y lavado se puso en contacto con películas de autorradiografía ultrasensibles.

En la parte final de este proyecto, parte de las secuencias se determinó con un método no radiactivo, utilizando iniciadores marcados (IRDye 700 y IRDye 800) y el kit de la termo-sequenasa de USB.

4.3.5 Preparación de las sondas para los ensayos de hibridación

Las secuencias reguladoras (potenciadoras e inhibidoras) y las secuencias repetitivas Alu y Kpn se evidenciaron por hibridación en los productos amplificados derivados de las regiones intergénicas del locus GH-PL.

4.3.5.1 Obtención de la sonda del inhibidor

A partir de la construcción phPL3-*NheI-ClaI*, se amplificó por PCR-Larga la región promotora distal de hPL3 utilizando las mismas condiciones antes descritas (Tabla 1), posteriormente el producto amplificado se digirió con la enzima *BamHI* para liberar la secuencia que contiene la región inhibidora (578 pb), se cortó la banda y se purificó con el kit de extracción en gel de Quiaex II (ver 4.3.2.3).

4.3.5.2 Obtención de la sonda de la secuencia Alu

La sonda Alu se obtuvo de la construcción de phGH-N-*BamHI-EcoRI*, digiriendo con las enzimas *Hind III-Ssp I*, para obtener únicamente la secuencia Alu (300 pb). La banda de interés se separó por electroforesis, se cortó y se purificó con el kit de extracción en gel de Quiaex II.

4.3.5.3 Obtención de la sonda de la secuencia Kpn

La sonda Kpn se obtuvo a partir de la construcción de phPL3 *Nhe I- Cla I*, amplificando la región promotora distal como en el caso de la región inhibidora y el producto amplificado se digirió con las enzimas *Eco RI – Sma I*, liberando un fragmento de 228 pb, el cual se resolvió por electroforesis, se cortó y se purificó con el kit de extracción en gel de Quiaex II.

4.3.5.4 Marcaje de las sondas

Las secuencias inhibidoras, Alu y Kpn purificadas se marcaron utilizando el kit de marcaje, Radprime DNA System de la siguiente manera. Se desnaturalizaron 25 ng de

DNA disuelto en TE 1X a 95°C por 5 min, inmediatamente se colocó el tubo en hielo, se añadieron 1 µl 500 µM dGTP, 1 µl 500 µM dTTP, 1 µl 500 µM dCTP, 20 µl 2.5X de solución de random primers, 5µl [α -³²P]dATP, 3000 Ci/mmol y agua para completar 49 µl, se mezcló brevemente y se adicionó 1 µl del fragmento Klenow, se mezcló nuevamente y se incubó a 37°C por 2 h. Finalmente se añadieron 5 µl de solución stop para parar la reacción. Los productos marcados se purificaron por una cromatografía de exclusión sobre una columna de sephadex G50 (42). A la sonda marcada se le adicionaron 5 ml de la solución de hibridación (SSC 6X, SDS 0.5 %, y reactivo de Denhardt's 5X) y la hibridación se realizó en gel.

4.3.5.5 Obtención y marcaje de la sonda del potenciador

Para la obtención de la región potenciadora primeramente se realizó el marcaje de un primer (111), que se utilizó posteriormente en la reacción de PCR (Tabla 5). La reacción se llevó a 37°C, después de 1 h se le adicionaron nuevamente 10 µl de la reacción pero sin iniciador. La incubación se prolongó 1 h más, y finalmente la enzima se inactivó a 65 °C por 10 min. Se empleó la construcción *phPL3NheI-ClaI*, para obtener la secuencia de interés (potenciador) por medio de PCR, utilizando las condiciones estándar de reacción descritas en la tabla 6. Después de un paso de desnaturalización a 95°C por 3 min, la amplificación se realizó durante 30 ciclos a 95°C / 1 min, 63°C / 1 min y 72°C / 1 min. Por último, el programa terminó en un ciclo de extensión a 72°C/5min.

Tabla 5. Condiciones de marcaje del primer

Componentes de la reacción	Conc. Final
Buffer 10X	1X
Primer 111	5.0 μ M
T4 polinucleótido cinasa 10 U/ μ l	1.0 U/ μ l
[γ -P ³²] ATP (10 mCi/ml)	2.0 μ Ci/ μ l
H ₂ O mQ estéril cbp	10.0 μ l

Tabla 6. Condiciones estándares para la PCR

Componentes de la PCR	Conc. final
Buffer 10X	1X
MgCl ₂ 25 Mm	1.5 mM
dNTP's 10 mM	0.1 mM
³² P-Iniciador 111*, 5 μ M	0.2 μ M
Iniciador 114, 5 μ M	0.2 μ M
DNA polimerasa Taq	0.05 U/ μ l
DNA 50 ng/ μ l	2 ng/ μ l
H ₂ O mQ estéril cbp	25 μ l

4.3.6 Hibridación en gel

4.3.6.1 Preparación del gel

Las hibridaciones se realizaron directamente en el gel siguiendo el protocolo siguiente. Los productos amplificados (regiones intergénicas, regiones promotoras intermedias y distales), se separaron mediante electroforesis en un gel de agarosa al 0.8%. El gel se secó con el secador de vacío a temperatura ambiente durante 30 min y 30 min aplicando una temperatura de 60°C. Posteriormente el gel se lavó 3 veces por 30 min cada vez, primero con la solución de depurinación (HCl 0.1 N), después con la solución de desnaturalización (NaCl 1.5 M y NaOH 0.5 M) y por último con la solución de neutralización (NaOH 1 M, 0.5 M de Tris-HCl 0.5 M, pH 7.2). Al terminar el paso de neutralización, el gel se lavó con la solución 10X de SSC (NaCl 1.48M, citrato de sodio 0.15M, pH 7).

4.3.6.2 Condiciones de hibridación

La hibridación se realizó utilizando las regiones intergénicas para evidenciar la región potenciadora y las regiones promotoras distales e intermediarias para identificar las secuencias inhibitoras, secuencias repetitivas Alu y Kpn.

El gel pretratado se prehibridó con 5 ml de la solución de hibridación (6X de SSC, 0.5 % de SDS y 5X de reactivo de Denhardt's) durante 1 h a 58°C. Al finalizar este paso se removió la solución y se adicionaron 5 ml de solución de hibridación junto con la sonda marcada. El gel se hibridó toda la noche a 58 °C. Al día siguiente se removió la solución de hibridación y se lavó brevemente con la solución 2 X SSC, 0.1 % SDS, dos veces con la solución 2X SSC, 0.1 % a 55°C por 5 min, después se lavó dos veces con la

solución 1X SSC, 0.1% SDS a 55°C por 10 min y finalmente, se realizó un lavado con la solución 0.1X SSC, 0.1% SDS a 65°C por 30 min. El gel se secó completamente antes de exponerlo a una película ultrasensible a -70°C.

4.3.6.3 Análisis de las secuencias nucleotídicas

Se realizaron alineamientos de las secuencias obtenidas de las clonas, mediante el programa Clustal W, además de utilizar otras secuencias de clonas ya existentes en el laboratorio o disponibles en el GenBank. Los árboles filogenéticos se construyeron utilizando el método de Máxima Parsimonia, con el programa DNAPars (del paquete Phylip (44)).

CAPITULO V

RESULTADOS

5.1 Obtención de las regiones intergénicas del locus GH-PL

A partir de DNA genómico de macaco y de mono verde y utilizando los iniciadores ITG10 e ITG11, se estandarizaron las condiciones de la PCR-Larga para obtener las regiones intergénicas del locus GH-PL. Como se muestra en la Figura 9, se obtuvieron regiones intergénicas de diferentes tamaños, unas largas de alrededor de 12500 pb y otras más cortas de aproximadamente 5000 pb. El chimpancé utilizado como control positivo presentó cuatro bandas intergénicas: dos largas de 12500 pb y dos cortas.

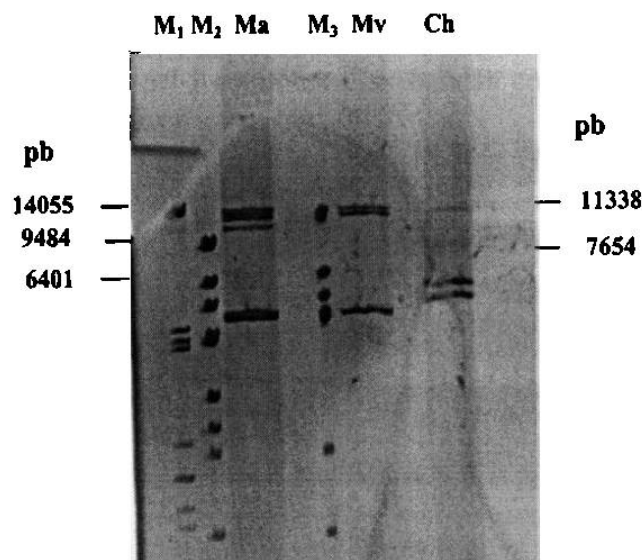


Figura 9. Amplificación de las regiones intergénicas por PCR-Larga. Se muestran las amplificaciones obtenidas por PCR-Larga a partir de DNA genómico de macaco (Ma), mono verde (Mv) y chimpancé (Ch). Las bandas se resolvieron en un gel de agarosa al 0.6 % y se tiñeron con bromuro de etidio. Los marcadores comerciales fueron M₁ (λ Pst I), M₂ (Mk2), M₃ (Mk1).

En el caso del macaco se pueden observar tres bandas intergénicas largas de 13100 pb, 12400 pb, y 11370 pb. Además se separó también una banda corta muy intensa de 5300 pb. El mono verde presentó un patrón similar, sin embargo únicamente se observaron dos bandas largas de 13400 pb y de 12270 pb, además de una corta de 5580 pb. La intensidad del producto amplificado representado por esta banda corta, sugirió que podría provenir de la amplificación de dos regiones intergénicas.

5.2 Caracterización de las regiones intergénicas

Las bandas intergénicas amplificadas se caracterizaron tomando como referencia la secuencia humana. Cabe señalar que los dos monos presentaron el mismo patrón de caracterización (Figura 10), sin embargo éste fue diferente a lo esperado en base al humano. Por ejemplo, en el caso del humano: *Afl* II, *Kpn* I, *Eco* RV y *Hind* III cortan únicamente las bandas largas, *Sfl* I solamente las bandas cortas y *Xho* I corta ambas bandas, mientras en los monos del viejo mundo: *Afl* II e *Hind* III cortaron tanto los productos largos como los cortos, *Kpn* I cortó las bandas cortas y *Xho* I cortó una de las intergénicas largas (Figura 10).

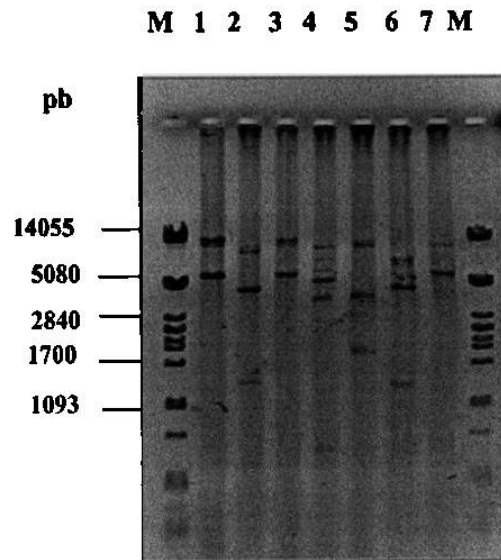


Figura 10. Caracterización de las regiones intergénicas de macaco. Las enzimas para realizar la caracterización se seleccionaron en base a la secuencia humana, las bandas intergénicas amplificadas se cortaron con diferentes enzimas de restricción. En el carril 1 se muestra el producto amplificado (P.A). sin digerir, P.A. digerido con: 2. *Afl* II, 3. *Sfl* I, 4. *Xho* I, 5. *Kpn* I, 6. *Hind* III, 7. *Eco* RV. Se utilizó el marcador comercial (M), λ *Pst* I. La caracterización del mono verde fue similar a la del macaco.

5.3 Caracterización de las regiones intergénicas cortas.

Para verificar el número de productos que integran la banda intergénica corta, se realizó una caracterización de la banda purificada y reamplificada, con las enzimas *Eco* RV y *Hind* III. El patrón que se obtuvo fue el mismo para ambos monos, apreciándose un corte parcial (Figura 11), aun con una mayor cantidad de enzima. Por lo que efectivamente la región intergénica corta está formada por dos bandas, que se pueden diferenciar por los sitios de restricción de *Eco* RV y *Hind* III.

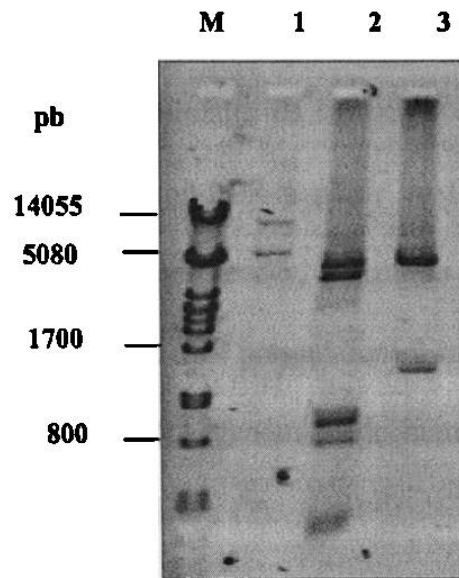


Figura 11. Caracterización de la región intergénica corta de mono verde. La región intergénica corta purificada y amplificada se digirió con *Eco* RI (carril 2) e *Hind* III (carril 3), se utilizó como control el producto amplificado el cual se muestra en el carril 1, M marcador λ *Pst* I. El mismo patrón se observó poniendo un exceso de enzima. La caracterización de la banda corta de macaco fue similar a la del mono verde.

5.4 Obtención de las regiones promotoras por PCR

Las amplificaciones de las diferentes longitudes de las secuencias promotoras se realizaron a partir del DNA genómico, así como de los productos amplificados y purificados de las regiones intergénicas. Sin embargo, la electroforesis no permitió resolver suficientemente las regiones intergénicas largas por lo que se purificaron las tres bandas juntas, de la misma manera las regiones cortas tampoco se lograron resolver por lo que éstas se purificaron también juntas.

5.4.1 Obtención de las regiones promotoras proximales

Las regiones promotoras proximales de los genes del locus GH-PL del macaco y del mono verde se obtuvieron por PCR a partir de DNA genómico y de las regiones intergénicas amplificadas y purificadas, utilizando el juego de primers D11 - ITG11. Todos los productos amplificados presentaron el mismo tamaño de 380 pb. Se utilizó como control positivo el DNA genómico de humano, cuyos productos amplificados también fueron de 380 pb (Figura 12).

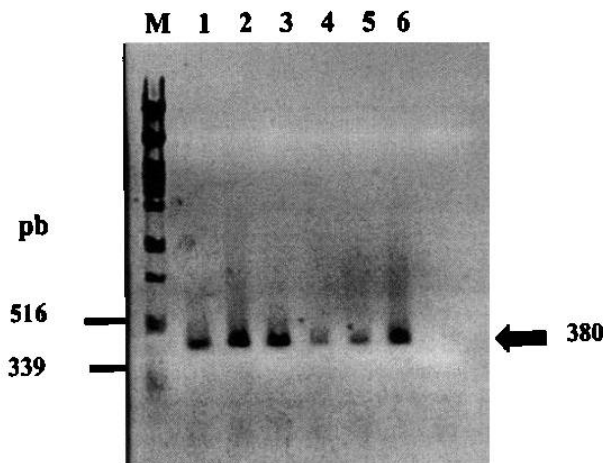


Figura 12. Amplificación de las regiones promotoras proximales. Se amplificaron los promotores de los genes GH-PL con los iniciadores D11-ITG11, a partir de DNA genómico (carriles 1 y 4 respectivamente) y de las regiones intergénicas purificadas de macaco y mono verde. Los carriles 2 y 5 corresponden a las regiones intergénicas largas de macaco y mono verde, respectivamente, mientras que los carriles 3 y 6 corresponden a las regiones cortas. Se utilizó el marcador λ *Pst* I para determinar el tamaño del fragmento.

Los productos amplificados de las regiones promotoras proximales se caracterizaron con enzimas de restricción y el patrón de caracterización se utilizó posteriormente para diferenciar las regiones promotoras distales (Figura 13). El macaco y mono verde presentaron un patrón de caracterización muy similar.

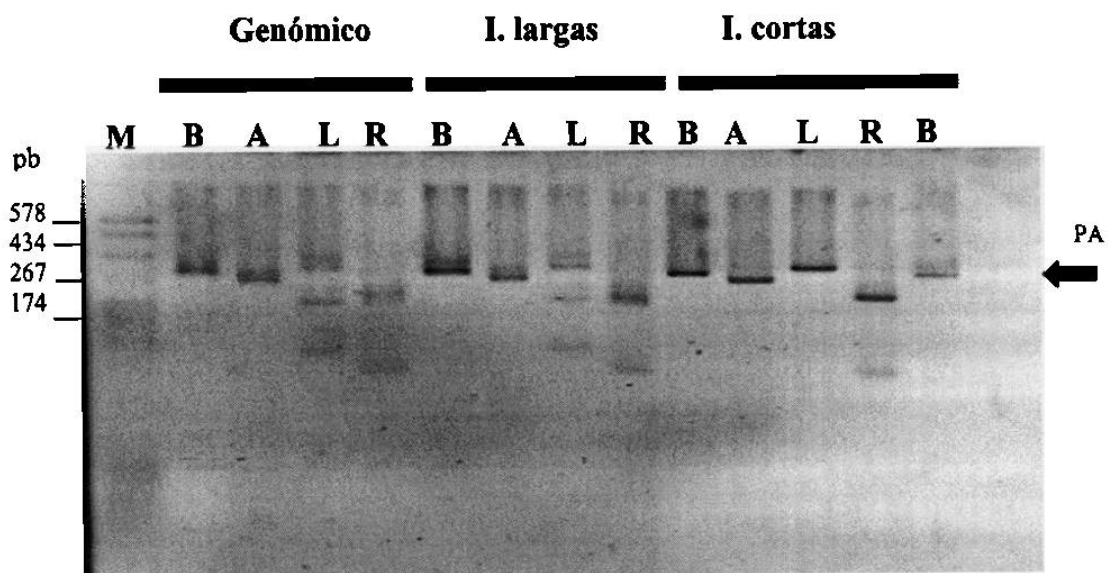


Figura 13. Caracterización de las regiones promotoras de macaco. Los productos amplificados obtenidos del DNA genómico, de las intergénicas largas y cortas, se digirieron con diferentes enzimas de restricción. Los productos generados se resolvieron en un gel de agarosa al 2 %. M, marcador Puc *Hae* III, B, *Bam* HI, A, *Apa* I, L *Apa* LI, R, *Rsa* I. La flecha indica el producto sin digerir.

5.4.2 Obtención de las regiones promotoras intermedias

Utilizando un segundo iniciador 5' consenso que se aparee en una región más alejada del sitio de inicio del promotor, se logró amplificar las regiones promotoras intermedias del locus GH-PL del macaco y del mono verde. Todos los productos amplificados obtenidos

del DNA genómico, de las regiones intergénicas largas y cortas de los dos monos del viejo mundo presentaron el mismo tamaño de 1050 pb (Figura 14); sin embargo, en el humano utilizado como control, los productos amplificados presentaron dos tamaños: uno de alrededor de 1100 pb que corresponde a la amplificación de los genes hPL1, hPL2, hGHV y otro de aproximadamente 1400 pb que proviene de los genes hGHN y hPL3.

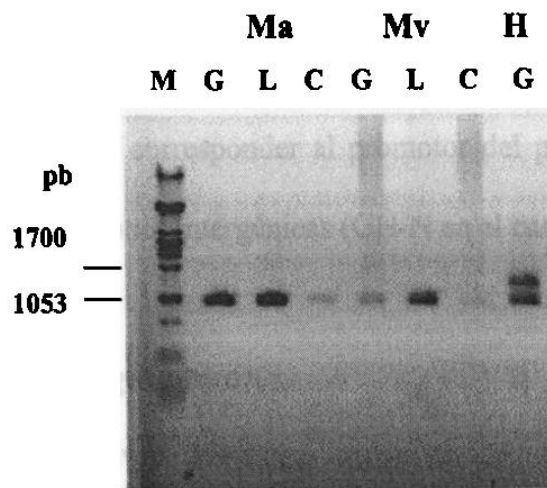


Figura 14. Amplificación de las regiones intergénicas intermedias. Los productos amplificados se resolvieron en gel de agarosa al 0.8 % y se tiñeron con bromuro de etidio. M. Marcador λ *Pst* I, Ma, macaco. Mv, mono verde. H, humano. G, genómico. L, región intergénica larga. C, región intergénica corta.

5.4.3 Obtención de las regiones promotoras distales

Una región todavía más distal del promotor de los genes GH-PL se amplificó utilizando un tercer primer 5' (5Ed1). En el humano, utilizado como control positivo, se observaron únicamente dos bandas, correspondiendo la superior a todos los genes placentarios y la inferior al gen hGHN. Los productos obtenidos a partir del

DNA genómico de los monos del viejo mundo presentaron diferentes tamaños (entre 3200 y 1600 pb). Las reamplificaciones de las regiones intergénicas largas presentaron tres tamaños diferentes y las reamplificaciones de las regiones intergénicas cortas dieron un solo tamaño, el cual corresponde al tamaño menor obtenido a partir de las regiones largas. Cabe señalar que las amplificaciones a partir de las regiones intergénicas largas de macaco y de mono verde mostraron un patrón diferente (Figura 15 B).

En la amplificación obtenida con el DNA genómico se observaron cuatro bandas, y no tres como a partir de las regiones intergénicas (Figura 15 A). La cuarta banda (alrededor de 1600 pb) podría corresponder al promotor del primer gen de locus, el cual no está incluido en las regiones intergénicas (GH-N en el caso del humano).

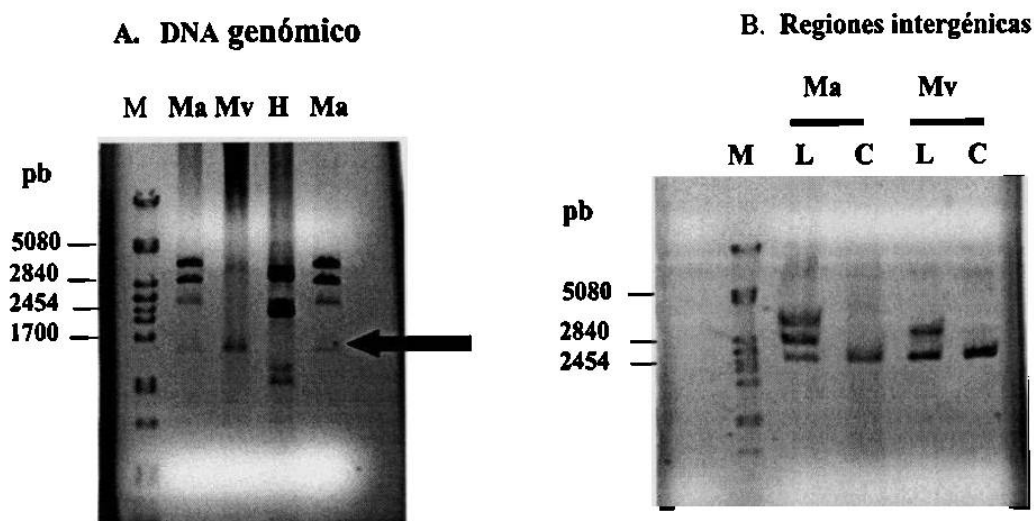


Figura 15. Amplificación de las regiones promotoras distales. Los productos amplificados con el juego de iniciadores 5Ed1-ITG11 a partir de DNA genómico (A) y de las regiones intergénicas purificadas (B) se resolvieron en geles de agarosa al 0.8 %. M, marcador λ *Pst* I, Ma: macaco. Mv: mono verde, H: humano. L: región intergénica larga. C: región intergénica corta. La banda adicional que se observa únicamente en el caso del DNA genómico se señala con la flecha.

Para corroborar que la banda obtenida de la amplificación del DNA genómico de macaco y mono verde correspondía a un promotor distal del locus GH-PL, ésta se purificó y se reamplificó con el juego de primers que amplifica la región promotora proximal (D11-ITG11). El producto amplificado que se obtuvo fue de 380 pb, que era el tamaño esperado. Posteriormente se realizó una caracterización enzimática del producto amplificado con *Bam* HI, *Apa* I y *Apa* LI, para confirmar el resultado.

En base al marcador molecular, se pudo determinar el tamaño de cada producto amplificado; los resultados obtenidos a partir de los tres juegos de iniciadores utilizados para amplificar diferentes longitudes de la secuencia promotora, se recapitulan en la tabla 7.

Evolución de las regiones intergénicas del locus GH-PL, en los monos del viejo mundo

Tabla 7. Tamaños (en pb) de los productos amplificados de las regiones promotoras.

Primates	Intergénicas	5Ed1	5Ed2	380
Macaco		3200		
	I. Largas	2900	1050	380
		2510		
	I. Cortas	2490	1050	380
	1 ^{er} gen del locus	1660	1050	380
Mono Verde		3070		
	I. Largas	2900		
		2510	1050	380
	I. Cortas	2490	1050	380
	1 ^{er} gen del locus	1680	1050	380
Humano	I. Largas (PL2, hGHV)	3000	1100	380
	I. Cortas (hPL1, hPL3)	3100	1100	380
	hGH-N	2110	1410	380

5.5 Clonación de las regiones promotoras proximales y distales

Los productos amplificados de las regiones promotoras se clonaron en vector T y las clonas recombinantes se seleccionaron primeramente por el retardo en la migración del plásmido (Figura 16) y luego verificando la presencia y tamaño del inserto.

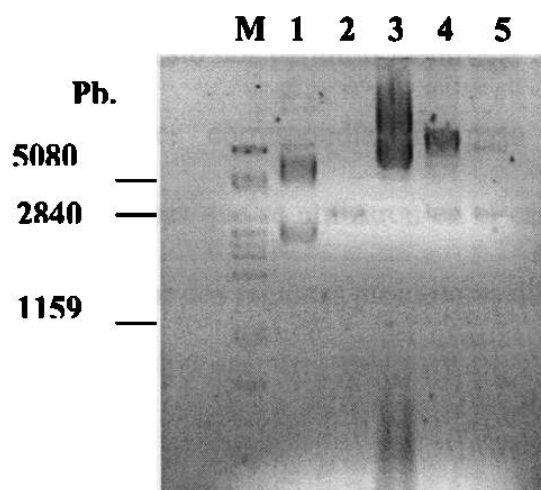


Figura 16. Identificación de las clonas recombinantes. Las clonas se seleccionaron de acuerdo al retardo que presentaron durante la electroforesis en gel de agarosa al 0.8%. M, marcador λ *Pst* I, 1: pBS sin digerir, 2: pBS linealizado 3: Clona 5Ed1-ITG11 (promotor distal), 4 y 5 : Clonas D11-ITG11 de las regiones promotoras proximales.

En el caso de las regiones promotoras proximales (pp) se realizó una digestión con las enzimas de restricción *Eco* RI y *Hind* III, que se encuentran flanqueando el inserto para verificar su tamaño, que debería ser de 380 pb. Posteriormente se le realizó una caracterización con las enzimas de restricción: *Bam*HI, *Apa*I y *Apa*LI para identificar a

que región promotora correspondía (Figura 17). De las regiones promotoras proximales se obtuvieron cuatro clonas del macaco y tres del mono verde (tabla 8).

Para identificar las clonas que contenían las regiones promotoras distales (pd), las cuales deberían contener un inserto de ~ 3000 pb, se realizó una amplificación de las clonas utilizando los primers 5Ed1-ITG11 y los productos amplificados se compararon con la amplificación inicial. Esto nos permitió identificar a cual de las tres bandas de las regiones promotoras distales correspondía. El paso siguiente fue realizar una caracterización con las enzimas que se utilizaron en el caso de las regiones promotoras proximales. Se lograron clonar dos regiones promotoras distales de cada mono.

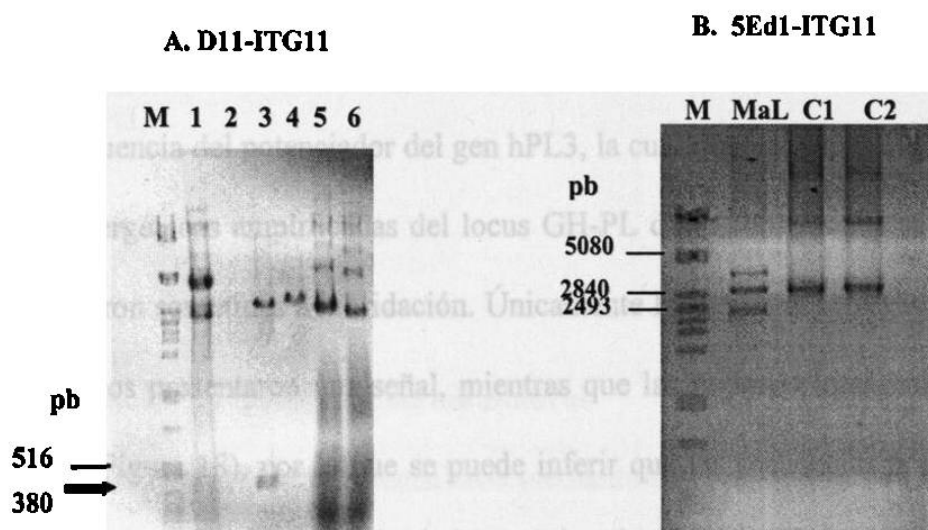


Figura 17. Caracterización del inserto de las clonas obtenidas. A) Caracterización con el juego de primers D11-ITG11 (región promotora proximal) y B) Caracterización con el juego 5Ed1-ITG11 (región promotora distal). A) Los carriles 4, 5 y 6 corresponden a un plásmido sin digerir y el carril 3 a la digestión con *EcoRI-Hind III*, M es el marcador λ *Pst I*, y el carril 1 corresponde al pBS sin digerir. B) Las clonas candidatas para las regiones distales fueron reamplificadas y el resultado de la amplificación de dos clonas se muestran en los carriles C1 y C2, mientras que el carril MaL corresponde al producto amplificado a partir de las regiones intergénicas largas del macaco.

Tabla 8. Clonas obtenidas de las regiones promotoras

	Promotor distal (pd)	Promotor proximal (pp)	
	5ED1-ITG11	D11-ITG11	
Macaco	MapdL	MvppL	MvppC
	2	2	2
Mono Verde	MvpdL	MvppL	MvppC
	2	1	2

5.6 Identificación de las secuencias potenciadoras.

Las secuencias potenciadoras se identificaron por medio de hibridación utilizando como sonda la secuencia del potenciador del gen hPL3, la cual tiene un tamaño de 430 pb. Las regiones intergénicas amplificadas del locus GH-PL de los dos monos se separaron en un gel y fueron sometidas a hibridación. Únicamente las regiones intergénicas largas de los dos monos presentaron una señal, mientras que las regiones intergénicas cortas no hibridaron (Figura 18), por lo que se puede inferir que las secuencias potenciadoras se encuentran únicamente en las regiones intergénicas largas al igual que en el humano.

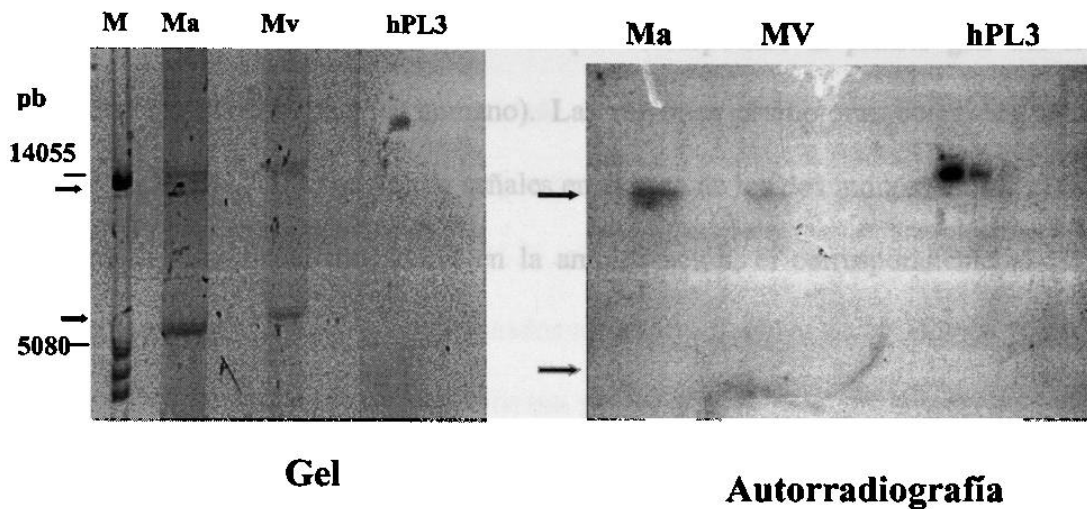


Figura 18. Identificación de las secuencias potenciadoras. Las regiones intergénicas amplificadas se resolvieron en un gel de agarosa al 0.6 %, para obtener una mayor resolución de las bandas. Diferentes cantidades del producto amplificado de hPL3 se colocaron como control positivo. M marcador λ *Pst* I, Ma: macaco, Mv: mono verde, hPL3 (45 ng, 10 ng, 1 ng)

5.7 Identificación de las secuencias inhibidoras

Las secuencias inhibidoras se evidenciaron mediante hibridación utilizando las regiones promotoras distales amplificadas. La sonda de 578 pb, que se obtuvo a partir de una construcción de phPL3, se marcó con radiactividad. Cabe señalar que las regiones inhibidoras en el humano se encuentran en la región 5' de los genes que se expresan en placenta (27). En los monos del viejo mundo las secuencias inhibidoras se observaron en la mayoría de los productos amplificados obtenidos con el juego de iniciadores 5Ed1-

ITG11, a partir de las regiones intergénicas largas y cortas (Figura 19). La única banda que presentó una señal muy débil fue la que correspondió al primer gen del locus (equivalente a hGH-N para el humano). Las regiones promotoras obtenidas con los iniciadores (5Ed2-ITG11) no dieron señales en el caso de los dos monos, siendo el único carril que dió una señal muy débil en la amplificación, el correspondiente al DNA genómico humano.

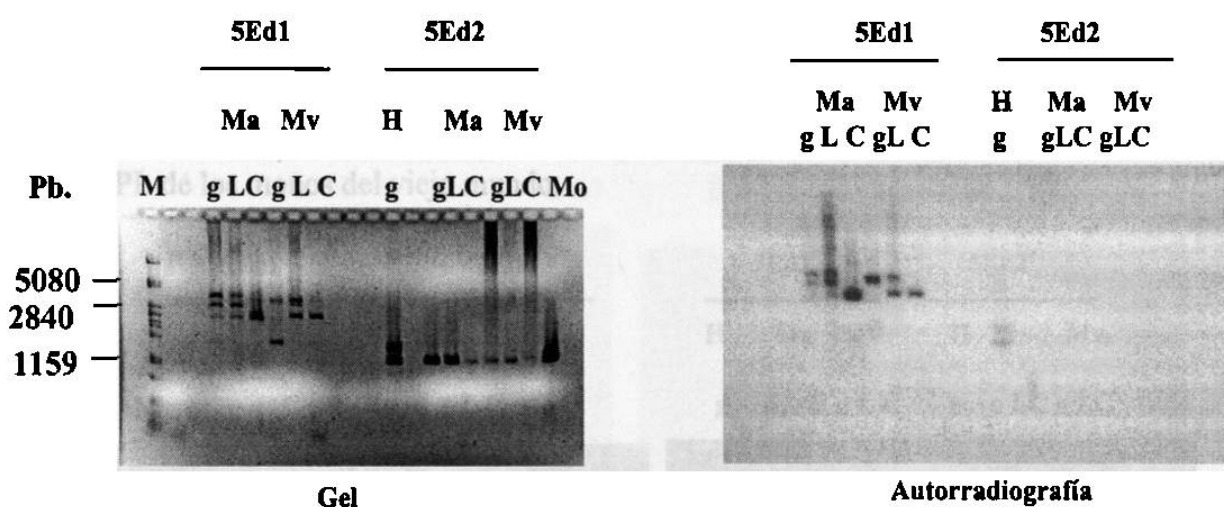


Figura 19. Identificación de las secuencias inhibitoras. Los productos de la amplificación de las regiones promotoras distales e intermedias obtenidos con los iniciadores 5Ed1 y 5Ed2, respectivamente, a partir de DNA genómico (g), regiones intergénicas largas (L) y cortas (C), fueron separados en un gel de agarosa al 0.8% (parte izquierda). El gel se sometió a hibridación con la sonda correspondiente a la región inhibitora de hPL3. El resultado de la autorradiografía se muestra en la parte derecha. El producto amplificado a partir de DNA genómico de humano con los juegos de iniciadores se incluyó como control (H). Para verificar los tamaños de las bandas se utilizó un marcador de peso molecular λ *Pst* I.

5.8 Identificación de las secuencias repetitivas Alu

Las secuencias Alu se identificaron por medio de hibridaciones utilizando una sonda marcada, de un tamaño de 300 pb, derivada de un producto amplificado. Se utilizaron los productos amplificados de las regiones promotoras distales y de las regiones promotoras intermedias de los genes GH-PL obtenidos con los iniciadores 5Ed1 y 5Ed2, respectivamente. Los productos amplificados correspondientes a las regiones promotoras distales del locus GH-PL de los dos monos presentaron hibridación, mientras que las regiones promotoras intermedias no dieron señal (Figura 20), por lo que se deduce que existen secuencias repetitivas Alu en las regiones distales de los promotores de los genes GH-PL de los monos del viejo mundo.

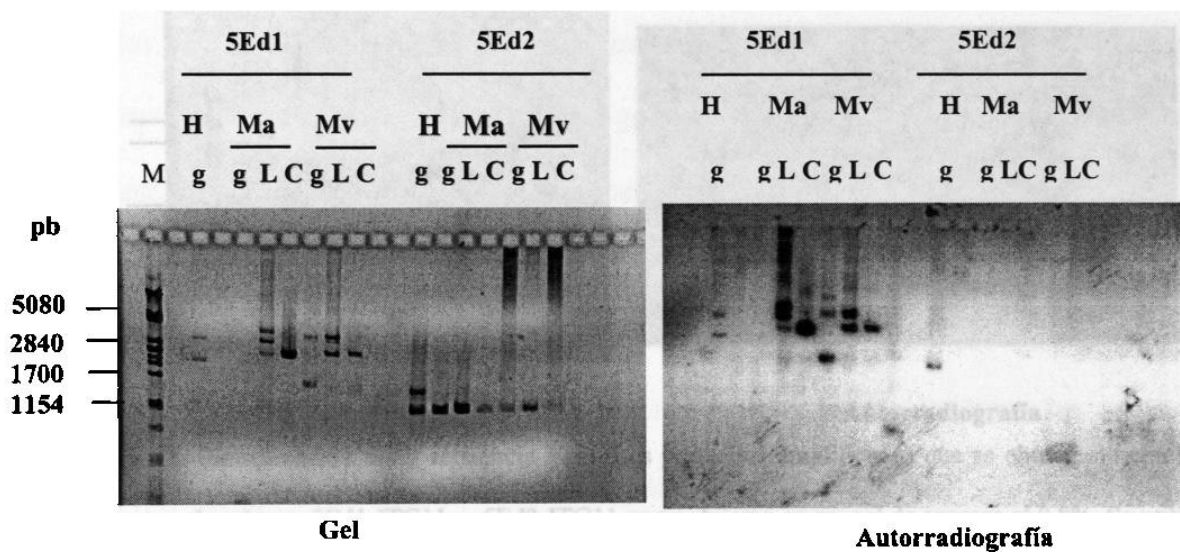


Figura 20. Identificación de las secuencias Alu. Las secuencias Alu se evidenciaron utilizando los productos amplificados con los juegos de iniciadores 5Ed1-ITG11 y 5Ed2-ITG11. Los productos amplificados se resolvieron por electroforesis y después, el gel se hibridó con una sonda de 300 pb correspondiente a una secuencia Alu del locus hGH-hPL. Se utilizó como control positivo al humano. La nomenclatura utilizada fue la siguiente: H: humano, Ma: macaco, Mv: mono verde, g: DNA genómico, L: región intergénica larga, C: región intergénica corta, M: marcador λ Pst I.

5.9 Identificación de las secuencias Kpn

Para evidenciar las secuencias Kpn en los promotores de los genes GH-PL de los monos del viejo mundo, se utilizó como sonda la secuencia presente en la construcción de phPL3, la cual tiene un tamaño de 228 pb. Se utilizaron los promotores de los genes obtenidos por amplificación con los iniciadores 5Ed1-ITG11 y 5Ed2-ITG11. Como se observa en la Figura 21, únicamente el carril correspondiente al humano dio señal. Por lo tanto no hay inserción de secuencia Kpn en el locus GH-PL de los dos monos.

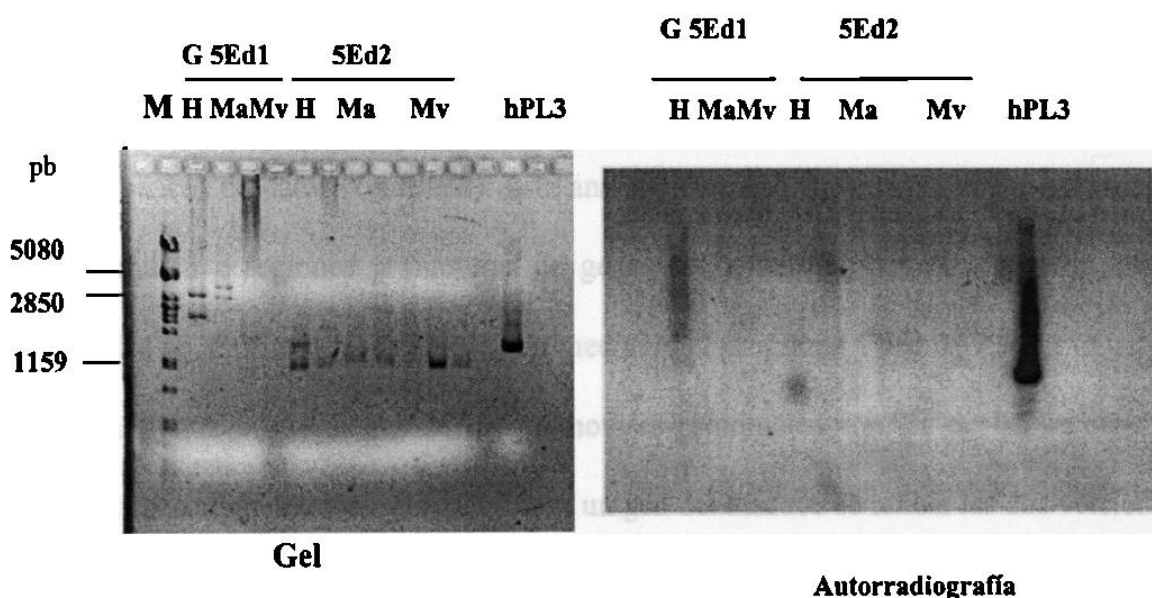


Figura 21. Identificación de la secuencia Kpn. Los productos amplificados que se obtuvieron con los dos juegos de primers 5Ed1-ITG11, y 5Ed2-ITG11 se resolvieron en un gel de agarosa al 0.8%. Se utilizó como control positivo al producto amplificado a partir del DNA genómico humano (H) y de hPL3. El gel fue hibridado con una sonda correspondiente a la secuencia Kpn del locus GH-PL humano. Se muestran los resultados tanto de la electroforesis (izquierda) como de la autorradiografía (derecha).

5.10 Secuenciación de las regiones promotoras proximales y distales

Las clonas obtenidas de las regiones promotoras de los monos del viejo mundo se secuenciaron utilizando los iniciadores universales (m13 “forward” y m13 “reverse”), que se aparean en el vector pBS SK+. Esto con la finalidad de realizar comparaciones con las secuencias humanas y determinar las variaciones que presentan.

Las secuencias obtenidas se encuentran en el anexo 1 y corresponden a la región promotora proximal de cuatro genes del macaco y tres del mono verde. Además se cuenta con la secuencia parcial de la región promotora distal de dos genes de macaco y de mono verde.

Una vez obtenidas las secuencias, éstas se mandaron a comparar en el programa *Blast*, con los bancos de datos (GenBank). Este análisis permitió confirmar que las secuencias correspondían a regiones promotoras de genes de la familia GH-PL. Después, estas secuencias se alinearon y se compararon mediante el programa Clustal W, para tratar de relacionar entre sí las clonas de los promotores proximales con las de las secuencias distales. Esta comparación indicó que para un gen del macaco se tenían las dos versiones del promotor variante (proximal y distal). Finalmente, se logró clonar las regiones promotoras proximales de cinco genes del locus GH-PL de ambos monos.

5.11 Análisis de las secuencias promotoras

Teniendo las secuencias completas de la región promotora proximal de los genes del macaco y del mono verde, se realizó un alineamiento de éstas mediante el programa

Clustal W, para comparar e identificar los principales sitios de unión a factores transcripcionales (Figura 22). La longitud del promotor es poco variable, observándose una deleción mayor sobre todo en el promotor MappL4. La caja TATA está conservada en todos los promotores, así como el sitio de Pit distal y Sp1. Sin embargo, el sitio Pit proximal presenta más cambios en ciertos promotores y puede ser parcialmente deletado. El sitio de respuesta a AMPc no se encuentra conservado. En el sitio de unión del iniciador InrE se observan muy pocas modificaciones.

Para tener una mayor inferencia de los cambios evolutivos que se presentaron en dichos monos, se realizó una nueva comparación incluyendo a las secuencias del locus hGH-hPL. Utilizando el método de máxima parsimonia, se construyó un árbol filogenético de estas regiones promotoras (Figura 23). Se puede observar una estrecha relación de una secuencia promotora (MappL2) del macaco con la secuencia del gen GH-V ya disponible en el GenBank. Esto sugiere que estas secuencias corresponden al mismo gen y por lo tanto el gen variante del macaco seguiría una región intergénica larga.

En el árbol, se puede observar claramente que las regiones promotoras del complejo GH-PL de los monos del viejo mundo se organizan en dos grupos: uno incluye únicamente a las regiones intergénicas largas, y el otro a los promotores de una región intergénica larga y a los provenientes de las regiones intergénicas cortas. Además, se puede notar también la estrecha relación que existe entre los promotores del macaco y del mono verde, lo cual sugiere que tuvieron un origen evolutivo muy similar. Eso no se observa con las secuencias del humano que forman un grupo muy distinto.

Evolución de las regiones intergénicas del locus GH-PL, en los primates del viejo mundo

	Spl	Pit distal	Creb
Consenso	gTgGgAAGgGAAAGATGaCAAGcCAGGGGcATGATcCCaGCATGgTGGGAGgagcTTCTAAATTAGCCATTAGCACAGGcaCgTcAGtgggccaaccatg		
hGH-N	---	---	---
mGH-V	a	t	a
Mapp12	---	---	---
Mapp14	a	t	a
Mappc6	---	---	---
Mappc2	---	---	---
Mvpp16	---	---	---
Mvppc8	---	---	---
Mvppc6	---	---	---
Mvpd17	---	---	---
Mapd13	---	---	---
Mapd11	---	---	---

	Pit Proximal	TATA	InrE
Consenso.	cgtaaacGGTACAcagAAAtAgTgGGGtCAAgCAGcaAGATaAGGGcCAGggTATAAAAGGGgCCcACaAGAGACCgCTCca		
hGH-N	A	---	---
mGH-V	---	---	---
Mapp12	---	---	---
Mapp14	---	---	---
Mappc6	---	---	---
Mappc2	---	---	---
Mvpp16	---	---	---
Mvppc8	---	---	---
Mvppc6	---	---	---
Mvpd17	---	---	---
Mapd13	---	---	---
Mapd11	---	---	---

Figura 22. Comparación de los promotores. Se compararon a los promotores del humano, macaco y mono verde mediante el programa clustal. La secuencia consenso se indica en la primera línea, los cambios están remarcados en las secuencias analizadas mientras que () indica la concordancia del nucleótido y (*) una deleción. En los cuadros se marcan los sitios de unión de factores transcripcionales, en donde se observa que Spl y Pit distal están muy conservados, todos presentan deleciones y cambios en Creb. En el sitio de unión de Pit proximal se presentan sustituciones y una deleción en Mapp14. InrE se observa relativamente conservado.

CAPITULO VI

DISCUSIÓN

El gen de la hormona del crecimiento constituye un buen modelo para realizar estudios evolutivos (45,46,47), sin embargo, este gen pertenece a una familia multigénica que incluye entre otros, al lactógeno placentario, por lo cual constituye también un buen modelo para estudiar la evolución de una familia multigénica.

En el humano, ya se conoce la organización del locus hGH-hPL, siendo ésta: hGHN, hPL1, hPL2, hGHV y hPL3 (14); en otros primates se han realizado estudios, como por ejemplo en el macaco (39), habiéndose hasta ahora logrado obtener únicamente los DNAs y la secuencia completa del gen GH-V. En el mono araña y chimpancé se determinó recientemente la organización parcial del locus GH-PL (40).

Las regiones intergénicas en el humano son cuatro, dos presentan un tamaño de 6000 pb y las dos restantes son de alrededor de 13000 pb. El mono araña presenta cinco regiones intergénicas, todas son del mismo tamaño de alrededor de 3000 pb. El locus GH-PL del chimpancé es más semejante al humano, pero presenta cinco regiones intergénicas, las cuales tienen un tamaño más heterogéneo.

Los monos del viejo mundo divergieron después de los monos del nuevo mundo, y antes de los grandes monos (Figura 4), por lo cual ocupan una posición estratégica para inferir acerca de los eventos evolutivos que dieron lugar al incremento de las regiones

intergénicas que se puede observar entre el mono araña y el chimpancé. Además, el análisis de las regiones intergénicas en monos del viejo mundo permitió confirmar el número de genes que conforman el locus GH-PL en estas especies. La organización del locus GH-PL se puede determinar a partir del análisis de clonas de una biblioteca genómica (13), ó utilizando una herramienta muy útil en Biología Molecular: la PCR.

En este trabajo se propuso obtener por PCR las regiones intergénicas del locus GH-PL de dos especies de monos del viejo mundo: macaco y mono verde, para después caracterizarlas y realizar la comparación con el humano.

6.1 Cinco regiones intergénicas integran el locus GH-PL de los monos del viejo mundo

Las regiones intergénicas se obtuvieron mediante PCR-Larga, utilizando primers ya disponibles en el laboratorio, los cuales se diseñaron en base a la secuencia humana, y habían permitido amplificar previamente las regiones intergénicas del mono araña (40).

Las regiones intergénicas de los monos del viejo mundo son cinco, lo cual indica que el locus está formado por seis genes. Golos y cols. (39) describieron cinco genes en el macaco, sin embargo la intensidad de las bandas hibridadas en el análisis por Southern blot del DNA genómico, podía sugerir más de cinco genes, de los cuales cuatro se expresan en placenta y uno en hipófisis. El análisis de las regiones intergénicas del locus GH-PL permitió aclarar el resultado anterior confirmando que son seis genes los que integran el complejo. Las regiones intergénicas de los monos del viejo mundo se clasifican de acuerdo a su tamaño en regiones intergénicas largas con un

tamaño de aproximadamente 12500 pb y regiones intergénicas cortas que miden alrededor de 5500 pb.

El patrón obtenido es similar al observado en los grandes monos, pero muy diferente al del mono araña. Por lo tanto, la expansión del locus GH-PL se realizó entre la divergencia de los monos del nuevo mundo y del viejo mundo, hace aproximadamente 23 a 48 millones de años.

Las regiones intergénicas amplificadas a partir del DNA genómico de los monos del viejo mundo se caracterizaron con enzimas de restricción. El patrón que se obtuvo fue muy diferente al patrón de las regiones intergénicas del humano, por lo que con este resultado no fue posible relacionar las regiones intergénicas de los dos monos con las del humano. Las diferencias observadas en los mapas de restricción de las regiones intergénicas entre los monos y el humano sugirieron que estas secuencias tuvieron una evolución diferente. Este resultado corrobora el origen diferente de los GH-V de macaco y humano descrito previamente por Wallis (46).

6.2 Evolución de los promotores proximales

Otro enfoque para estudiar el locus GH-PL es a partir de las regiones promotoras. Los resultados de la amplificación de los promotores a partir de las regiones intergénicas confirmaron que el locus está formado por seis genes. De cinco de ellos se clonaron y caracterizaron por lo menos sus regiones promotoras proximales. Estas se obtuvieron utilizando primers específicos que se aparean después del sitio de unión a Sp1. Los productos de los monos del viejo mundo presentan un tamaño similar al observado en

el humano. Cabe mencionar que el análisis de las secuencias de las regiones promotoras permitió inferir sobre la evolución de la regulación de la expresión de los miembros de esta familia génica (48,49).

Los principales factores transcripcionales (como Pit, InrE, Sp1 y AMPc) involucrados en la regulación de los genes hGHs y hPLs se encuentran dentro de las 300 primeros pares de bases del promotor.

Al realizar el alineamiento de las secuencias promotoras de los dos monos se observó que la caja TATA está estrictamente conservada en las dos especies analizadas. El factor transcripcional Pit-1 presenta dos sitios de unión en los promotores de GH y PLs; el sitio proximal está poco conservado presentando deleciones y sustituciones, en cambio, el sitio distal se encuentra conservado en la mayoría de las regiones promotoras. En humano el sitio distal es poco necesario para dirigir la expresión de los promotores, ya que el acceso a este sitio puede ser bloqueado por Sp1, cuyo sitio está adyacente (31), sin embargo, cabe remarcar que las regiones promotoras clonadas corresponden del segundo gen en adelante del complejo GH-PL. Suponiendo una organización similar a la del humano, estos promotores corresponden a PLs y/o GHs-V, por lo tanto presentarían una expresión placentaria en la cual se demostró que por lo menos en el humano, Pit-1 no participa (34). Al contrario, el sitio de unión del iniciador InrE está conservado en todas las secuencias, lo que reafirma la importancia de su papel en la regulación placentaria de estos genes (34).

El elemento de respuesta al AMPc está poco conservado y generalmente parcialmente deletado, lo que podría sugerir que esta secuencia presenta poca importancia al nivel de la regulación.

Con los alineamientos realizados de las regiones promotoras también se pudo evidenciar claramente como se relacionan las bandas largas y cortas del macaco con las respectivas bandas del mono verde. Las secuencias relacionadas provienen de duplicaciones sucesivas, en las cuales las secuencias se van diferenciando dependiendo de la presión selectiva. En el árbol filogenético es muy interesante notar como las regiones intergénicas largas y cortas forman grupos diferentes y debido a duplicaciones evolutivas que se presentaron, éstos se fueron diferenciando para dar lugar al locus GH-PL. Además, la interrelación muy estrecha entre las bandas cortas de ambas especies permite inferir que surgieron del mismo origen evolutivo. El promotor de una región intergénica larga está asociada con ambas bandas cortas del mono verde, esto podría sugerir que todos se originaron de un evento de duplicación pero que algunas sufrieron inserciones posteriores que dieron lugar a las diferencias que se observan.

Se conoce que hGH-V en el humano está atrás de una intergénica larga, en el macaco se pudo realizar la comparación de la secuencia de GH-V (reportada en el GenBank) con las secuencias de las regiones promotoras obtenidas y se encontró que al igual que en humano, variante de macaco está atrás de una región intergénica larga.

6.3 Evolución de las regiones promotoras intermedias y distales

Todas las regiones promotoras intermedias de los monos del viejo mundo presentaron el mismo tamaño de 1050 pb. En cambio en el humano, se obtienen tres tamaños diferentes dependiendo de los genes considerados, esto es debido a la presencia de secuencias repetitivas Alu y Kpn. Por lo tanto, se puede inferir que estos elementos repetitivos fueron insertados posteriormente, específicamente en el linaje del humano. Esto fue confirmado por hibridación en donde las regiones intermedias de los monos del viejo mundo no presentaron señal, confirmando la ausencia de estos elementos repetitivos.

Las regiones promotoras distales de ambos monos son más variables, sobre todo las de las regiones intergénicas largas e inclusive dentro de los mismos monos existen diferencias en el tamaño. En estas regiones se encuentran inserciones Alu y el elemento inhibidor como lo demostraron las hibridaciones de las regiones promotoras del locus GH-PL de los dos monos. El análisis de las secuencias promotoras indicó claramente que las primeras 1000 pb de la región promotora están muy conservadas entre los cinco genes internos del locus; las diferencias se observaron en la parte distal y se pueden relacionar con la inserción de elementos repetitivos y reguladores (inhibidor).

En las regiones distales obtenidas con el DNA genómico se observó una banda adyacente no amplificada a partir de las regiones intergénicas. Esta pudiera corresponder al primer gen del locus de los monos del viejo mundo equivalente al gen hGH-N en humano. Esta especulación se comprobó al realizar la reamplificación de la banda utilizando los iniciadores de las regiones promotoras proximales (D11-ITG11) y se

corroboró aún con la hibridación del inhibidor, en la cual se observó que tanto las bandas largas como las cortas dieron señal con el inhibidor excepto esta banda. Por lo tanto, probablemente en monos el igual que en el humano, el gen N fue el primero del locus.

Las regiones intergénicas largas de los monos presentan hibridación con el potenciador, igual que en el locus humano. Tomando en base que en el humano el potenciador está atrás de los PLs (14), se puede inferir que las regiones intergénicas largas de los monos del viejo mundo corresponden a la parte 3' de los genes PLs.

Estos resultados indican que el inhibidor y el potenciador se insertaron antes de la divergencia de los monos del viejo mundo y participaron en el alargamiento de las regiones intergénicas. La adquisición de la expresión tejido específico se presentó cuando se insertaron los elementos regulatorios, por lo tanto se podría suponer que los cinco genes internos del macaco y del mono verde se expresan en placenta, lo que Golos y cols. reportaron para el macaco (39).

6.4 El locus GH-PL es altamente dinámico

La organización del locus de los monos del viejo mundo no se pudo determinar debido a que no se clonaron los genes. Pero teniendo como referencia al locus humano y en base a los resultados obtenidos de las regiones intergénicas, se puede proponer que el locus en los monos del viejo mundo presenta una organización similar con seis genes. Existen dos posibles organizaciones: 2 GHs y 4 PLs ó 3 GHs/3 PLs. La falta de evidencia sobre

la naturaleza del último gen (el que no fue reportado por Golos y cols. (39), no permite decidir entre las dos opciones.

Las organizaciones posibles de las dos opciones (2 GHs/4 PLs y 3 GHs/3PLs) se muestran en la Figura 24.

La clonación de los genes del locus permitirá completar este trabajo y elucidar la organización del locus GH-PL del macaco y mono verde. Los eventos de duplicación que generaron el locus fueron diferentes en los monos del viejo mundo y en el humano; sin embargo, hubo eventos compartidos como la inserción del inhibidor y potenciador que probablemente vinieron con las secuencias Alu por transposición. Estas secuencias repetitivas se encuentran involucradas en los procesos de recombinación (10), por lo que se infiere que estos elementos son la principal fuerza que dirige la evolución.

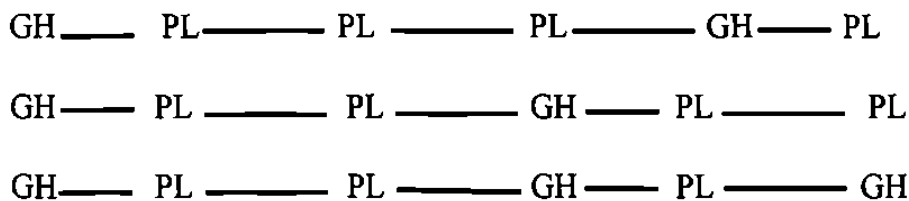


Figura 24. Hipótesis sobre la organización del locus GH-PL en los monos del viejo mundo. Se describen las tres posibles organizaciones del locus GH-PL en los monos del viejo mundo. El complejo está integrado por seis genes, y cinco regiones intergénicas, los dos genes GH presentan en su extremo 3' una región intergénica corta que no incluye potenciador.

CAPITULO VII

CONCLUSIONES

- El locus GH-PL en los monos del viejo mundo está formado por seis genes y cinco regiones intergénicas.
- Las regiones intergénicas se clasifican en dos grupos de acuerdo a su tamaño: tres intergénicas largas (~ 12500 pb) y dos intergénicas cortas (~ 5000 pb). Las regiones largas se caracterizan por la presencia del elemento potenciador, del inhibidor, y de secuencias Alu mientras que las regiones cortas no presentan el potenciador.
- La presencia de estos elementos reguladores en las secuencias intergénicas indica que estos elementos se insertaron antes de la divergencia de los primates del viejo mundo y por lo tanto se adquirió la expresión específica de tejido en este periodo, (hace 23 - 48 millones de años) y ésta se conservó hasta el humano.
- Las regiones promotoras distales presentan tamaños variables mientras que las secuencias proximales son más homogéneas, en tamaño. Estas diferencias se pueden atribuir a la inserción de elementos regulatorios y a secuencias repetitivas.

- Las secuencias Alu están presentes en las regiones intergénicas, específicamente en las regiones promotoras largas. Sin embargo, la inserción del Alu (5r) presente en el promotor de hGHN ocurrió después de la divergencia de los monos del viejo mundo.
- La secuencia Kpn no se encuentra presente en las regiones intergénicas de los monos del viejo mundo, por lo tanto se insertó después de la divergencia de los primates del viejo mundo.
- En las dos especies de monos del viejo mundo, las regiones intergénicas del locus GH-PL, presentan tamaños diferentes, por lo que se puede inferir que esta región del genoma sufre una evolución muy rápida. En consecuencia el locus GH-PL constituye un excelente modelo para estudiar la evolución del genoma.

CAPITULO VIII

BIBLIOGRAFIA

1. Bellgard MI, Itoh T, Watanabe H, Imanishi T, Gojobori T, 1999. Dynamic evolution of genomes and the concept of genome space. *Ann N Y Acad Sci*, 870 : 293 –300
2. De Souza SJ, Long M, Gilbert W. 1996. Introns and gene evolution. *Genes Cells*, 1 (6):493-505
3. Hsiund Li W., Graur D. Fundamentals of molecular evolution. 1991. Sunderland Mass, USA.
4. Singer M.F. 1982. SINEs and LINEs: Highly repeated short and long interspersed sequences in mammalian genomes. *Cell*, 28:433-434
5. Singer M. Berg P. Genes and genomes. A changing perspective. University Science Books. USA.
6. Hutchison III, C.A., S.C. Hardies, D.D. Loeg, W.R. Shehee, M.H. Edgell. 1989. LINEs and related retroposons: Long interspersed repeated sequences in the eucaryotic genome. pp 593 –617. In D.E. Berg and M.M. Howe (ends), Mobile DNA. *American Society for Microbiology*, Washintong, D.C.
7. Britten R.J. Baron WF, Stout DB, Davidson EH, 1988. Sources and evolution of human Alu repeated sequences. *Proc Natl Acad USA* (13).4770-4
8. Shen MR, Batzer MA, Deininger PL, 1991. Evolution of the master Alu gene (s). *J Mol Evol*, 33 (4) : 311 – 20
9. Szmulewicz MN, Novick GE, Herrera RJ, 1998. Effects of Alu insertions on gene function. *Electrophoresis*, 19 (8-9) : 1260 – 4
10. Britten R.J. 1996. DNA sequences insertion and evolutionary variation in gene regulation. *Proc Natl Acad Sci USA*, 3;93 (18):9374-7
11. Ohta Tomoko 1991 Multigene families and evolution of complexity *J. Mol. Evol.* 33: 34-41.

12. George DL, JA Phillips III, U. Francke, PH Seeburg 1981. The genes from growth hormone and chorionic somatomammotropin are on the long arm of the chromosome 17 in region q21-q22. *Human. Genet.* 57:138-141
13. Harper ME, HA Barrera-Saldaña, GF Saunders. 1982. Chromosome localization of the human placental lactogene-growth hormone gene cluster to 17q22-24. *Am. J. Human . Genet.* 34,227-234
14. Chen EY, Liao DH, Smith HA. Barrera-Saldaña, RE, Gelinas, PH, Seeburg. 1989. The human growth hormone locus: nucleotide sequences, biology and evolution. *Genomics* 4, 479-497
15. DeNoto FM, DD Moore, HM Goodman 1981. Human growth hormone DNA sequences and mRNA structure: possible alternative splicing. *Nucleic Acids Res.* 9: 3719-3730
16. Rogers BL, MG, Sobnosky, GF, Saunders. 1986. Transcriptional enhancer within the human placental lactogen and growth hormone multigene cluster. *Nucleic Acids Res.* 14: 7647-7659
17. Frankenne F, F. Rentier-Delrue, ML, Scippo, J. Martical, G. Hennen 1987. Expression of the growth hormone variant gene in human placenta. *J. Clin. Endocrin. Metab.* 64:635-637
18. Barrera-Saldaña H.A., Robberson D.L., Saunders G.H. 1981. Transcriptional products of the human placental lactogen gene. *J. Biol. Chem.* 257:12399-12404
19. Seeburg PH, J. Shine, JA, Martial, A. Ullrich, JD, Baxter, HM, Goodman 1977. Nucleotide sequence of part of the gene for human chorionic somatomammotropin: purification of DNA complementary to predominant mRNA species. *Cell*, 2: 157-165
20. Reséndez-Pérez D, Ramírez-Solis R. Varela-Echavarría A., Martínez-Rodríguez HG, Barrera-Saldaña HA. 1990. Coding potential of transfected human placental genes. *Nucleic Acids Res*, 18: 4665-4670
21. Cooke N.E. Ray J. Emery, JG, Liebhaber A. 1988. Two distinct species of human growth hormone-variant mRNA in the human placenta: the expression of novel growth hormone proteins. *J. Biol. Chem* 263:9001-9006
22. Ray J., Jones B.K., Liebhaber S.A., Cooke N.E., 1989. Glycosylated human growth hormone variant. *Endocrinology*.125:566-568

23. Boguszowski C-L., Svensson P.A., Jansson T., Clark R., Carlsson M.S., Carsson B. 1988. Cloning of two novel growth hormone transcripts expressed in the human placenta. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 83(8):2878-2885.
24. Barrera-Saldaña H.A., Seeburg P.H., Saunders G.F. 1983. Two structurally different genes produce the same secreted human placental lactogen hormone. *J. Biol. Chem.*, 258:3787-3793
25. Tjian R. 1995. Molecular machines that control genes. *Sci, Am.* 38-45
26. Karin M., Theill, L., Castrillo, J.S., McCormick, A., Brady, H. 1990. Cell type specific expression of the growth hormone gene and its control by GHF-1. *Folia endocrinol.* 66. 1205-1220
27. Nachtigal MW, BE, Nicke, PA, Cattini. 1993. Pituitary-specific repression of placental members of the human growth hormone gene family. *J. Biol. Chem* 268:8473-8479
28. Ingraham HA, R. Chen, HJ, Mangalam, HP, Elsholtz, SF, Flynn, CR, Lin, DM, Simmons, L. Swanson, MG, Rosenfeld. 1988. A tissue specific transcription factor containing a homeodomain specifies a pituitary phenotype. *Cell* 55,519-529
29. Lefevre C, I. Dana J. Grindlay, M. Bodner, M. Karin. 1987. Tissue specific expression of the human growth hormone gene is conferred in part by the binding of a specific transacting factor. *EMBO J.* 6, 971-981
30. Stephanou A., S. Handwerger 1995. Retinoic acid and thyroid hormone regulate placental lactogen expression in human trophoblast cells. *Endocrinology* 136,933-938
31. Lemaire F.P. Lafontaine D.A., Courtios S.J., Durviaux S.M, Rousseau G.G. 1990. Sp1 can displace GHF-1 from its distal binding site and stimulate transcription from the growth hormone gene promoter. *Mol and Cellular Biology*, p 1811-1814
32. Courtois S.J., Lafontaine, D.A., Lemaigre, F.P., Durviaux S. M., Rousseau, G. G. 1990. Nuclear factor-1 and activator protein bind in a mutually exclusive way to overlapping promoter sequences and trans-activate the human growth hormone gene. *Nuc Acids Res*, 18,57-64
33. Lipkin, S.M., Naar, A.M., Kall, K.A., Sack, R.A., Rosenfeld, M.G. 1993. Identification of a novel zinc finger protein binding a conserved element critical for Pit-1-dependent growth hormone gene expression. *J. Pediatr Endocrinol* (3-4): 225-8.

34. Jiang SW, AR, Sephard, NL, Eberhardt. 1995. An initiator element is required for maximal human chorionic somatomammotropin gene promoter and enhancer function. *J. Biol Chem.* 270,3683-3692
35. Fitzpatrick SL, WH Walter, Sauders 1990. DNA Sequences involved in the transcription activation of a human placental lactogene. *Mol. Endocrinology.* 4, 1815-1826
36. Stephanou A., Ross R., Handwerger. 1994. Regulation of human placental lactogen expression by 1,25-Dihydroxyvitamin D₃. *Endocrin Vol* 135, No. 6
37. Hirt H., J, Kimelman , M.J. Birnbaum, E.Y. Chen, P.H. Seeburg N.L. Eberhardt A. Barta. 1987. The human growth hormone locus: Structure, evolution and allelic variations. *DNA* 6,59-70
38. Novacek M.J. 1992 Mammalian phylogeny: shaking the tree. *Nature.* 356,121-125
39. Golos TG, Durning M, Fisher JM, Fowler PD. 1993. Cloning of four growth hormone/chorionic somatommatropin-related complementary deoxyribonucleic acids differentially expressed during pregnancy in the Rhesus monkey placenta. *Endocrinology.* 133:1744-1751
40. Esquivel- Escobedo D.C. 1999. Organización del locus del complejo GH-PL en el mono araña (*Ateles geoffroyi*). Tesis de maestría. Fac. de medicina, UANL.
41. Martínez-Soriano J.P. Cab Barrera E.L., Támez González R., Leal Klevezas D.S. 1993. Detección de *brucella abortus* por medio de la reacción en cadena de la polimerasa. *Bioquímica*, 18:10-16
42. Sambrook J. Maniatis T., Fritch E.F. 1989. Molecular cloning, A laboratory manual, 2nd Ed. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N.Y.
43. Inoue H. Nojima H, Okamaya H. 1990. High efficiency transformation of *E. coli* with plasmid. *Gene* . 96:23-28
44. Felsenstein J. 1993 PHYLIP (phylogeny inference package) version 3.5 c. Department of Genetics, University of Washintong, Seattle
45. 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
46. Wallis M. 1994. Variable evolutionary rates in the molecular evolution of mammalian growth hormones. *J. Mol. Evol*, 38:619-627

47. 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
48. Krawczak M., Chuzhanova N.A., Cooper D.N. 1999. Evolution of the proximal promoter region of the mammalian growth hormone gene. *Gene*, 237: 143-151
49. 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.* 192839:1360-6.

