

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 (quinasas 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.

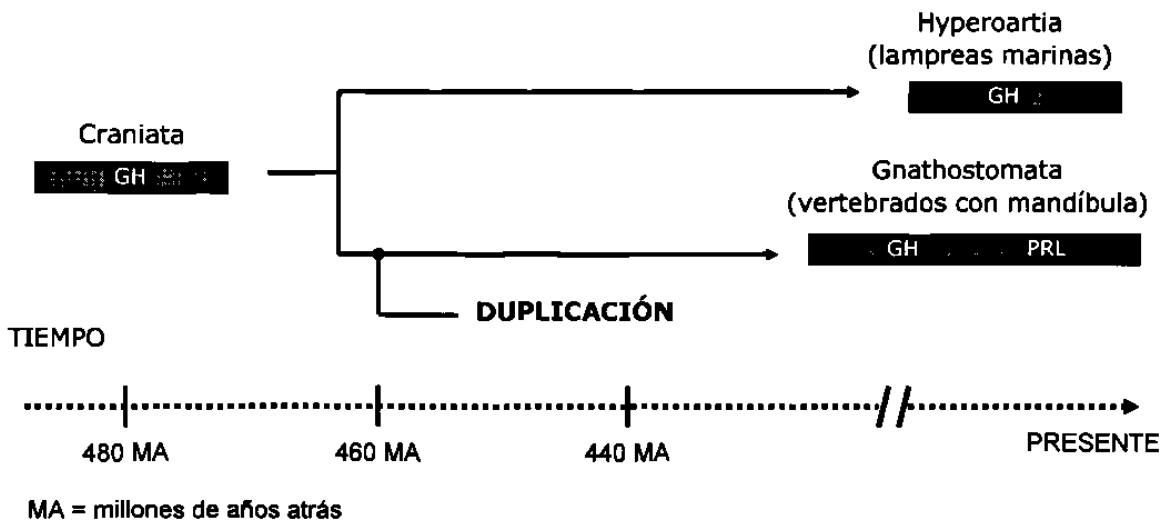


Figura 1: Origen de la familia GH/PRL. Hipótesis sobre el surgimiento de los genes GH y PRL en los vertebrados actuales a partir de un gen ancestral.

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

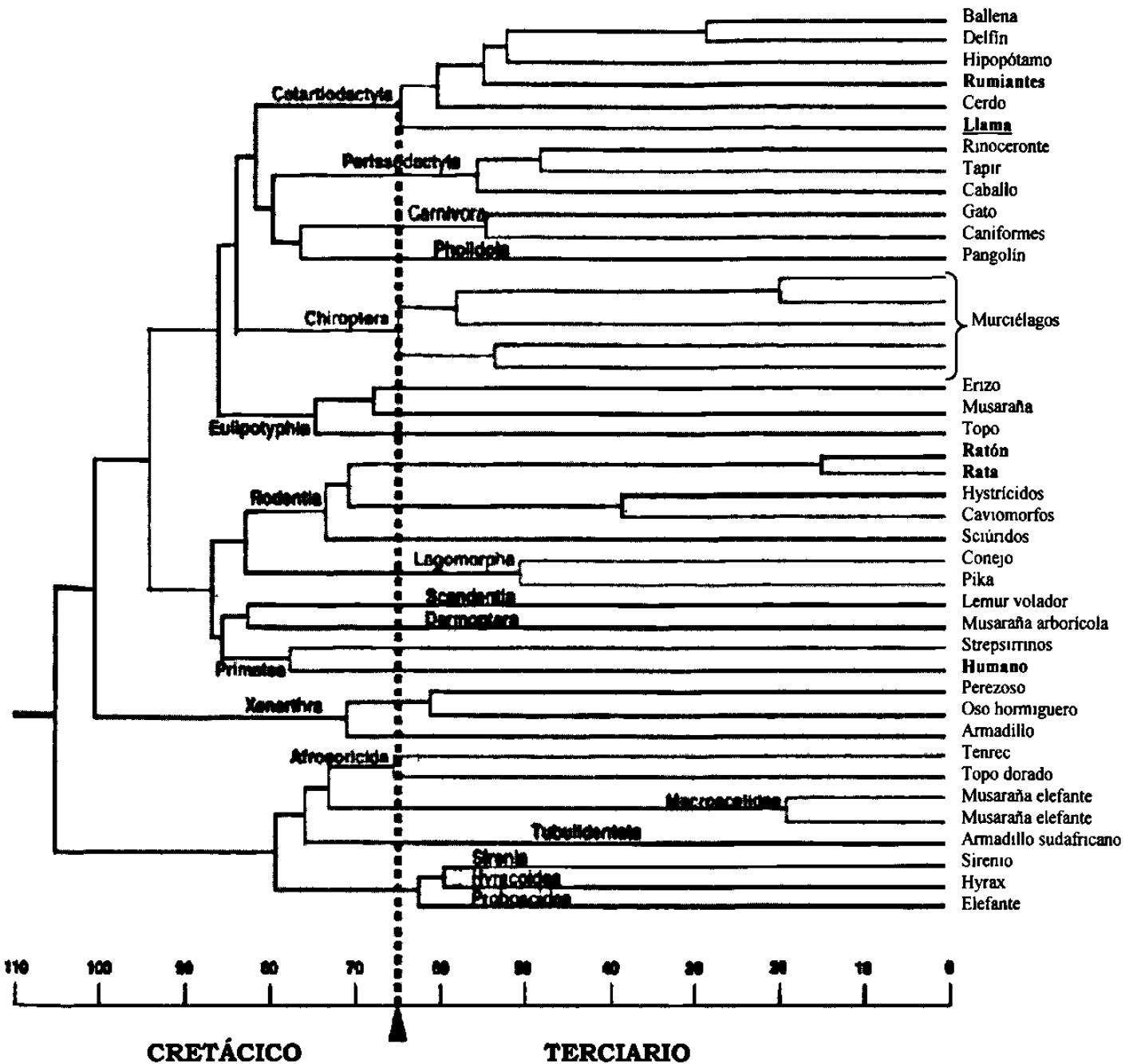


Figura 2: Árbol filogenético de la radiación de los mamíferos desde el Cretácico. Se muestran en negritas las especies con reportes de PRPs y/o PLs; subrayada la especie en la cual se ha encontrado actividad lactogénica en suero pero no se tiene reportes de genes PRP/PL (tomado de Springer y cols, 2003).

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).

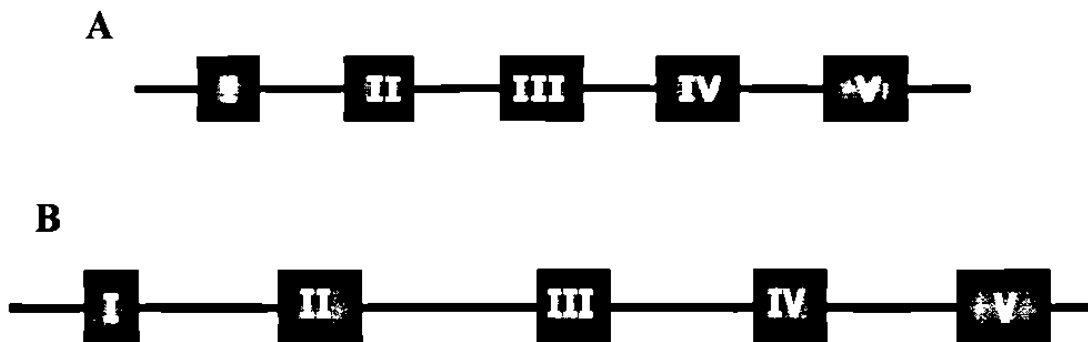


Figura 3: Estructura general de los genes de la familia GH/PRL. En A: gen de GH (y PL en primates). En B: gen de PRL (y PRP/PL/PLF en roedores y rumiantes). Obsérvese las regiones intrónicas de mayor longitud para el gen de la PRL, aun y cuando el tamaño de los exones es similar en ambos genes.

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 postraducciona (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.

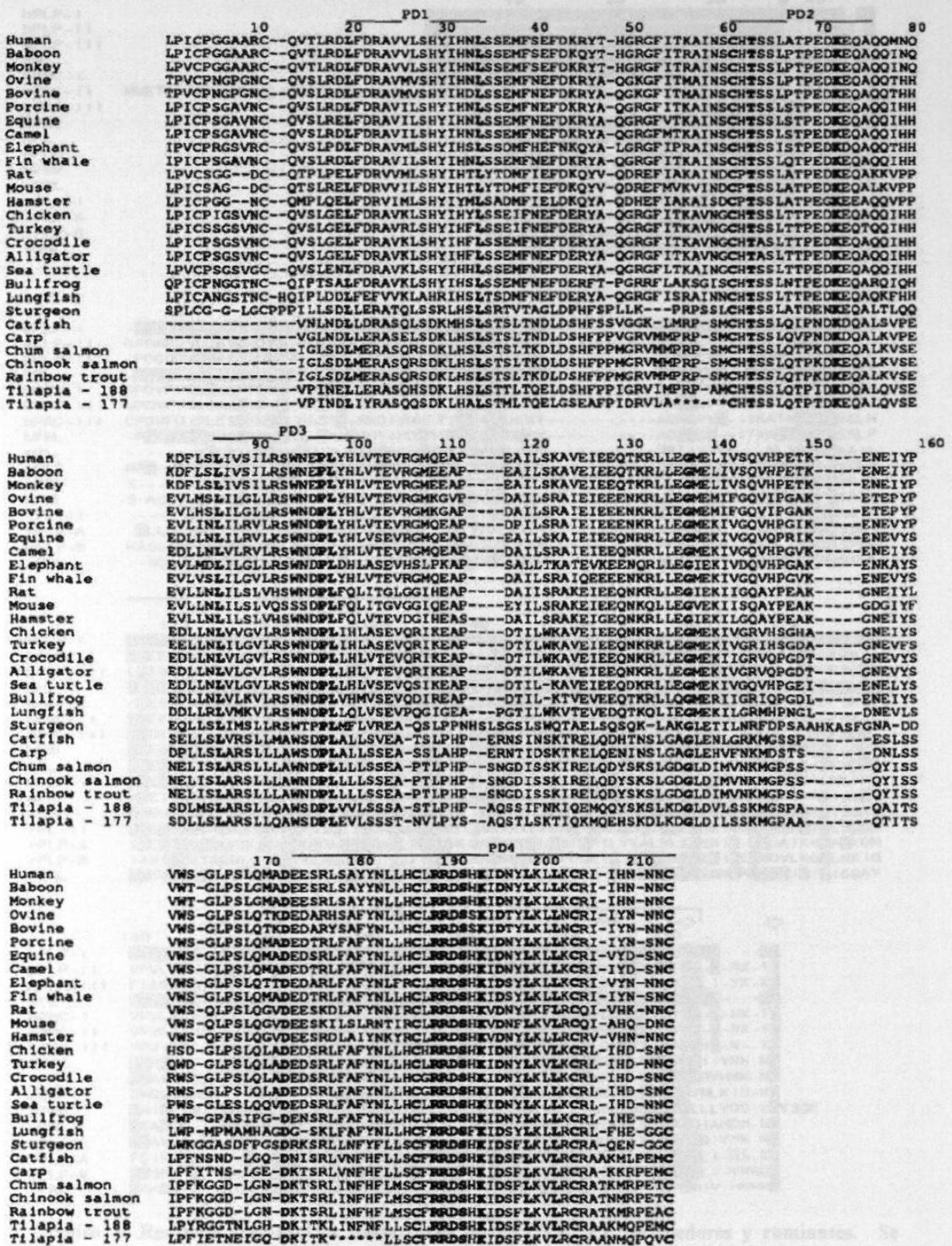


Figura 4: PRLs de varias especies de vertebrados. Se señala la localización de los cuatro dominios conservados entre las especies (PD1-PD4), presuntamente necesarios para la unión de específica de la PRL con su receptor y/o indispensables para la actividad específica de la hormona. En negritas los aminoácidos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

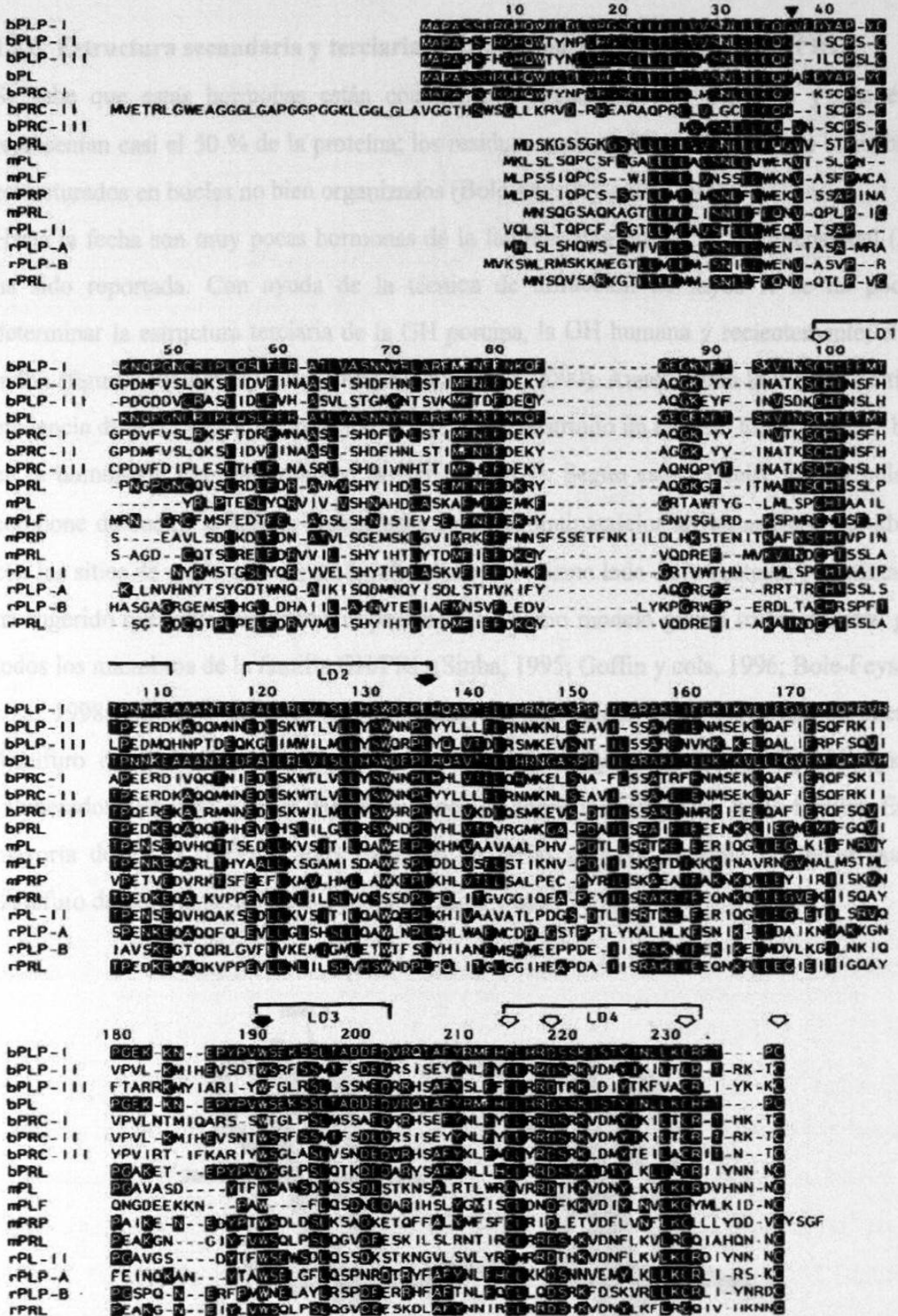


Figura 5: Residuos aminoácidos conservados en PRL/PRP/PL de roedores y ruminantes. Se comparan las estructuras primarias de varios genes relacionados a PRL. La numeración corresponde a la secuencia de PLP (PRP) bovino. Se indican con flechas negras los residuos conservados únicamente en los genes PRL/PRP/PL; con flechas blancas aquellos residuos también presentes en los demás miembros de la familia GH/PRL. El triángulo negro indica el sitio de corte de la peptidasa para la liberación de la proteína madura. LD1-LD4: dominios lactogénicos (tomado de Yamakawa y cols, 1990).

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).

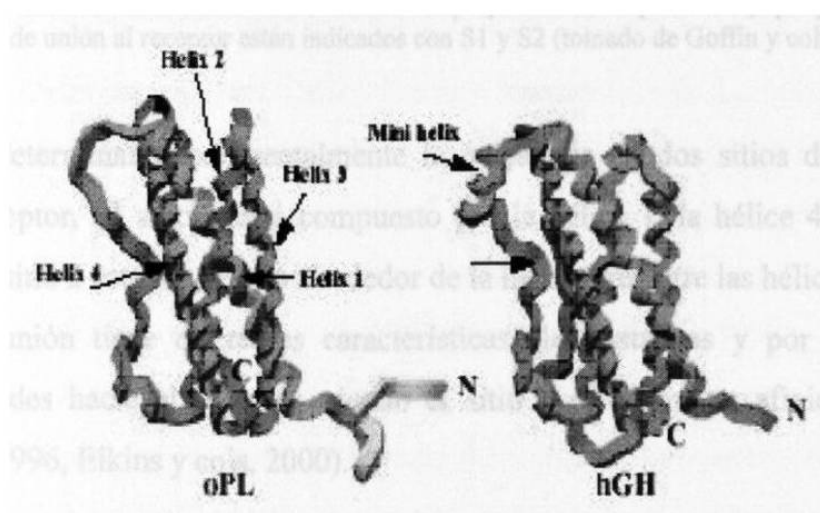


Figura 6: Modelo tridimensional del PL ovino y la GH humana. Se aprecian las cuatro α -hélices características y la presencia de un bucle amino terminal con puente disulfuro en el PL, ausente en todas las GHs (tomado de Elkins y cols, 2000).

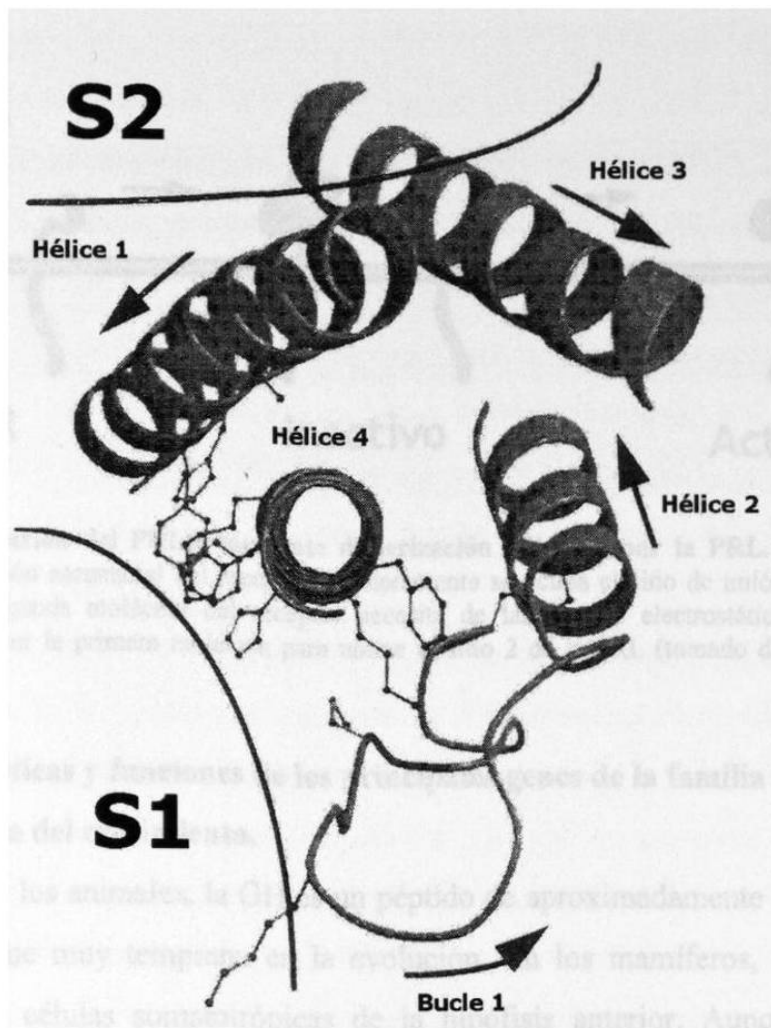


Figura 7: Modelo tridimensional hipotético de la molécula de PRL humana. El modelo fue reconstruido con base en los coordinados cristalográficos de la GH porcina. Puede apreciarse claramente las cuatro α -hélices características de las proteínas de la familia. Las flechas indican la orientación de las 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).

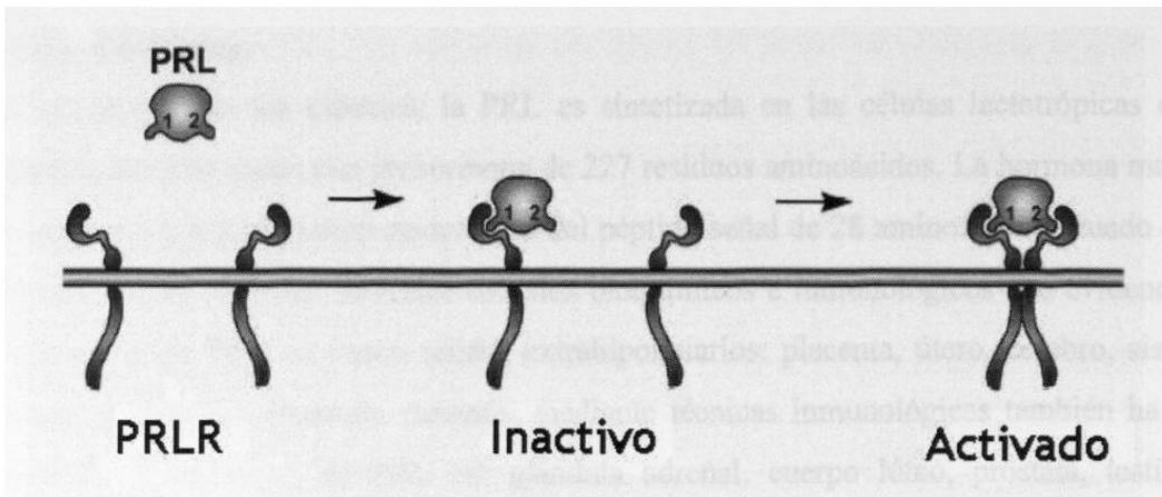


Figura 8: Activación del PRLR mediante dimerización inducida por la PRL. Esquema que ilustra la activación secuencial del receptor. Primeramente se ocupa el sitio de unión 1 (de mayor afinidad). La segunda molécula del receptor necesita de las fuerzas electrostáticas adicionales proporcionadas por la 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 rumiantes (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 somatomotropina 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.

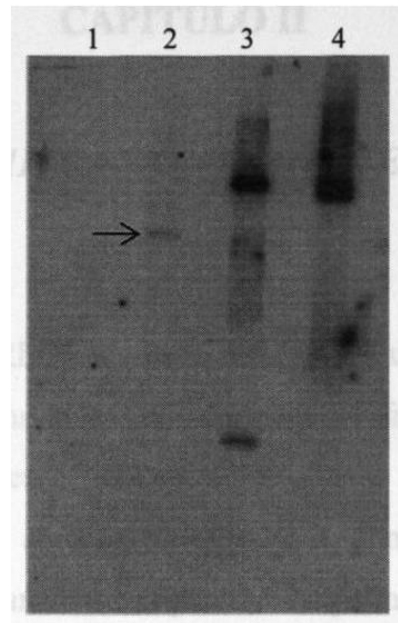


Figura 9: Autorradiografía del gel hibridado con una sonda de PL-II bovino y PAs de gato, vaca y oveja. La flecha indica el producto presuntamente relacionado a PRL. Carriles: 1, marcador; 2, Producto amplificado (PA) de gato; 3, PA de vaca; 4, PA de oveja (tomado de González, 2001).

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.

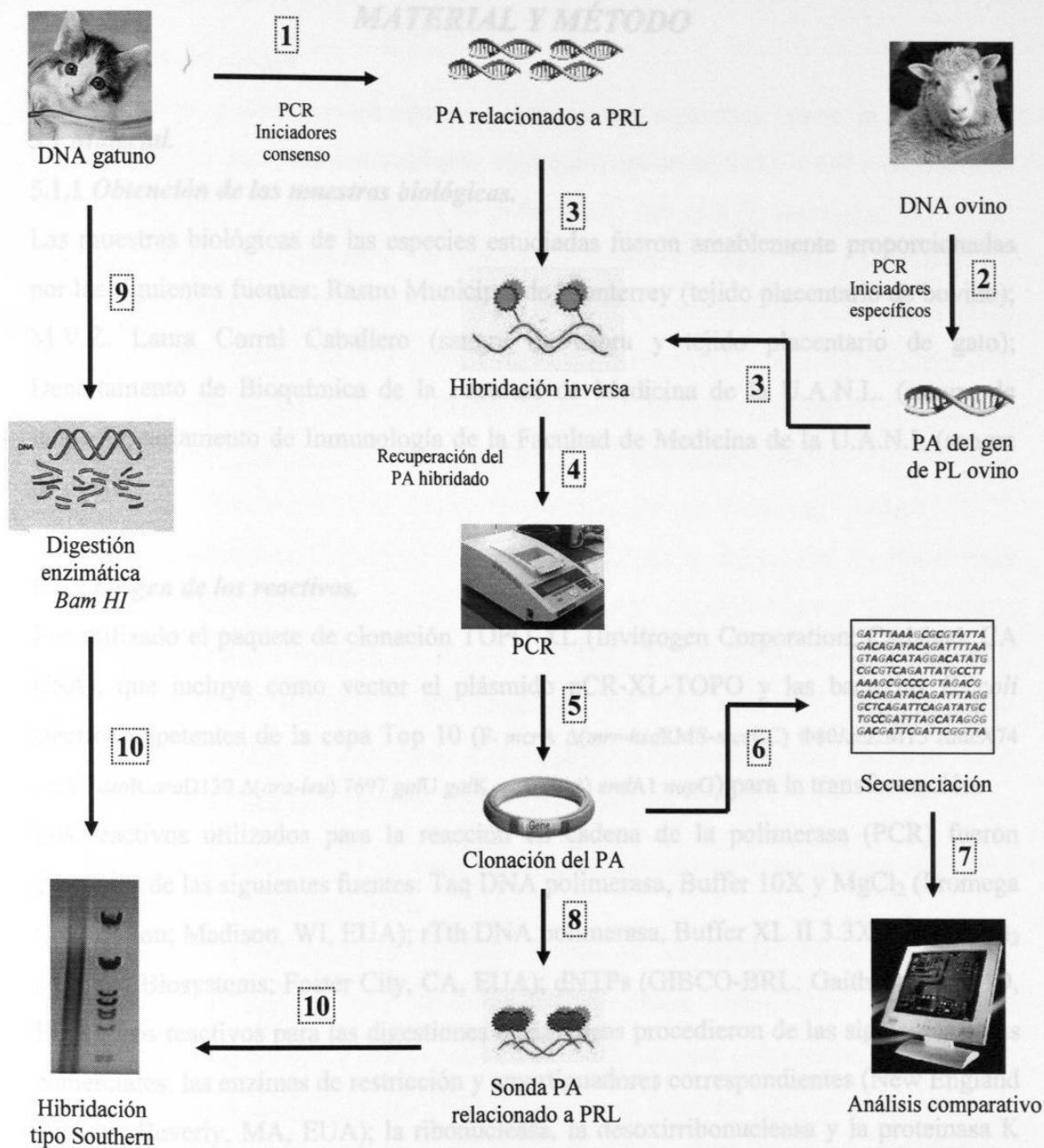


Figura 10: Estrategia general del trabajo. Esquema global de la estrategia utilizada durante la realización del presente trabajo. Los números en las flechas hacen referencia a los pasos descritos en el texto.

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); centrífuga 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 dejo 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 °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 °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.

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.

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.

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