

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.

## 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.

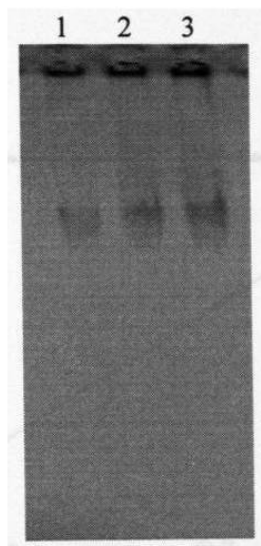


Figura 11: Extracción de los DNAg. Gel de agarosa al 0.8 % donde se evidencia la calidad de los DNAg obtenidos. Se depositó 1  $\mu$ l de cada muestra. Carriles: 1, gato; 2, cabra; 3, oveja.

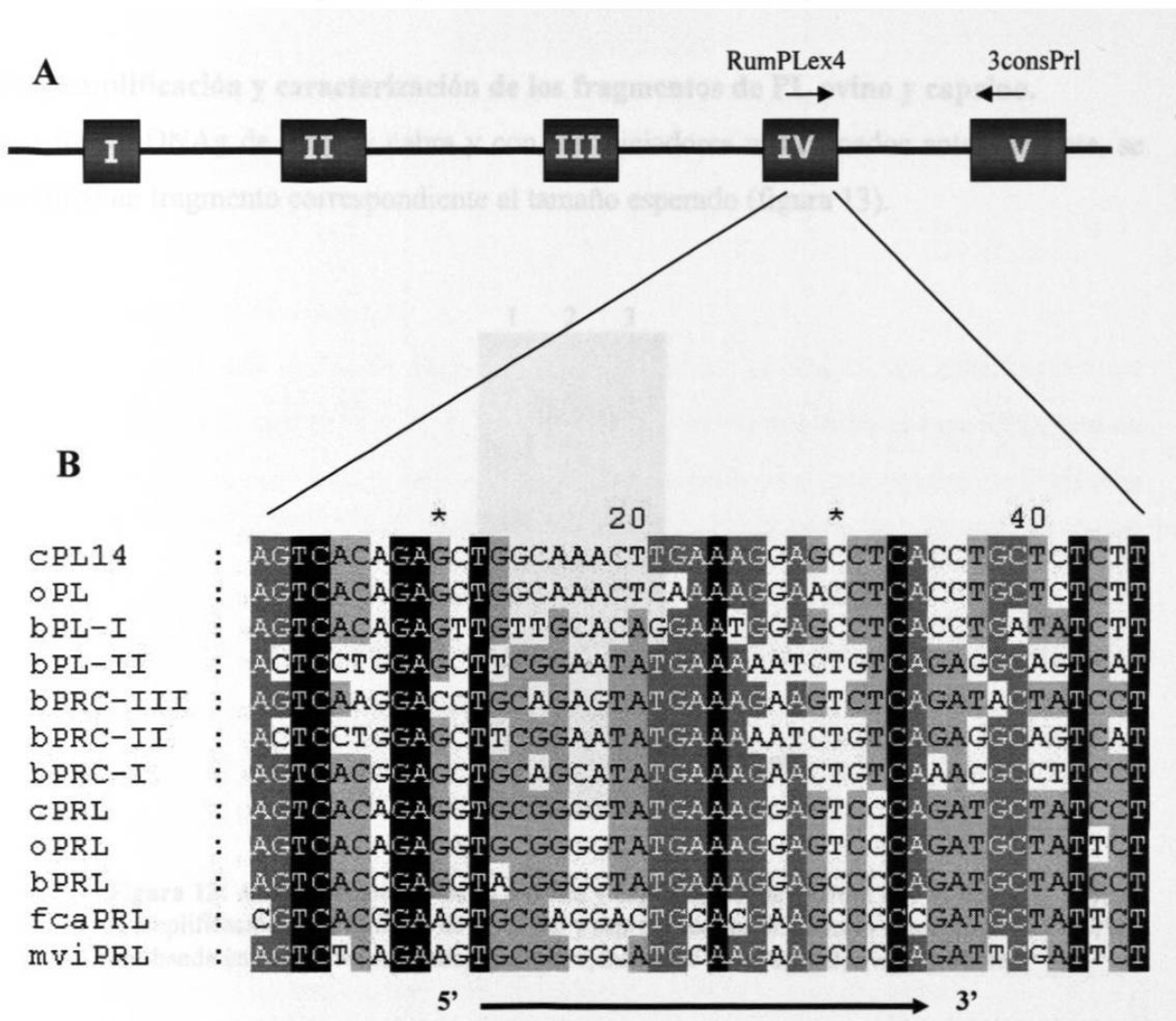
#### 6.2 Obtención de la clona de PL ovino.

##### 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.

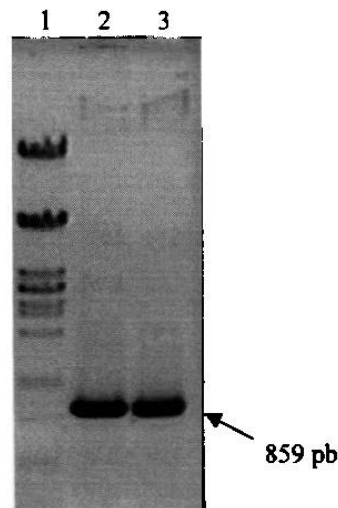
El iniciador 3' (3consPrl) utilizado fue uno ya disponible en la oligoteca de la ULIEG, construido con base en las zonas más conservadas del exón 5 de los genes de la familia. La secuencia nucleotídica de los iniciadores fue la siguiente:

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.

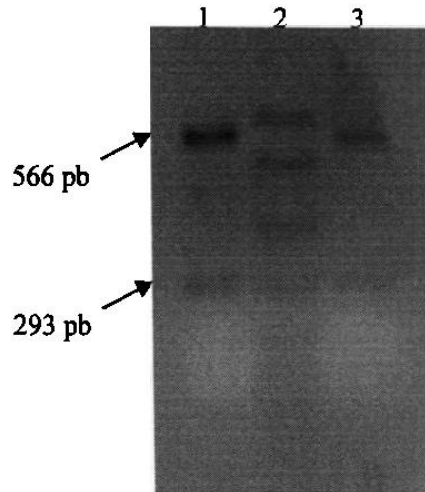
### 6.2.2 Amplificación y caracterización de los fragmentos de PL ovino y caprino.

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).

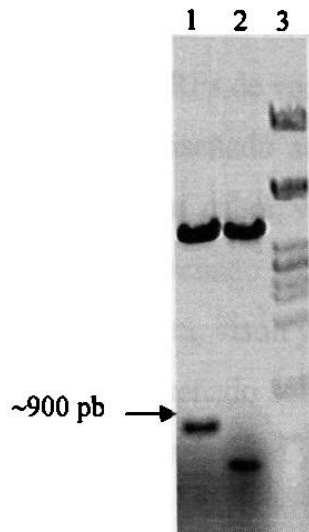


**Figura 14:** Caracterización enzimática de los PL ovino y caprino. Gel de agarosa al 2.5 % que ilustra la digestión de los PA de oveja y cabra cortados con *Eco* RI. Carriles: 1, oveja; 2, marcador (pUC + *Msp* I); 3, cabra.

### 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.

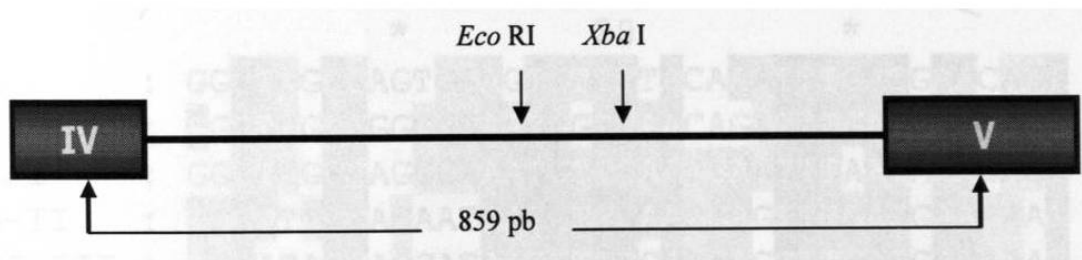
Las clonas que presentaron retraso electroforético con relación al plásmido control sin inserto, fueron seleccionadas y digeridas con las enzimas *Mlu* I y *Not* I, cuyos sitios de restricción en el plásmido flanquean la región de inserción del producto. De esta manera, el inserto liberado correspondió 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 ( $\lambda$  + *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.



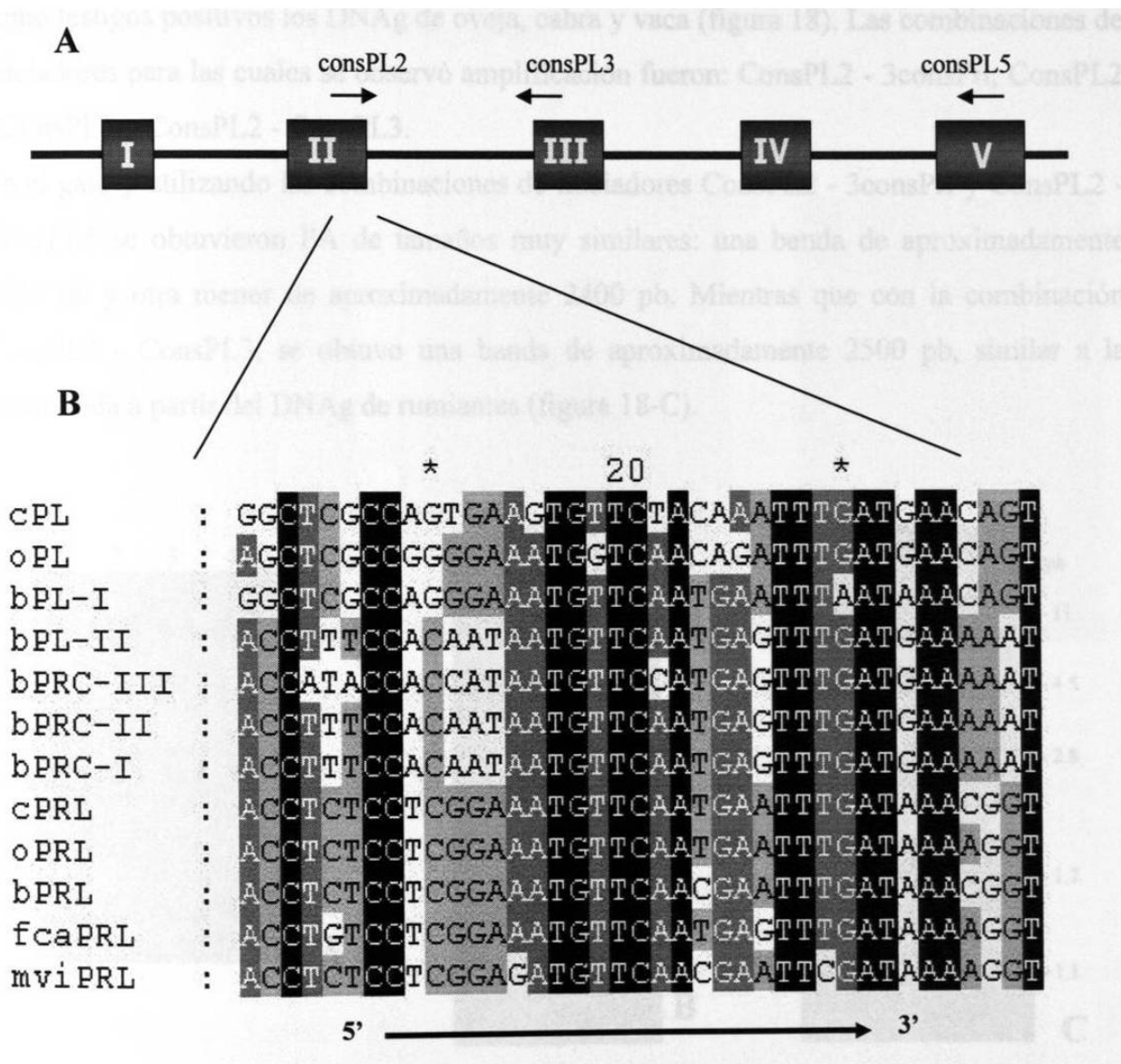
**Figura 16: Análisis del inserto de PL ovino.** Esquema representativo del inserto de la clona oarPL8, que corresponde al PL ovino, abarcando desde el exón IV hasta el exón V del gen. Se señalan los sitios de restricción analizados y extensión del inserto.

### 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:

- 5ConsPr1 (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.



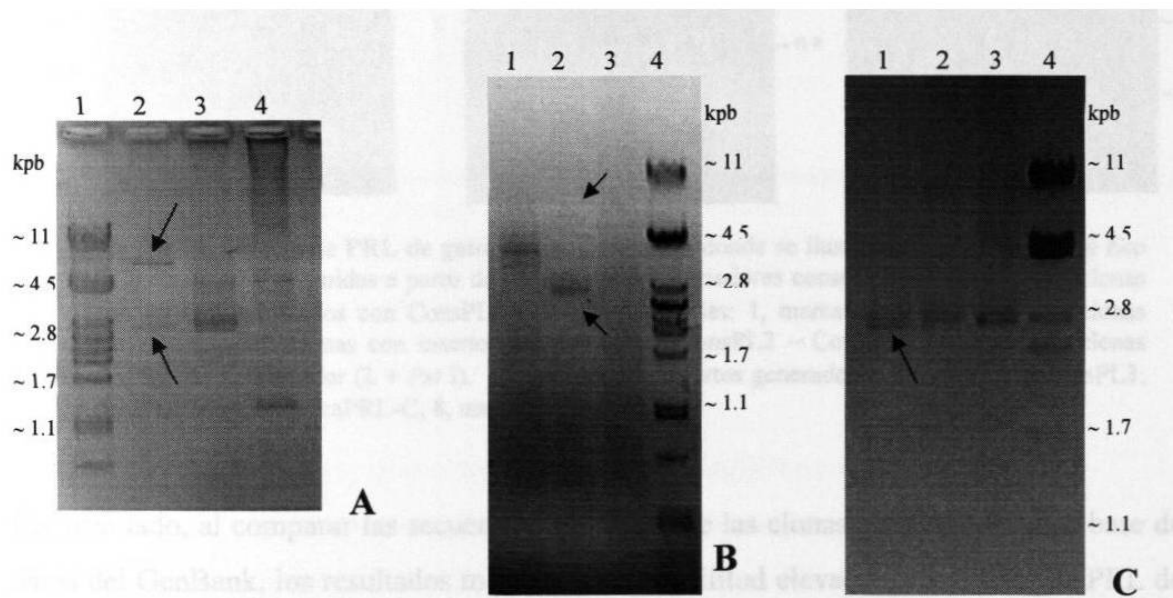
La secuencia de los iniciadores quedó como sigue:

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).

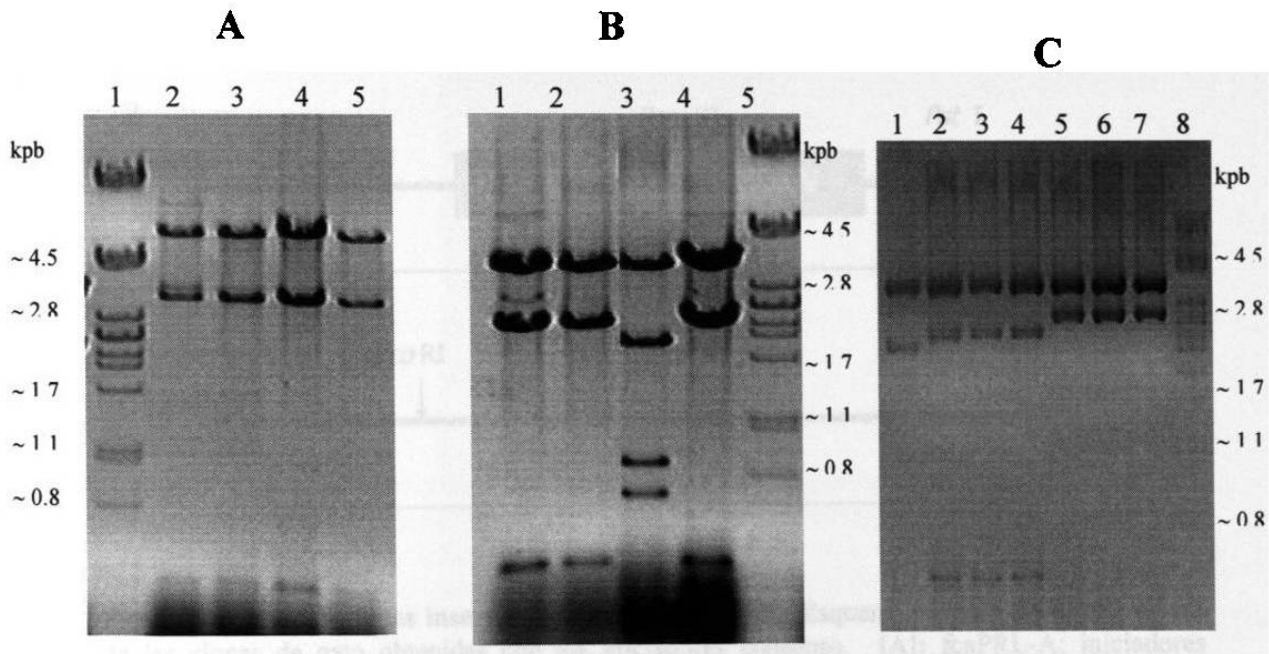


**Figura 18: Amplificación de los PRPs con los iniciadores consenso.** Geles de agarosa donde se ilustra la amplificación realizada con los iniciadores consenso a partir de DNAg de gato oveja y cabra. [A]: ConsPL2 - 3consPrI; carriles: 1, marcador ( $\lambda + Pst$  I); 2, gato; 3, oveja; 4, vaca. [B]: 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.

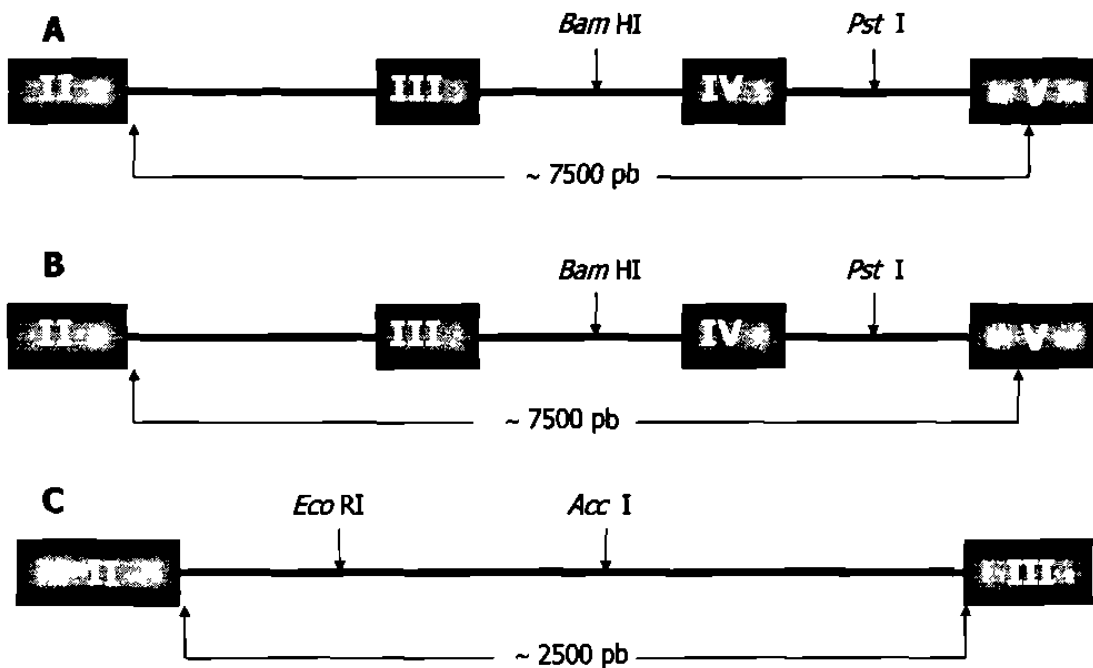
Las clonas fueron analizadas mediante cortes con enzimas de restricción, tomando como patrón positivo de PRL la reamplificación del gen de PRL (obtenido en un primer paso con iniciadores específicos). De esta manera se pudo evidenciar que los patrones de las clonas correspondían al obtenido para la PRL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

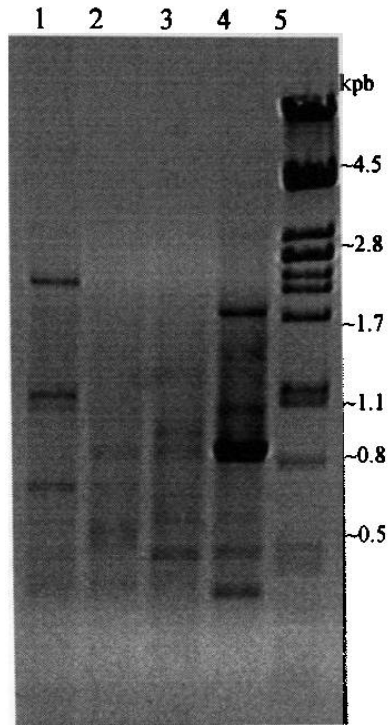


**Figura 20: Análisis de los insertos de las clonas fcaPRL.** Esquema representativo del inserto de las clonas de gato obtenidas con los iniciadores consenso. [A]: fcaPRL-A; iniciadores ConsPL2 - 3consPrI. [B]: fcaPRL-B; iniciadores ConsPL2 - ConsPL5. [C]: fcaPRL-C; iniciadores ConsPL2 - ConsPL3. Los 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

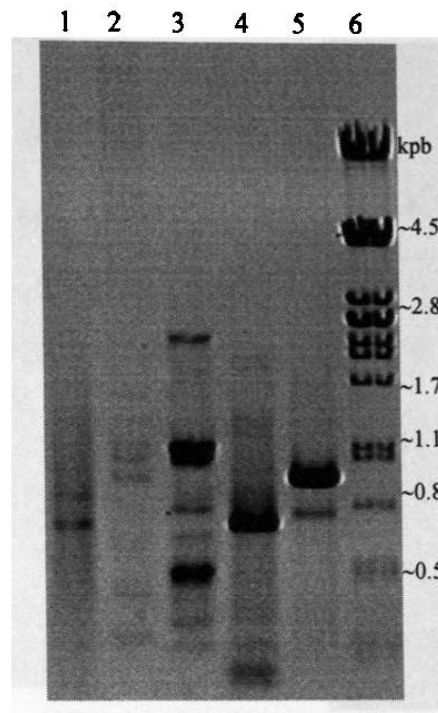
permitió eliminar los PA del gen de PRL que hubieran sido amplificados. Las combinaciones de iniciadores que fueron ensayadas fueron: ConsPL2 - 3consPrl y ConsPL2 - ConsPL5. Paralelamente, se amplificaron DNAg de gato y DNAg de león como patrón de comparación.



**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.

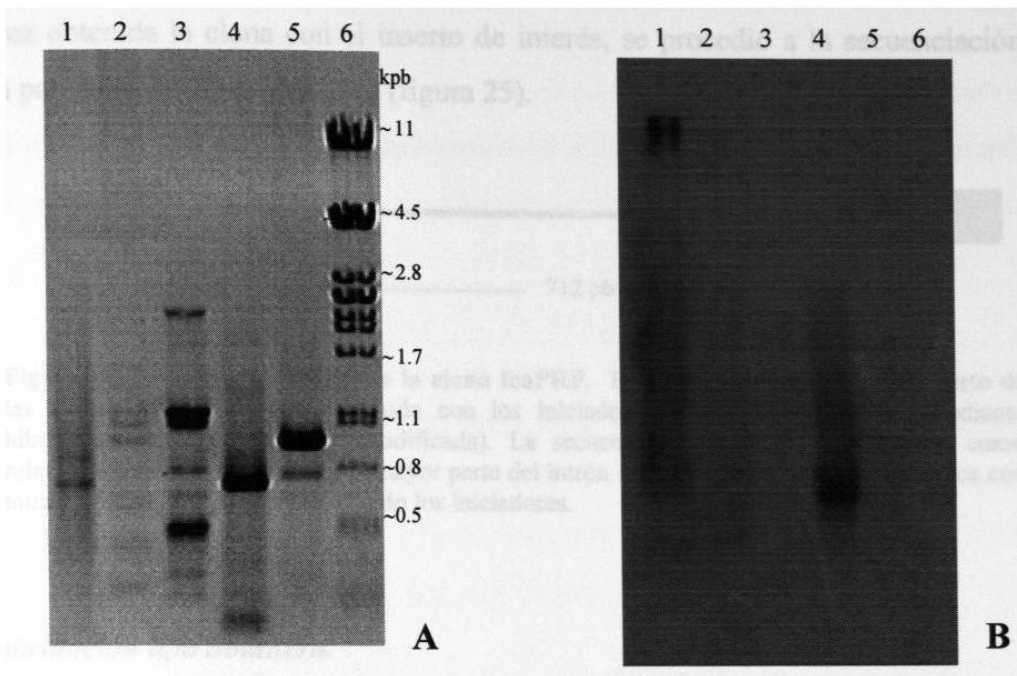
Los productos obtenidos en el apartado anterior fueron hibridados contra una sonda de PL ovino fijada en una membrana de nylon, según se detalla en la metodología. Una vez terminada la hibridación, los productos del eluido final fueron reamplificados con los mismos iniciadores consenso utilizados para 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 ( $\lambda$  + *Pst* I).

### 6.3.6 Identificación del producto reamplificado relacionado a PRL.

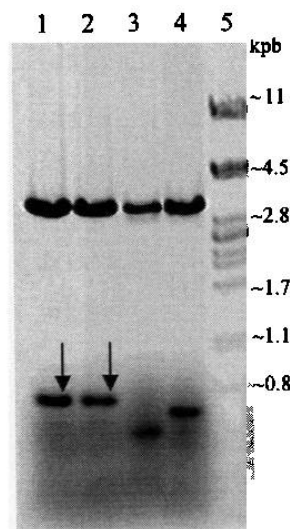
Debido a que resultó imposible evitar la generación de productos inespecíficos en la PCR aún en condiciones de alta astringencia, se realizó una hibridación radiactiva del gel con los productos reamplificados, utilizando como sonda el PL de ovino marcado. De esta manera, se pudo evidenciar la banda de 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.

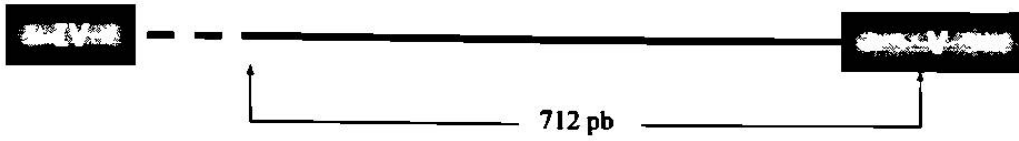
### 6.3.7 Clonación del producto reamplificado relacionado a PRL.

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 ( $\lambda$  + *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).

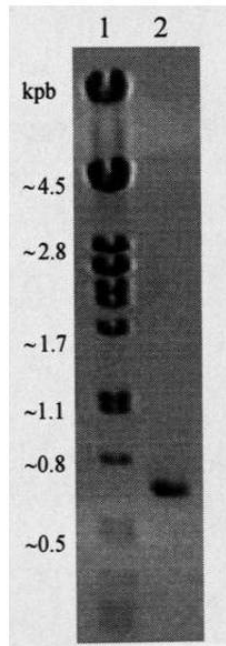


**Figura 25: Análisis del inserto de la clona fcaPRP.** Esquema representativo del inserto de las clonas fcaPRP de gato obtenido con los iniciadores ConsPL2 - ConsPL5, mediante hibridación inversa (estrategia modificada). La secuenciación permitió identificarlo como relacionado a PRL. Comprende la mayor 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.