

UNIVERSIDAD AUTONOMA DE NUEVO LEON
FACULTAD DE MEDICINA



ESTUDIO DE LOS GENES RELACIONADOS A
PROLACTINA EN EL GATO DOMESTICO (*Felis catus*)

ELABORADO POR.

M.C. Igor Israel Medina Villanueva

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

Marzo de 2004

TM

QH432

.M4

2004

c.1

M.C. Igor Israel Medina Villanueva



UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN



DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

FACULTAD DE MEDICINA



***ESTUDIO DE LOS GENES RELACIONADOS A
PROLACTINA EN EL GATO DOMÉSTICO (*Felis catus*)***

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

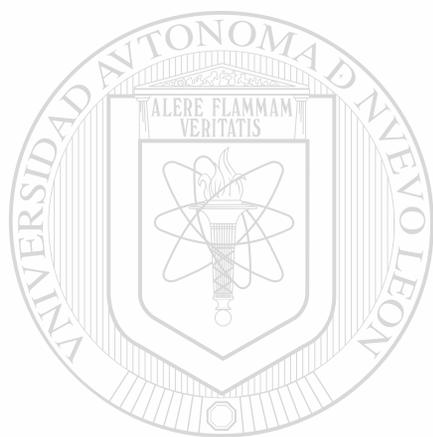
Elaborado por:

M.C. Igor Israel Medina Villanueva

Como requisito parcial para obtener
el grado de MAESTRO EN CIENCIAS con
especialidad en Biología Molecular e Ingeniería Genética.

Marzo de 2004

TM
QH432
M4
2 04



UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

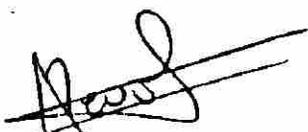
®

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS



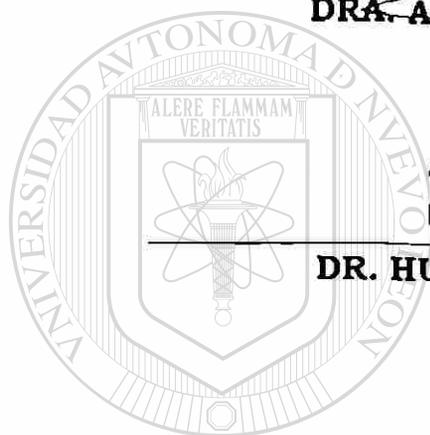
**ESTUDIO DE LOS GENES RELACIONADOS A PROLACTINA
EN EL GATO DOMÉSTICO (*Felis catus*)**

Aprobación de la Tesis:



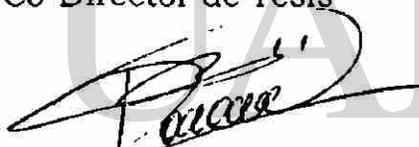
DRA. AGNÈS REVOL DE MENDOZA

Directora de Tesis



DR. HUGO A. BARRERA SALDAÑA

Co-Director de Tesis

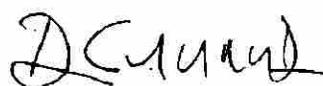


DRA. ROCÍO ORTÍZ LÓPEZ

Co-Directora de Tesis

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS



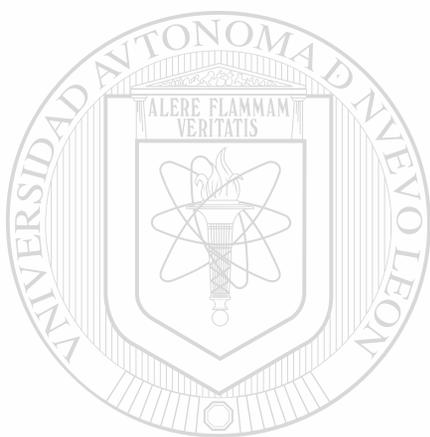
DR. DIONICIO A. GALARZA DELGADO

Subdirector

de Investigación y Estudios de Posgrado

El presente trabajo titulado “Estudio de los genes relacionados a prolactina en el gato doméstico (*Felis catus*)” fue realizado por el M.C. Igor Israel Medina Villanueva en el Laboratorio de Biología Molecular de la Unidad de Laboratorios de Ingeniería y Expresión Genéticas (ULIEG) del Departamento de Bioquímica de la Facultad de Medicina de la Universidad Autónoma de Nuevo León, bajo la dirección de la Dra. Agnès Revol de Mendoza y la codirección de la Dra. Rocío Ortiz López y el Dr. Hugo A. Barrera Saldaña.

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN[®]
DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS



A PAME†
in memoriam
UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN



DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

DEDICATORIA

A MIS PADRES

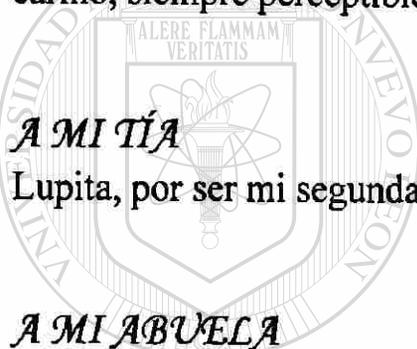
Elmer y Vilma, por su total apoyo en esta empresa y por darme todo su cariño, siempre perceptible aún en la distancia.

A MI TÍA

Lupita, por ser mi segunda madre y animarme siempre a seguir adelante.

A MI ABUELA

Vilma, que siempre me recibe con una sonrisa, me deleita con los mejores guisos y me quiere mucho.



UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN



DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

AGRADECIMIENTOS

A la Dra. Agnès Revol, por su interés y apoyo en el proyecto. Sincera y cordialmente, muchas gracias.

A la Dra. Rocío Ortiz y al Dr. Hugo A. Barrera por sus valiosas recomendaciones.

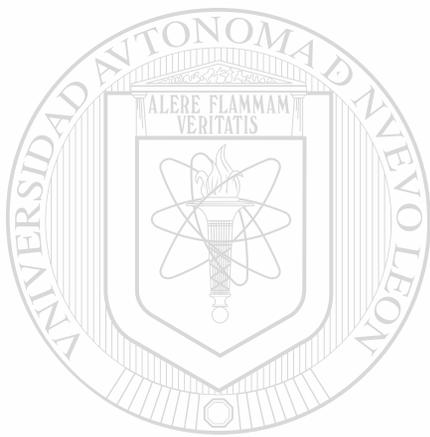
A la M.C. Dolores Esquivel por sus consejos y enseñanzas de secuenciación.

A mis compañeros de laboratorio: Rafael, Angélica, Ariana, Laura e Iram por su amistad y ayuda. En especial a Marisol, por su gran apoyo en los momentos difíciles. Gracias Virtuosa.

A Eric, por su amistad, apoyo y comprensión.

A mis compañeros de generación: Belarmino, Juan Carlos, Ángel, Karina y Naika, por su ayuda y críticas. Especialmente a Marcela, por brindarme su apoyo desinteresado en el momento más preciso.

A todo el personal de la ULIEG, por su ayuda en la realización de este trabajo.



“Felicidad no es hacer lo que uno quiere sino querer lo que uno hace”.

Jean Paul Sartre (1905-1980)

“Hay una fuerza motriz más poderosa que el vapor, la electricidad y la energía atómica: la voluntad”.

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

Albert Einstein (1879-1955)®

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

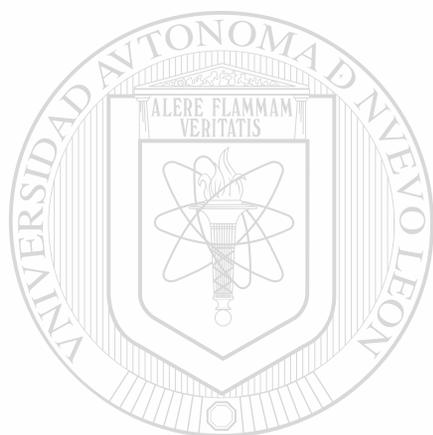
ÍNDICE

Contenido	Página
NOMENCLATURA	I
LISTA DE FIGURAS	IV
LISTA DE TABLAS	VI
RESUMEN	VII
CAPÍTULO I: INTRODUCCIÓN	1
1.1 Familias multigénicas	1
1.2 Familia multigénica GH/PRL	2
1.2.1 Evolución de la familia multigénica GH/PRL	3
1.2.2 Distribución de los miembros de la familia multigénica GH/PRL	5
1.2.3 Estructura general de los genes de la familia GH/PRL	6
1.2.4 Estructura primaria de las proteínas relacionadas a PRL	6
1.2.5 Estructura secundaria y terciaria de las proteínas de la familia GH/PRL	10
1.2.6 Características y funciones de los principales genes de la familia GH/PRL	12
1.2.6.1 Hormona del crecimiento	12
1.2.6.2 Prolactina	13
1.2.6.3 Proteínas relacionadas a prolactina	13
1.2.6.4 Lactógeno placentario	14
1.2.7 PRPs y PLs en órdenes distintos a primates rumiantes y roedores	17
CAPÍTULO II: JUSTIFICACIÓN E HIPÓTESIS	19
2.1 Justificación del trabajo.	19
2.2 Hipótesis del trabajo	19

Contenido	Página
5.2.3.1.4 Análisis de los plásmidos recombinantes de los PA del gato.	31
5.2.3.1.5 Clonación directa de los PA relacionados a PRL de oveja y cabra.	31
5.2.3.2 Obtención indirecta de las secuencias relacionadas a PRL en el gato mediante hibridación inversa.	31
5.2.3.2.1 Obtención de los PA relacionados a PRL de gato.	31
5.2.3.2.2 Hibridación inversa de los PA del gato.	32
5.2.3.2.3 Reamplificación de los PA del eluido de hibridación.	33
5.2.3.2.4 Hibridación en gel de los PA del eluido.	34
5.2.3.2.5 Identificación y purificación de las secuencias relacionadas a PRL del gato.	35
5.2.3.2.6 Clonación del PA del eluido relacionado a PRL de gato.	35
5.2.3.2.7 Análisis de los plásmidos recombinantes del PA eluido relacionado a PRL de gato.	35
5.2.4 Hibridación tipo Southern.	36
5.2.4.1 Obtención de la sonda de PRP de gato.	36
5.2.4.2 Digestión enzimática del DNAG de gato.	37
5.2.4.3 Hibridación del gel tipo Southern.	37
5.2.5 Análisis de las relaciones filogenéticas de los productos obtenidos.	38
5.2.5.1 Alineamiento nucleotídico de los extremos 3'.	38
5.2.5.2 Alineamiento nucleotídico del fragmento exónico.	39
5.2.5.3 Alineamiento aminoacídico.	39
 CAPÍTULO VI: RESULTADOS	 40
6.1 Obtención de los DNAG	40
6.2 Obtención de la clona de PL ovino.	40
6.2.1 Diseño de iniciador específico para PL de rumiantes.	40
6.2.2 Amplificación y caracterización de los fragmentos de PL ovino y caprino.	42

Contenido	Página
6.2.3 Clonación del PL ovino.	43
6.2.4 Análisis del inserto de PL ovino.	44
6.3 Obtención de las clonas relacionadas a PRL de gato.	44
6.3.1 Diseño de los iniciadores consenso PRL/PRP/PL	44
6.3.2 Amplificación de las secuencias relacionadas a PRL de gato.	46
6.3.3 Clonación directa de los PA relacionados a PRL del gato.	47
6.3.4 Hibridación inversa de los PA obtenidos en condiciones relajadas.	48
6.3.5 Reamplificación de los PA eluidos de la hibridación inversa.	49
6.3.6 Identificación del producto reamplificado relacionado a PRL.	50
6.3.7 Clonación del producto reamplificado relacionado a PRL.	51
6.4 Hibridación tipo Southern.	52
6.4.1 Obtención de la sonda de PRP de gato.	52
6.4.2 Hibridación del gel tipo Southern.	53
6.5 Clonación de los PA de la familia PRL/PL de rumiantes.	54
6.6 Análisis filogenético de los productos obtenidos.	56
6.6.1 Alineamiento nucleotídico de los extremos 3'.	56
6.6.2 Reconstrucción de los árboles filogenéticos de las secuencias nucleotídicas.	56
6.6.3 Alineamiento aminoacídico de los exones 5.	60
CAPÍTULO VII: DISCUSIÓN	61
7.1 Obtención de la clona de PL ovino.	61
7.2 Obtención de las clonas relacionadas a PRL.	61
7.2.1 Amplificación de las secuencias relacionadas a PRL con iniciadores consenso.	61
7.2.2 Clonas relacionadas a PRL en el gato.	62
7.2.3 Clonas relacionadas a PRL en cabra y oveja.	64
7.3 Elementos repetitivos en la familia GH/PRL.	65
7.4 Hibridación tipo Southern.	66

Contenido	Página
7.5 Alineamientos nucleotídico y aminoacídico de las secuencias obtenidas.	67
7.6 Surgimiento de los genes relacionados a PRL en el gato.	69
CAPÍTULO VIII: CONCLUSIONES	71
CAPÍTULO IX: BIBLIOGRAFÍA	72



UANL

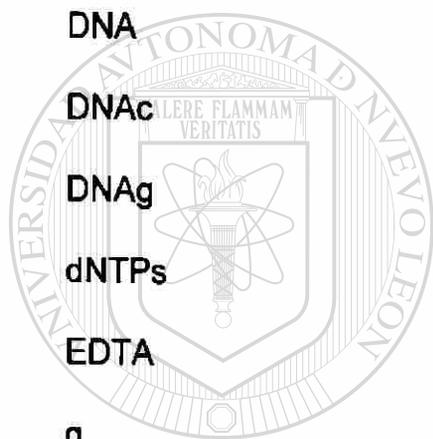
UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN



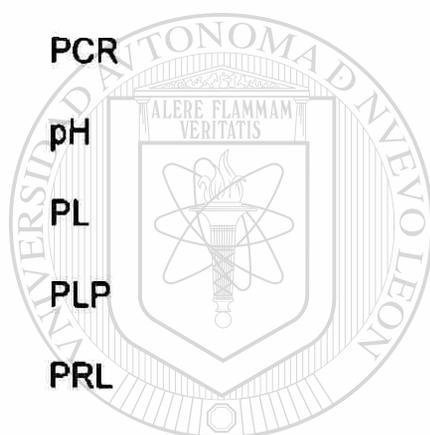
DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

NOMENCLATURA

°C	Grados centígrados
A	Absorbancia
AMPc	Monofosfato de adenosina cíclico
cbp	Cuanto baste para
cm ²	Centímetros cuadrados
dATP	Trifosfato de desoxiadenosina
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DNAc	DNA complementario al RNA
DNAg	DNA genómico
dNTPs	Desoxirribonucleosidos trifosfato
EDTA	Acido etilendiaminotetra-acético
g	Gramos
g	Fuerza centrífuga relativa
GH	Hormona del crecimiento
GHR	Receptor para la GH
kDa	Kilodaltones
Kpb	Kilopares de bases
kV	Kilovoltios
l	Litros
M	Concentración molar
mg	Miligramo (s)
min	Minuto (s)



ml	Mililitro (s)
mM	Concentración milimolar
ms	Milisegundos
N	Concentración normal
ng	Nanogramo (s)
nm	Nanómetro (s)
PA	Producto (s) amplificado (s)
pb	Pares de bases
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
pH	$-\log[H^+]$
PL	Lactógeno placentario
PLP	Proteína similar a prolactina
PRL	Prolactina
PRLR	Receptor para la PRL
PRP	Proteína relacionada a prolactina
RNA	Ácido ribonucleico
rpm	Revoluciones por minuto
RT	Retrotranscripción
s	Segundo (s)
SDS	Lauril sulfato de sodio
SL	Somatolactina
TA	Temperatura ambiente
Taq	DNA polimerasa de <i>Thermus aquaticus</i>

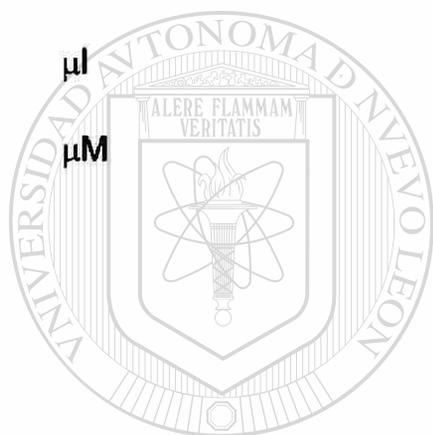


UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

®

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

Tm	Temperatura de alineamiento
U	Unidades internacionales de enzima
UV	Ultravioleta
V	Voltios
vol	Volumen, volúmenes
X	Veces la concentración
μF	Microfaradios
μg	Microgramo (s)
μl	Microlitro (s)
μM	Concentración micromolar



UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

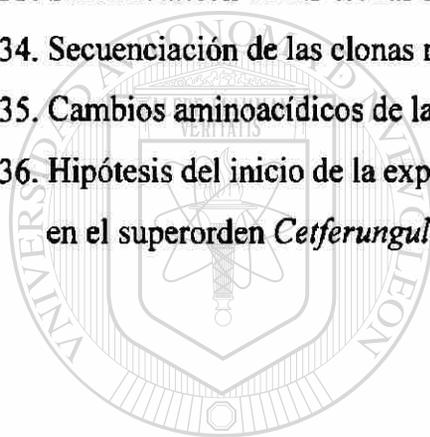


DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

LISTA DE FIGURAS

Figura	Página
1. Origen de la familia GH/PRL	4
2. Árbol filogenético de la radiación de los mamíferos desde el Cretácico	5
3. Estructura general de los genes de la familia GH/PRL	6
4. PRLs de varias especies de vertebrados	8
5. Residuos aminoácidos conservados en PRL/PRP/PL de roedores y rumiantes	9
6. Modelo tridimensional del PL ovino y la GH humana	10
7. Modelo tridimensional hipotético de la molécula de PRL humana	11
8. Activación del PRLR mediante dimerización inducida por la PRL	12
9. Autorradiografía del gel hibridado con una sonda de PL-II bovino y PAs de gato, vaca y oveja	18
10. Estrategia general del trabajo	22
11. Extracción de los DNAs	40
12. Diseño del iniciador RumPLex4	41
13. Amplificación de los PLs ovino y caprino	42
14. Caracterización enzimática de los PL ovino y caprino	43
15. Clonas del PL ovino	44
16. Análisis del inserto de PL ovino	44
17. Diseño de los iniciadores consenso	45
18. Amplificación de los PRPs con los iniciadores consenso	46
19. Clonas de PRL de gato	47
20. Análisis de los insertos de las clonas fcaPRL	48
21. Amplificación de PRPs en condiciones relajadas	49
22. Reamplificación de los PA post-hibridación	50
23. Hibridación de los productos reamplificados	51
24. Clonas de PRP de gato	51

Figura	Página
25. Análisis del inserto de la clona fcaPRP	52
26. Amplificación de la sonda de PRP de gato	52
27. Hibridación tipo Southern	53
28. Clonas de PRPs de oveja y cabra	54
29. Análisis de los insertos de las clonas de oveja y cabra	55
30. Alineamiento nucleotídico de las secuencias obtenidas	57-58
31. Árboles filogenéticos de las secuencias nucleotídicas	59
32. Alineamiento aminoacídico de las secuencias obtenidas	60
33. Secuenciación de las clonas fcaPRL	63
34. Secuenciación de las clonas relacionadas a PRL de rumiantes	64
35. Cambios aminoacídicos de la PRP de gato	68
36. Hipótesis del inicio de la expansión de los genes relacionados a PRL en el superorden <i>Cetferungulata</i>	70



UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN



DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

LISTA DE TABLAS

Tabla	Página
1. Distribución de los genes de la familia GH/PRL en vertebrados	4
2. Condiciones de la PCR para la obtención del PL ovino	26
3. Condiciones de PCR para la obtención de la sonda de PL ovino	29
4. Condiciones de PCR con los iniciadores consenso	30
5. Condiciones de PCR para la obtención de los PA relacionados a PRL de gato	32
6. Condiciones de PCR de los PA del eluido de hibridación	33
7. Condiciones de PCR para la obtención de la sonda de PRP de gato	36
8. Números de acceso (GenBank) de las secuencias comparadas en este trabajo	41
9. Clonas de genes relacionados a la familia PRL/PL obtenidos.	55

RESUMEN

M.C. Igor Israel Medina Villanueva
Universidad Autónoma de Nuevo León
Facultad de Medicina
Título del estudio:

ESTUDIO DE LOS GENES
RELACIONADOS A PROLACTINA EN
EL GATO DOMÉSTICO (*Felis catus*).

Número de páginas: 75

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

Área de estudio: Evolución Molecular

Justificación y objetivos del estudio: La familia multigénica GH/PRL surgió temprano en la evolución de los vertebrados por duplicaciones sucesivas de un gen ancestral. En algunos órdenes de mamíferos, la familia se ha expandido notablemente; tal es el caso de roedores y rumiantes donde duplicaciones en el gen de prolactina han originado una subfamilia donde quedan incluidos PRLs, PLs, PRPs, (PLPs) y PLFs. Con excepción de la PRL, son escasos los reportes sobre el papel fisiológico de tales genes. Sin embargo, trabajos recientes sugieren la participación de algunos de ellos en los procesos de lactación y de crecimiento intrauterino de las crías de especies de importancia comercial, como bovinos, ovinos y caprinos. A la fecha, se ignora si el surgimiento de estos genes es privativo de roedores y rumiantes o ha acontecido también en otras especies de mamíferos. En el caso del gato doméstico, trabajos previos han sugerido la existencia de algunos de estos genes en su genoma, aun cuando no existen reportes de actividad lactogénica en el suero de este animal. Dado que esta especie ha sido propuesta como modelo animal para el estudio de muchas de las enfermedades que aquejan al ser humano, determinar si tales genes existen realmente, no sólo ampliará el conocimiento del genoma de este animal, sino también ayudará a comprender mejor los procesos evolutivos que llevaron al surgimiento de estos genes en el superorden de los cetferungulados, dentro del cual tanto el gato doméstico como los rumiantes están incluidos. En este trabajo se propone la obtención y secuenciación de genes relacionados a PRL en el gato, así como la determinación de sus relaciones filogenéticas con los demás miembros de la familia.

Conclusiones y contribuciones: Mediante el diseño y utilización de iniciadores consenso para genes relacionados a PRL en rumiantes, fue posible la amplificación de varios productos a partir de los DNAG de gato, oveja y cabra. Estos dos últimos fueron utilizados como testigos de reacción, realizándose clonaciones directas de los mismos y con las cuales pudo obtenerse varias clonas con secuencias relacionadas a PRL. Después de un proceso de hibridación inversa con PL ovino de los productos amplificados del gato, fue posible la eliminación de inespecificidades y la obtención de un producto que estaba relacionado a PRL. Este producto fue clonado en el vector pCR-XL-TOPO y secuenciado en su totalidad. Se trata de un fragmento de 712 pb filogenéticamente relacionado a la PRC-I (PRP-I) bovina, que abarca desde el segundo tercio del intrón 4 hasta la mitad del exón 5. La traducción y comparación de la región exónica de esta secuencia contra los genes para PRL/PRP/PL conocidos para carnívoros y rumiantes, evidenció la conservación de aminoácidos clave que han sido involucrados en la unión de la proteína al receptor, aunque también pudo observarse diversos cambios aminoácídicos específicos para la secuencia obtenida. Ensayos de hibridación tipo Southern del DNAG de gato contra esta secuencia, evidenciaron la presencia de dos señales, sugiriendo la presencia de al menos dos de estas secuencias en el genoma. Estos resultados vienen a confirmar los reportes previos acerca de la existencia de PRPs en el genoma del gato e indican que al menos un evento de duplicación de la PRL tuvo lugar antes de la radiación del superorden *Cetferungulata*.

CAPÍTULO I

INTRODUCCIÓN

Los avances alcanzados en el Proyecto Genoma Humano han permitido que la elaboración de mapas físicos y la secuenciación de cada uno de los cromosomas de nuestra especie, sean ahora realidades tangibles. Solo en otra especie de vertebrados, el ratón, se ha alcanzado hasta ahora un avance comparable respecto al estudio del genoma.

El estudio de los genomas permite conocer acerca de las adaptaciones y procesos evolutivos ocurridos en cada una de ellos. Además, el establecimiento de mapas genéticos permite comparar el grado de conservación del arreglo génico entre las especies.

Dentro de los procesos evolutivos mencionados, se encuentra el surgimiento de las diversas familias multigénicas en los genomas. La manera en como éstas han surgido y se han ido transformando a través del tiempo permite inferir sobre los mecanismos evolutivos que han moldeado los genomas de las especies.

1.1 Familias multigénicas.

La duplicación del DNA es una fuerza importante que subyace en la evolución de las especies. Las duplicaciones en tándem pueden producirse por errores de replicación o de recombinación. Posteriormente, estos duplicados pueden separarse por translocación cromosómica, por un fenómeno de transposición, o bien, permanecer contiguos (Lewin, 2001). Las duplicaciones pueden ocurrir a diferentes niveles del genoma, desde fragmentos de cromosomas hasta exones individuales. Cuando está involucrado un gen completo, la duplicación genera dos copias con secuencias idénticas, pero que eventualmente tenderán a diferenciarse debido a la acumulación de mutaciones diferentes para cada una (Lewin, 2001).

Un conjunto de genes que se asume proviene de la duplicación y variación de una secuencia ancestral constituye una familia multigénica. Sus miembros pueden permanecer agrupados o dispersarse hacia cromosomas diferentes. Asimismo, una familia multigénica puede estar constituida por unos cuantos genes o cientos de ellos (Ohta, 1991; Lewin, 2001).

Se asume que el número de repeticiones en tándem es proporcional a la cantidad de producto que se deriva de dicho gen, por tanto, pueden generarse numerosas copias si el producto del gen llegara a necesitarse en cantidades muy grandes (Lewin, 2001).

Lo anterior tiene importantes implicaciones referentes al mantenimiento de la identidad de la especie y de la presión selectiva. Así, estas familias multigénicas ofrecen una buena oportunidad para analizar las fuerzas implicadas en la evolución de regiones amplias del genoma y no solamente en la de genes tomados como unidades individuales (Lewin, 2001).

1.2 Familia multigénica GH/PRL.

En los vertebrados, una de las familias génicas más estudiada es la perteneciente a la hormona del crecimiento/prolactina (GH/PRL), nombrada así con base en los nombres de sus principales integrantes: el gen de la hormona del crecimiento (GH) y el de la prolactina (PRL). Sin embargo, también se incluyen en esta familia otros genes estrechamente relacionados: los lactógenos placentarios (PL), las proliferinas (PLF), las proteínas relacionadas a prolactina (PRP), las proteínas semejantes a prolactina (PLP), las somatolactinas (SL) y algunos pseudogenes. Existen estudios genéticos, estructurales y funcionales que han demostrado claramente que estos genes pertenecen a una misma familia (Bole-Feysot y cols, 1998).

La mayoría de las proteínas codificadas por esta familia génica tienen un peso molecular entre el rango de 22-23 kDa. No obstante, debido a variaciones surgidas por remociones alternativas de los intrones de los genes o por procesos postraduccionales (glucosilación, proteólisis, etc.) existen masas moleculares reportadas que van desde los 6 y 16 kDa para la prolactina, hasta los 34 kDa como en el caso de algunos lactógenos placentarios en rumiantes (Corbacho y cols, 2002; Forsyth y Wallis, 2002).

Todos los miembros de esta familia exhiben un mecanismo similar de acción y de activación del receptor a través de la homo o heterodimerización del dominio extracelular del receptor y la subsecuente activación de diversas cinasas intracelulares acopladas (Sakal y cols, 1998). Los receptores para prolactina (PRLRs) y para hormona del crecimiento (GHRs) se encuentran estructural y funcionalmente relacionados con los miembros de la clase 1 de la superfamilia de receptores de citocinas. Estos receptores son proteínas transmembranales que comparten secuencias altamente conservadas en sus dominios intra y

extracelulares y que pueden activar la cascada transduccional denominada JAK/STAT (cinzas Janus/transductores de señal y activadores de la transcripción) como consecuencia de la homodimerización de los receptores inducida por el ligando (Corbacho y cols, 2002; Forsyth y Wallis, 2002).

1.2.1 Evolución de la familia multigénica GH/PRL.

Se cree que en los vertebrados los genes de GH y PRL se originaron por duplicación génica de un gen ancestral seguida por la divergencia de los productos. Muy probablemente, esta divergencia se dio tempranamente (aproximadamente hace unos 460 millones de años) inmediatamente antes de la radiación de los vertebrados con mandíbula (*Gnathostomata*)(figura 1). Este supuesto concuerda con la hipótesis propuesta por ciertos autores de que se registró un evento extenso de duplicación génica en esta etapa evolutiva de los vertebrados (Pébusque y cols, 1998). Ciertamente, tanto la GH como la PRL están presentes en todos los vertebrados con mandíbula estudiados hasta la fecha, incluyendo muchos peces (Goffin y cols, 1996; Freeman y cols, 2000; Elkins y cols, 2000; Kawauchi y cols, 2002). El modelo de evolución propuesto para la familia (al igual que para otras familias multigénicas codificantes para hormonas proteicas) es con prolongados períodos de cambios muy escasos, interrumpidos por ocasionales períodos de cambios acelerados (Wallis, 2001). Esta aceleración ocurrió para la GH durante la evolución de los primates y los artiodáctilos, mientras que para la PRL se presentó en la evolución de los roedores, los rumiantes, los elefantes y el humano (Forsyth y Wallis, 2002).

La aparición de nuevos órdenes y subórdenes de mamíferos al final del período Cretácico, posiblemente estuvo acompañada de nuevas duplicaciones del material genético (figura 2); éstas pudieron ocurrir también en la misma familia GH/PRL. Además, un claro fenómeno de convergencia puede ser observado al interior de la familia génica GH/PRL: el surgimiento de los lactógenos placentarios.

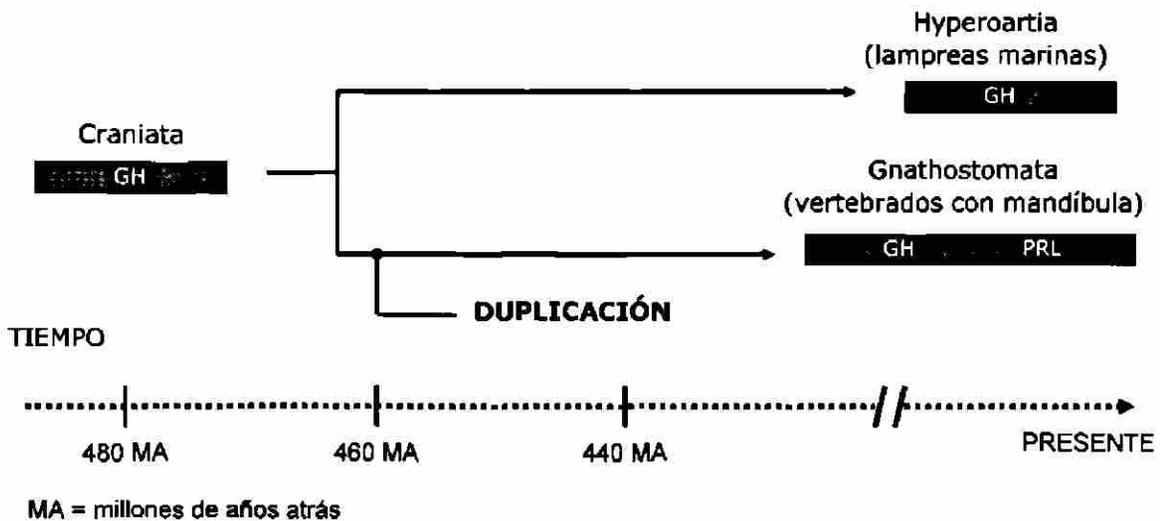


Figura 1: Origen de la familia GH/PRL. Hipótesis sobre el surgimiento de los genes GH y PRL en los vertebrados actuales a partir de un gen ancestral.

En el orden de los primates, duplicaciones en el gen de la GH, dieron origen a los PLs; en rumiantes y roedores en cambio, los PLs surgieron a partir de duplicaciones del gen de la PRL, al igual que diversas proteínas relacionadas a ésta última, las llamadas proteínas relacionadas a prolactina (PRPs). Se asume que estas duplicaciones se han producido de manera independiente para cada orden, ya que hasta la fecha no hay reportes de la presencia de PLs en otros órdenes más que en los ya señalados (tabla 1). En otras clases de vertebrados como en los peces, se ha reportado la presencia de somatolactinas, proteínas estrechamente relacionadas a la familia (Wallis y cols, 1998; Elkins y cols, 2000; Forsyth y Wallis, 2002).

Tabla 1: Distribución de los genes de la familia GH/PRL en vertebrados.

Miembro de la familia	Orden
GH	Todos los vertebrados
PRL	Todos los vertebrados
PL	Primates, rumiantes, roedores
PRP	Rumiantes
PLP	Roedores
PLF	Roedores
SL	Algunos peces

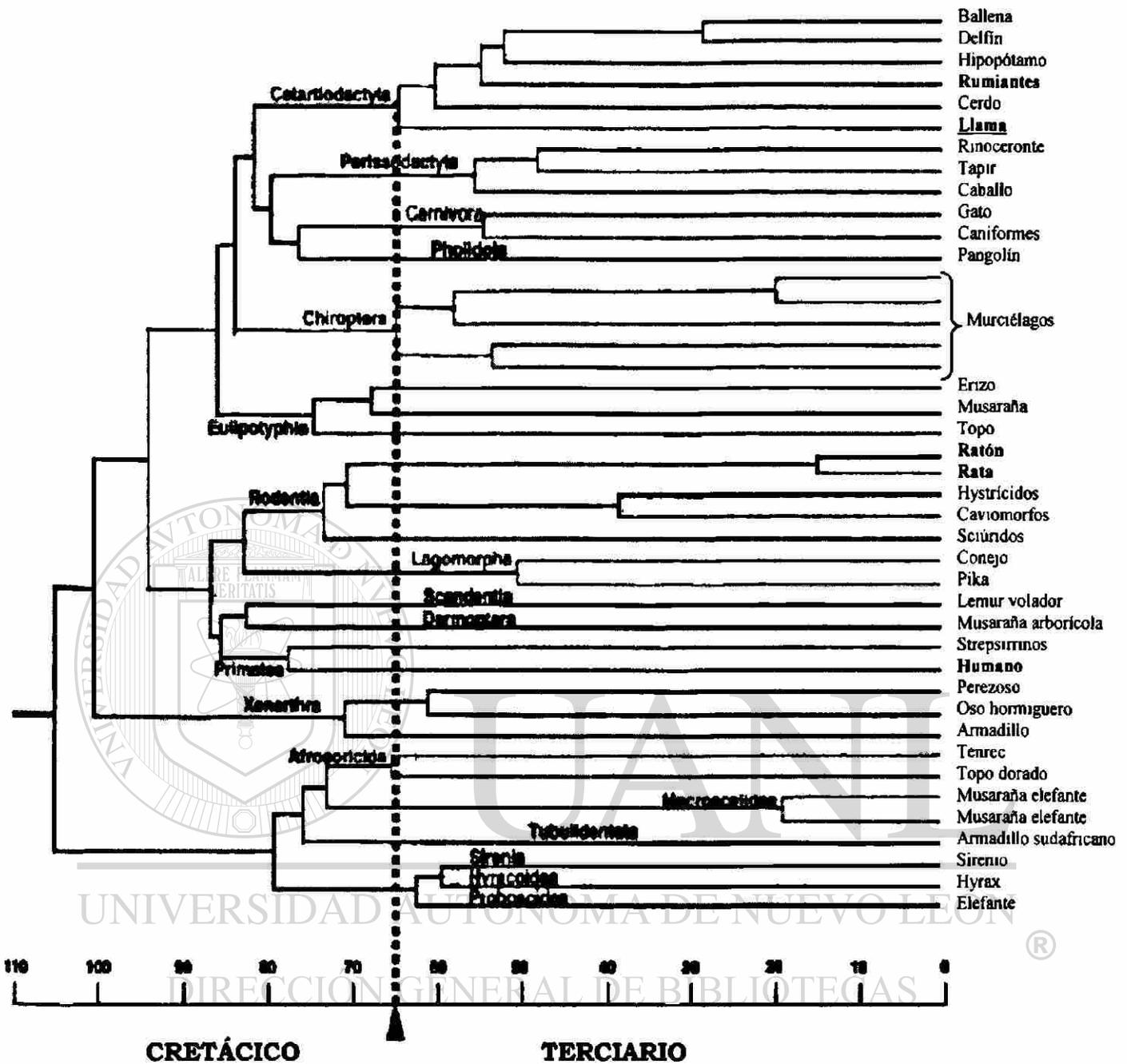


Figura 2: Árbol filogenético de la radiación de los mamíferos desde el Cretácico. Se muestran en negritas las especies con reportes de PRPs y/o PLs; subrayada la especie en la cual se ha encontrado actividad lactogénica en suero pero no se tiene reportes de genes PRP/PL (tomado de Springer y cols, 2003).

1.2.2 Distribución de los miembros de la familia multigénica GH/PRL.

Como ya se señaló, los miembros de esta familia han sufrido una expansión notable en tres principales órdenes de mamíferos: primates, roedores y rumiantes. En estos órdenes se han observado fenómenos de duplicación múltiple, pero en otros no, los cuales han originado el surgimiento de varios genes relacionados. Para el resto de las especies, solo ha sido

reportada la presencia de una copia única de GH y de PRL (Goffin y cols, 1996). Solo el estudio más profundo de los genomas y la búsqueda de genes en especies aun no estudiadas, permitirá descartar la posible presencia de genes relacionados a la familia y/o de pseudogenes relacionados.

1.2.3 Estructura general de los genes de la familia GH/PRL.

Los genes pertenecientes a la familia GH/PRL están conformados por cinco exones y cuatro intrones (a excepción de las GHs de algunos peces salmónidos y ciertas PRPs de roedores en los cuales se observa la presencia de seis exones). Los genes de PRL y los relacionados a ésta son de 4 a 5 veces más grandes (8-10 kpb) que los de GH (~2 kbp), aún dentro de la misma especie (figura 3). También se ha reportado la presencia de pseudogenes con diversos grados de deleción tanto exónica como intrónica. Los sitios de empalme siguen la regla general GT-AG y en algunos genes es posible observar diversos sitios de empalme alternativos (Sinha, 1995; Orwig y cols, 1997).

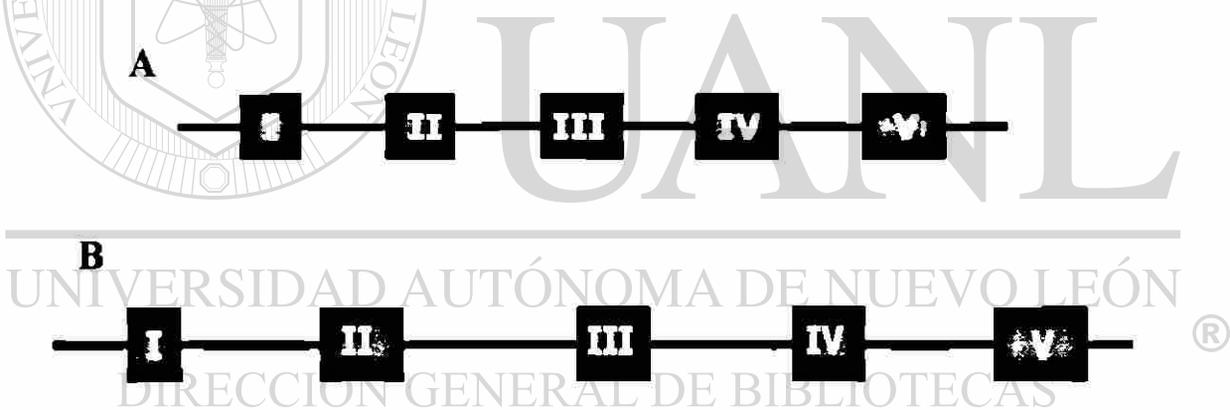


Figura 3: Estructura general de los genes de la familia GH/PRL. En A: gen de GH (y PL en primates). En B: gen de PRL (y PRP/PL/PLF en roedores y rumiantes). Obsérvese las regiones intrónicas de mayor longitud para el gen de la PRL, aun y cuando el tamaño de los exones es similar en ambos genes.

1.2.4 Estructura primaria de las proteínas relacionadas a PRL.

La estructura primaria de la PRL fue elucidada por primera vez para la hormona ovina en 1970 por Li y cols. Desde entonces, las secuencias aminoacídicas de muchas GHs y PRLs de diferentes especies han sido reportadas (figura 4). En la mayoría de los mamíferos, las hormonas están constituidas por 190-200 aminoácidos y poseen seis residuos de cisteínas (posiciones 4, 11, 58, 174, 191 y 199) excepto para las GHs, que sólo poseen los últimos

cuatro. Estos residuos determinan los puentes disulfuro intracatenarios observados en las estructuras tridimensionales de las moléculas. Además, en el caso de las hormonas relacionadas a PRL y algunos PLs de ciertas especies, se observan residuos de asparagina que son susceptibles de glucosilación postraduccional (N-glucosilación) (Sinha, 1995; Goffin y cols, 1996; Bole-Feysot, 1998).

La comparación de las secuencias aminoacídicas de las PRLs de diferentes especies revela varios grados de similitud entre ellas. Alrededor de 32 residuos aminoacídicos han sido conservados entre las especies, los cuales se encuentran situados en cuatro distintas regiones de la molécula: entre las posiciones 18-32, 58-72, 83-98 y 160-199 (figura 4). Estos dominios de PRL (PD) se consideran determinantes para la unión específica con el receptor y pudieran ser críticos para las actividades específicas de la hormona (Sinha, 1995).

De la misma manera, la comparación de la estructura primaria de diversas PRPs, tanto de roedores como de rumiantes, permitió el establecimiento de cuatro regiones muy conservadas que se cree son fundamentales para la unión de la proteína con su receptor. Estas regiones llamadas dominios lactogénicos (LD) no guardan correspondencia exacta con los PDs comentados antes, y en algunos casos pueden llegar a traslaparse (figura 5). Dentro de los LDs se encuentran siete aminoácidos altamente conservados, cinco de los cuales se encuentran también en otros miembros la familia GH/PRL (Cys98, Cys214, Asp218, Cys231 y Cys236)* mientras que los dos restantes (Leu135 y Trp190)* están presentes únicamente en los genes PRL/PRP/PL de estas especies (Yamakawa y cols, 1990).

Otros autores han encontrado también otros residuos determinantes para la unión proteína-receptor de la PRL y algunas PRPs, mediante mutagénesis sitio-dirigida (Val23, His30, Phe37, His59, Pro66, Lys69, Tyr169, His173, Arg176, His180, Lys181 y Tyr185)† que disminuye la actividad mitógena de la hormona cuando es ensayada en células Nb2 de rata en al menos 50 % (Goffin y cols, 1996).

*Numerados con base en la secuencia de PL-I bovino.

†Numerados con base en la secuencia de PRL humana.

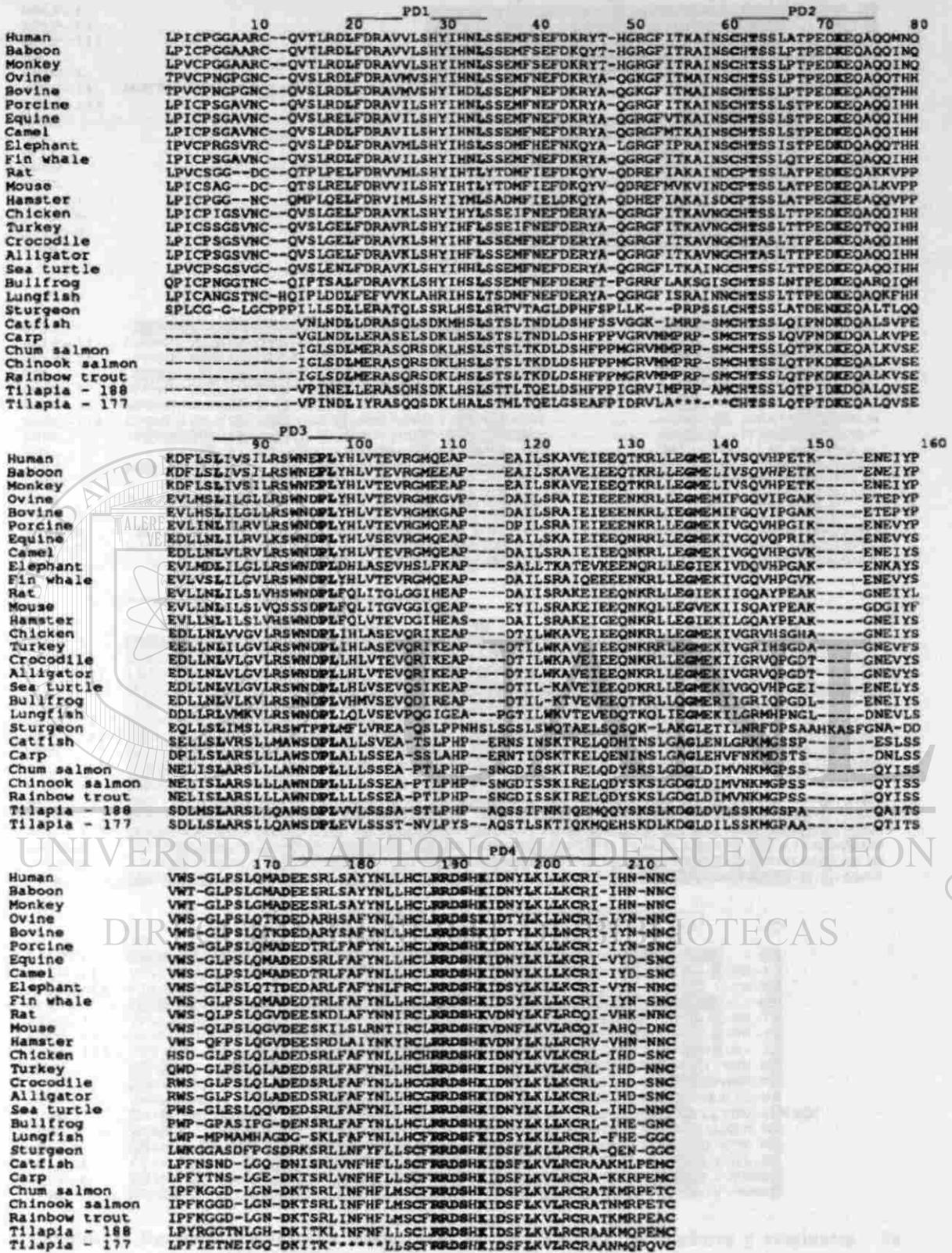


Figura 4: PRLs de varias especies de vertebrados. Se señala la localización de los cuatro dominios conservados entre las especies (PD1-PD4), presuntamente necesarios para la unión de específica de la PRL con su receptor y/o indispensables para la actividad específica de la hormona. En negritas los aminoácidos más conservados. Los asteriscos señalan residuos ausentes en algunas variantes (tomado de Sinha, 1995).

1.2.5 Estructura secundaria y terciaria de las proteínas de la familia GH/PRL.

Se sabe que estas hormonas están constituidas únicamente por α -hélices y que éstas representan casi el 50 % de la proteína; los residuos aminoacídicos restantes se encuentran estructurados en bucles no bien organizados (Bole-Feysot y cols, 1998).

Hasta la fecha son muy pocas hormonas de la familia cuya estructura tridimensional (3D) ha sido reportada. Con ayuda de la técnica de difracción de rayos X se ha podido determinar la estructura terciaria de la GH porcina, la GH humana y recientemente, el PL ovino (figura 6) (Goffin y cols, 1996; Elkins y cols, 2000). Aunque para la PRL no se tiene evidencia directa de su conformación 3D, se ha reconstruido un modelo hipotético con base en la homología que presenta con la GH (figura 7). Según este modelo, la molécula se compone de cuatro α -hélices organizadas en haces antiparalelos arriba-arriba abajo-abajo, con los sitios de unión al receptor localizados en el mismo lado de la proteína compacta. Se ha sugerido que esta conformación podría servir como modelo global tridimensional para todos los miembros de la familia GH/PRL (Sinha, 1995; Goffin y cols, 1996; Bole-Feysot y cols, 1998; Elkins y cols, 2000). Otra característica común lo constituyen los puentes disulfuro determinados por los residuos de cisteínas Cys53-Cys165 y Cys182-Cys189 (numerados con base a la HGH) encontrados en todos los miembros de la familia. En la mayoría de PRLs, PRPs y PLS (pero no en GHs) se haya presente un tercer puente disulfuro determinado por Cys(-6)-Cys2 (Elkins y cols, 2000).

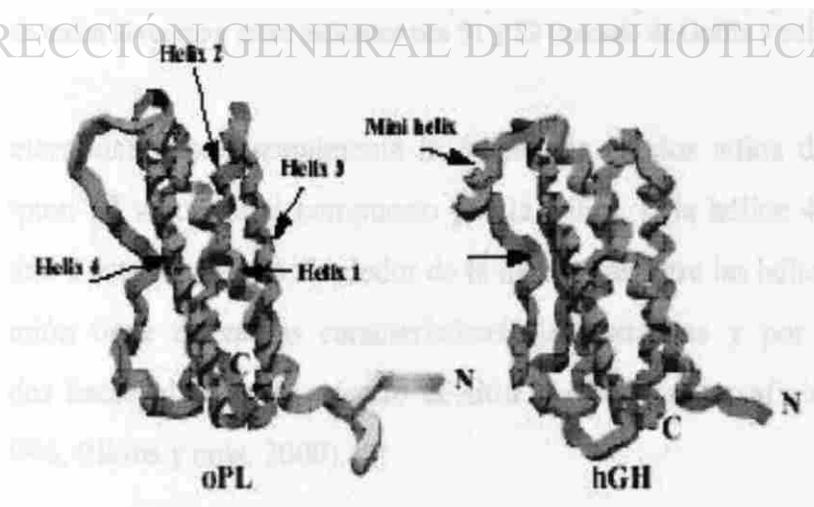


Figura 6: Modelo tridimensional del PL ovino y la GH humana. Se aprecian las cuatro α -hélices características y la presencia de un bucle amino terminal con puente disulfuro en el PL, ausente en todas las GHs (tomado de Elkins y cols, 2000).

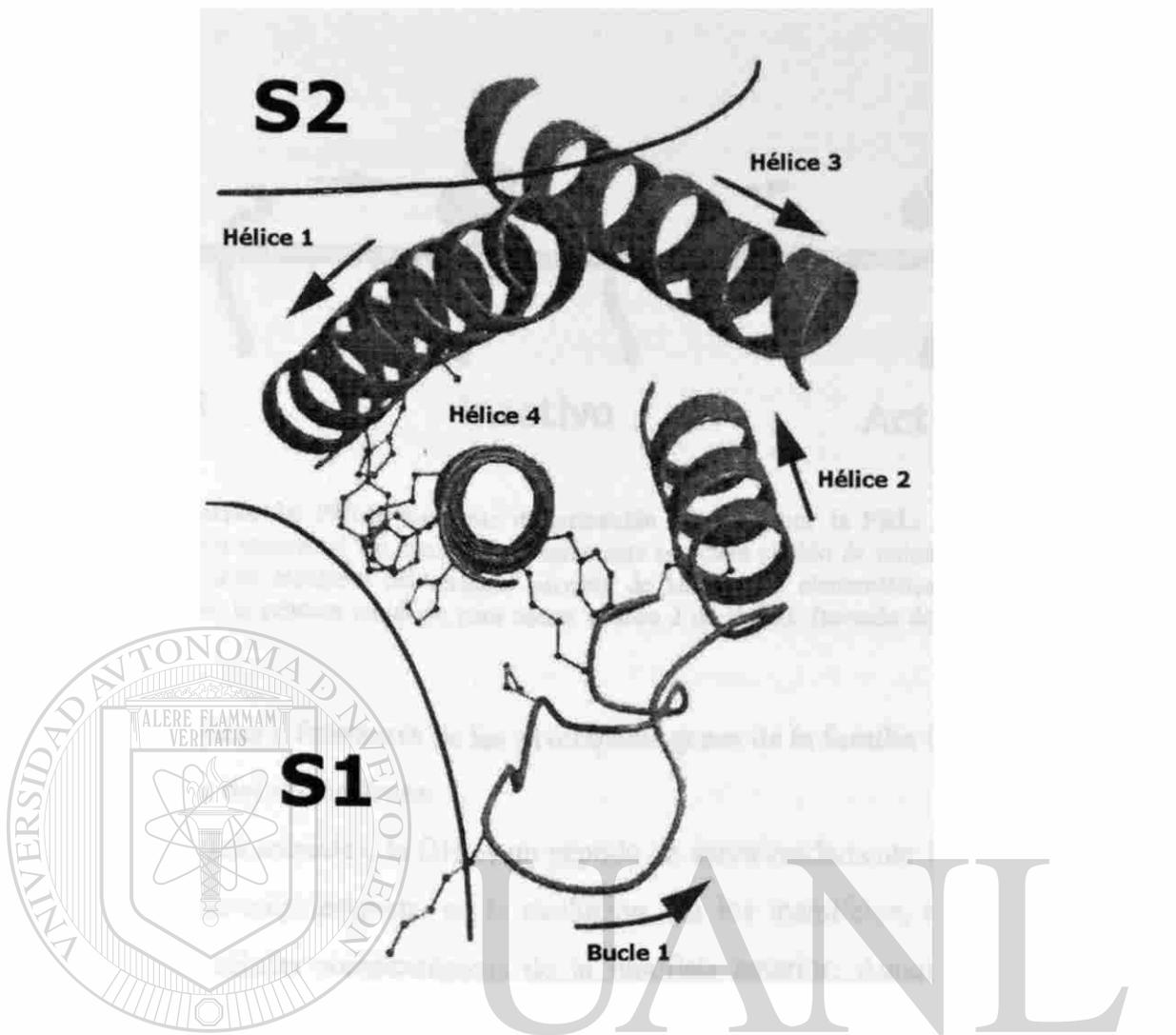


Figura 7: Modelo tridimensional hipotético de la molécula de PRL humana. El modelo fue reconstruido con base en los coordenados cristalográficos de la GH porcina. Puede apreciarse claramente las cuatro α -hélices características de las proteínas de la familia. Las flechas indican la orientación de las hélices de N a C-terminal. La hélice cuatro se encuentra perpendicular al plano del papel y apunta hacia el lector. Los sitios de unión al receptor están indicados con S1 y S2 (tomado de Goffin y cols, 1996).

Se ha podido determinar experimentalmente la existencia de dos sitios de unión de la molécula al receptor. El sitio 1 está compuesto por la hélice 1, la hélice 4 y el bucle 1, mientras que el sitio 2 está localizado alrededor de la hendidura entre las hélices 1 y 3.

Cada sitio de unión tiene diferentes características electrostáticas y por tanto, poseen distintas afinidades hacia el receptor, siendo el sitio 1 el de mayor afinidad (figura 8) (Goffin y cols, 1996, Elkins y cols, 2000).

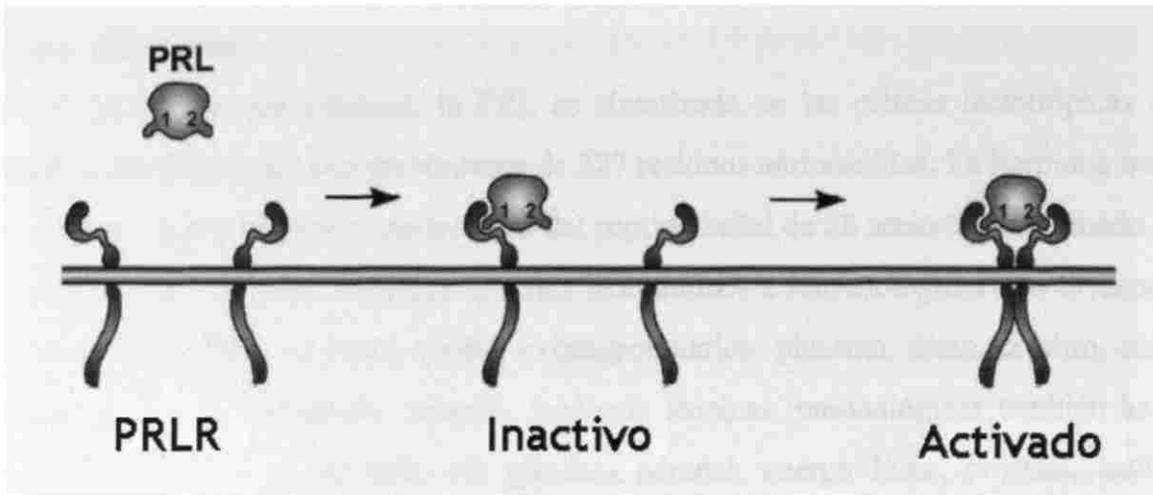


Figura 8: Activación del PRLR mediante dimerización inducida por la PRL. Esquema que ilustra la activación secuencial del receptor. Primeramente se ocupa el sitio de unión 1 (de mayor afinidad). La segunda molécula del receptor necesita de las fuerzas electrostáticas adicionales proporcionadas por la primera molécula para unirse al sitio 2 de la PRL (tomado de Bole-Feysot, 1998).

1.2.6 Características y funciones de los principales genes de la familia GH/PRL.

1.2.6.1 Hormona del crecimiento.

En la mayoría de los animales, la GH es un péptido de aproximadamente 190 aminoácidos cuya aparición fue muy temprana en la evolución. En los mamíferos, esta hormona es secretada en las células somatotrópicas de la hipófisis anterior. Aunque solo ha sido reportada la presencia de una sola GH en la mayoría de los animales estudiados, en algunos órdenes se ha reportado la presencia de dos o más de estas hormonas, como ocurre en algunos primates y ruminantes (Wallis y cols, 1998; Wallis y Wallis, 2002).

En el humano, existen dos GH: la HGH-N expresada en la hipófisis y la HGH-V expresada en la placenta. Además, existen varias formas circulantes de la hormona, algunas provenientes de la remoción diferencial de intrones del transcrito primario en su vía de maduración hacia el mRNA (empalme alterno), como en el caso de la HGH-N con dos isoformas de 20 y 22 kDa, y otras generadas a partir de modificaciones postraduccionales (glucosilación de la HGH-V) (Chen y cols, 1989; Untergasser y cols, 1998).

Las principales funciones de la GH están implicadas en la regulación del crecimiento somático y el desarrollo y con ciertos aspectos del metabolismo general (Goffin y cols, 1996; Lioupis y cols, 1997). Sin embargo, también se ha reportado la implicación de la GH en otros procesos biológicos, tales como la reproducción, la inmunidad y, en los peces, la osmorregulación (Hull y Harvey, 2001; Lee y cols, 2001).

1.2.6.2 Prolactina.

En la mayoría de las especies, la PRL es sintetizada en las células lactotrópicas de la hipófisis anterior como una prehormona de 227 residuos aminoácidos. La hormona madura es originada por la digestión proteolítica del péptido señal de 28 aminoácidos situado en el extremo amino terminal. Diversos estudios bioquímicos e inmunológicos han evidenciado la presencia de PRL en varios tejidos extrahipofisarios: placenta, útero, cerebro, sistema inmune y glándula mamaria. Además, mediante técnicas inmunológicas también ha sido reportada la presencia de PRL en: glándula adrenal, cuerpo lúteo, próstata, testículo, glándula uretral, glándula lacrimal, islotes pancreáticos e intestino delgado (Sinha, 1995; Goffin y cols, 1996; Bole-Feysot, 1998).

La PRL es una de las más versátiles hormonas de la hipófisis en términos de acción biológica. A la fecha, se han documentado más de 300 diferentes efectos de la hormona; los más documentados son: desarrollo mamario e iniciación de la lactación en mamíferos, osmorregulación en los peces, comportamiento parental en las aves y crecimiento y metamorfosis en los anfibios, entre otros (Goffin y cols, 1996; Bole-Feysot, 1998; Schradin y Anzenberger, 1999; Freeman y cols, 2000). Cómo una simple molécula es capaz de llevar a cabo tantas acciones parece explicarse con recientes estudios que reportan la existencia de varias formas biológicamente activas de la hormona. Algunas formas son resultado de modificaciones postraduccionales (fragmentos generados por proteólisis, glucosilación, fosforilación, desamidación, sulfatación, dimerización, unión a proteínas), mientras otras son determinadas genéticamente (genes variantes de PRL y variantes por empalme alterno). Estos hallazgos sugieren que la PRL es quizás una prohormona, la cual es sintetizada como precursor y después convertida en sus diferentes formas biológicamente activas (Sinha, 1995; Ben-Jonathan y cols, 1996; Freeman y cols, 2000).

1.2.6.3 Proteínas relacionadas a prolactina.

Las PRPs son un grupo de hormonas heterogéneas relacionadas a la PRL, que sin embargo, no se unen a los receptores PRLR o GHR. Hasta ahora, se sabe que son secretadas por la placenta de rumiantes y roedores muy temprano durante la gestación. Aunque son más similares entre sí que con otros miembros de la familia, las PRPs pueden diferir entre sí hasta en más del 55 % para una misma especie. Aun más, las PRPs de rumiantes y roedores

comparten en promedio, una similitud de apenas 30 % en su secuencia aminoacídica (Schuler y cols, 2001).

En la vaca, al menos seis de estas hormonas han sido reportadas y todas corresponden a proteínas con distintos grados de glucosilación. La secuencia aminoacídica esperada para los cDNA disponibles, predice una conformación tridimensional similar a la de los otros miembros de la familia génica (excepto para la BPRP-VI), con los puentes disulfuro intracatenarios y las cuatro α -hélices características. A pesar de ello, estas proteínas muestran cambios aminoacídicos específicos en los dos sitios clave de unión con el receptor, que hace que no pueda ligarse ni con el GHR ni con el PRLR. Más aún, experimentos realizados con BPRP-I purificada no pudieron demostrar la unión de esta proteína con ninguno de los receptores antes mencionados. Estos hallazgos sugieren la posible existencia de un receptor específico para PRP aún no identificado (Goffin y cols, 1996). Junto con los PLs, las PRPs son secretadas por las células binucleadas de la placenta hacia los torrentes circulatorios materno y fetal. También se ha sugerido la presencia de PRPs en otras especies de rumiantes (Schuler y cols, 2001).

En los roedores, las PRPs estudiadas hasta la fecha también se encuentran glucosiladas y algunas de ellas ya han sido purificadas. Al igual que en los rumiantes, la estructura terciaria es similar a la de la GH y la PRL, aunque aquí se observa en algunas de ellas una débil actividad lactogénica. Se cree que esta función se ha retenido debido a que los cambios aminoacídicos ocurridos se realizaron con otros aminoácidos con propiedades fisicoquímicas similares. Otras actividades documentadas para las PRPs en roedores incluyen la regulación de la angiogénesis en las células endoteliales, la estimulación de la síntesis de DNA en el útero (uterotrófica) y la unión con el receptor de la manosa-6-fosfato/factor de crecimiento similar a la insulina tipo II (IGF-II) (Goffin y cols, 1996).

1.2.6.4 Lactógeno placentario.

Los PLs son hormonas polipeptídicas secretadas por la placenta hacia los torrentes circulatorios materno y fetal de algunos mamíferos. Hasta la fecha, solo se tienen reportes de la existencia de estas hormonas en primates, rumiantes y roedores.

Aunque las funciones biológicas de los PLs aún no están bien comprendidas, es razonable pensar que probablemente desempeñen funciones similares a la GH y a la PRL, con base en

su semejanza estructural. Experimentos realizados en ovejas gestantes, revelan que el PL ovino (OPL) pudiera funcionar como la única hormona somatotrópica en el feto, conclusión basada en las respuestas del feto al OPL, que incluyen estimulación de la glucogénesis, transporte aminoacídico intracelular, proliferación celular y síntesis del factor de crecimiento semejante a la insulina tipo I (IGF-I). Se ha observado también, que los niveles de PLs en los torrentes circulatorios materno y fetal son altamente dependientes de especie, es decir, varían de una especie animal a otra (Sakal y cols, 1998).

En el humano, el PL fue descrito originalmente por Josimovich y MacLaren en 1962, quienes establecieron en forma definitiva su origen placentario (Bolander y Fellows, 1976). Este péptido tiene un peso molecular de 21.5 kDa y consiste de 191 residuos aminoacídicos, de los cuales 160 guardan correspondencia exacta con la hormona del crecimiento humana normal (HGH-N). Es por esta razón, que el HPL es conocido también como somatomamotropina coriónica humana (HCS) y es clasificado dentro de la misma familia que la HGH. El HPL es producido por las células del sincitiotrofoblasto placentario y sus concentraciones séricas se incrementan progresivamente a lo largo de la gestación alcanzando un pico máximo aproximadamente en la trigésimo octava semana. Debido a que la vida media del HPL en la circulación materna es corta (10-30 min), las fluctuaciones en los niveles circulantes de la hormona son indicadores del bienestar placentario. Se ha observado que la secreción del HPL no es influida por estados de estrés o por el metabolismo general, tampoco muestra ritmo circadiano (Spellacy y cols, 1966; Hartog, 1972; Genazzani y cols, 1972).

Una correlación importante es la que se establece entre los niveles de HPL y la masa placentaria total, la cual se ha utilizado como indicador de la suficiencia de este órgano. Así, niveles bajos de HPL en la circulación materna se han asociado con la presencia de diversas patologías como muerte intrauterina, distocia y asfixia neonatal. De igual manera, los niveles muy elevados de HPL sérica pueden ser indicativos de patología fetal debido a enfermedades específicas tales como macrosomía fetal asociada a diabetes mellitus materna, isoinmunización Rh e hidropesía fetal (Spellacy y cols, 1967; Genazzani y cols, 1972; Lindberg y Nelson, 1973).

En rumiantes, los lactógenos placentarios son sintetizados en las células binucleadas del trofoectodermo placentario. La estructura y biología de estas hormonas han sido estudiadas

más ampliamente en bovinos, caprinos y ovinos. Los PLs de rumiantes tienen una mayor semejanza con la PRL que con la GH para la misma especie (49 % con la PRL contra 25 % con la GH en el caso de la oveja), aunque es ligada por ambos tipos de receptores: lactogénicos y somatogénicos (Kann y cols, 1999; Liang y cols, 1999; Biener y cols, 2003). Mientras que en ovinos y caprinos la masa molecular del PL es de aproximadamente 23 kDa, en los bovinos varía de 31 a 34 kDa debido a la glucosilación de la molécula. Estas hormonas son secretadas tanto a la circulación fetal como a la materna, pero mientras que en la primera los niveles séricos van decreciendo conforme avanza la gestación; en la segunda, estos niveles van incrementándose cada vez más, hasta alcanzar una meseta hacia el final de la gestación (Bolander y Feilows, 1976).

Informes previos señalan que los PLs de ovino y de bovino son capaces de actuar a través de los receptores para prolactina (PRLRs) de la glándula mamaria en sus respectivas especies, así como en las líneas celulares de linfoma Nb₂ de la rata. Además, ha sido descrita la existencia de receptores para PL bovino en el endometrio de vacas gestantes (Herman y cols, 1999). De esta manera, los PLs de bovino y ovino serían capaces de realizar sus funciones mediante tres tipos diferentes de receptores: 1) receptores para PL (PLRs) específicos de la hormona, los cuales se ha sugerido que existen principalmente en los tejidos fetales (Freemark y Comer, 1989); 2) receptores de la hormona de crecimiento (GHRs), y 3) receptores para prolactina (PRLRs). (Sakal y cols, 1998). Se ha descrito también que en la regulación de las actividades de los PLs pudiera estar implicada la heterodimerización de los receptores GHR y PRLR, con base en los experimentos realizados con receptores quiméricos *in vitro* (Herman y cols, 2000).

Tanto en caprinos como en ovinos se ha observado que el PL se encuentra incrementado durante la gestación y en el postparto y que sus niveles se correlacionan con el rendimiento lácteo. El incremento del rendimiento lácteo ha sido atribuido a las actividades tanto mamogénica como lactogénica del PL. Sin embargo, la manera exacta por la cual actúa la hormona a este respecto no es clara. Existen informes que relacionan la actividad de la hormona con la producción del IGF-I, el cual actuaría como intermediario para la estimulación de las actividades antes citadas (Kann y cols, 1999). El IGF-I sería producido por la estimulación directa de receptores situados en el tejido mamario y no por la estimulación de receptores para hormona del crecimiento (GHR) situados en el hígado, tal

como ocurre normalmente con la propia GH. También se ha comunicado que los niveles séricos de PL no afectan de manera directa los niveles circulantes de GH y/o PRL y que por lo tanto, es poco probable que el PL actúe *in vivo* sobre los receptores GHR o PRLR a nivel hipotalámico, ya que esto produciría una alteración en los niveles séricos de GH y PRL en estas especies (Kann y cols, 1999).

1.2.7 PRPs y PLs en órdenes distintos a primates, rumiantes y roedores.

Además de la presencia de PLs y PRPs en las especies comentadas anteriormente, no existen reportes hasta la fecha de la existencia de tales genes en otros órdenes de mamíferos. Un estudio de radioinmunoanálisis (RIA) y bioensayos con el plasma de animales pertenecientes a los órdenes Insectivora (musaraña), Chiroptera (murciélago), Edentata (armadillo), Lagomorpha (conejo), Carnivora (perro, gato, hurón), Perissodactyla (caballo, cebra, rinoceronte) y aún dentro de los artiodáctilos (cerdo), no pudo demostrar actividad lactogénica alguna (Forsyth, 1986). Sin embargo, estudios recientes realizados en llamas gestantes por medio de técnicas inmunológicas, pudieron evidenciar la presencia de por lo menos una glucoproteína relacionada a PL bovino en las células placentarias de esos animales. Estos estudios fueron confirmados por medio de Western Blot y con electroferesis en gel de acrilamida en condiciones desnaturalizantes (SDS-PAGE) (Olivera y cols, 2003).

Por otro lado, trabajos realizados en la ULIEG sugieren que podrían existir secuencias relacionadas a PLs o a PRPs en el genoma del gato (González, 2001). Experimentos realizados con sondas marcadas de lactógeno placentario bovino II (bPL-II), evidencian una banda de hibridación con productos de PCR generados a partir de iniciadores consenso diseñados sobre las zonas más conservadas de los exones II y V de los genes de PRL, PRP y PL bovinos y de la PRL de gato (figura 9). Sin embargo, esta secuencia aún no ha sido aislada y se desconoce si realmente es representativa de algún gen (o pseudogen) perteneciente a la familia.

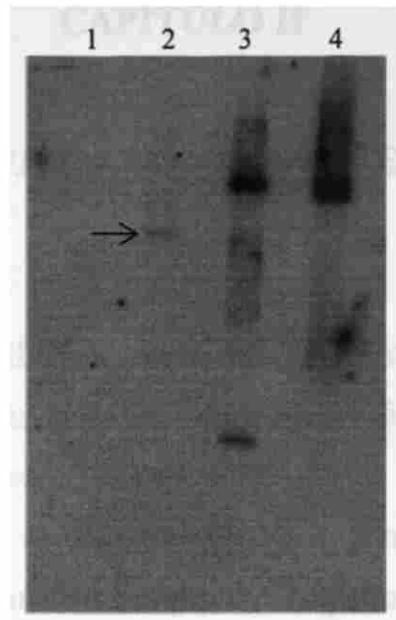
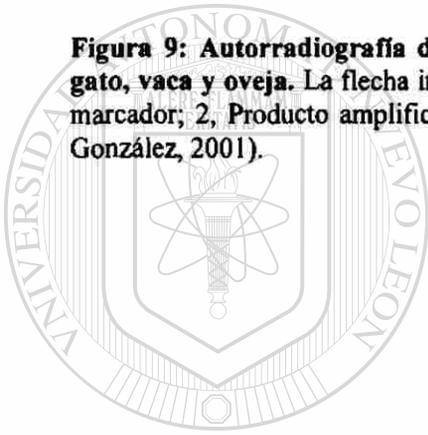


Figura 9: Autorradiografía del gel hibridado con una sonda de PL-II bovino y PAs de gato, vaca y oveja. La flecha indica el producto presuntamente relacionado a PRL. Carriles: 1, marcador; 2, Producto amplificado (PA) de gato; 3, PA de vaca; 4, PA de oveja (tomado de González, 2001).



UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

®

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

CAPÍTULO II

JUSTIFICACIÓN E HIPÓTESIS

2.1 Justificación del trabajo.

La familia multigénica GH/PRL/PL es considerada un buen modelo para estudiar la evolución de los genomas y ha sido utilizada para tal fin en múltiples trabajos. La clonación y análisis de los genes pertenecientes a esta familia han sido realizados ampliamente en primates y en algunos otros órdenes, como en los roedores y en los rumiantes. En estos últimos, el análisis comparativo ha permitido establecer que las PRPs y los PLs presentes en sus genomas son el resultado de la duplicación del gen de la PRL, contrario a lo acontecido en primates, donde ha sido el gen de GH el que ha dado lugar a la aparición de los PLs por duplicación.

Sin embargo, es poco lo que se conoce sobre la existencia de hormonas relacionadas a esta familia multigénica en tejido placentario de mamíferos pertenecientes a otros órdenes. Particularmente en el caso de los carnívoros, un estudio sugiere que no existen PLs en este orden, basado en la imposibilidad de detectar actividad lactogénica en el suero de los animales ensayados. Por otro lado, estudios preliminares realizados en la ULIEG sugieren que sí existen PRPs y que éstas se derivaron en forma similar a la ocurrida en rumiantes y roedores, es decir, por duplicación de un gen de PRL ancestral. La existencia de un producto de PCR en el gato que hibrida con una sonda derivada de PL-II bovino y que no corresponde al propio gen de PRL, ha sugerido la existencia de secuencias relacionadas a PRL que pudieran corresponder a PRPs y/o PLs en este felino. Para despejar estas dudas, se propuso en este trabajo la obtención y caracterización de genes relacionados a PRL en el gato, así como el establecimiento de la relación que guardan con la familia multigénica GH/PRL/PL.

2.2 Hipótesis del trabajo.

Existen al menos dos secuencias relacionadas a prolactina en el genoma del gato doméstico.

CAPÍTULO III

OBJETIVOS

3.1 *Objetivo general.*

Evidenciar los genes relacionados a prolactina en el gato doméstico (*Felis catus*)

3.2 *Objetivos específicos.*

- 3.2.1 Obtener y caracterizar los genes relacionados a PRL en el gato doméstico.
- 3.2.2 Determinar las relaciones filogenéticas correspondientes a la familia PRL/PL en diferentes órdenes de mamíferos, incluyendo la nueva información a derivarse del presente trabajo.
- 3.2.3 Evidenciar la presencia de la secuencia obtenida en el genoma del gato mediante hibridación tipo Southern.

CAPÍTULO IV

ESTRATEGIA GENERAL

De manera general, los pasos que se siguieron en la realización de este trabajo fueron los siguientes (figura 10):

- 1) amplificación de productos relacionados a PRL de gato a partir de DNAg e iniciadores consenso;
- 2) amplificación de un fragmento de PL ovino a partir de DNAg e iniciadores específicos;
- 3) hibridación inversa de la sonda de PL ovino contra los productos obtenidos en el paso 1;
- 4) reamplificación de los productos del gato que hibridaron con la sonda de PL ovino;
- 5) clonación de los productos obtenidos en el paso 4;
- 6) secuenciación de las clonas obtenidas en el paso anterior;
- 7) análisis de las secuencias obtenidas y reconstrucción de árboles filogenéticos;
- 8) obtención y marcaje radioactivo de la sonda de PRP de gato identificada;
- 9) digestión enzimática del DNAg de gato con *Bam* HI;
- 10) hibridación tipo Southern del DNAg de gato contra la sonda de PRP de gato marcada.

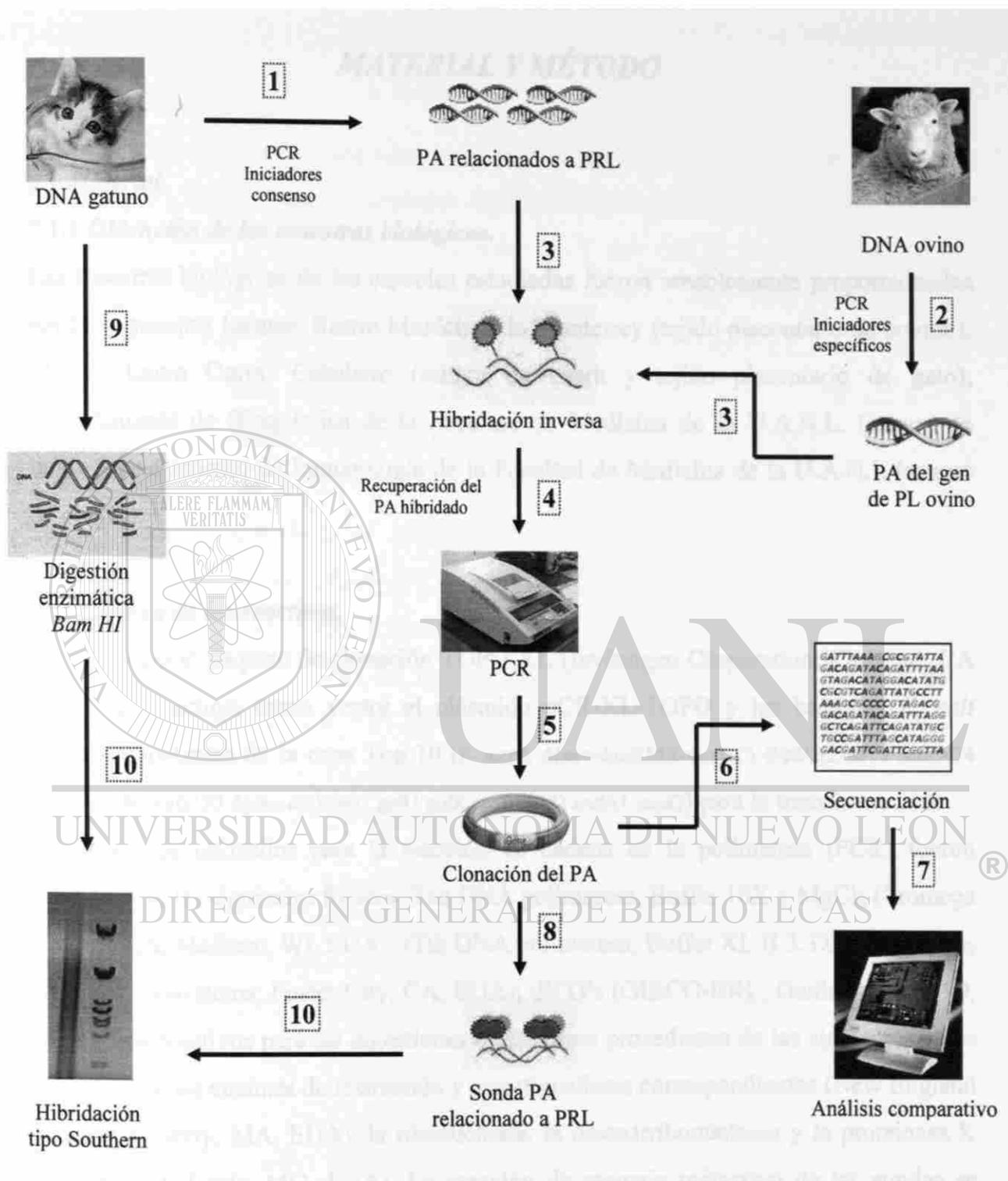


Figura 10: Estrategia general del trabajo. Esquema global de la estrategia utilizada durante la realización del presente trabajo. Los números en las flechas hacen referencia a los pasos descritos en el texto.

CAPÍTULO V

MATERIAL Y MÉTODO

5.1 Material.

5.1.1 Obtención de las muestras biológicas.

Las muestras biológicas de las especies estudiadas fueron amablemente proporcionadas por las siguientes fuentes: Rastro Municipal de Monterrey (tejido placentario de bovino); M.V.Z. Laura Corral Caballero (sangre de cabra y tejido placentario de gato); Departamento de Bioquímica de la Facultad de Medicina de la U.A.N.L. (sangre de león); Departamento de Inmunología de la Facultad de Medicina de la U.A.N.L. (sangre de oveja).

5.1.2 Origen de los reactivos.

Fue utilizado el paquete de clonación TOPO XL (Invitrogen Corporation; Carlsbad, CA USA), que incluye como vector el plásmido pCR-XL-TOPO y las bacterias *E. coli* electrocompetentes de la cepa Top 10 (F-*mcrA* Δ (*mrr-hsdRMS-mcrBC*) Φ 80*lacZ*.M15 Δ *lacX74* *recA1 deoR araD139* Δ (*ara-leu*) 7697 *galU galK rpsL* (Str^r) *endA1 nupG*) para la transformación.

Los reactivos utilizados para la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) fueron obtenidos de las siguientes fuentes: Taq DNA polimerasa, Buffer 10X y MgCl₂ (Promega Corporation; Madison, WI, EUA); rTth DNA polimerasa, Buffer XL II 3.3X y Mg(OAc)₂ (Applied Biosystems; Foster City, CA, EUA); dNTPs (GIBCO-BRL; Gaithersburg, MD, EUA). Los reactivos para las digestiones enzimáticas procedieron de las siguientes casas comerciales: las enzimas de restricción y amortiguadores correspondientes (New England Biolabs; Beverly, MA, EUA); la ribonucleasa, la desoxirribonucleasa y la proteinasa K (SIGMA; St. Louis, MO, EUA). La reacción de marcaje radiactivo de las sondas se realizó con el estuche comercial Rad Labeling System (GIBCO-BRL); se utilizó el radionucléotido [α -P³²]dATP (Amersham International; Buckinghamshire, UK) y como coprecipitador el vivid violet (CHIMERx LiCor, California, EUA). Las reacciones de

secuenciación se llevaron a cabo con el estuche de LiCor y utilizando iniciadores M13 universales sentido y antisentido (GIBCO-BRL).

5.1.3 Origen del equipo.

En este trabajo se utilizaron los equipos e instalaciones siguientes: horno de microondas LG modelo MS-70IC; microcentrifugas Eppendorf modelos 5402 y 5415 (Brinkmann Instruments, Inc. NY EUA); fuentes de poder ISCO 494 (ISCO, Nebraska, EUA), EC 600 (E-C Aparatus Corporation, St Petersburg, Florida) y BRL 250 (GIBCO-BRL); centrifuga Beckmann allegra TM 21R modelo 367570; secuenciador automático DNA sequencer Long Reader 4200 (LI-COR, CA, EUA); termomixer Eppendorf modelo 5436 (Brinkmann Instruments, Inc. NY EUA); desecador de geles (Labconco, CA, EUA); incubadora Shell Lab modelo 1525; incubadora de hibridación modelo 310 (Robbins Scientific Co. Sunnyvale, CA, EUA); espectrofotómetros Beckman modelo DU-70 (Scientific Instruments Division Fullerton, CA, EUA) y Eppendorf BioPhotometer modelo 6131 (Brinkmann Instruments, Inc. NY EUA); congelador marca Torrey (Mty, Mex); termocicladores modelos MJ Research PT150 y PT100 (Watertown, Mass, EUA); Perkin Elmer 2400; RoboCycler 96 (Stratagene, La Jolla, CA, EUA); electroporador BioRad Gene Pulser II (Hercules, CA, EUA); computadora IBM modelo G42; fotodocumentador Gel Doc 1000 de BioRad (Hercules, CA, EUA).

5.1.4 Programas computacionales.

Los programas de computadora utilizados fueron los siguientes: procesador de texto *Microsoft Word*® versión 2002 (©Microsoft Corporation, 1983-2001); procesador de gráficos *Microsoft Power Point*® versión 2002 (©Microsoft Corporation, 1983-2001); Amplify versión 1.2b (Bill Engels 1992 University of Wisconsin Genetics M. Madison, WI, EUA); DNA Strider TM 1.3 (Merck and C.E.A. 1999, Service de Biochimie-Département de Biologie, Institut de Recherche Fondamentale, CEA, France); OLIGO versión 4.0 (© 1992 Wojciech Rychlik, National Bioscience Inc., Plymouth, MN, EUA); CLUSTAL W versión 1.5 (Multiple Sequence Alignments); CLUSTAL X versión 1.8 (Multiple Sequence Alignments); Phylip (Phylogeny Inference Package, version 3.5c

Department of Genetics, University of Washington, Seattle, EUA); GeneDoc version 2.6.002 (© 2000 by Karl Nicholas).

5.2 Método.

5.2.1 Extracción del DNA génómico.

5.2.1.1 A partir de tejido placentario.

La técnica utilizada fue una modificación de la inicialmente por Stafford y cols. en 1976 (Sambrook y Russell, 2001). Aproximadamente 1 g de tejido placentario fue triturado con mortero y pistilo junto con 1 ml de solución de lisis (10 mM Tris-HCl pH 8.0; 0.1M EDTA pH 8.0; 0.5 % SDS p/v; 20 mg/ml RNasa). La mezcla fue transferida a tubos Eppendorf de 2 ml e inmediatamente se le adicionó proteinasa K hasta una concentración final de 100 µg/ml. La muestra se incubó a 50 °C con agitación constante durante 18 horas. Al término, se dejó enfriar la muestra a temperatura ambiente (TA) y luego se le adicionó 0.5 vol de fenol saturado pH 8.0 y 0.5 vol de sevag (cloroformo: alcohol isoamílico [24:1]). Se agitó la muestra con el vórtex durante 30 s y luego se centrifugó a 10000 g durante 15 min a TA. Se transfirió la fase acuosa a un tubo nuevo y se repitió la extracción fenol/sevag. Se precipitó el DNA adicionando 0.2 vol de acetato de amonio 10 M y 2 vol de etanol al 100 % frío. Se agito la mezcla con el vórtex durante 10 s y se dejó reposar a TA durante 5 min. Luego, se centrifugó la muestra a 10 000 g durante 10 min a TA. Al término, se decantó el tubo y la pastilla precipitada fue lavada con 1 ml de etanol al 70 % y centrifugada de nuevo a 10 000 g durante 10 min a TA. Finalmente, se aspiró el etanol del tubo y el remanente se dejó evaporar colocando el tubo abierto a TA por 1 hora. La pastilla de DNA se resuspendió en 0.5 ml de buffer TE 1X (100 mM Tris-HCl pH 8.0; EDTA pH 8.0)

5.2.1.2 A partir de sangre.

Se utilizó la técnica denominada TSNT. Se colocaron 5 ml de sangre total anticoagulada con EDTA en un tubo Falcon de 15 ml y se centrifugó la muestra a 500 g durante 5 min a TA. Se desecho el sobrenadante (plasma) y se añadió al paquete celular 2 ml de buffer de lisis TSNT (2% Tritón X-100; 1 % SDS; 100 mM NaCl; 10 mM Tris-HCl pH 8.0; 1 mM EDTA pH 8.0) mezclando por inversión. Luego, se agregaron 5 ml de fenol saturado pH

8.0 y 1 ml de sevag, agitando el tubo en el vórtex hasta su completa homogenización. Después el tubo fue centrifugado a 10 000 g durante 20 min a TA. La fase acuosa fue transferida a un tubo Falcon de 15 ml nuevo y se procedió a la precipitación de DNA: se agregaron 2 vol de etanol al 100 %, se mezcló por inversión y se centrifugó a 10 000 g por 15 min a TA; se desechó el sobrenadante y la pastilla de DNA fue lavada en 2 ml de etanol al 70 % y centrifugada otra vez a 10 000 g por 10 min a TA. Finalmente, se desechó el sobrenadante, se dejó evaporar a TA los residuos de etanol y se resuspendió la pastilla de DNA en 500 µl de buffer TE 1X.

5.2.2 Obtención de la clona de PL ovino.

5.2.2.1 Iniciadores.

Con el auxilio de los programas computacionales OLIGO y Amplify, se diseñaron y ensayaron virtualmente iniciadores específicos para PL de rumiantes con base a las secuencias de este gen reportadas hasta la fecha para estas especies.

5.2.2.2 Estandarización de la PCR.

Se realizaron ensayos de la PCR variando las concentraciones de DNA, magnesio y temperatura de alineamiento con la finalidad de obtener el menor número de productos inespecíficos. La PCR optimizada se describe en la tabla 2.

Tabla 2: Condiciones de la PCR para la obtención del PL ovino.

REACTIVO	CONCENTRACIÓN FINAL
Buffer 10 X	1X
dNTPs 10mM	200 µM
Iniciador RumPLex4 5 µM	0.4 µM
Iniciador 3ConsPrl 5µM	0.4 µM
MgCl ₂ 25 mM	1.5 mM
Taq DNA polimerasa 5 U/µl	0.25 U/µl
DNAG	100 ng/50 µl
H ₂ O miliQ	cbp 50 µl

Después de un paso inicial de desnaturalización a 94 °C por 5 min, las amplificaciones se realizaron por 34 ciclos que incluyeron en este orden: un paso de desnaturalización a 94 °C por 35 s, un paso de apareamiento a 58 °C por 30 s y un paso de extensión a 72 °C por 1 min. El PA obtenido fue evidenciado mediante electroforesis en gel de agarosa al 1.5 % y tinción con bromuro de etidio. El tamaño esperado del PA fue de 859 pb. Una vez confirmado lo anterior, se procedió a eliminar los reactivos no incorporados en la reacción de PCR mediante extracción fenol/sevag y precipitación con etanol y acetato de sodio 3M. Después de la extracción se confirmó la integridad del PA mediante electroforesis en gel de agarosa al 1.5 %. Por último, se cuantificó la cantidad y la pureza relativa del PA por medio de espectrofotometría a A_{260} y relación A_{260}/A_{280} .

5.2.2.3 Clonación del PA de PL ovino.

Se tomaron 30 ng del PA verificando que tuviera al menos una relación A_{260}/A_{280} de 1.8 y se clonó en el vector pCR-XL-TOPO según las instrucciones del estuche comercial. Se transformaron bacterias *E. coli* de la cepa TOP 10 con el vector recombinante mediante electroporación ajustando el aparato con los siguientes parámetros: resistencia 200 ohmios, capacitancia 25 μ F, voltaje 2.5 kV, el pulso varió entre 3-5 ms. Las bacterias transformadas fueron incubadas en 500 μ l de medio SOC (2 % triptona, 0.5 % extracto de levadura, 10 mM NaCl, 2.5 mM KCl, 10 mM $MgCl_2$, 10 mM $MgSO_4$, 20 mM glucosa) en el termomixer durante 1 h a 37 °C con agitación vigorosa con la finalidad de que el gen de resistencia del vector pudiera expresarse a niveles óptimos. Al término, las bacterias fueron incubadas en placas con medio Luria-Bertani-agar (1 % triptona, 0.5 % extracto de levadura, 1 % NaCl, 1.5 % agar) suplementado con kanamicina (50 μ g/ml) durante un período de 18 h. Se eligieron al azar 20 de las colonias bacterianas obtenidas y se sembraron en tubos de ensayo con 4 ml de medio Luria-Bertani (1 % triptona, 0.5 % extracto de levadura, 1 % NaCl) suplementado con kanamicina (50 μ g/ml) e incubadas a 37 °C por 18 h con agitación vigorosa.

5.2.2.4 Obtención del DNA plasmídico.

Se realizó la extracción de DNA plasmídico mediante la técnica de minipreparaciones por lisis alcalina descrita por Sambrook y Russell, 2001. Se tomaron 2 ml del cultivo bacteriano de cada tubo de ensayo depositándolos en tubos Eppendorf de 2 ml, se centrifugaron durante 30 s a 13000 g a TA y se desechó el sobrenadante. Se agregó a cada tubo 100 µl de Solución I (50 mM glucosa, 25 mM Tris-HCl pH 8.0, 10 mM EDTA pH 8.0), se mezcló en el vórtex por 30 s y se incubó la mezcla por 5 min a 4 °C. Después, se adicionaron 200 µl de Solución II preparada en fresco (0.2N NaOH, 1 % (p/v) SDS), se mezcló por inversión y se incubaron los tubos por espacio de 5 min a 4 °C. Luego, se agregaron 150 µl de Solución III (90 µl acetato de potasio 5M, 17.25 µl ácido acético glacial, 42.75 µl agua destilada), se mezcló por inversión y se incubó 5 min a 4 °C. Los tubos fueron centrifugados 10 min a 13000 g a TA, recuperándose el sobrenadante a tubos Eppendorf nuevos de 1.5 ml. Finalmente, se realizó una extracción con fenol/sevag y precipitación con etanol similar a la descrita para la extracción de DNA genómico.

5.2.2.5 Análisis de los plásmidos recombinantes de PL ovino.

Se realizó electroforesis en gel de agarosa al 0.8 % de los DNAs plasmídicos y aquellos que presentaron una migración retrasada respecto al plásmido control (sin inserto) fueron seleccionados como posibles candidatos. Una pequeña alícuota de estos últimos fue digerida con la enzima de restricción *Eco* RI la cual libera el inserto contenido, para después realizar electroforesis de la digestión y evidenciar el tamaño de los insertos. Aquellas clonas que presentaron un inserto con el tamaño esperado de 859 pb fueron seleccionadas y se secuenciaron dos de ellas para verificar la identidad del inserto.

5.2.2.6 Obtención de la sonda de PL ovino.

Una vez obtenida la clona de PL ovino, se realizó una PCR de la misma utilizando los iniciadores específicos con los cuales se originó el inserto, con la finalidad de obtener la secuencia única de PL que fue utilizada para los procesos de hibridación en gel e hibridación inversa posteriores. Las condiciones de la PCR se describen en la tabla 3.

Tabla 3: Condiciones de PCR para la obtención de la sonda de PL ovino.

REACTIVO	CONCENTRACIÓN FINAL
Buffer 10 X	1X
dNTPs 10mM	200 μ M
Iniciador RumPLex4 5 μ M	0.4 μ M
Iniciador 3ConsPrl 5 μ M	0.4 μ M
MgCl ₂ 25 mM	1.5 mM
Taq DNA polimerasa 5 U/ μ l	0.25 U/ μ l
DNA plasmídico	10 ng/50 μ l
H ₂ O miliQ	cbp 50 μ l

Después de un paso inicial de desnaturalización a 94 °C por 5 min, las amplificaciones se realizaron por 34 ciclos que incluyeron en este orden: un paso de desnaturalización a 94 °C por 35 s, un paso de apareamiento a 60 °C por 30 s y un paso de extensión a 72 °C por 1 min. El PA obtenido fue evidenciado, purificado y cuantificado de manera similar a la ya descrita para el PA a partir de DNAg.

5.2.3 Obtención de las secuencias relacionadas a PRL en el gato.

5.2.3.1 Obtención de las secuencias relacionadas a PRL en el gato mediante clonación directa.

5.2.3.1.1 Iniciadores.

Con el auxilio de los programas computacionales OLIGO y Amplify, se diseñaron y ensayaron virtualmente iniciadores consenso para PRL/PRP/PL con base en las secuencias de estos genes reportadas hasta la fecha para rumiantes y carnívoros. Además, fue incluido el iniciador 3' utilizado para la obtención de la sonda de PL ovina, descrito previamente.

5.2.3.1.2 Estandarización de la PCR.

Se llevaron a cabo varios ensayos de PCR utilizando los iniciadores 5' y 3' en todas las combinaciones posibles. Las condiciones de las PCRs se mantuvieron relativamente inespecíficas, con la finalidad de favorecer la amplificación de productos relacionados a PRL y no sólo de esta última. Se incluyeron como testigos positivos de la reacción DNA de oveja y de cabra. La reacción de PCR se describe en la tabla 4.

Tabla 4: Condiciones de PCR con los iniciadores consenso.

REACTIVO	CONCENTRACIÓN FINAL
Buffer XL II 3.3 X	1X
dNTPs	200 μ M
Iniciador 5' 5 μ M	0.4 μ M
Iniciador 3' 5 μ M	0.4 μ M
MgO(Ac) ₂ 25 mM	1.8 mM
rTth DNA polimerasa 2 U/ μ l	0.08 U/ μ l
DNAg	100 ng/50 μ l
H ₂ O miliQ	cbp 50 μ l

Después de un paso inicial de desnaturalización a 94 °C por 5 min, las amplificaciones se realizaron por 34 ciclos que incluyeron en este orden un paso de desnaturalización a 94 °C por 35 s, un paso de apareamiento a 59 °C por 30 s y un paso de extensión a 68 °C por 7 min. Los PA obtenidos fueron evidenciados mediante electroforesis en gel de agarosa al 1 % y tinción con bromuro de etidio.

A los PA de las combinaciones de iniciadores que presentaron amplificación en el gato se les procedió a eliminar los reactivos no incorporados en la reacción de PCR mediante extracción fenol/sevag y precipitación con etanol y acetato de sodio 3M. Después de la extracción se confirmó la integridad de los PA mediante electroforesis en gel de agarosa al 1 %. Por último, se cuantificó la cantidad y la pureza relativa de los PA por medio de espectrofotometría a A₂₆₀ y relación A₂₆₀/A₂₈₀.

5.2.3.1.3 Clonación directa de los PA relacionados a PRL del gato.

Se tomaron 30 ng de los PA de cada reacción verificando que tuvieran una relación A₂₆₀/A₂₈₀ de al menos 1.8 y se clonaron en el vector pCR-XL-TOPO según las instrucciones del estuche comercial. Se transformaron bacterias *E. coli* de la cepa TOP 10 con el vector recombinante mediante electroporación con las mismas condiciones utilizadas para la clonación del PA de PL ovino.

El cultivo de las bacterias y la obtención del DNA plasmídico fueron realizados de la misma forma como se señaló para la obtención de la clona de PL ovino. La única diferencia fue el número de clonas levantadas, que en este caso fueron 60.

5.2.3.1.4 Análisis de los plásmidos recombinantes de los PA del gato.

Se realizó electroforesis en gel de agarosa al 0.8 % de los DNAs plasmídicos y aquellos que presentaron una migración retrasada respecto al plásmido control (sin inserto) fueron seleccionados como posibles candidatos. Una pequeña alícuota de estos últimos fue digerida con la enzima de restricción *Eco* RI la cual libera el inserto contenido, para después realizar electroforesis de la digestión y evidenciar el tamaño de los insertos. Aquellas clonas que presentaron un inserto con los tamaños esperados de ~7000 pb y ~3000 pb fueron seleccionadas y se secuenciaron dos de ellas para verificar la identidad del inserto.

5.2.3.1.5 Clonación directa de los PA relacionados a PRL de oveja y cabra.

Debido a que los reportes para genes relacionados a PRL en rumiantes únicamente incluyen el cDNA de los mismos (excepto para la vaca) y con la finalidad de contar con más secuencias con las cuales realizar el análisis filogenético de los productos obtenidos en el gato, se decidió aprovechar los PA obtenidos de oveja y cabra y realizar clonación y secuenciación de los mismos. El procedimiento utilizado fue el mismo que el ya descrito para los PA del gato.

5.2.3.2 Obtención indirecta de las secuencias relacionadas a PRL en el gato mediante hibridación inversa.

Se realizó hibridación inversa de los PA del gato contra la sonda de PL ovina fijada en membrana de nylon. El nivel de astringencia fue controlado de tal manera que el PA de las secuencias relacionadas a PRL del gato se mantuvieran fijadas a la sonda de PL ovina mientras que los demás productos de amplificación, incluyendo la correspondiente a prolactina, fueran eluidas con los primeros lavados de la membrana.

5.2.3.2.1 Obtención de los PA relacionados a PRL de gato.

Fueron utilizados para tal fin los mismos iniciadores consenso que los señalados para la clonación directa. Las condiciones de la PCR fueron relajadas mediante la disminución de la temperatura de alineamiento, el aumento del tiempo de alineamiento y el aumento de la concentración final de los iniciadores. La reacción se describe en la tabla 5.

Tabla 5: Condiciones de PCR para la obtención de los PA relacionados a PRL de gato.

REACTIVO	CONCENTRACIÓN FINAL
Buffer XL II 3.3 X	1X
dNTPs	200 μ M
Iniciador 5' 5 μ M	0.5 μ M
Iniciador 3' 5 μ M	0.5 μ M
MgO(Ac) ₂ 25 mM	1.8 mM
rTth DNA polimerasa 2 U/ μ l	0.08 U/ μ l
DNAg	100 ng/50 μ l
H ₂ O miliQ	cbp 50 μ l

Después de un paso inicial de desnaturalización a 94 °C por 5 min, las amplificaciones se realizaron por 34 ciclos que incluyeron en este orden: un paso de desnaturalización a 94 °C por 35 s, un paso de apareamiento a 56 °C por 40 s y un paso de extensión a 68 °C por 7 min. Los PA obtenidos fueron evidenciados mediante electroforesis en gel de agarosa al 1 % y tinción con bromuro de etidio.

5.2.3.2.2 Hibridación inversa de los PA del gato.

Fue llevado a cabo el siguiente procedimiento: una membrana de nylon de 2 cm x 1.5 cm se sumergió durante 10 min en una solución de buffer 6X SSC (3M NaCl, 0.3M citrato de sodio); luego, se depositó con un micropipeta la sonda de PL ovino en toda la superficie de la membrana, y se dejó secar por espacio de 5 min. Pasado este tiempo, se impregnó papel filtro Whatman 3MM con la solución desnaturalizante (1.5M NaCl, 0.5 NaOH) y se colocó sobre la superficie de la membrana donde fue depositada la sonda por espacio de 10 min; después se retiró este papel filtro de la membrana y se colocó otro papel filtro impregnado con la solución neutralizante (1M NaCl, 0.5M Tris-HCl pH 7.0) también por 10 min. Por último, la sonda fue fijada a la membrana mediante incubación a 80 °C durante 2 h.

La membrana fue colocada dentro de un tubo Eppendorf de 2 ml y prehibridada con 1 ml de solución de prehibridación/hibridación (5X SSC, 5X solución Denhardt, 1 % (p/v) SDS) a 55 °C durante 2 h. Al término, se desechó la solución de prehibridación y se agregó 500 μ l de la solución de hibridación precalentada a 55 °C conteniendo los PA de gato obtenidos, previamente desnaturalizados durante 5 min a 95 °C. Los productos se dejaron hibridando durante 18 h a 55 °C con rotación continua del tubo.

Pasado este tiempo se realizaron los lavados de la membrana de la manera siguiente: se desechó la solución de hibridación y se dejó enfriar la membrana a temperatura ambiente; luego, se depositó en el tubo 1 ml de la solución de lavado I (2X SSC, 0.1 % (p/v) SDS) y se dejó el tubo con rotación constante durante 20 min; después, se desechó esta solución y se agregó 1 ml de la solución de lavado II (0.2X SSC, 0.1 % (p/v) SDS) lavando con rotación continua durante 20 min; por último, se desechó la solución II y se agregó 1 ml de solución de lavado III (0.1X SSC, 0.1 % (p/v) SDS) precalentada a 55 °C y se dejó incubando el tubo durante otros 20 min.

Para la elusión de los PA hibridados, se desechó la solución de lavado III y se agregaron 500 µl de agua NanoPure precalentada a 60 °C y se dejó incubando por espacio de 30 min a 60 °C con agitación constante. Finalmente, el eluido fue recolectado en un tubo nuevo y almacenado a -20 °C hasta su utilización.

5.2.3.2.3 Reamplificación de los PA del eluido de hibridación.

Se realizaron ensayos de PCR de los PA del eluido de hibridación utilizando los iniciadores que habían sido utilizados para originarlos en la PCR inicial. Se utilizaron condiciones de astringencia de la reacción lo más altas posibles para eliminar la probabilidad de amplificar productos no específicos; además se incluyeron testigos de reacción: uno con solo el iniciador 5' y otro con solo el iniciador 3'. Las condiciones de la reacción de PCR se describen en la tabla 6.

Tabla 6: Condiciones de PCR de los PA del eluido de hibridación.

REACTIVO	CONCENTRACIÓN FINAL
Buffer 10 X	1X
dNTPs 10 mM	200 µM
Iniciador 5' 5 µM	0.4 µM
Iniciador 3' 5µM	0.4 µM
MgCl ₂ 25 mM	1.3 mM
Taq DNA polimerasa 5 U/µl	0.25 U/µl
PA	10 ng/50 µl
H ₂ O miliQ	cbp 50 µl

Después de un paso inicial de desnaturalización a 94 °C por 5 min, las amplificaciones se realizaron por 34 ciclos que incluyeron en este orden: un paso de desnaturalización a 94 °C por 30 s, un paso de apareamiento a 62 °C por 30 s y un paso de extensión a 72 °C por 2 min. Los PA obtenidos fueron evidenciados mediante electroforesis en gel de agarosa al 1.5 % y tinción con bromuro de etidio.

5.2.3.2.4 Hibridación en gel de los PA del eluido.

Con la finalidad de evidenciar los PA que realmente presentaban semejanza con la secuencia de PL ovino, se realizó una hibridación radiactiva en gel de los productos obtenidos de las reacciones anteriores. Para esto se realizó electroforesis de estos productos en un gel de agarosa al 1 %, se tiñó con bromuro de etidio, se documentó la imagen del mismo y finalmente se desecó para su posterior hibridación. Las soluciones utilizadas para esta hibridación fueron las mismas que las descritas para la hibridación inversa.

La hibridación del gel se realizó de la manera siguiente: una vez desecado el gel, éste se sumergió durante 10 min en la solución desnaturalizante, luego se sumergió durante otros 10 min en la solución neutralizante y se dejó prehibridando con la solución de prehibridación (a razón de 1 ml de solución por cada 10 cm² de superficie del gel) durante 2 h a 55 °C en un tubo con rotación continua. Al término, la solución de prehibridación fue desechada y sustituida por la misma cantidad de solución de hibridación precalentada a 55 °C y conteniendo la sonda de PL ovino previamente marcada con radiactividad (según las instrucciones del estuche comercial utilizado) y desnaturalizada a 95 °C por 5 min. Finalmente, se dejaron hibridando los productos por espacio de 18 h a 55 °C.

Terminado el tiempo de hibridación, fue desechada la solución de hibridación y se lavó el gel de la siguiente forma: se dejó enfriar el gel a TA tras lo cual se agregaron 50 ml de solución de lavado I, agitando el tubo de manera continua durante 20 min y desechando la solución al término, este paso se repitió una vez más; luego se agregó la misma cantidad de solución de lavado II, agitando el tubo continuamente durante 20 min para luego desechar la solución, este paso se repitió una vez más; el mismo procedimiento se siguió con la solución de lavado III, pero este paso se llevo a cabo a 55 °C.

Al finalizar los lavados, el gel fue envuelto en plástico Saran Wrap y expuesto con película ultrasensible y pantalla amplificadora de señal durante toda la noche a $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$. Al día siguiente, la película fue revelada con una maquina reveladora automática.

5.2.3.2.5 Identificación y purificación de las secuencias relacionadas a PRL del gato.

La autorradiografía obtenida se comparó con la imagen del gel previamente fotodocumentada y se determinó el tamaño aproximado del producto que mostraba señal. Posteriormente, se realizó una electroforesis preparativa de este producto en gel de agarosa de bajo punto de fusión al 1.5 %, se visualizó el producto en un transiluminador de luz ultravioleta (UV) y con ayuda de una hoja de bisturí, se cortó el gel en la zona correspondiente al PA que había mostrado señal. Se rebanó el fragmento del gel en pequeños pedazos y se colocaron en un tubo Eppendorf de 2 ml. Se pesó el tubo y se determinó la masa de los fragmentos cortados. Se adicionaron 5 vol de buffer LMT (20mM Tris-HCl pH 8.0, 1mM EDTA pH 8.0) y se incubó el tubo a $65\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante 10 min después de lo cual se dejó enfriar a TA. Luego se agregó 1 vol igual de fenol saturado y se mezcló con el vórtex durante 20 s, para después separar las fases mediante centrifugación a 4000 g por 10 min a TA. Se recuperó la fase acuosa en un tubo nuevo y se realizó extracción fenol/sevag y precipitación con etanol, según ya se ha descrito. Finalmente, se realizó cuantificación del producto y determinación de pureza relativa mediante espectrofotometría.

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

5.2.3.2.6 Clonación del PA del eluido relacionado a PRL de gato.

La clonación de este producto se realizó de manera similar a la ya descrita para la clonación del PL ovino. También el cultivo de las bacterias y la obtención del DNA plasmídico fueron realizados de la misma forma como se señaló para la obtención de la clona de PL ovino.

5.2.3.2.7 Análisis de los plásmidos recombinantes del PA eluido relacionado a PRL de gato.

Se realizó electroforesis en gel de agarosa al 1 % de los DNAs plasmídicos y aquellos que presentaron una migración retrasada respecto al plásmido control (sin inserto) fueron

seleccionados como posibles candidatos. Una pequeña alícuota de estos últimos fue digerida con la enzima de restricción *Eco* RI, la cual libera el inserto contenido, para después realizar electroforesis de la digestión y evidenciar el tamaño de los insertos. Aquellas clonas que presentaron un inserto con el tamaño esperado determinado en la autorradiografía fueron seleccionadas y se secuenciaron dos de ellas para verificar la identidad del inserto.

5.2.4 Hibridación tipo Southern.

Con la finalidad de evidenciar el número de secuencias de PRP de gato presentes en el genoma del gato, se realizó una hibridación radiactiva en gel tipo Southern del DNAg de gato digerido con la enzima *Bam* HI contra una sonda preparada a partir del inserto de la clona de PRP de gato que se obtuvo en el apartado anterior. Las soluciones utilizadas para esta hibridación fueron las mismas que las descritas para la hibridación inversa.

5.2.4.1 Obtención de la sonda de PRP de gato.

Una vez obtenida la clona de gato relacionada a prolactina (PRP), se realizó una PCR de la misma utilizando los iniciadores específicos con los cuales se originó el inserto, con la finalidad de obtener la secuencia única de PRP que fue utilizada para el proceso de hibridación tipo Southern. Las condiciones de la PCR se describen en la tabla 7.

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

Tabla 7: Condiciones de PCR para la obtención de la sonda de PRP de gato.

REACTIVO	CONCENTRACIÓN FINAL
Buffer 10 X	1X
dNTPs 10mM	200 μ M
Iniciador 5' 5 μ M	0.4 μ M
Iniciador 3' 5 μ M	0.4 μ M
MgCl ₂ 25 mM	1.5 mM
Taq DNA polimerasa 5 U/ μ l	0.25 U/ μ l
DNA plasmídico	10 ng/50 μ l
H ₂ O miliQ	cbp 50 μ l

Después de un paso inicial de desnaturalización a 94 °C por 5 min, las amplificaciones se realizaron por 34 ciclos que incluyeron en este orden: un paso de desnaturalización a 94 °C por 35 s, un paso de apareamiento a 60 °C por 30 s y un paso de extensión a 72 °C por 1 min. El PA obtenido fue evidenciado, purificado y cuantificado mediante los procedimientos ya descritos.

5.2.4.2 Digestión enzimática del DNAg de gato.

Se realizó cuantificación del DNAg de gato mediante espectrofotometría, se tomaron 10 µg del mismo y se resuspendieron en 10 µl de Buffer 10X de digestión para *Bam HI*. Se mezcló varias veces por pipeteo y se incubó a 4 °C por espacio de 4 h. Luego, se agregaron 10 µl de BSA 10X, 5 µl de enzima *Bam HI* (20 U/µl) y agua NanoPure hasta completar 50 µl de reacción total. El tubo se incubó a 37 °C durante 12 h tras las cuales se agregaron otros 5 µl de enzima *Bam HI* y se volvió a incubar durante 12 h más. Al término, se tomó una pequeña alícuota de la reacción y se realizó electroforesis en gel de agarosa al 0.8 % y tinción con bromuro de etidio para confirmar que la digestión hubiera sido total. Finalmente, se realizó electroforesis de la totalidad de la reacción en gel de agarosa al 0.8 % a bajo voltaje (5 V/cm) durante 12 h, incluyendo como testigos las clonas de PL ovino y una de las clonas de PRL de gato anteriormente obtenidas, se tiñó el gel con bromuro de etidio para confirmar la presencia de los productos y luego se desecó para su posterior hibridación.

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

5.2.4.3 Hibridación del gel tipo Southern.

La hibridación del gel se realizó de la manera siguiente: una vez desecado el gel, éste se sumergió durante 10 min en la solución de depurinación (0.1N HCl), después 10 min en la solución desnaturalizante, y luego durante otros 10 min en la solución neutralizante; se dejó prehibridando con la solución de prehibridación (a razón de 1 ml de solución por cada 10 cm² de superficie del gel) durante 2 h a 55 °C en un tubo con rotación continua. Al término, la solución de prehibridación fue desechada y sustituida por la misma cantidad de solución de hibridación precalentada a 55 °C y conteniendo la sonda de PRP de gato previamente marcada con radiactividad (según las instrucciones del estuche

comercial utilizado) y desnaturalizada a 95 °C por 5 min. Finalmente, se dejaron hibridando los productos por espacio de 18 h a 55 °C.

Terminado el tiempo de hibridación, fue desechada la solución de hibridación y se lavó el gel de la siguiente forma: se dejó enfriar el gel a TA tras lo cual se agregaron 50 ml de solución de lavado I, agitando el tubo de manera continua durante 20 min y desechando la solución al término, este paso se repitió una vez más; luego se agregó la misma cantidad de solución de lavado II, agitando el tubo continuamente durante 20 min para luego desechar la solución, este paso se repitió una vez más; el mismo procedimiento se siguió con la solución de lavado III pero este paso se llevo a cabo a 55 °C. Al finalizar los lavados, el gel fue envuelto en plástico Saran Wrap y expuesto con película ultrasensible y pantalla amplificadora de señal durante 7 días a -70 °C. Pasado este tiempo, la película fue revelada con una maquina reveladora automática.

5.2.5 Análisis de las relaciones filogenéticas de los productos obtenidos.

Las secuencias de todas las clonas obtenidas fueron comparadas de tres diferentes maneras: se realizó el alineamiento nucleotídico de las mismas incluyendo todo el fragmento que pudo ser secuenciado a partir del extremo 3'; también otro alineamiento nucleotídico pero únicamente incluyendo la porción del exón disponible; y finalmente, un alineamiento aminoacídico con el marco de lectura correspondiente para cada clona.

5.2.5.1 Alineamiento nucleotídico de los extremos 3'.

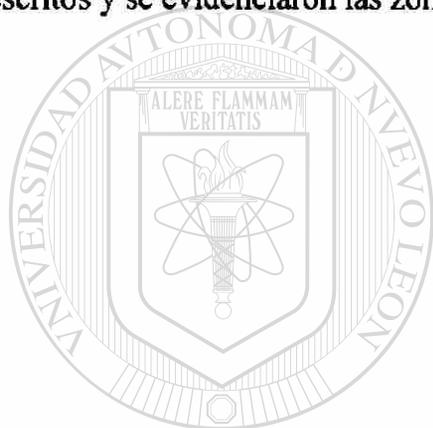
Se realizó secuenciación de las clonas en ambos extremos del inserto mediante iniciadores M13 sentido y antisentido y utilizando el estuche comercial de LiCor. La comparación de las secuencias se realizó utilizando los programas computacionales Clustal W, Clustal X y GeneDoc. Las secuencias obtenidas se cortaron de tal manera que correspondieran en el mismo número de bases nucleotídicas, pero respetando zonas de inserción y deleción dentro de las mismas. Una vez alineadas, se realizó la reconstrucción del árbol filogenético incluyendo los genes de la familia (de rumiantes y carnívoros) disponibles en el GenBank que reportaran las zonas de secuenciación correspondientes a las clonas. En el árbol se incluyeron los valores de *bootstrap* de las ramas y la secuencia de PRL de pollo como grupo externo.

5.2.5.2 Alineamiento nucleotídico del fragmento exónico.

Se siguió un procedimiento similar al anterior, pero también fueron incluidos los exones correspondientes a los genes de la familia en roedores.

5.2.5.3 Alineamiento aminoacídico.

Tomando como base el alineamiento nucleotídico del fragmento exónico, las secuencias fueron traducidas a secuencias aminoacídicas en los tres diferentes marcos de lectura posibles. Cada uno fue comparado con la base de datos del GenBank y aquellos que presentaron correspondencia con las proteínas de la familia fueron los seleccionados. Las secuencias aminoacídicas fueron alineadas con los programas computacionales ya descritos y se evidenciaron las zonas de cambios y las regiones conservadas.



UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS



CAPÍTULO VI

RESULTADOS

6.1 Obtención de los DNAg

Los DNAg de gato y de vaca se extrajeron a partir de tejido placentario mientras que los DNAg de cabra y oveja se obtuvieron a partir de muestras de sangre. Las tres extracciones realizadas permitieron obtener DNAg de buena calidad (figura 11), aun cuando la extracción de tejido placentario tuvo un rendimiento ligeramente menor. Para el gato se obtuvieron 20 mg/g, en la cabra 30 mg/g y en la oveja 32 mg/g.

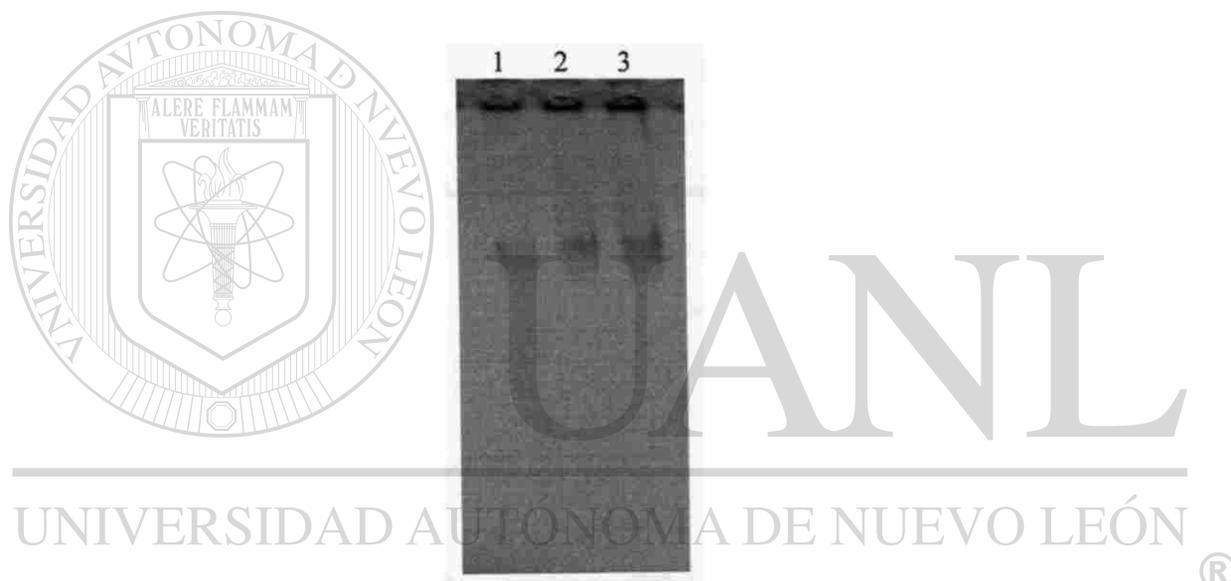


Figura 11: Extracción de los DNAg. Gel de agarosa al 0.8 % donde se evidencia la calidad de los DNAg obtenidos. Se depositó 1 μ l de cada muestra. Carriles: 1, gato; 2, cabra; 3, oveja.

6.2 Obtención de la clona de PL ovino.

6.2.1 Diseño de iniciador específico para PL de rumiantes.

Se diseñó un iniciador 5' (RumPLex4) específico para PL de rumiantes mediante el alineamiento y comparación (con el programa GeneDoc) de las secuencias de los cDNAs de PLs disponibles en el GenBank pertenecientes a rumiantes; también se incluyeron los cDNAs de PRPs y PRLs disponibles con la finalidad de elegir zonas altamente conservadas pero presentes únicamente en los PL y no en otros miembros de la familia (tabla 8). La zona idónea para tal fin estaba situada sobre la mitad del exón 4 (figura 12).

Tabla 8: Números de acceso (GenBank) de las secuencias comparadas en este trabajo.

SECUENCIA	Nº DE ACCESO
mviPRL	X59785
fcaPRL	U25974
amePRL	AY161285
ecaPRL	AY373339
sscPRL	X14068
btaPL-I	AH001142
btaPL-II	AB098992
btaPRC-I	AH001153
btaPRC-II	M27239
btaPRC-III	M27240
btaPRL	AF426315
oarPRL	M27057
oarPL	AH006346
chiPRL	X76049
chiPL	Sakal y cols, 1998.

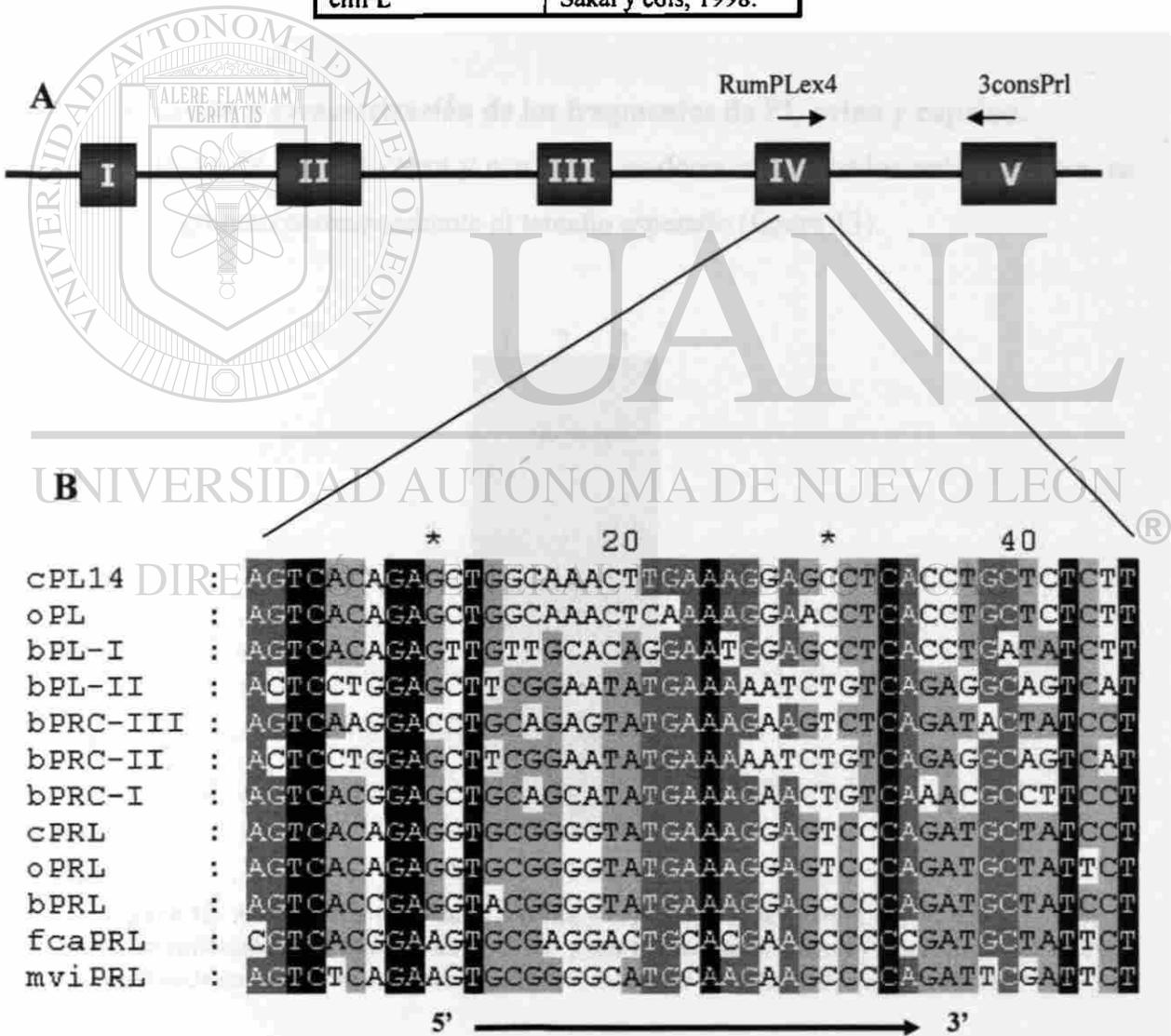


Figura 12: Diseño del iniciador RumPLex4. [A]: El esquema señala los lugares de apareamiento de los iniciadores para la amplificación de los PLs de rumiantes, ubicados hacia la zona central de los exones 4 (RumPLex4) y 5 (3consPrl). **[B]:** Alineamiento de secuencias codificantes para genes de la familia PRL/PL de rumiantes y carnívoros. La flecha indica la zona sobre la cual se diseñó el iniciador RumPLex4; nótese los dos últimos nucleótidos del extremo 3' (CC), presentes únicamente en la secuencia de los PLs.

El iniciador 3' (3consPrl) utilizado fue uno ya disponible en la oligoteca de la ULIEG, construido con base en las zonas más conservadas del exón 5 de los genes de la familia. La secuencia nucleotídica de los iniciadores fue la siguiente:

5'- CTG GCA ACC TTG AAW GGA ACC TCA CC -3' RumPLex4
 5'- TGC TTG AAT CCC TGC GTA GGC -3' 3consPrl

De esta manera, se pudo amplificar un fragmento del gen que comprendía la mitad del exón 4, todo el intrón 4 y la mitad del exón 5. Con base en la secuencia casi completa reportada para el gen de PL ovino, el tamaño esperado para tal fragmento era de 859 pb, incluyendo los iniciadores.

6.2.2 Amplificación y caracterización de los fragmentos de PL ovino y caprino.

A partir del DNAG de oveja y cabra y con los iniciadores mencionados anteriormente, se amplificó un fragmento correspondiente al tamaño esperado (figura 13).



Figura 13: Amplificación de los PLs ovino y caprino. Gel de agarosa al 1 % donde se ilustra la amplificación del fragmento de PL ovino y caprino con los iniciadores específicos. Se observa una banda única al nivel esperado. Carriles: 1, marcador ($\lambda + Pst$ I); 2, oveja; 3, cabra.

Con base en la secuencia del gen de PL ovino reportada en el GenBank, se eligió la enzima de restricción *Eco* RI para la caracterización enzimática de los PA. Al ser digeridos los PA, se obtuvieron los fragmentos esperados de 566 pb y 293 pb (figura 14).

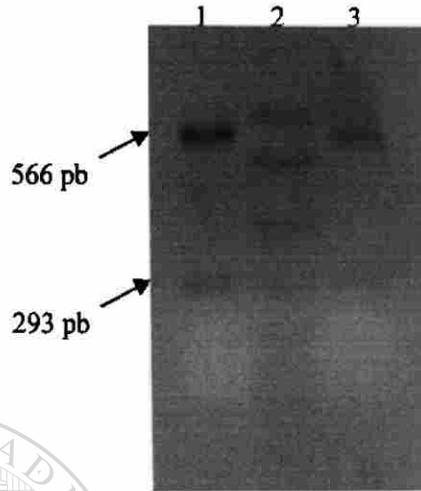


Figura 14: Caracterización enzimática de los PL ovino y caprino. Gel de agarosa al 2.5 % que ilustra la digestión de los PA de oveja y cabra cortados con *Eco* RI. Carriles: 1, oveja; 2, marcador (pUC + *Msp* I); 3, cabra.

6.2.3 Clonación del PL ovino.

Una vez caracterizado el PA correspondiente al PL ovino, se realizó una purificación del mismo y se clonó en el vector pCR-TOPO-XL, el cual posee una enzima topoisomerasa en cada uno de sus extremos para unir los productos amplificados que posean una adenina terminal. Se siguieron las instrucciones del estuche comercial y posteriormente se realizaron la transformación y los cultivos bacterianos correspondientes.

Las clonas que presentaron retraso electroforético con relación al plásmido control sin inserto, fueron seleccionadas y digeridas con las enzimas *Mlu* I y *Not* I, cuyos sitios de restricción en el plásmido flanquean la región de inserción del producto. De esta manera, el inserto liberado correspondió al tamaño del PA clonado más algunas bases pertenecientes a la región de policlonación del plásmido (figura 15). Dos de las clonas que mostraron este patrón electroforético fueron secuenciadas. La comparación de las secuencias obtenidas con la base de datos del GenBank arrojó una identidad del 100 % con el PL ovino.

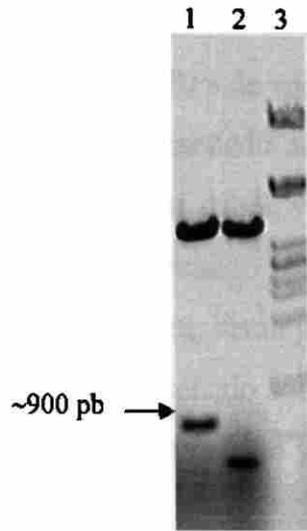


Figura 15: Clonas del PL ovino. Gel de agarosa al 1 % que ilustra la digestión de algunas clonas de PL ovino con *Mlu* I y *Not* I. Se libera un inserto con el tamaño esperado. Carriles: 1, clona oarPL8; 2, clona oarPL2; 3, marcador (λ + *Pst* I).

6.2.4 Análisis del inserto de PL ovino.

La determinación de la secuencia confirmó que el inserto abarca desde la mitad del exón 4 hasta la mitad del exón 5 (figura 16). Además, se pudo corroborar la existencia de dos sitios de restricción para las enzimas *Eco* RI y *Xba* I.

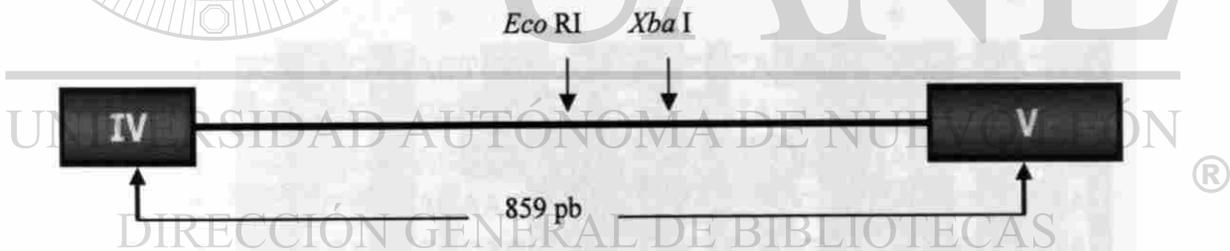


Figura 16: Análisis del inserto de PL ovino. Esquema representativo del inserto de la clona oarPL8, que corresponde al PL ovino, abarcando desde el exón IV hasta el exón V del gen. Se señalan los sitios de restricción analizados y extensión del inserto.

6.3 Obtención de las clonas relacionadas a PRL de gato.

6.3.1 Diseño de los iniciadores consenso PRL/PRP/PL

Se diseñaron tres iniciadores consenso (uno 5' y dos 3') mediante el alineamiento y comparación de las secuencias de los cDNAs de PRLs, PRPs y PLs disponibles en el GenBank pertenecientes a rumiantes y carnívoros, eligiendo zonas altamente conservadas en todos los miembros de la familia analizados (figura 17). Las zonas elegidas para tal fin fueron las siguientes:

- 5ConsPrl (iniciador 5'): diseñado en otro trabajo, se aparea sobre el segundo exón de los cDNA para PRL, PL y PRPs de vaca, oveja, cabra y gato.
- ConsPL2 (iniciador 5'): fue diseñado sobre el segundo exón de los cDNA para PRL, PRPs y PLs de vaca, oveja, cabra, visón y gato.
- ConsPL3 (iniciador 3'): fue diseñado sobre el tercer exón de los cDNA para PRL, PRPs y PLs de vaca, oveja, cabra, visón y gato.
- ConsPL5 (iniciador 3'): fue diseñado sobre el quinto exón de los cDNA para PRL, PRPs y PLs de vaca, oveja, cabra, visón y gato.

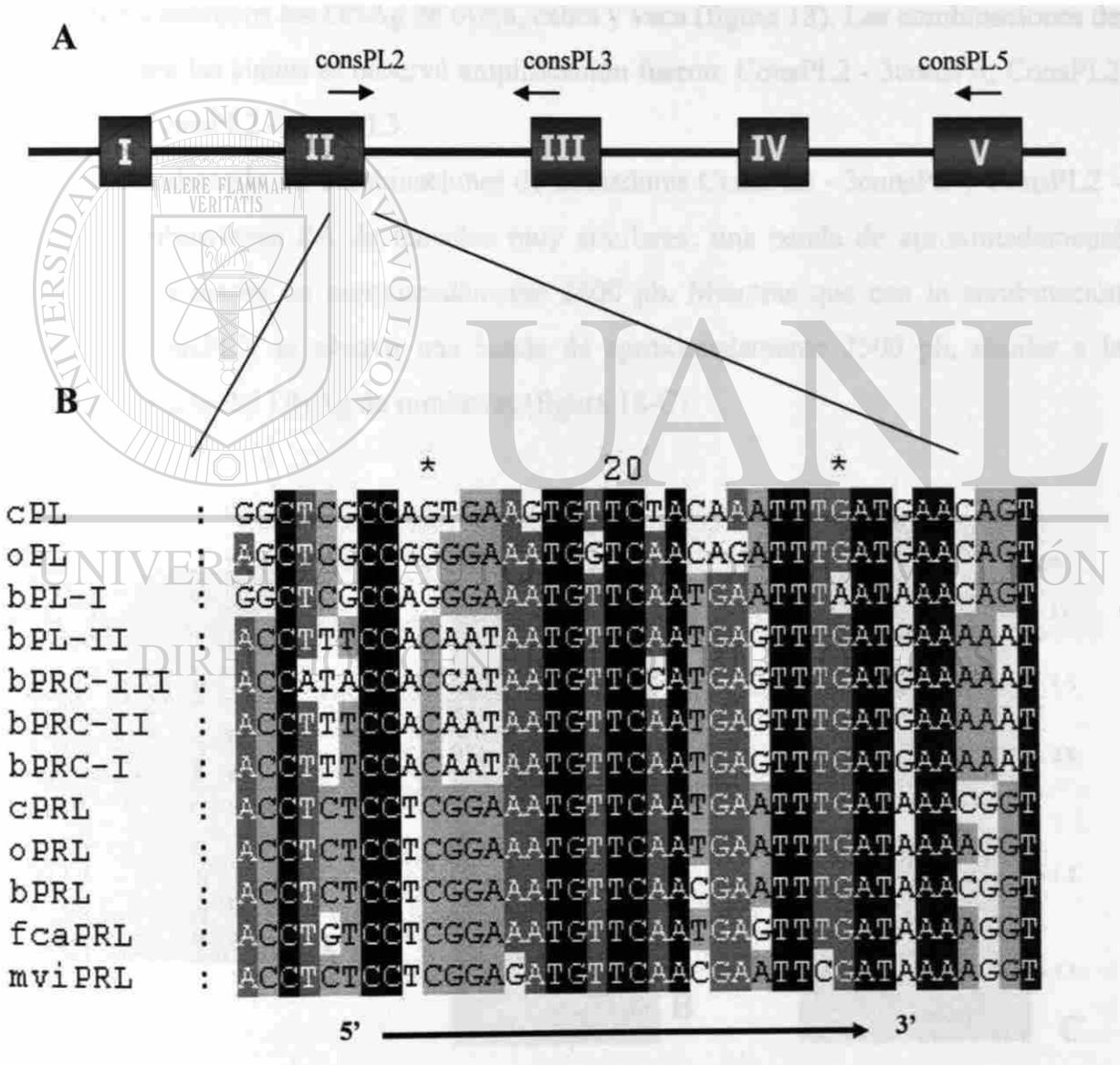


Figura 17: Diseño de los iniciadores consenso. [A]: Esquema que señala las zonas de apareamiento de los iniciadores consenso diseñados para la amplificación de los PRPs de gato y de rumiantes. [B]: Alineamiento de secuencias codificantes para genes de la familia PRL/PL de rumiantes y carnívoros. En este ejemplo, se indica la zona sobre la cual se diseñó el iniciador ConsPL2; nótese que los últimos nucleótidos del extremo 3' están presentes en la mayoría de las secuencias.

La secuencia de los iniciadores quedó como sigue:

5'- TGC TGT CAG ACC TGC TCY TGT G -3'	5consPrI
5'- GTC CTG GGA AAT GTT CAA TGA GTT TG -3'	ConsPL2
5'- AGG CGT GGG CAT ACC GTT YAT C -3'	ConsPL3
5'- ATA CTT GCG TAG GCA GTG GAG CAG -3'	ConsPL5

6.3.2 Amplificación de las secuencias relacionadas a PRL de gato.

A partir de DNAg de gato y con las condiciones de amplificación ya señaladas, se realizaron reacciones de PCR para la amplificación de los PRPs de gato. Se incluyeron como testigos positivos los DNAg de oveja, cabra y vaca (figura 18). Las combinaciones de iniciadores para las cuales se observó amplificación fueron: ConsPL2 - 3consPrI, ConsPL2 - ConsPL5 y ConsPL2 - ConsPL3.

En el gato y utilizando las combinaciones de iniciadores ConsPL2 - 3consPrI y ConsPL2 - ConsPL5 se obtuvieron PA de tamaños muy similares: una banda de aproximadamente 7500 pb y otra menor de aproximadamente 2400 pb. Mientras que con la combinación ConsPL2 - ConsPL3, se obtuvo una banda de aproximadamente 2500 pb, similar a la encontrada a partir del DNAg de rumiantes (figura 18-C).

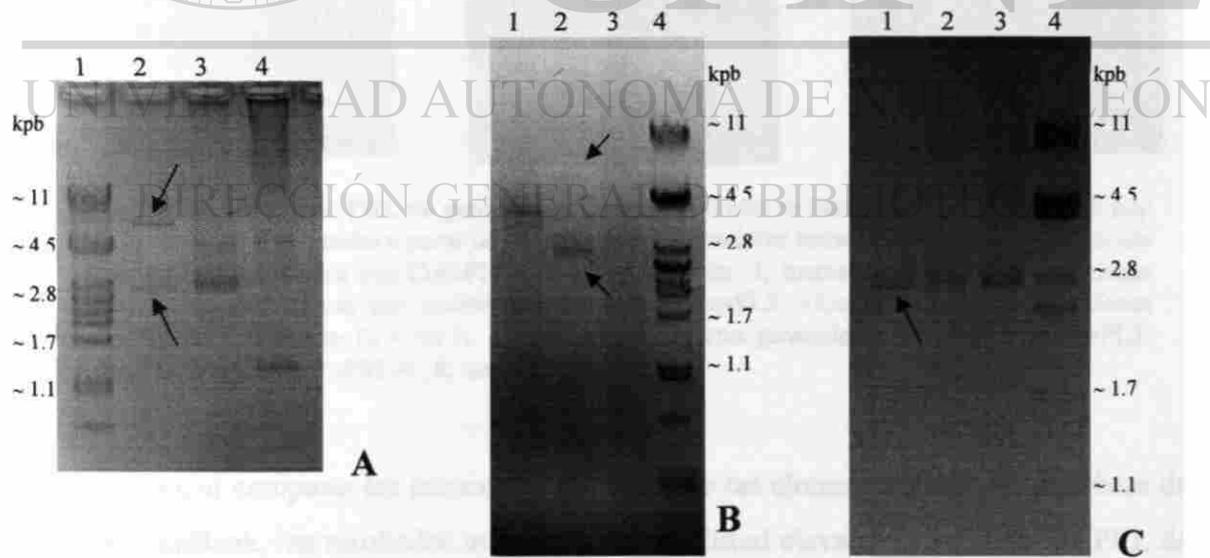


Figura 18: Amplificación de los PRPs con los iniciadores consenso. Geles de agarosa donde se ilustra la amplificación realizada con los iniciadores consenso a partir de DNAg de gato, oveja y cabra. [A]: ConsPL2 - 3consPrI; carriles: 1, marcador ($\lambda + Pst$ I); 2, gato; 3, oveja; 4, vaca. [B]: ConsPL2 - ConsPL5; carriles: 1, oveja; 2, gato; 3, vaca; 4, marcador ($\lambda + Pst$ I). [C]: ConsPL2 - ConsPL3; carriles: 1, gato; 2, oveja; 3, cabra; 4, marcador ($\lambda + Pst$ I). Los PA de gato están señalados con flechas; estos productos fueron purificados y clonados.

6.3.3 Clonación directa de los PA relacionados a PRL del gato.

Los PA obtenidos fueron purificados y clonados según el protocolo ya descrito. Las clonas obtenidas fueron digeridas con la enzima de restricción *Eco* RI para determinar el tamaño del inserto (figura 19). Aquellas clonas cuyo inserto correspondía al esperado (según la banda purificada) fueron caracterizadas y secuenciadas para determinar su relación con la familia multigénica.

Las clonas fueron analizadas mediante cortes con enzimas de restricción, tomando como patrón positivo de PRL la reamplificación del gen de PRL (obtenido en un primer paso con iniciadores específicos). De esta manera se pudo evidenciar que los patrones de las clonas correspondían al obtenido para la PRL de gato.

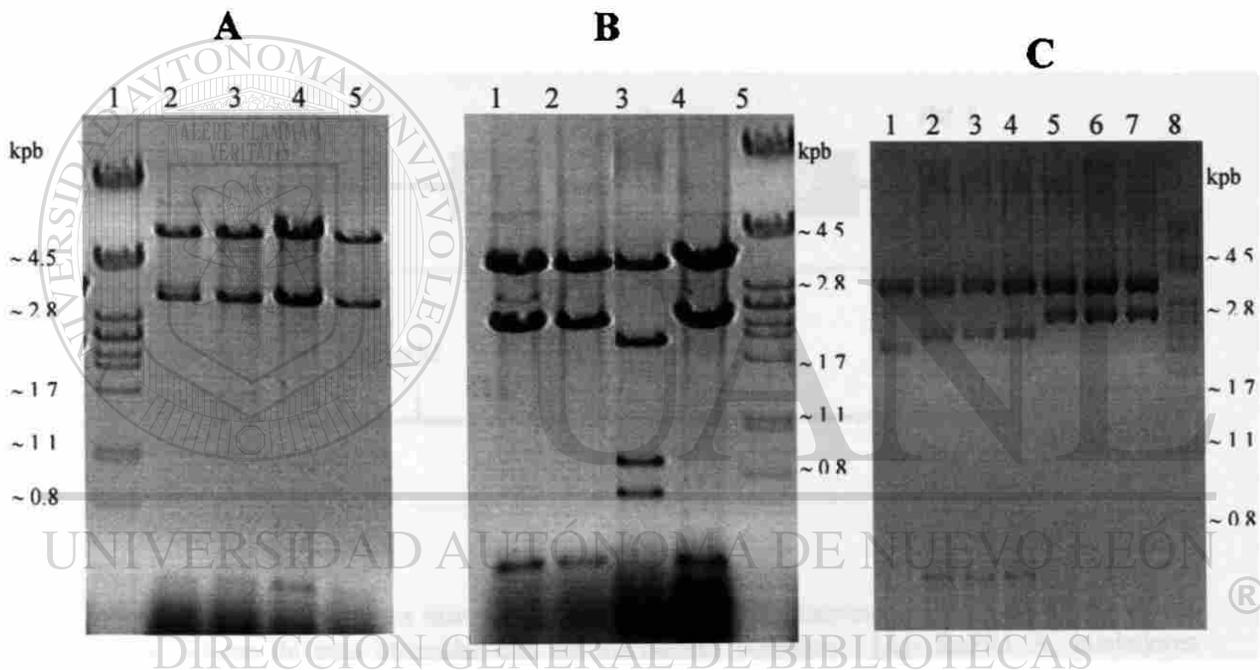


Figura 19: Clonas de PRL de gato. Geles de agarosa donde se ilustran las digestiones con *Eco* RI de las clonas obtenidas a partir de los PA con los iniciadores consenso en el gato. [A]: clonas con insertos generados con ConsPL2 – 3consPrI; carriles: 1, marcador ($\lambda + Pst$ I); 2-5 clonas fcaPRL-A. [B]: clonas con insertos generados con ConsPL2 – ConsPL5; carriles: 1-4, clonas fcaPRL-B; 5, marcador ($\lambda + Pst$ I). [C]: clonas con insertos generados con ConsPL2 – ConsPL3; carriles: 1-7, clonas fcaPRL-C; 8, marcador ($\lambda + Pst$ I).

Por otro lado, al comparar las secuencias obtenidas de las clonas analizadas con la base de datos del GenBank, los resultados mostraron una similitud elevada (>85 %) con la PRL de visón, para la cual se tiene reportada gran parte de las secuencias intrónicas que flanquean los exones. Así, los tres tipos de clonas obtenidas contenían un inserto correspondiente a PRL de gato (figura 20).

En ese momento, se determinó que las condiciones de PCR señaladas en la metodología para la obtención de PA relacionados a PRL, únicamente favorecían la amplificación de secuencias del gen de PRL y no de PRPs. Por tal motivo, se redujo la astringencia de la PCR aumentando el tiempo de alineamiento y la concentración de los iniciadores, y disminuyendo la temperatura de alineamiento; las concentraciones finales del resto de los reactivos se mantuvieron sin cambios.

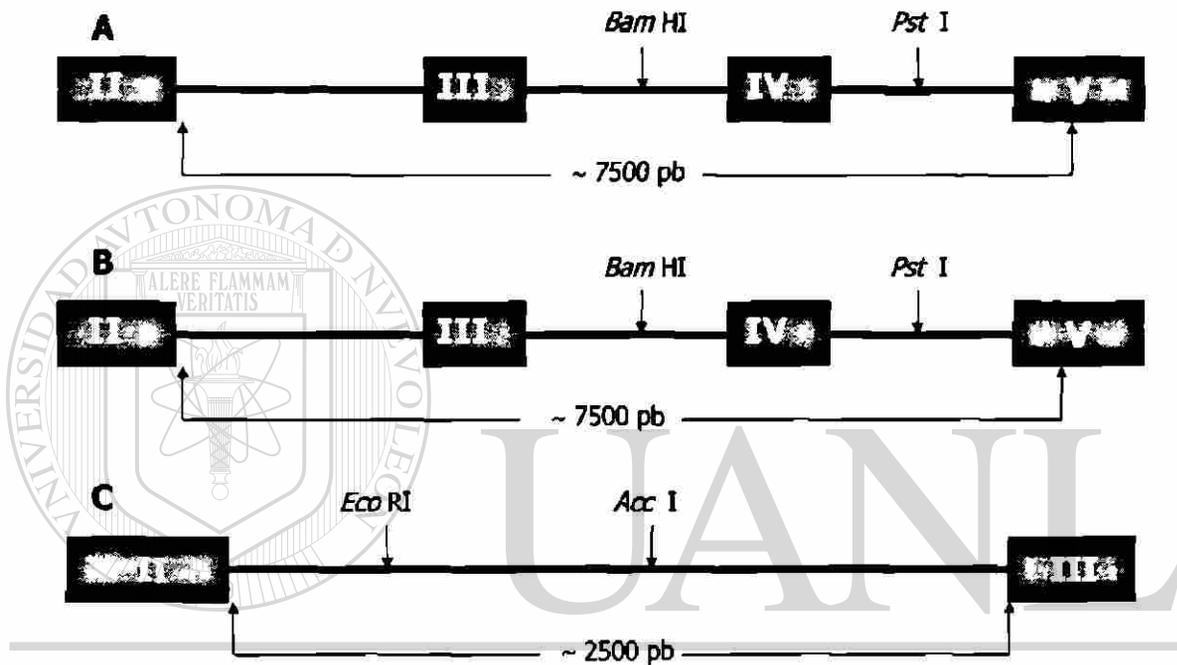


Figura 20: Análisis de los insertos de las clonas fcaPRL. Esquema representativo del inserto de las clonas de gato obtenidas con los iniciadores consenso. [A]: fcaPRL-A; iniciadores ConsPL2 - 3consPrl. [B]: fcaPRL-B; iniciadores ConsPL2 - ConsPL5. [C]: fcaPRL-C; iniciadores ConsPL2 - ConsPL3. Los tres grupos corresponden a fragmentos del gen de PRL. Se señalan los sitios de restricción analizados y la extensión aproximada del inserto.

6.3.4 Hibridación inversa de los PA obtenidos en condiciones relajadas.

Debido a la alta inespecificidad que se presentó por el relajamiento de las condiciones de PCR mencionadas anteriormente (figura 21), se realizó una hibridación inversa de estos PA inespecíficos contra una sonda de PL ovino fijada en una membrana de nylon. La finalidad de este procedimiento fue colectar aquellos productos que presentaran hibridación con la sonda y eliminar aquellos debidos a la inespecificidad de la reacción. A la par, esta técnica

permitió eliminar los PA del gen de PRL que hubieran sido amplificados. Las combinaciones de iniciadores que fueron ensayadas fueron: ConsPL2 - 3consPrl y ConsPL2 - ConsPL5. Paralelamente, se amplificaron DNAg de gato y DNAg de león como patrón de comparación.

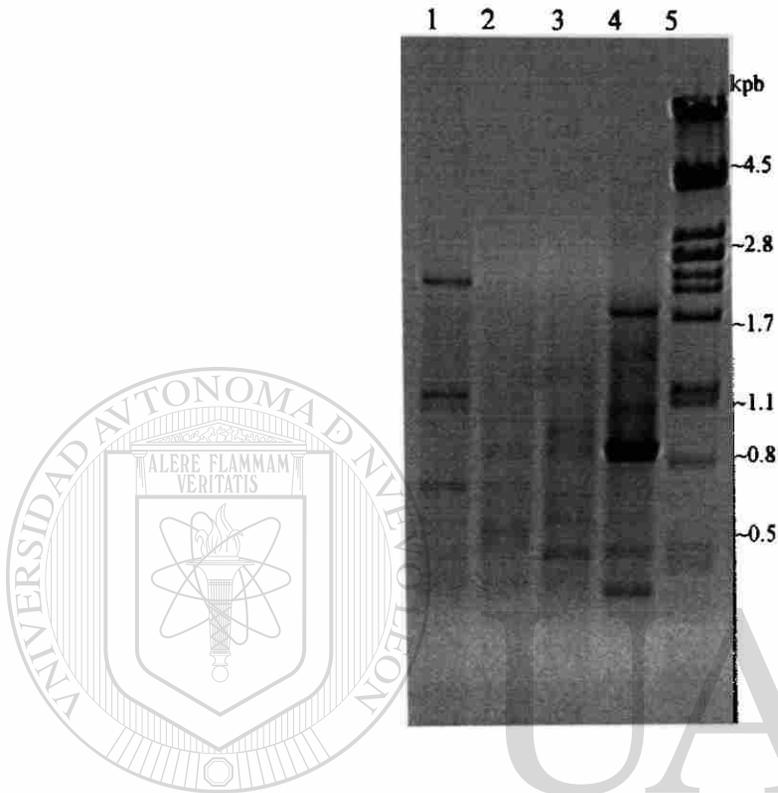


Figura 21: Amplificación de PRPs en condiciones relajadas. Gel de agarosa de los PA obtenidos en condiciones relajadas de amplificación con los iniciadores consenso. Puede observarse la presencia de múltiples bandas. Carriles: 1, DNAg de gato ConsPL2 - 3consPrl; 2, DNAg león ConsPL2 - 3consPrl; 3, DNAg de gato ConsPL2 - ConsPL5; 4, DNAg de león ConsPL2 - ConsPL5; 5, marcador ($\lambda + Pst$ I).

6.3.5 Reamplificación de los PA eluidos de la hibridación inversa.

Los productos obtenidos en el apartado anterior fueron hibridados contra una sonda de PL ovino fijada en una membrana de nylon, según se detalla en la metodología. Una vez terminada la hibridación, los productos del eluido final fueron reamplificados con los mismos iniciadores consenso utilizados para la generación del PA inicial respectivo. No obstante, la PCR se llevó a cabo en condiciones de alta astringencia con la finalidad de eliminar la reamplificación de productos inespecíficos. Se incluyeron también, testigos de la reacción que incluían únicamente uno de los iniciadores (figura 22).

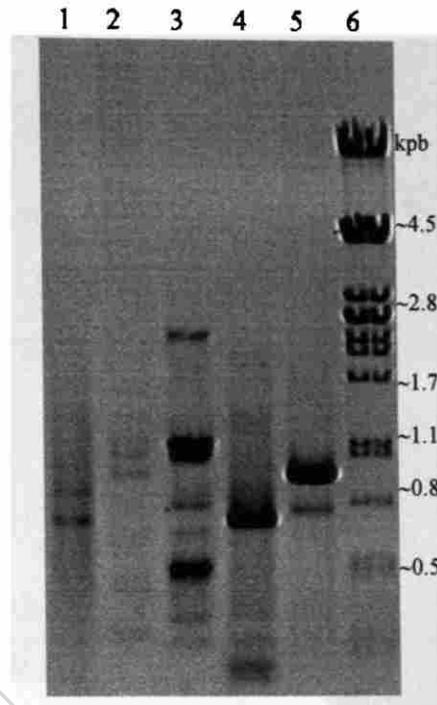


Figura 22: Reamplificación de los PA post-hibridación. Gel de agarosa de los PA obtenidos de la reamplificación con alta astringencia de los productos del eluido post-hibridación inversa. La reamplificación se realizó con los PA obtenidos a partir de los iniciadores ConsPL2 - 3consPrl. Carriles: 1, ConsPL2 - 3consPrl; 2, ConsPL2; 3, 3consPrl; 4, ConsPL2 - ConsPL5; 5, ConsPL5; 6, marcador (λ + *Pst* I).

6.3.6 Identificación del producto reamplificado relacionado a PRL.

Debido a que resultó imposible evitar la generación de productos inespecíficos en la PCR aún en condiciones de alta astringencia, se realizó una hibridación radiactiva del gel con los productos reamplificados, utilizando como sonda el PL de ovino marcado. De esta manera, se pudo evidenciar la banda de hibridación que correspondía a la secuencia relacionada a PRL y también calcular el tamaño aproximado de la misma (figura 23). Conociendo estos datos, se procedió a purificar y clonar la banda de interés.

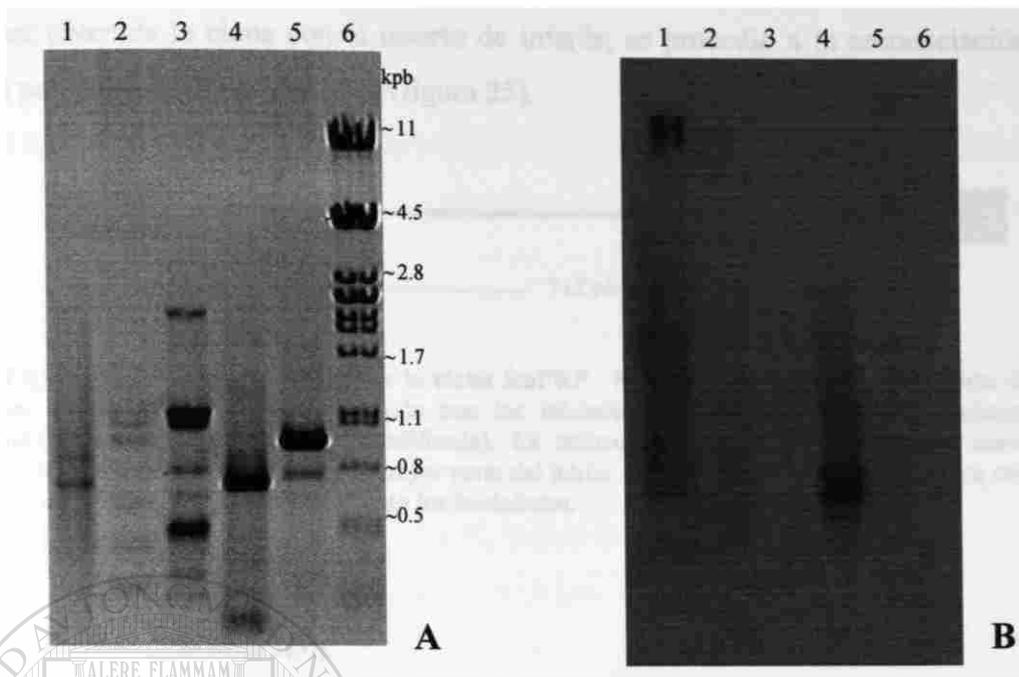


Figura 23: Hibridación de los productos reamplificados. Gel y autorradiografía que evidencian la banda de hibridación correspondiente al producto reamplificado relacionado a PRL. Se utilizó PL ovino como sonda marcada. [A]: (ver figura 21). [B]: Autorradiografía del gel A en la cual puede apreciarse una banda con señal fuerte de aproximadamente 700-800 pb presente en el carril 4.

6.3.7 Clonación del producto reamplificado relacionado a PRL.

El producto reamplificado que mostró señal en la autorradiografía fue purificado a partir del gel y clonado en el vector pCR-TOPO. El inserto fue generado con los iniciadores ConsPL2 - ConsPL5 y el tamaño esperado para el mismo fue de aproximadamente 700 pb (figura 24).

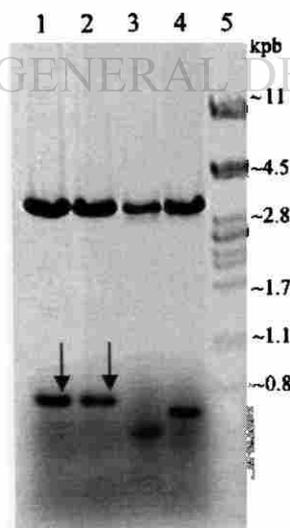


Figura 24: Clonas de PRP de gato. Gel de agarosa donde se ilustra las digestiones con *Eco* RI de las clonas obtenidas a partir del producto reamplificado que mostró señal de hibridación con la sonda de PL ovino marcada. Señalados con flecha los insertos con el tamaño esperado (~700 pb). Carriles: 1-4, clonas fcaPRP; 5, marcador (λ + *Pst* I).

Una vez obtenida la clona con el inserto de interés, se procedió a la secuenciación de la misma para corroborar su identidad (figura 25).

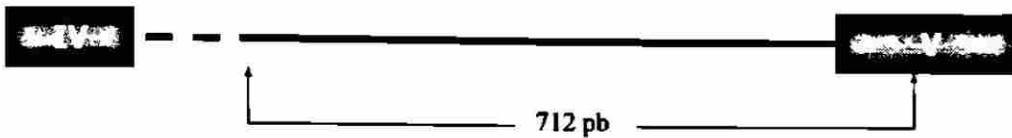


Figura 25: Análisis del inserto de la clona fcaPRP. Esquema representativo del inserto de las clonas fcaPRP de gato obtenido con los iniciadores ConsPL2 - ConsPL5, mediante hibridación inversa (estrategia modificada). La secuenciación permitió identificarlo como relacionado a PRL. Comprende la mayor parte del intrón 4 y la mitad del exón 5. Se indica con número la longitud exacta incluyendo los iniciadores.

6.4 Hibridación tipo Southern.

6.4.1 Obtención de la sonda de PRP de gato.

Se realizó PCR de la clona fcaPRP para obtener un PA que sirvió como sonda durante la hibridación tipo Southern. Utilizando las condiciones señaladas en la metodología, se obtuvo un PA único con el tamaño esperado de 712 pb (figura 26), el cual fue reamplificado, purificado y marcado con radiactividad.

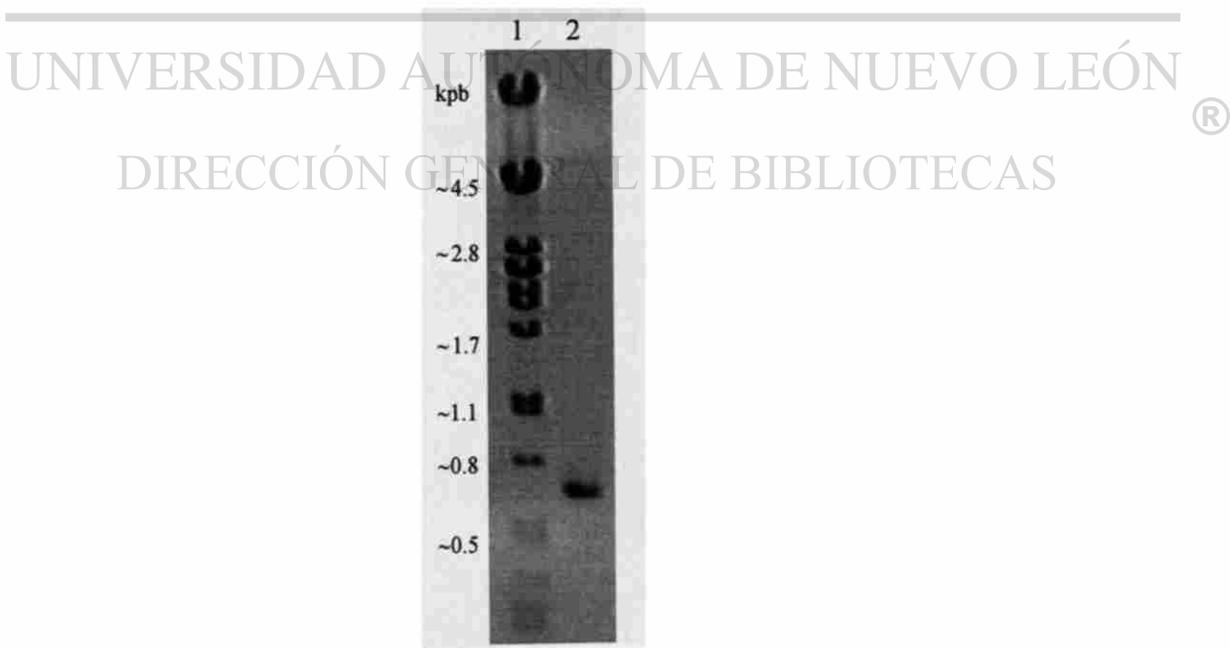


Figura 26: Amplificación de la sonda de PRP de gato. Gel de agarosa al 1 % que ilustra la banda única de amplificación (flecha) obtenida a partir de la clona fcaPRP y los iniciadores ConsPL2 - ConsPL5, la cual fue utilizada como sonda para la hibridación tipo Southern del DNAg de gato. Carriles: 1, marcador ($\lambda + Pst$ I); 2, PA PRP de gato.

6.4.2 Hibridación del gel tipo Southern.

Una vez realizada la hibridación, se midió con el contador Geiger la radiactividad residual del gel para determinar el tiempo de exposición de la película. Debido a que la señal del testigo positivo de hibridación (PA de PRP de gato) era excesivamente fuerte, se decidió realizar un corte a nivel de esta banda con la finalidad de evitar la interferencia con la señal de las bandas en el carril del DNAg. El PA testigo de PRL de gato mostró una señal relativamente baja por lo que se expuso a la par con el DNAg. La película fue expuesta con el gel durante 30 días, al término de los cuales fue revelada y fotodocumentada. Se observaron dos bandas relativamente cercanas entre sí, cuya longitud aproximada se encontraba entre las 400-500 pb. La banda más pequeña presentaba una señal más fuerte (más o menos el doble) que la banda superior (figura 27).



Figura 27: Hibridación tipo Southern. Autorradiografía del gel de hibridación tipo Southern realizada con DNAg de gato digerido con *Bam* HI e hibridado con sonda marcada de PRP de gato. Se observa la presencia de dos zonas de hibridación, la más baja muestra claramente una señal más fuerte que la superior (flechas). Carriles: 1, DNAg de gato; 2, clon de fcaPRL-B sin digerir (testigo de PRL).

6.5 Clonación de los PA de la familia PRL/PL de rumiantes.

Los PA obtenidos partir de DNAg de oveja y cabra (ref. sección 6.3.2) fueron clonados mediante los procedimientos ya descritos. La clonación se realizó directamente a partir de los productos de PCR obtenidos (ref. figura 18). Las clonas obtenidas fueron digeridas con diversas combinaciones de enzimas de restricción con la finalidad de liberar el inserto y determinar el tamaño aproximado de los mismos (figura 28).

Las clonas que presentaban un tamaño de inserto correspondiente al paquete de bandas observadas a nivel de aproximadamente 4500-5000 pb, fueron seleccionadas y caracterizadas mediante secuenciación. De las clonas secuenciadas, tres de ellas (dos de cabra y una de oveja) pertenecieron a secuencias relacionadas a la familia PRL/PL. Los insertos abarcaban desde el inicio del intrón 2 hasta el exón 5 (figura 29). La comparación con el banco de datos del GenBank, mostró alta similitud de las secuencias de cabra con el PRP bovino y de la secuencias de oveja con la PRL bovina. La tabla 9 resume el número e identidad de todas las clonas obtenidas durante la realización de este trabajo.

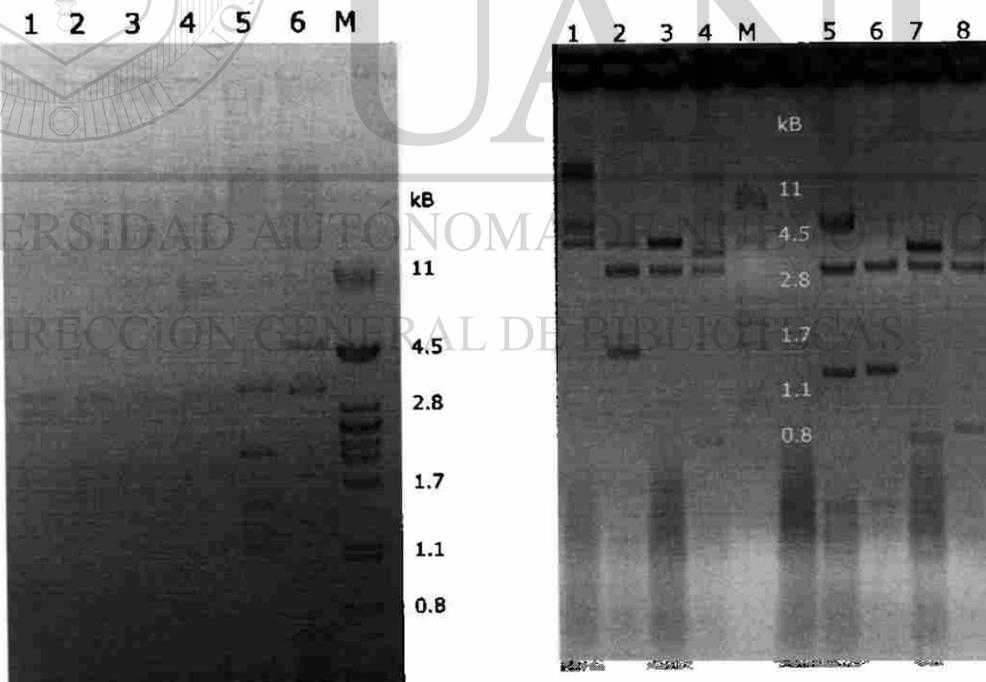


Figura 28: Clonas de PRPs de oveja y cabra. Geles de agarosa de las clonas de PRPs obtenidas a partir de DNAg de oveja y cabra y los iniciadores consenso. [A]: Clonas de oveja. Carriles: 1-2, oarPRL5 (digerida con *Eco* RI/*Acc* I y *Bam* HI/*Not* I, respectivamente); 3-4, oarPRL22 (digerida con *Eco* RI/*Acc* I y *Bam* HI/*Not* I, respectivamente); 5-6, oarPRL36 (digerida con *Eco* RI/*Acc* I y *Bam* HI/*Not* I, respectivamente). [B]: Clonas de cabra. Carriles: 1 y 5, chiPRP7; 2 y 6, chiPRP66; 3 y 7, chiPRP106; 4 y 8, chiPRP120. 1-4, digeridas con *Eco* RI; 5-8, digeridas con *Bam* HI/*Xba* I. M, marcador (λ + *Pst* I).

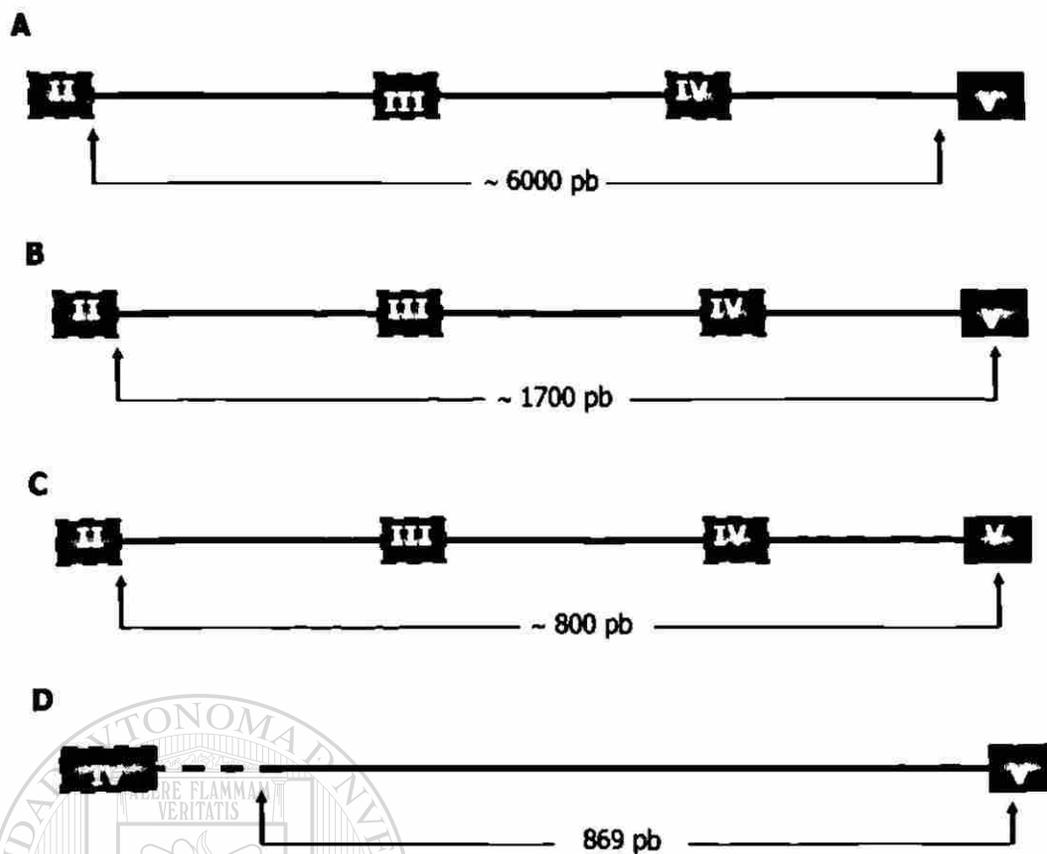


Figura 29: Análisis de los insertos de las clonas de oveja y cabra. Esquema representativo del inserto de las clonas de rumiantes obtenidos con los iniciadores consenso. [A]: oarPRL5; iniciadores ConsPL2 - ConsPL5. [B]: chiPRP66; iniciadores ConsPL2 - 3consPrI. [C]: chiPRP106; iniciadores ConsPL2 - 3ConsPrI. [D]: chiPRP120; iniciadores ConsPL2 - 3consPrI. Se señala la extensión aproximada del inserto.

Tabla 9: Clonas de genes relacionados a la familia PRL/PL obtenidas.

CLONA	PRIMERS	EXTENSIÓN*	GENOMA
fcaPRP1	consPL2 3consPrI		Gato
fcaPRL-A7	consPL2 3consPrI		Gato
fcaPRL-B8	consPL2 consPL5		Gato
fcaPRL-C4	consPL2 consPL3		Gato
chiPRP66	consPL2 3consPrI		Cabra
chiPRP106	consPL2 3consPrI		Cabra
chiPRP120	consPL2 3consPrI		Cabra
oarPRL5	consPL2 consPL5		Oveja
oarPL8	RumPLex4 3consPrI		Oveja

* Las flechas indican la zona de apareamiento de los iniciadores dentro de la estructura del gen hipotético ancestral.

6.6 Análisis filogenético de los productos obtenidos.

6.6.1 Alineamiento nucleotídico de los extremos 3'.

Todas las clonas obtenidas fueron secuenciadas, obteniéndose para algunas de ellas la secuencia total del inserto. Se eligió el extremo 3' como zona de comparación debido a que la clona obtenida de PRP de gato solamente comprendía una parte de intrón 4 y la parte inicial del exón 5. El alineamiento de las secuencias evidenció diversas zonas consenso dentro del exón, mientras que en el intrón, las zonas consenso fueron más esporádicas. Pudieron observarse también cambios nucleotídicos importantes en el exón de la secuencia del PRP de gato, que no fueron observados en las demás secuencias (figura 30).

6.6.2 Reconstrucción de los árboles filogenéticos de las secuencias nucleotídicas.

Se realizó la reconstrucción de un árbol filogenético con respecto a las secuencias nucleotídicas de los genes analizados. Fue posible observar el agrupamiento de las PRLs y de los PRPs por separado, así como la inclusión del PRP de gato junto con las PRP de rumiantes y no con las PRL de carnívoros, lo que indica claramente que se trata de una secuencia diferente a la PRL de gato. Fue incluida la secuencia de PRL de pollo como grupo externo. Como se indica en la figura 31-A, los valores de *bootstrap* altos no permiten suponer ambigüedades en la topología del árbol.

Con la finalidad de tener un panorama más amplio de las relaciones filogenéticas con otros órdenes de mamíferos, se realizó la reconstrucción de un árbol que incluyó únicamente los fragmentos del exón 5 correspondientes a los genes de la familia PRL/PL/PLF disponibles en el GenBank para rumiantes, roedores, perisodáctilos y carnívoros. Una vez más, utilizando la PRL de pollo como grupo fuera, se observó que las PRLs de carnívoros y perisodáctilos quedaron muy asociados a la secuencia ancestral, mientras que las PRPs de rumiantes y roedores tuvieron una evolución más rápida (Wallis y Wallis, 2002). Para ambos órdenes, tanto los PLs como las PRPs derivan de sus respectivos genes de PRLs. En el caso de los rumiantes la mayoría de los PLs se agruparon en una ramificación mientras que las PRPs en otra. Claramente pudo observarse la inclusión del PRP de gato en el mismo grupo que los PRPs de rumiantes. Cabe señalar el agrupamiento de los PLs de rumiantes con las PRLs y no con los PRPs del mismo orden, con la única excepción del PL-II bovino, el cual se agrupa con las PRPs (figura 31-B).

chiPRP106 : GCATGGAAGTGG--AAGGAAGAAAAGAGAAAGTTAAAACCTAACCT-----TGACTTATG
 chiPRP120 : GCATGGAAGTGG--AAGGAAGAAAAGAGAAAGTTAAAACCTAACCT-----TGACTTATG
 chiPRP66 : GCATGAGAGTGG-GAAGGAAGAAAAGAGAAAGTTAAAACCTAACCT-----TGAGTTATG
 btaPRC-I : GCAAGCAAGAGG-GAAGGAAGAAAAGAGAAAGTTAAAACCTGATCT-----TGAGTTCCA
 fcaPRP1 : GCATGAGAGGGG-GAAGGAAGAAAAGAGAAATTTAAAACCTAGACT-----GEAGTTA-G
 oarPL : GCATGAGAGTGG-AAAGGAAGGAAAGATAAAGTCAAACCAAACCTCGTACTTGAGTTCTG
 btaPRL : GCATGAGAAATGA-GAAGCAAAGAAAAGAGAAGATCAAACCAAACCTACTTGAGTTCTG
 oarPRL5 : GCATGAGAGTGACGGAAAGAAAAGAGAAAGTCAAACCAAACCTAATACTTGAATTCTG
 fcaPRL7 : GCTTCATCTGTGATCACATCCATGTTAGAAACCTACATC-----TGAATTGCG
 mviPRL : ACCTCATC-----ACCTACACATTAGGACACTCACACC-----TGAACCCTG
 ggaPRL : GCTTAGAAATTTTAAGCAAAATAAACTGAAATATCTGGTGAAATTT--CATTCAAATCTG

chiPRP106 : TTTCTACTTTTTA-----GATTCCTAATAGTTTCTCATAGGCTGGCTCCAAAA-----
 chiPRP120 : TTTCTACTTTTTA-----GATTCCTAATAGTTTCTCATAGGCTGGCTCCAAAA-----
 chiPRP66 : TTTCTACTTTTTA-----GATTACTAATAGTTTCTCATAGGCTGGCTCCAAAA-----
 btaPRC-I : TTTTACTTTTTA-----GATTTTAAATAGTTTCTCATAGGCTGGCTCCAAAA-----
 fcaPRP1 : TATCTACTTTTTCA-----GATTTCTAATAGTTTCTCATAGGCTGGCTCCAAAA-----
 oarPL : CTTCTTGATTTTTA-----GATTGCTAACAGATTTTCCATACACTGGCTCCAAAA-----
 btaPRL : CTTT-AGTTTTTATTAATAAATTAACATAATATCTGATACACTGGCTCCAAAA-----
 oarPRL5 : CTTTTAGTTTTTATTAATAAATTAACATAATATCTGATACACTAACTCTGAAA-----
 fcaPRL7 : CTTCTACTGCTCA-----GGCTATTAACAGACTCT-GATACACAGCTCAGTACTCTAC
 mviPRL : CTTCTACTTTTTA-----GACTACGAATAGATTCAGATACACTTGTCTAATAACCCAT
 ggaPRL : TTTGATGGTCTAAA-----GAACTCTTGCAGAACAAAAGGGAGACATAACAGGAA-----

chiPRP106 : -TTCATATCTAGAGAGTTTT-ATATTGGTGTGCTTCCCCAAA-TCTTAATTTGATAATT
 chiPRP120 : -TTCATATCTAGAGAGTTTT-ATATTGGTGTGCTTCCCCAAA-TCTTAATTTGATAATT
 chiPRP66 : -TCCATATCTAGATAGTTTT-ATATTCATATGTCATCCCCAAA-TCTTAATTTGATAATT
 btaPRC-I : -TCCATATCTAGAGAGTTTT-ATAGTCATATGTCCTTCCCCAAA-TCTTTATTTGATAATT
 fcaPRP1 : -TCCATAGAGAGAGAGTTTT-ATATTCATATGTCCTTCCCCAAA-TCTTTGTTTGATAATT
 oarPL : -TCCATGCTAGAGAGTTTT-ATAA-----GTCTTCCCCAA--TCTTAATTTGATAATA
 btaPRL : -TCCAAGTGTAGAGACTTTT-ATGT-----ATCTTCCCTAAT-TTTTAATTTGATAAAT
 oarPRL5 : -TCCAAGTGTAGACTCTTTT-CNGT-----ATCTTCCCCAAT-TACTAATTTGATAAAT
 fcaPRL7 : CCCTCCCTCTAGAGAGCATTGACGCTCATGCCTCTTCCCCAAA-TCTTCGTTTGACAATG
 mviPRL : GCCTCTGCTAGAGAGCTTT-ATGTCCAGGCCTETTCCCCAAA-TCTTAATTTGACAATT
 ggaPRL : -ACACTTTACAAGCTGTACCACTACTGACTAGTGTTCCTCAAGGTCAATATTTCTTAATT

chiPRP106 : AGAAGCAAAAAACATAAGCGAATACTAATAAAG-CACAGAAAAGTCATTATCTTTTGGG
 chiPRP120 : AGAAGCAAAAAACATAAGCGAATACTAATAAAG-CACAGAAAAGTCATTATCTTTTGGG
 chiPRP66 : AGAAGGAACAAAGATAAGCAAATCTAATAAAA-CACATAAGAAGTC-TTATCTTTTGGG
 btaPRC-I : AGAAGCAAAAAAGATAAGCAAATTTAATAAAA-TGCATAAGAAGTCATTATCATTGGG
 fcaPRP1 : AGAAGAACA AAAAGATAAGCAAATACTAGTAAAA-CGCATAAGAAGTCATTATCATTGGG
 oarPL : AGAGGGAACAAGAGAGCAAATACTAATAAAA-CTCATAA-AATTCAATTCTTTTGGG
 btaPRL : AGAAAGAACAAGATGAGCTAATACTACTAAAA-CTCATAAATAACTCATTATCTTTTGGG
 oarPRL5 : AGAAAGAACAAGATGAGCAAATACTACTAAAA-CTCATAACAATTCATTATCTTTTGGG
 fcaPRL7 : GGAAGGAACGCAGACAAGCGACTACTAGTAATA-CT-----AAGTTGCTATCTTTTGGG
 mviPRL : AGCAGGAACCAAGATACCCACAAACGAGTAATG-CT-----AAGTCACTATCTTTTGGG
 ggaPRL : CTCTETTCTACCCAGACAGAT-TGACTATCATCTCTTACTGTATGATTATGCTCTC---

```

chiPRP106 : TATTCAGATTATTTTCCAGTAAGGTGGAAGATGTACAAGGCTTGCATTTACTGGTCAGG
chiPRP120 : TATTCAGATTATTTTCCAGTAAGGTGGAAGATGTACAAGGCTTGCATTTACTGGTCAGG
chiPRP66  : TGTTCAGATGATTATTCAGCAATGCAGAAGATGTTGGACGCTCATATTTACTGGTCAGG
btaPRC-I  : TATTCAGATTATTTGTTCCAGTCTTGAATACGATGATCCAGGCTCGCAGTAGCTGGACAGG
fcaPRP1   : TATTTAGATTATTTGCTCCGCCATGAAGATGATTCGCAATGCTCCAGAGTCTGGTCAGA
oarPL     : TGCTTAGAT--TCATCCTGG-----AGAGAAGAACCAGCCCTATCCAGTGTGGTCAGA
btaPRL    : TGTTTAGGG-GTTATTCTCGAGCCAAAGAGAC---TGACCCCTACCCCTGTGTGGTCAGG
oarPRL5   : TGCTTAG---GTTATTCTCGAGCCAAAGAGAC---TGACCCCTACCCCTGTGTGGTCAGG
fcaPRL7   : TGACTAGGT--TCATCCCAGTCCAGAGAAAAC----CAGCTCTACTCCGTCTGGTCAGG
mviPRL    : CGATTAGGT--TCATCCTCGAGTCCAGAGAAAAC----GAGGTTTACTCCGTCTGGTCAGG
ggaPRL    : --TCTAGGT--TCATTCTGCTGATGCTGGAAAT----GAAATTTACTCTCACTGGGACGG
    
```



```

chiPRP106 : ACTCCCATCCCTGATGTCCAGAGATGAAGATGTGAGTCATTCTGCATTTGATTAACCTGT
chiPRP120 : ACTCCCATCCCTGATGTCCAGAGATGAAGATGTGAGTCATTCTGCATTTGATTAACCTGT
chiPRP66  : ACTCCCATCCCTGATGTCCAGCGATGAAGATGTGGTCATTCTGAATTTTAT-AACCTGT
btaPRC-I  : ACTCCCATCCCTAATGTCCAGCGATGAAGATAGGGCTCATTCTGGAATTTTAT-AACCTGT
fcaPRP1   : TGTCGGATATGTEAAGTCCAGTGAAGATAGGGCTCATTCTGAATTTGAT-AACCTGC
oarPL     : ACAGTCTCCTCCCTCACATCACAGGATGAGAATGTGGCCGAGTTGCTTTTTAT-AGACTGT
btaPRL    : ACTCCCGTCCCTGCAAACTAAGGATGAAGATGCAGTTATTCTGCTTTTTAT-AACCTGC
oarPRL5   : ACTCCCATCCCTGCAAACTAAGGATGAAGATGCAGTCATTCTGCTTTTTAC-AACCTGC
fcaPRL7   : ACTCCCGTCCCTGCAGATGGCTGATGAAGACTCTCCCTCTTTGCTTTTTAT-AACCTGC
mviPRL    : ACTTCCATCTCTGCAGATGGCTGATGAAGACTCACGCCTTTTTGCTTTTTAT-AACCTGC
ggaPRL    : CCTTCCATCCCTGCAACTCGCTGATGAGGACTCCAGACTCTTTGCTTTTTAT-AACCTGC
    
```

```

chiPRP106 : TCAAA-TGCCT-ACGCAGGGATTCAAGCA
chiPRP120 : TCAAA-TGCCT-ACGCAGGGATTCAAGCA
chiPRP66  : TCAAC-TGCCT-ACGCAGGGATTCAAGCA
btaPRC-I  : TCTAC-TGCCT-GCGCAGGGATTCAAGCA
fcaPRP1   : TCCAC-TGCCT-ACGCAAGTAT-----
oarPL     : TCCAC-TGCCT-ACACAGGGATTCAAGTA
btaPRL    : TCCAC-TGCCT-GCGCAGGGATTCAAGCA
oarPRL5   : TCCACGTGCCTTACGCAAGTAT-----
fcaPRL7   : TCCAC-TGCCT-ACGCAGGGATTCAAGCA
mviPRL    : TCCAC-TGCCT-ACGCAGGGATTCA----
ggaPRL    : TGCAT-TGCCT-CGCAGAGATTCCACAA
    
```

Figura 30: Alineamiento nucleotídico de las secuencias obtenidas. Alineamiento de los extremos 3' (intrón 4 - exón 5) de las secuencias relacionadas a PRL obtenidas a partir de gato, cabra y oveja. La flecha indica el inicio del exón 5. Se utilizó el programa GeneDoc.

... secuencias relacionadas a PRL obtenidas a partir de gato, cabra y oveja. La flecha indica el inicio del exón 5. Se utilizó el programa GeneDoc.

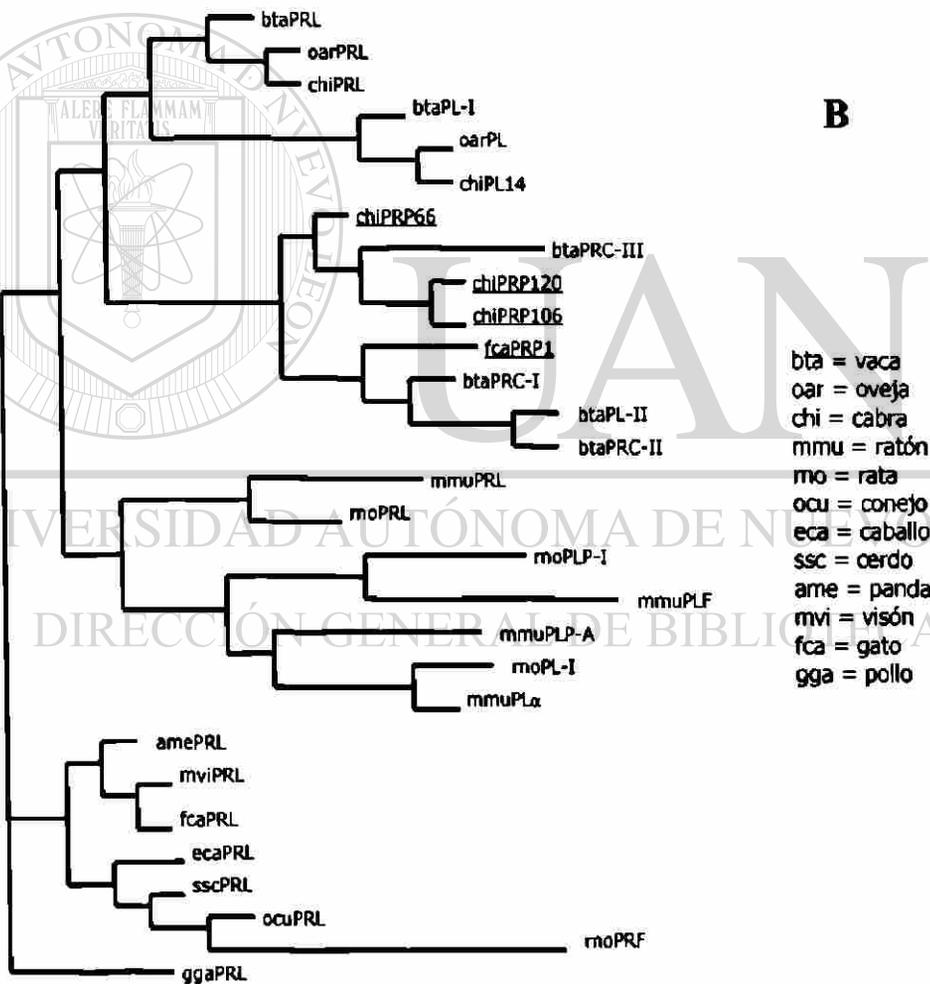
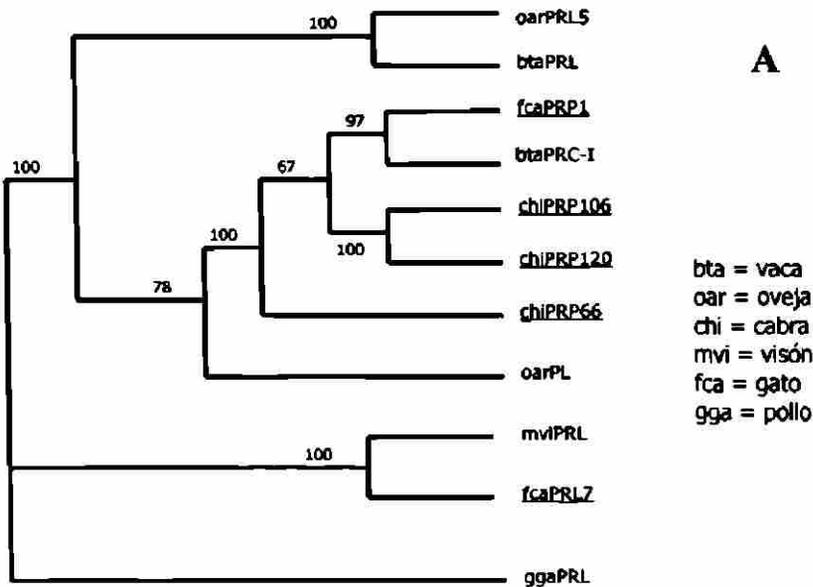


Figura 31: Árboles filogenéticos de las secuencias nucleotídicas. Reconstrucción de los árboles filogenéticos a partir de las secuencias nucleotídicas de los extremos 3' de los genes obtenidos. [A]: Árbol generado a partir de las secuencias del extremo 3' (intrón 4 - exón 5); se incluyen los valores de *bootstrap* en cada rama correspondiente. [B]: Árbol generado a partir de las secuencias de la mitad inicial del exón 5 de cada uno de los genes. Se incluyeron más órdenes de comparación. Se muestra en letra gris las clonas obtenidas en este trabajo, subrayada la clona de PRP de gato. Fue utilizado el programa de máxima parsimonia del paquete PHYLIP.

6.6.3 Alineamiento aminoacídico de los exones 5.

Una vez hallado el marco de lectura correcto para las secuencias del fragmento del exón 5 de cada una de las clonas obtenidas, se realizó el alineamiento aminoacídico de las mismas, incluyendo solamente las secuencias de los genes de la familia para rumiantes y carnívoros. Se pudieron comparar alrededor de 40 aminoácidos para cada gen, observándose zonas muy conservadas en todas las secuencias y otras específicas para PRLs y para PRPs. También se evidenciaron cambios aminoacídicos específicos para el PRP de gato, aun dentro de zonas consenso en los demás genes, tales como Asn9, Tyr19, Val20 y Leu32 (figura 32).

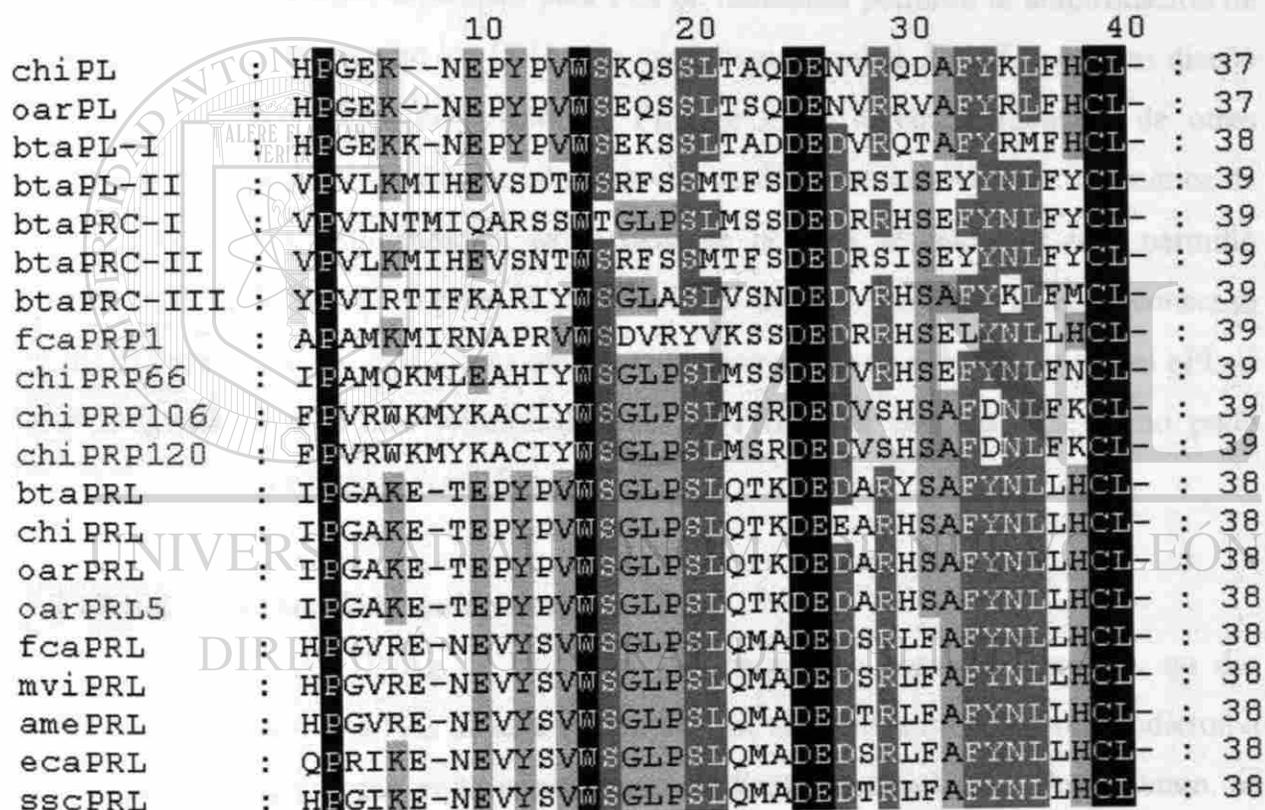


Figura 32: Alineamiento aminoacídico de las secuencias obtenidas. Ilustración del alineamiento de las secuencias aminoacídicas correspondientes a los fragmentos del exón 5 de las clonas de gato, cabra y oveja. Se observan zonas muy conservadas en todas las secuencias así como cambios específicos del PRP de gato respecto a zonas consenso en los demás genes. Se muestran sombreadas las clonas obtenidas en este trabajo. Se utilizó el programa de alineamiento GeneDoc.

CAPÍTULO VII

DISCUSIÓN

7.1 Obtención de la clona de PL ovino.

Los ensayos de hibridación y clonación de este trabajo fueron realizados utilizando el gen de PL ovino como sonda, ya que la secuencia nucleotídica completa del gen se encuentra disponible en el GenBank, mientras que para los PLs de vaca y cabra únicamente se han reportado los cDNAs.

El diseño de un iniciador específico para PLs de rumiantes permitió la amplificación de un fragmento de este gen en los DNAs de vaca, oveja y cabra. Debido a que se diseñó sobre zonas conservadas únicamente en PLs, se evitó la coamplificación de otros miembros de la familia, tal y como se comprobó mediante caracterización enzimática de los PAs obtenidos. Sin embargo, en el caso de la vaca, el iniciador solo permitió amplificar el gen de bPL-I pero no el bPL-II, el cual no contenía la zona consenso utilizada para el diseño. Esta última observación concuerda con el hecho de que el bPL-II está filogenéticamente más relacionado con las PRPs que con los PLs, como pudo determinarse posteriormente (ref. figura 31-B).

7.2 Obtención de las clonas relacionadas a PRL.

La amplificación del DNAg de gato con los iniciadores consenso para PL no dio resultados positivos. Los PAs de baja intensidad que se obtuvieron no correspondieron a genes de la familia, como pudo corroborarse mediante secuenciación. Por lo tanto, se utilizaron los iniciadores consenso diseñados sobre las regiones conservadas entre PRLs, PRPs y PLs.

7.2.1 Amplificación de las secuencias relacionadas a PRL con iniciadores consenso.

Los primeros ensayos de PCR utilizando los iniciadores consenso y DNAs de rumiantes, permitieron la amplificación principalmente de secuencias relacionadas a PRL (tanto PRLs como PRPs), pero no de PLs. Este resultado se puede explicar por el número mayor de PRPs en comparación a los PLs, que aparecieron durante la evolución de los

rumiantes. En el caso de la vaca, por ejemplo, se tienen reportes de la existencia de cuando menos seis de estos genes (Goffin y cols, 1996; Schuler y cols, 2001); mientras que solo existen dos secuencias reportadas para PLs. Algo similar se ha reportado para los roedores, aun cuando en este caso las duplicaciones se registraron aparentemente de manera independiente a las de los rumiantes.

Para el gato, la amplificación de PRL era la única favorecida bajo estas condiciones (a excepción de una banda de inespecificidad, como se demostró posteriormente mediante hibridación). Así, todos los ensayos de clonación realizados en el gato siguiendo esta estrategia, culminaron siempre en la obtención de clonas correspondientes a PRL.

En vista de estos resultados, se procedió a la modificación de la estrategia. Se realizaron ensayos de PCR con los DNAg, utilizando los mismos iniciadores que en la estrategia anterior, pero en condiciones de reacción más relajadas: disminuyendo la temperatura de alineamiento y aumentando el tiempo de apareamiento de los iniciadores. De esta manera se esperó que aumentarían las probabilidades de amplificación para otros miembros de la familia diferentes a PRL, aun y cuando se aumentaría también la generación de bandas de inespecificidad. La eliminación de los productos inespecíficos de reacción se realizó mediante hibridación inversa de los PA contra PL ovino. Por lo tanto, solo aquellos PA que mostraron similitud con el PL ovino hibridaron en la membrana, mientras los productos inespecíficos fueron eluidos con los primeros lavados. Los PA de interés fueron recolectados y reamplificados en condiciones de alta astringencia con el fin de eliminar cualquier inespecificidad residual. Al final, estos productos reamplificados fueron clonados y caracterizados. Los PA de rumiantes obtenidos a la par con el DNAg de gato, que sirvieron como controles de la PCR, fueron clonados directamente a partir del producto de reacción.

7.2.2 Clonas relacionadas a PRL en el gato.

Mediante la estrategia original propuesta, pudieron obtenerse tres tipos de clonas distintas relacionadas a PRL a partir de DNAg de gato. Dos de ellas con un inserto de aproximadamente 7500 pb y una menor con inserto de aproximadamente 2500 pb. La secuenciación posterior de las clonas, permitió corroborar su identidad con la PRL (figura 33). Los insertos más grandes correspondían al fragmento del gen comprendido desde el

inicio del intrón 2 hasta la mitad del exón 5, mientras que el inserto pequeño únicamente comprendía el intrón 2 en su totalidad. Se secuenciaron los extremos de cada uno de los insertos, así como fragmentos de los intrones flanqueantes al exón 4 en las clonas más grandes.

Por medio de la comparación de secuencias con el programa BLAST (GenBank), pudo determinarse la presencia de un elemento repetitivo nuclear corto (SINE) de aproximadamente 123 pb insertado en la primera mitad del intrón 2 de los tres tipos de clonas analizadas. En el caso del gen de la PRL de visión, cuya secuencia está reportada en el GenBank casi en su totalidad, también se encuentra incrustado este elemento repetitivo aunque en una región diferente a la del gato (intrones 3 y 4). Además, según los reportes del GenBank, este SINE está ampliamente distribuido en el genoma del gato y es exclusivo del orden *Carnivora*. Estos hallazgos sugieren que la inserción de este elemento se realizó de manera independiente en cada linaje y por lo tanto, constituyó un evento reciente que ocurrió después de la divergencia entre estas dos especies, hace aproximadamente 25 millones de años (Janczewski y cols, 1992).

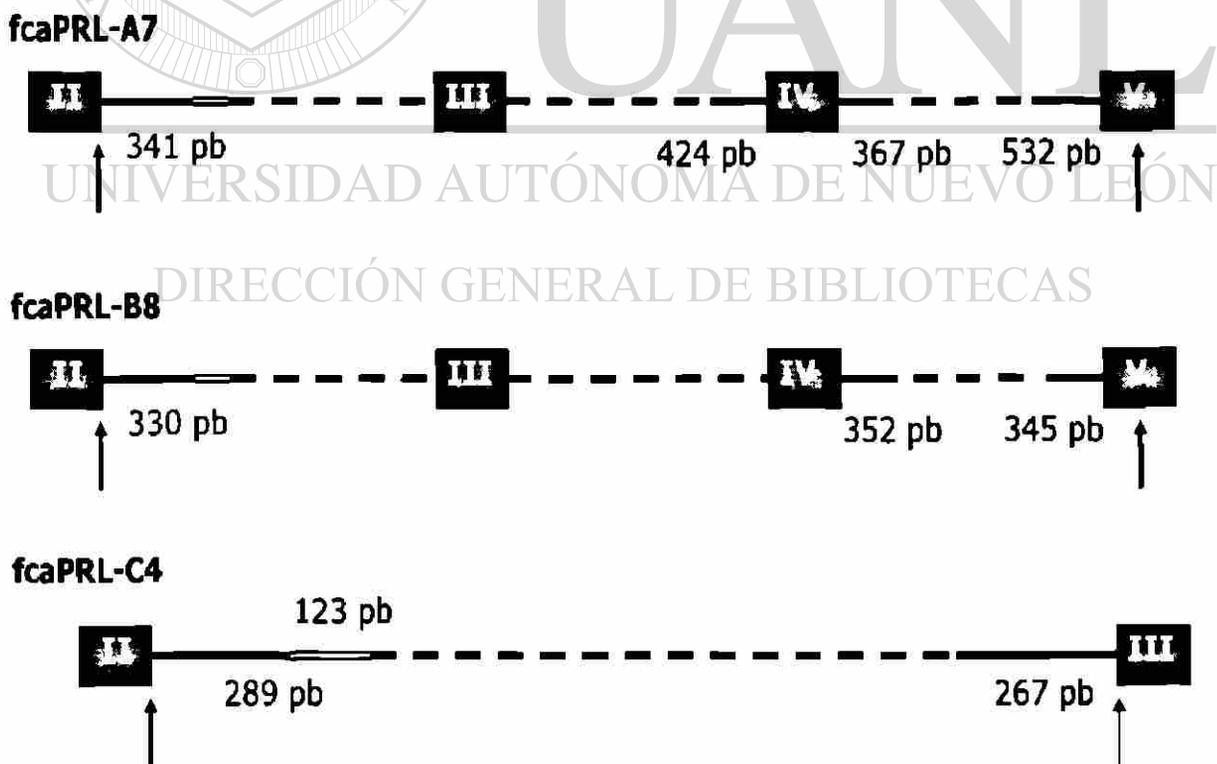


Figura 33: Secuenciación de las clonas fcaPRL. Se esquematiza la extensión de los insertos, limitados por las flechas, de los tres tipos de clonas obtenidas mediante clonación directa del producto de PCR. Las líneas continuas indican el avance de la secuenciación de las mismas, cuya identidad con la PRL de gato quedó confirmada. La doble raya indica la localización aproximada del SINE dentro del intrón 2.

Por otra parte, mediante la estrategia modificada pudo obtenerse una clona cuyo inserto está relacionado a PRL pero que es diferente a ésta, tal como se demostró mediante hibridación y secuenciación posteriores. Los PAs utilizados en esta clonación se obtuvieron por apareamiento inespecífico del oligonucleótido 5' (ConsPL2) dentro del gen. La explicación de este fenómeno podría estar en la formación misma de los genes de la familia, los cuales surgieron debido a duplicaciones sucesivas de un primer exón.

El inserto fue secuenciado en su totalidad; abarca una extensión de 712 pb, y se sitúa desde poco después del inicio del intrón 4 hasta la mitad del exón 5 (ref. figura 25). La comparación de la secuencia con el programa BLAST (GenBank) determinó un porcentaje de similitud de 86 %, 74 % y 50 % con los genes de PRP bovino, PL ovino y PRL de gato respectivamente, lo cual la confirmó como perteneciente a la familia PRL/PL.

7.2.3 Clonas relacionadas a PRL en cabra y oveja.

Aun y cuando para la vaca se tienen varios reportes de genes relacionados a la familia, es muy poco lo que se sabe sobre el particular en otras especies de rumiantes. Ejemplos claros de esto son la cabra y la oveja, para las cuales se cuenta solamente con un reporte para cada una de GH, PRL y PL. Esta escasez de puntos de comparación, limita en parte la reconstrucción idónea de árboles filogenéticos de la familia en estas especies. Debido a esto, los PA obtenidos a partir de DNAg de cabra y oveja que sirvieron como testigos positivos de reacción durante la obtención de los productos relacionados a PRL en el gato, fueron clonados y caracterizados con la finalidad de ofrecer un panorama más amplio sobre la evolución de los genes de esta familia.

Así, de las clonas secuenciadas, cuatro de ellas (tres de cabra y una de oveja) pertenecieron a secuencias relacionadas a la familia PRL/PL. El inserto de la clona de oveja y dos insertos de las clonas de cabra abarcan desde el inicio del intrón 2 hasta el exón 5; mientras que el inserto de la clona de cabra restante, abarca parte del intrón 4 y el exón 5 (figura 34). La comparación con el banco de datos del GenBank, mostró alta similitud de las secuencias de cabra con el PRP bovino y de las secuencias de oveja con la PRL bovina. Esta comparación permitió, además, determinar la presencia de un elemento SINE de 144 pb en el intrón 4 de una de las clonas de cabra. Tal elemento repetitivo ha

sido reportado en otras especies de artiodáctilos, tales como vaca, búfalo y jirafa, pero no en otros órdenes, siendo específico de este orden.

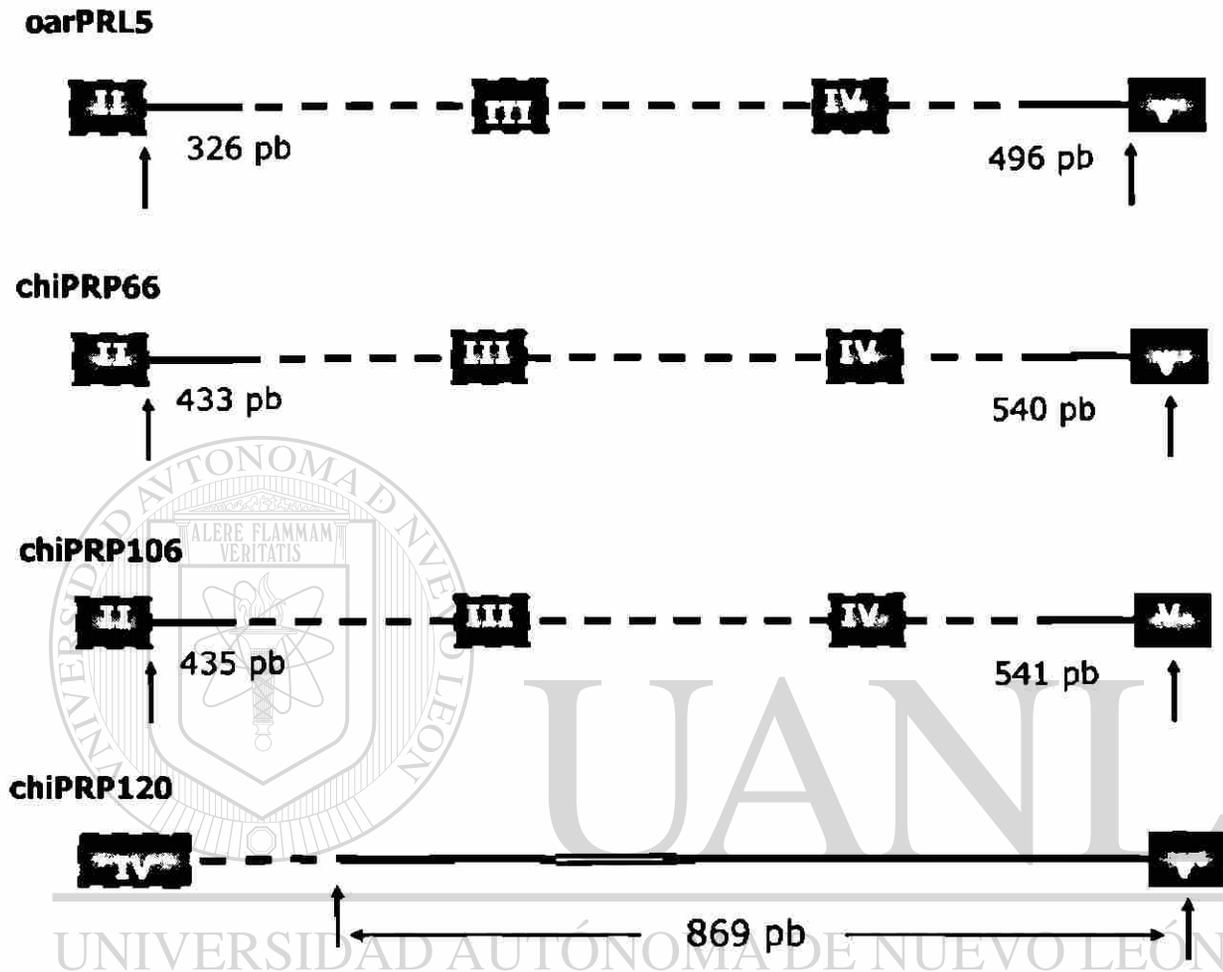


Figura 34: Secuenciación de las clonas relacionadas a PRL de rumiantes. Se esquematiza la extensión de los insertos, limitados por las flechas, de los cuatro tipos de clonas obtenidas mediante clonación directa del producto de PCR. Las líneas continuas indica el avance de la secuenciación de las mismas. La doble raya indica la localización aproximada del SINE.

7.3 Elementos repetitivos en la familia GH/PRL.

Durante este trabajo, se observó la presencia de elementos repetitivos (tipo SINE) en algunas de las secuencias obtenidas, como en la PRL de gato y PRP de cabra. Se cree que la presencia de secuencias repetitivas en los genomas (por ejemplo, SINEs), es debida a la integración de ciertos virus ocurrida tempranamente en la evolución de las especies. Estos elementos eventualmente pierden la capacidad infecciosa, pero no la replicativa, de tal manera que se multiplican y se insertan en zonas del genoma que

poseen cierta homología. Estas inserciones pueden ser tan extensas que constituyan buena parte del genoma de una especie en particular. Tal es el caso del genoma humano, donde un mismo elemento repetitivo nuclear, llamado *Alu*, es responsable de hasta el 10 % de las secuencias reportadas. Los elementos repetitivos son utilizados en filogenética para el establecimiento de líneas de evolución entre las especies, basada en la presencia o ausencia de ellos en las especies de un mismo orden. De esta manera, pueden establecerse ramas de divergencia anteriores o posteriores a la inserción de tales elementos repetitivos. En la familia génica de la GH/PRL también se ha reportado la presencia de elementos repetitivos. En el locus de la GH humana por ejemplo, existen 48 de tales secuencias insertadas entre las zonas intergénicas (Chen y cols, 1989). La importancia evolutiva de los elementos repetitivos queda establecida por el hecho de la recombinación homóloga, ya que estos propician el intercambio de secuencias entre las zonas intermedias y la duplicación de dichas secuencias. Este es el caso que parece haber ocurrido en el locus de la GH humana.

Aun cuando en el caso de los rumiantes no se tiene información completa de la distribución de elementos repetitivos, el hallazgo de un SINE en una de clonas de cabra obtenidas, sugiere que la expansión de la familia de PRL/PL en este orden puede estar determinada por un fenómeno de evolución dinámica, donde la duplicación de genes y los mecanismos de conversión génica ocurridos, son el resultado de recombinaciones homólogas entre las secuencias intergénicas y entre los intrones, respectivamente.

En el gato es más difícil establecer esta hipótesis, ya que únicamente se cuenta con reportes parciales para dos miembros de la familia (GH y PRL). Desgraciadamente, el hallazgo de una secuencia relacionada a PRL en este trabajo no permite aclarar tal incógnita debido a lo limitado de la secuencia que se obtuvo.

7.4 Hibridación tipo Southern.

Para corroborar la presencia del gen de PRP de gato y determinar la expansión de la familia génica en esta especie, se procedió a realizar una hibridación tipo Southern con el DNAg de gato. En la autoradiografía correspondiente se pudieron evidenciar claramente dos zonas de señal, las cuales se encontraban más o menos cercanas entre sí. La señal de la banda inferior tenía aproximadamente el doble de intensidad que la superior, lo cual

sugiere que podría tratarse de una banda doble, o bien, corresponder al gen que se utilizó precisamente como sonda. De ser esto cierto, el genoma del gato tendría por lo menos dos (o tal vez tres) secuencias relacionadas a PRL. La hibridación cruzada con otras zonas de homología es improbable debido a que la sonda utilizada no contenía ningún elemento repetitivo reportado hasta la fecha. Ambas bandas presentaron un tamaño pequeño de aproximadamente 400-500 pb, los cuales son muy inferiores al esperado en el caso de la PRL. En efecto, el gen de la PRL contiene sólo un sitio *Bam* HI localizado en el intrón 3 por lo que se espera una banda arriba de 3202 pb (González, 2001), la cual no se observó en la autorradiografía, ya que las condiciones de hibridación fueron astringentes para limitar precisamente una reacción cruzada con este gen. Por otro lado, la señal observada en el carril del testigo de PRL puede explicarse debido a un exceso de cantidad de clona depositada en este caso.

7.5 Alineamiento nucleotídico y aminoacídico de las secuencias obtenidas.

El análisis del alineamiento nucleotídico de las secuencias reveló que la PRP de gato presentaba cambios nucleotídicos importantes respecto a las zonas consenso observadas para las demás secuencias. Estos cambios se presentaron aun dentro de la zona exónica analizada, y con el alineamiento aminoacídico pudo comprobarse que algunos de ellos eran no sinónimos, por ejemplo Tyr19 por Ser19, Val20 por Leu20 y Leu32 por Phe32.

El alineamiento aminoacídico se realizó ajustando el tamaño de todos los exones al de las clonas obtenidas (entre 37 y 39 aminoácidos) y eliminando la secuencia correspondiente al iniciador 3' respectivo (figura 35). En el caso de la PRP de gato, se observó una importante conservación de los aminoácidos claves que han sido reportados como necesarios para la unión al receptor y/o actividad específica de la hormona: los residuos Trp14, Asp24, Glu25 y Cys38 (Yamakawa y cols, 1990; Sinha, 1995), según la numeración utilizada en la figura 34. Otros residuos importantes para la unión de la PRL humana con su receptor también se encuentran conservados: Tyr33 y His37 (Goffin y cols, 1996). Por otro lado, se observaron cambios en zonas menos conservadas, tal es el caso en los residuos 16-18 conservados en PRLs pero no en PRPs y PLs, y en el residuo 32, conservado en PRLs y PLs pero no en PRPs. Aun cuando el residuo Pro2 se encuentra altamente conservado en este alineamiento, no hay reportes de su participación

en la unión al receptor; según datos previos (Sinha, 1995), Pro2 está conservado en PRLs de mamíferos, reptiles y algunos peces, y podría jugar algún papel en la estructura tridimensional de la proteína.

Si bien es verdad que los datos obtenidos apoyan la hipótesis de que el gen de PRP de gato pudiera ser funcional, lo cierto es que existen otros determinantes importantes de unión al receptor y de actividad hormonal que no se han podido analizar debido a la secuencia demasiado corta obtenida. En todo caso, no es posible realizar una afirmación exacta de tal hipótesis, hasta no contar con la totalidad de la secuencia del gen y determinar el grado de conservación de los demás dominios implicados.

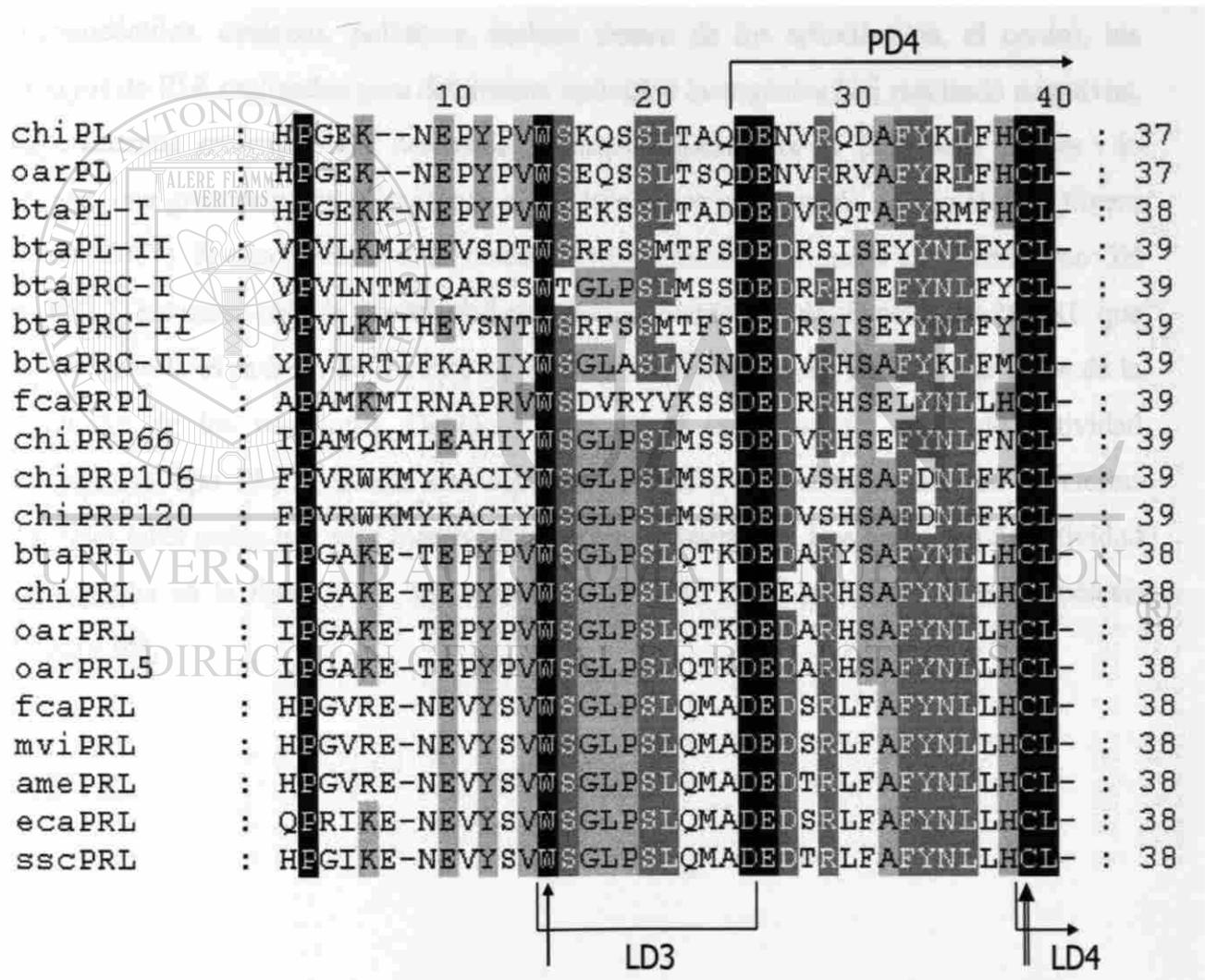


Figura 35: Cambios aminoacídicos de la PRP de gato. Los recuadros indican las zonas comprendidas dentro de los dominios proteínicos conservados (PD4: dominio prolactínico 4; LD3: dominio lactogénico 3; LD4: dominio lactogénico 4) de las hormonas, necesarios para su unión con el receptor y/o actividad específica (Yamakawa y cols, 1990; Sinha, 1995). La flecha simple indica el aminoácido clave conservado solamente en los genes PRL, PRP y PL conocidos. La flecha doble indica el aminoácido clave conservado en todos los miembros de la familia (Yamakawa y cols, 1990)

7.6 Surgimiento de los genes relacionados a PRL en el gato.

Tanto el árbol reconstruido con base en la totalidad de la secuencia de PRP de gato, como el elaborado solamente con la secuencia exónica, mostraron una clara relación del PRP de gato con los genes PRPs y PL-II de la vaca. Estos datos explican resultados obtenidos previamente (González, 2001), en los cuales se observó hibridación de secuencias del gato con una sonda de bPL-II.

Con base en la similitud hallada entre la secuencia de PRP de gato obtenida y las PRPs de rumiantes, surge la incógnita de determinar el momento del surgimiento de tal gen en el gato. Aun cuando para órdenes y subórdenes relacionados a rumiantes y carnívoros (perisodáctilos, cetáceos, polidotos, incluso dentro de los artiodáctilos, el cerdo), los ensayos de RIA realizados para determinar actividad lactogénica han resultado negativos, experimentos recientes han demostrado inmunológicamente la presencia de por lo menos, una glucoproteína relacionada al PL bovino en una especie de camélido (Olivera y cols, 2003). Si esta proteína es en realidad una hormona relacionada a la familia (no GH ni PRL), entonces cabe la posibilidad de que los eventos de duplicación de la PRL que provocaron la expansión de los PRPs y PLs en rumiantes, hayan tenido lugar antes de la radiación de los rumiantes. Debido a que en el cerdo no se detectado actividad lactogénica tipo PL, ni cuenta con reportes de PRPs, podría asumirse que en ciertas especies tales genes han sido inactivados, pero no eliminados. Los hallazgos de actividad lactogénica en la llama y de una secuencia de PRP en el gato apoyan esta hipótesis (figura 36).

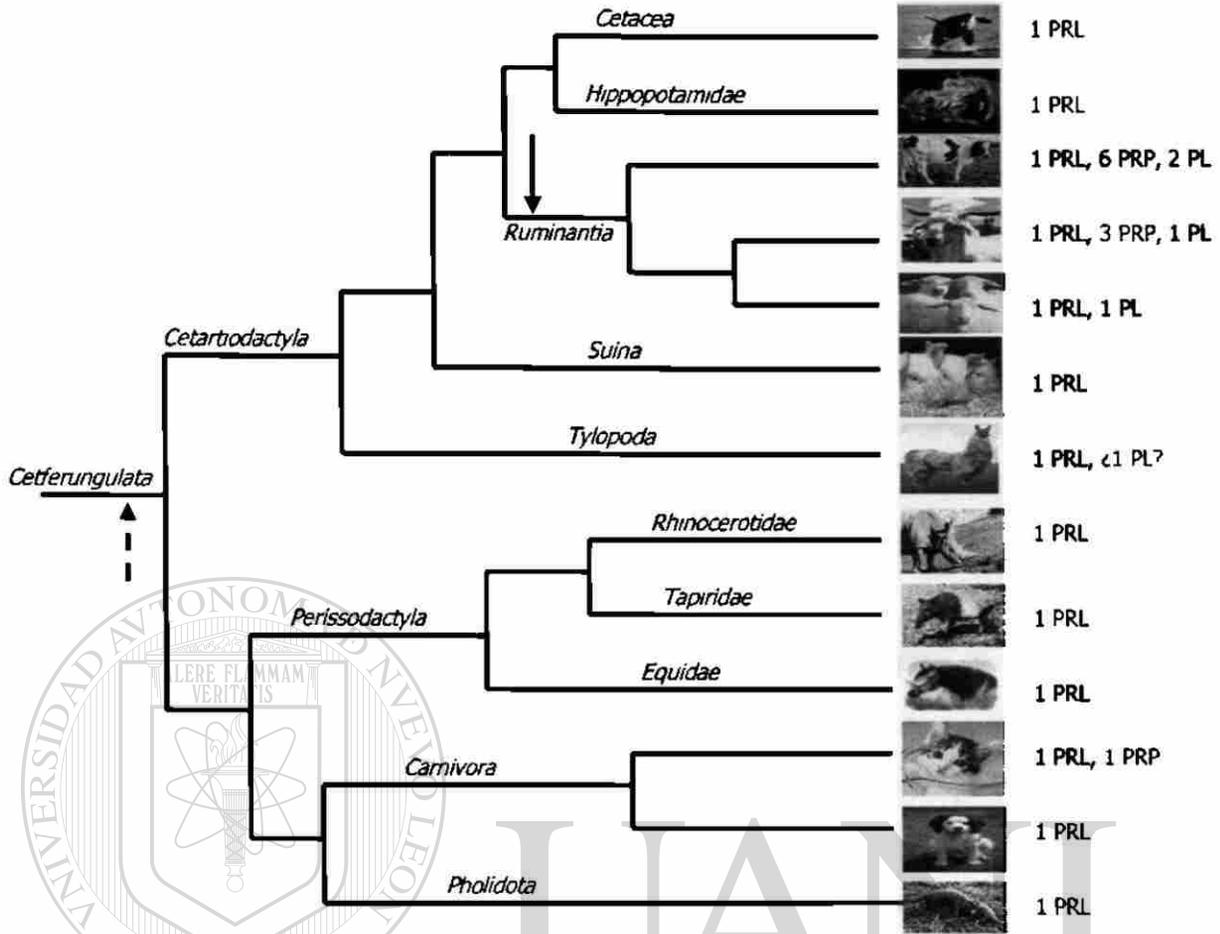


Figura 36: Hipótesis del inicio de la expansión de los genes relacionados a PRL en el superorden *Cetferungulata*. Se indican sobre las ramas del árbol los órdenes y subórdenes respectivos. A la derecha se enlistan: en negro los genes de la familia reportados hasta la fecha para la especie respectiva; en gris, aquellos no reportados todavía pero cuya existencia se asume. La flecha continua señala el sitio donde se cree actualmente comenzó la expansión de la familia PRL/PL en los rumiantes. La flecha discontinua señala el sitio donde podría haber ocurrido la primera duplicación de la PRL, con base en los hallazgos recientes.

CAPÍTULO VIII

CONCLUSIONES

Este trabajo permitió concluir lo siguiente:

- 1.- La estrategia de amplificación e hibridación inversa permitió la obtención de una secuencia relacionada a PRL (PRP) a partir de DNAg de gato doméstico. Tal secuencia fue clonada y secuenciada, determinándose su longitud exacta de 712 pb. Adicionalmente, se lograron clonar y secuenciar diversas PRPs de cabra y oveja, un PL de oveja y la PRL de gato.
- 2.- Algunos de los genes de la familia de la PRL (PRL de gato, PRL de visón y un PRP de cabra) presentan insertados elementos repetitivos específicos de su linaje, mostrando que los genes de la familia siguieron una evolución dinámica, aun después de la radiación de los géneros.
- 3.- La reconstrucción de árboles filogenéticos con base en las secuencias nucleotídicas permitió establecer la relación estrecha entre la PRP de gato y las PRPs bovinas.
- 4.- El análisis comparativo de las secuencias aminoacídicas permitió determinar la conservación de los aminoácidos clave involucrados en la función de la hormona, en el fragmento de PRP de gato obtenido.
- 5.- Se confirmó la existencia de por lo menos dos genes relacionados a PRL en el gato mediante hibridación tipo Southern del DNAg contra la PRP de gato obtenida.
- 6.- En conjunto, los resultados permiten proponer que hubo una duplicación del gen de la PRL en etapas más tempranas de la evolución de los carnívoros y rumiantes, a saber, antes de la radiación del superorden *Cetferungulata*.

CAPÍTULO IX

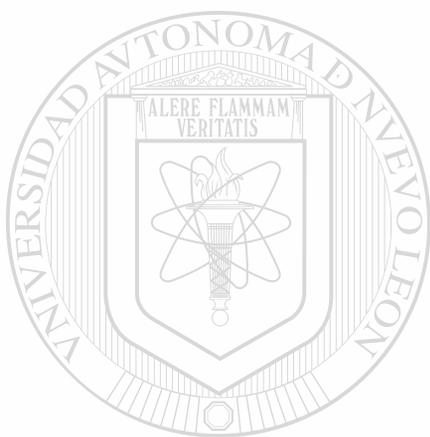
BIBLIOGRAFÍA

1. Ben-Jonathan N, Mershon JL, Allen DL, Steinmetzj RW. (1996). Extrapituitary Prolactin: Distribution, Regulation, Functions, and Clinical Aspects. *Endoc.* 17 (6).
2. Biener E, Martin C, Daniel N, Frank SJ, Cenztone VF, Herman B, Djiane J, Gertler A. (2003). Ovine Placental Lactogen-induced Heterodimerization of Ovine Growth Hormone and Prolactin Receptors in Living Cells is Demonstrated by FRET Microscopy and Leads to Prolonged Phosphorylation of STAT 1 and STAT 3. *Endoc.* 10:1210.
3. Bolander FF Jr., Feilows RE. (1976). Purification and Characterization of Bovine Placental Lactogen. *J. Biol. Chem.* 251 (9): 2703-2708.
4. Bole-Feysot C, Goffin V, Edery M, Binart N, Kelly PA. (1998). Prolactin (PRL) and Its Receptor: Actions, Signal Transduction Pathways and Phenotypes Observed in PRL Receptor Knockout Mice. *Endoc. Rev.* 19 (3): 225–268.
5. Chen EY, Liao Y, Smith DH, Barrera-Saldaña HA, Gelinas RE, Seeburg PH. (1989). The Human Growth Hormone: Nucleotide Sequence, Biology, and Evolution. *Genomics* 4: 479-497.
6. Corbacho AM, Martínez de la Escalera G, Clapp C. (2002). Review: Roles of prolactin and related members of the prolactin/growth hormone/placental lactogen family in angiogenesis. *J. Endocrin.* 173: 219-238.
7. Elkins PA, Christinger HW, Sandowski Y, Sakal E, Gertler A, De Vos AM, Kossiakoff AA. (2000). Ternary complex between placental lactogen and the extracellular domain of the prolactin receptor. *Nat. Struct. Biol.* 7 (9).
8. Forsyth IA, Wallis M. (2002). Growth hormone and prolactin--molecular and functional evolution. *J. Mammary Gland Biol. Neoplasia.* 7 (3): 291-312.
9. Forsyth IA. (1986). Variation among species in the endocrine control of mammary growth and function: the roles of prolactin, growth hormone and placental lactogen. *J. Dairy Sci.* 69 (3): 886-903.

10. Freeman ME, Kanyicska B, Lerant A, György Nagy G. (2000). Prolactin: Structure, Function, and Regulation of Secretion. *Physiol. Rev.* **80** (4).
11. Freemark M, Comer M. (1989). Purification of a distinct placental lactogen receptor, a new member of growth hormone/prolactin receptor family. *J. Clin. Invest.* **83**: 883–889.
12. Genazzani AR, Cocola F, Neri P, Fioretti P. (1972). Human chorionic somatomammotropin (HCS) plasma levels in normal and pathological pregnancies and their correlation with the placental function. *Acta Endocrin. (Copenhagen)*. **71**.
13. Goffin V, Shiverick KT, Kelly PA, Martial JA. (1996). Sequence-Function Relationships Within the Expanding Family of Prolactin, Growth Hormone, Placental Lactogen, and Related Proteins in Mammals. *Endoc. Rev.* **17** (4).
14. González Álvarez R. (2001). Estudio molecular del gen de la prolactina en el gato doméstico (*Felis catus*). Tesis de maestría. Facultad de Medicina, UANL.
15. Hartog M. (1972). Human chorionica somatomammotropin and its clinical significance. *Clin. Endocrin.* **1**: 209.
16. Herman A, Bignon C, Daniel N, Grosclaudei J, Gertler A, Djiane J. (2000). Functional Heterodimerization of Prolactin and Growth Hormone Receptors by Ovine Placental Lactogen. *J. Biol. Chem.* **275** (9): 6295-6301.
17. Herman A, Helman D, Livnah O, Gertler A. (1999). Ruminant Placental Lactogens Act as Antagonists to Homologous Growth Hormone Receptors and as Agonists to Human or Rabbit Growth Hormone Receptors. *J. Biol. Chem.* **274** (12): 7631-7639.
18. Hull KL, Harvey S. (2001). Growth hormone: roles in female reproduction. *J. Endoc.* **168**: 1-23.
19. Janczewski DN, Yuhki N, Gilbert DA, Jefferson GT, O'Brien SJ. (1992). Molecular phylogenetic inference from saber-toothed cat fossils of Rancho La Brea. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **89**: 9769-9773.
20. Kann G, Delobelle-Deroide A, Belair L, Gertler A, Djiane J. (1999). Demonstration of *in vivo* mammogenic and lactogenic effects of recombinant ovine placental lactogen and mammogenic effect of recombinant ovine GH in ewes during artificial induction of lactation. *J. Endoc.* **160**: 365-377.

21. Kawauchi H, Suzuki K, Yamazaki T, Moriyama S, Nozaki M, Yamaguchi K, Takahashi A, Youson J, Sower SA. (2002). Identification of Growth Hormone in the Sea Lamprey, an Extant Representative of a Group of the Most Ancient Vertebrates. *Endoc.* **143**: 4916-4921.
22. Lee LTO, Nong G, Chan YH, Tse DLY, Cheng CHK. (2001). Molecular cloning of a teleost growth hormone receptor and its functional interaction with human growth hormone. *Gene.* **270**: 121-129.
23. Lewin B. (2001). Genes VII. *Marbán Libros S.L.*; Madrid, España.
24. Liang R, Limesand SW, Anthony RV. (1999). Structure and Transcriptional Regulation of the Ovine Placental Lactogen Gene. *Eur. J. Biochem.* **265**: 883-895.
25. Lindberg BS, Nielson BA. (1973) Human placental lactogen levels in abnormal pregnancies. *J. Obst. Gynec. Brit. Comm.* **80**: 1046.
26. Lioupis A, Wallis OC, Wallis M. (1997). Cloning and characterisation of the gene encoding red deer (*Cervus elaphus*) growth hormone: implications for the molecular evolution of growth hormone in artiodactyls. *J. Mol. Endoc.* **19**: 259-266
27. Ohta T. (1991). Multigene families and evolution of complexity. *J. Mol. Evol.* **33**: 34-41.
28. Olivera L, Zago D, Leiser R, Jones C, Bevilacqua E. (2003). Placentation in the alpaca *Lama pacos*. *Anat Embryol (Berl)*. **207** (1): 45-62.
29. Orwig KE, Dai G, Rasmussen CA, Soares MJ. (1997). Decidual/Trophoblast Prolactin-Related Protein: Characterization of Gene Structure and Cell-Specific Expression. *Endoc.* **138** (6).
30. Pébusque MJ, Coulier F, Birnbaum D, Pontarotti P. (1998). Ancient Large-Scale Genome Duplications: Phylogenetic and Linkage Analyses Shed Light on Chordate Genome Evolution. *Mol. Biol. Evol.* **15** (9):1145-1159.
31. Sakal E, Bignon C, Chapnik-Cohen N, Daniel N, Paly J, Belair L, Djiane J, Gertler A. (1998). Cloning, preparation and characterization of biologically active recombinant caprine placental lactogen. *J. Endoc.* **159**: 509-518.
32. Sambrook J, Russell DW. (2001). Molecular Cloning. A Laboratory Manual. 3^a ed. *Cold Spring Harbor Laboratory Press*; New York, USA.

33. Schradin C, Anzenberger G. (1999). Prolactin, the Hormone of Paternity. *News Physiol. Sci.* **14**
34. Schuler LA, Lu JC, Brockman JL. (2001). Prolactin receptor heterogeneity: processing and signalling of the long and short isoforms during development. *Biochemical Society Transactions.* **29** (2).
35. Sinha YN. (1995). Structural Variants of Prolactin: Occurrence and Physiological Significance. *Endoc. Rev.* **16** (3): 354-369.
36. Spellacy WM, Carlson KL, Kirk SA. (1966). Dynamics of human placental lactogen. *Am. J. Obst. Gynec.* **96**: 11, 64.
37. Spellacy WM, Cohen WD, Carlson KL. (1967). Human Placental Lactogen Levels as a Measure of placental function. *Am. J. Obst. Gynec.* **97**: 560.
38. Springer MS, Murphy WJ, Eizirik E, O'Brien SJ. (2003). Placental mammal diversification and the Cretaceous–Tertiary boundary. *PNAS.* **100** (3.)
39. Untergasser G, Hermann M, Rumpold H, Berger P. (1998). Complex alternative splicing of the GH-V gene in the human testis. *European Journal of Endocrinology* **139**: 424–427.
40. Wallis M, Lioupis A, Wallis OC. (1998). Duplicate growth hormone genes in sheep and goat. *J. Mol. Endoc.* **21**: 1-5.
41. Wallis M. (2001). Episodic evolution of protein hormones in mammals. *J. Mol. Evol.* **53** (1): 10-8.
42. Wallis M, Wallis OC. (2002). Characterisation of the GH gene cluster in a new-world monkey, the marmoset (*Callithrix jacchus*). *J. Mol. Endoc.* **29**: 89-97.
43. Yamakawa M, Tanaka M, Koyama M, Kagesato Y, Watahiki M, Yamamoto M, Nakashima K. (1990). Expression of New Members of the Prolactin Growth Hormone Gene Family in Bovine Placenta. Isolation and Characterization of Two Prolactin-Like cDNA Clones. *Biochem. Mol. Biol.* **265** (15): 8915-8920.



UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN



DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS



