

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



1080123884

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

FACULTAD DE MEDICINA



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

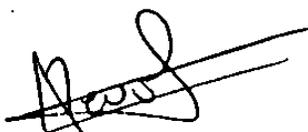
M4

2 04



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

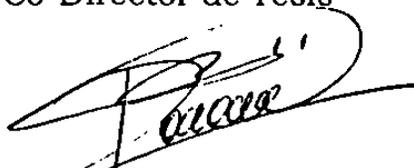
Aprobación de la Tesis:



DRA. AGNÈS REVOL DE MENDOZA
Directora de Tesis



DR. HUGO A. BARRERA SALDAÑA
Co-Director de Tesis



DRA. RÓCIO ORTÍZ LÓPEZ
Co-Directora de Tesis



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.

A PAME†
in memóriam

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.

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”.

Albert Einstein (1879-1955)

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
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

<i>Contenido</i>	<i>Página</i>
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: <i>CONCLUSIONES</i>	71
CAPÍTULO IX: <i>BIBLIOGRAFÍA</i>	72

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	Ácido etilendiaminotetra-acético
g	Gramos
<i>g</i>	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>

T _m	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

LISTA DE FIGURAS

<i>Figura</i>	<i>Página</i>
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

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*.