

6.4.2 Hibridación del gel tipo Southern.

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

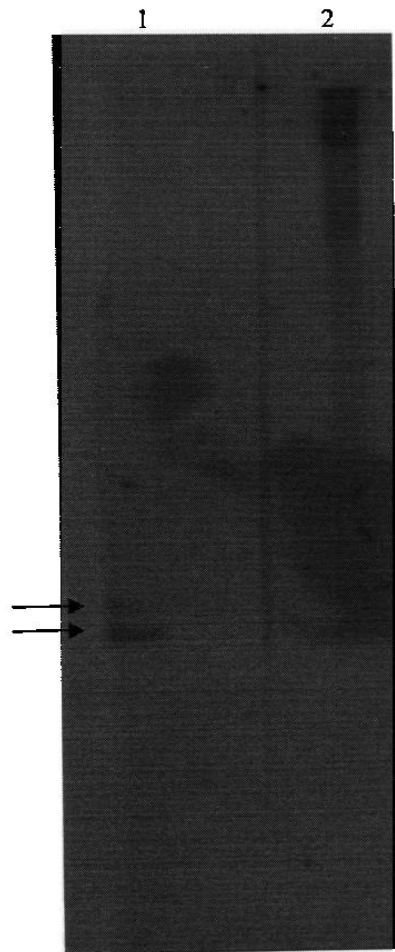


Figura 27: Hibridación tipo Southern. Autorradiografía del gel de hibridación tipo Southern realizada con DNAg de gato digerido con *Bam* HI e hibridado con sonda marcada de PRP de gato. Se observa la presencia de dos zonas de hibridación, la más baja muestra claramente una señal más fuerte que la superior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

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

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

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

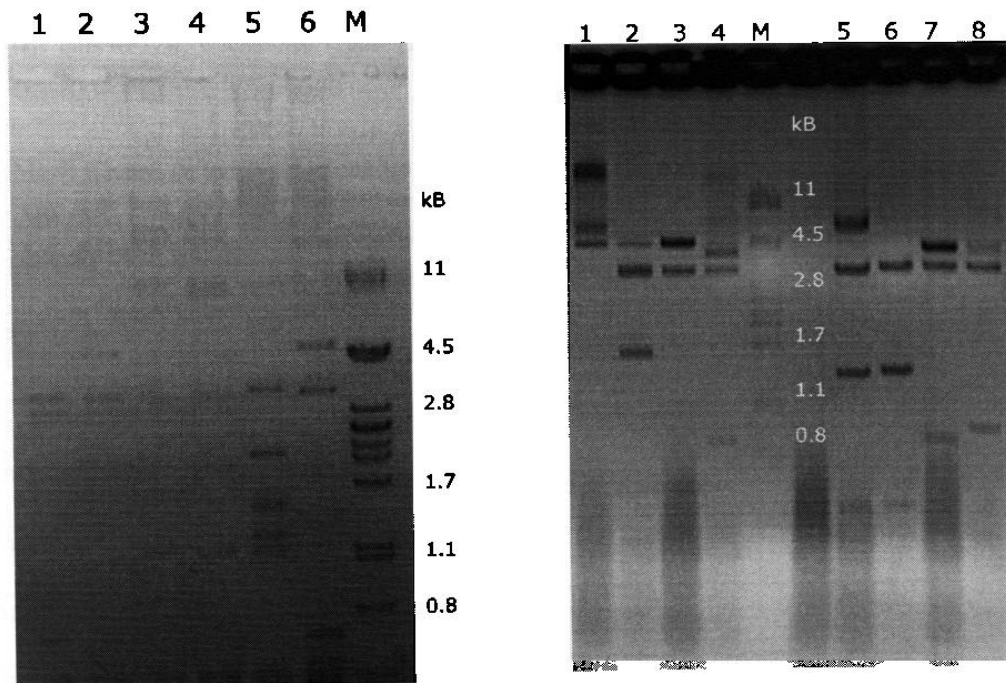


Figura 28: Clonas de PRPs de oveja y cabra. Geles de agarosa de las clonas de PRPs obtenidas a partir de DNAg de oveja y cabra y los iniciadores consenso. [A]: Clonas de oveja. Carriles: 1-2, oarPRL5 (digerida con *Eco* RI/*Acc* I y *Bam* HI/*Not* I, respectivamente); 3-4, oarPRL22 (digerida con *Eco*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

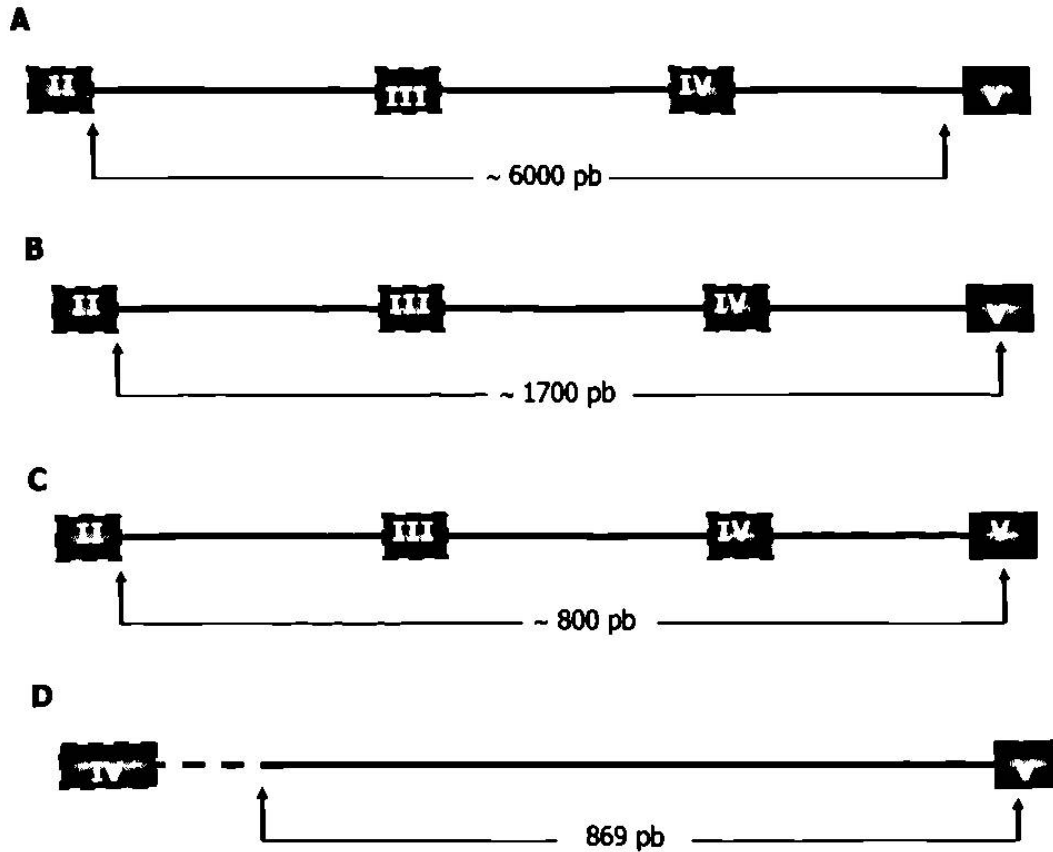


Figura 29: Análisis de los insertos de las clonas de oveja y cabra. Esquema representativo del inserto de las clonas de rumiantes obtenidos con los iniciadores consenso. [A]: oarPRL5; iniciadores ConsPL2 - ConsPL5. [B]: chiPRP66; iniciadores ConsPL2 - 3consPrl. [C]: chiPRP106; iniciadores ConsPL2 - 3ConsPrl.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

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

CLONA	PRIMERS	EXTENSIÓN*	GENOMA
fcaPRP1	consPL2 3consPrl		Gato
fcaPRL-A7	consPL2 3consPrl		Gato
fcaPRL-B8	consPL2 consPL5		Gato
fcaPRL-C4	consPL2 consPL3		Gato
chiPRP66	consPL2 3consPrl		Cabra
chiPRP106	consPL2 3consPrl		Cabra
chiPRP120	consPL2 3consPrl		Cabra
oarPRL5	consPL2 consPL5		Oveja
oarPL8	RumPlex4 3consPrl		Oveja

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

6.6 Análisis filogenético de los productos obtenidos.

6.6.1 Alineamiento nucleotídico de los extremos 3'.

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

6.6.2 Reconstrucción de los árboles filogenéticos de las secuencias nucleotídicas.

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

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

chiPRP106 : GGATGGAAGTGG--AAGGAAGAAAAGAGAAAGTTAAAACCTAACCT-----TGACTTATG
 chiPRP120 : GGATGAAAGTGG--AAGGAAGAAAAGAGAAAGTTAAAACCTAACCT-----TGACTTATG
 chiPRP66 : GGATGAGAGTGG-GAAEGAAGAAAAGAGAAAGTTAAAACCTAACCT-----TGAGTTATG
 btaPRC-I : GCAAGCAAGAGG-GAAGGAAGAAAAGAGAAAGTTAAAACCTGATCT-----TGAGTTCCA
 fcaPRP1 : GGATGAGAGGGG-GAAGGAAGAAAAGAGAAATTTAAAACCTAGACT-----GGAGTTA-G
 oarPL : GGATGAGAGTGG-AAAGGAAGGAAAGATAAAGTCAAACCAAACCTCGTACTTGAGTTCTG
 btaPRL : GGATGAGAATGA-GAAGCAAAGAAAAGAGAAGATCAAACCAAACCTACTTGAGTTCTG
 oarPRL5 : GGATGAGAGTGACGGAAAGAAAAGAGAAAGTCAAACCAAACCTAATACTTGAATTCTG
 fcaPRL7 : GCTTCATCTGTGATCAGATCCATGTTAGAAACCTACATC-----TGAATTCTG
 mviPRL : AGCTCATC-----ACCTACACATTAGGACACTCACACC-----TGAACCCTG
 ggaPRL : GCTTAGAAATTTTAAGCAATAACTGAAATATCTGGTGAAATT--CATTCAAATCTG

chiPRP106 : TTTCTACTTTTTA-----GATTCCTAATAGTTTCTCATAGGCTGGCTCCAAAA-----
 chiPRP120 : TTTCTACTTTTTA-----GATTCCTAATAGTTTCTCATAGGCTGGCTCCAAAA-----
 chiPRP66 : TTTCTACTTTTTA-----GATTACTAATAGTTTCTCATAGGCTGGCTCCAAAA-----
 btaPRC-I : TTTATACITTTTTA-----GATTTTTAATAGTTTCTCATAGGCTGGCTCCAAAA-----
 fcaPRP1 : TATCTACTTTTTCA-----GATTTCTAATAGTTTCTCATAGGCTGGCTCCAAAA-----
 oarPL : CTTCTTGATTTTTA-----GATTGCTAACAGATTTTCCATACACTGGCTCCAAA-----
 btaPRL : CTTT-AGTTTTTATTAATAAATTAACATATATCTGATACACTGGCTCCAAAA-----
 oarPRL5 : CTTTTAGTTTTTATTAATAAATTAACAGATATCTGATACACTAACTCTGAAA-----
 fcaPRL7 : CTTCTACTGCTCA-----GGCTATTAACAGACTCT-GATACACCAGCTCAGTACTCTAC
 mviPRL : CTTCTACTTTTTA-----GACTACGAATAGATTCCAGATACACTTGCTCAATAACCCAT
 ggaPRL : TTTGATGGTCTAAA-----GAAGCTCTTGCAGAACAAAAGGGAGACATAACAGGAA-----

chiPRP106 : -TTCATATCTAGAGAGTTTT-ATATTGGTGTCTTCCCCAAA-TCTTAATTTGATAATT
 chiPRP120 : -TTCATATCTAGAGAGTTTT-ATATTGGTGTCTTCCCCAAA-TCTTAATTTGATAATT
 chiPRP66 : -TCCATATCTAGAGAGTTTT-ATATTCATATGCTATCCCCAAA-TCTTAATTTGATAATT
 btaPRC-I : -TCCATATCTAGAGAGTTTT-ATAGTCATATGCTTCCCCAAA-TCTTTATTTGATAATT
 fcaPRP1 : -TCCATAGAGAGAGAGTTTT-ATATTCATATGCTTCCCCAAA-TCTTTGTTTGATAATT
 oarPL : -TCCATGCTAGAGAGTTTC-ATAA-----GTCTTCCCCAA--TCTTAATTTGATAATA
 btaPRL : -TCCAAGTGTAGAGACTTTC-ATGT-----ATCTTCCCTAAT-TTTTAATTTGATAAAT
 oarPRL5 : -TCCAAGTGTAGAGTCTTTC-CHGT-----ATCTTCCCCAAT-TACTAATTTGATAAAT
 fcaPRL7 : CCCTCCCTCTAGAGAGCATTGACGCTCATGCCTCTTCCCCAAA-TCTTCGTTTGACAATG
 mviPRL : GCCTCTGTCTAGAGAGCTTT-ATGTCCAGGCCTCTTGGCCCCAAA-TCTTAATTTGACAATT
 ggaPRL : -ACACTTTACAAGCTGTACCCTACTGACTAGTGTTCCTCAAGGTCAATATTTCTTAATT

chiPRP106 : AGAAGCAAAAAACATAAGCGAATACTAATAAAG-CACAGAAAAGTCATTATCTTTTGGG
 chiPRP120 : AGAAGCAAAAAACATAAGCGAATACTAATAAAG-CACAGAAAAGTCATTATCTTTTGGG
 chiPRP66 : AGAAGGAACAAAGATAAGCAAATCTAATAAAA-CACATAAGAAGTC-TTATCTTTTGGG
 btaPRC-I : AGAAGAAAAAAGATAAGCAAATTTAATAAAA-TGCATAAGAAGTCATTATCATTTGGG
 fcaPRP1 : AGAAGAACAAGATAAGCAAATACTAGTAAAA-CGCATAAGAAGTCATTATCATTTGGG
 oarPL : AGAGGGAACAAAGAAGAGCAAATACTAATAAAA-CTCATAA-AATTCATTATCTTTTGGG
 btaPRL : AGAAAGAACAAGATGAGCTAATACTACTAAAA-CTCATAAATAACTCATTATCTTTTGGG
 oarPRL5 : AGAAAGAACAAGATGAGCAAATACTACTAAAA-CTCATAACAATTCATTATCTTTTGGG
 fcaPRL7 : GGAAGGAACGCAGACAAGCGACTACTAGTAATA-CT-----AAGTGGCTATCTTTTGGG
 mviPRL : AGCAGGAACCAAGATACECACAAAGAGTAATG-CT-----AAGTCACTATCTTTTCCG
 ggaPRL : CTCTCTTCTACACCCAGACAGAT-TGACTATCATCTCTTACTGTATGATTATGTCTC---

```

chiPRP106 : TATTCAGATTATTTTCCAGTAAGGTGGAAGATGTACAAGGCTTGCATTTACTGGTCAGG
chiPRP120 : TATTCAGATTATTTTCCAGTAAGGTGGAAGATGTACAAGGCTTGCATTTACTGGTCAGG
chiPRP66  : TGTTCAGATGATTATTCAGCAATGCAGAAGATGTTGGAGGCTCATATTTACTGGTCAGG
btaPRC-I  : TATTCAGATTATTTGTTCCAGTCTTGAATACGATGATCCAGGCTCGCAGTAGCTGGACAGG
fcaPRP1   : TATTTAGATTATTTGCTCCGCCATGAAGATGATTCGCAATGCTCCAGAGTCTGGTCAGA
oarPL     : TGCTTAGAT--TCATCCTGG-----AGAGAAGAACGACCCCTATCCAGTGTGGTCAGA
btaPRL    : TGTTTAGGG-GTTATTCTCGAGCCAAAGAGAC---TGAGCCCTACCCCTGTGTGGTCAGG
oarPRL5   : TGCTTAG---GTTATTCTCGAGCCAAAGAGAC---TGAGCCCTACCCCTGTGTGGTCAGG
fcaPRL7   : TGACTAGGT--TCATCCCAGTCCAGTCCAGAGAAAAC---GAGGTCTACTCCGTCTGGTCCGG
mviPRL    : CGATTAGGT--TCATCCTGAGTCCAGTCCAGAGAAAAC---GAGGTTTACTCCGTCTGGTCCGG
ggaPRL    : --TCTAGGT--TCATTCTGCTGATGCTGGAAAT---GAAATTTACTCTCACTGGGACGG
    
```



```

chiPRP106 : ACTCCCATCCCTGATGTCCAGAGATGAAGATGTGAGTCATTCTGCATTTGATTAACCTGT
chiPRP120 : ACTCCCATCCCTGATGTCCAGAGATGAAGATGTGAGTCATTCTGCATTTGATTAACCTGT
chiPRP66  : ACTCCCATCCCTGATGTCCAGCGATGAAGATGTGGTTCATTCTGAATTTTAT-AACCTGT
btaPRC-I  : ACTCCCATCCCTAATGTCCAGCGATGAAGATAGGGTTCATTCTGAAATTTTAT-AACCTGT
fcaPRP1   : TGTCGGATATGTEAAGTCCAGTGAAGATAGGGTTCATTCTGAATTTGATTAACCTGC
oarPL     : ACAGTCTCTCCCTGCATCACAGGATGAGAATGTGGCCGAGTTGCTTTTTTAT-AGACTGT
btaPRL    : ACTCCCGTCCCTGCAACTAAGGATGAAGATGCACGTTATTCTGCTTTTTTAT-AACCTGC
oarPRL5   : ACTCCCATCCCTGCAACTAAGGATGAAGATGCACGTCATTCTGCTTTTTTAC-AACCTGC
fcaPRL7   : ACTCCCGTCCCTGCAGATGGCTGATGAAGACTCTCGCCTCTTTGCTTTTTTAT-AACCTGC
mviPRL    : ACTTCCATCTCTGCAGATGGCTGATGAAGACTCACGCCTTTTTGCTTTTTTAT-AACCTGC
ggaPRL    : CCTTCCATCCCTGCAACTCGCTGATGAGGACTCCAGACTCTTTGCTTTTTTAT-AACCTGC
    
```

```

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

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

Arboles filogenéticos de las secuencias nucleotídicas. Reconstrucción de los árboles filogenéticos a partir de las secuencias nucleotídicas de los extremos 3' de los genes obtenidos. (A): árbol filogenético generado a partir de las secuencias del extremo 3' (intrón 4 - exón 5); se incluyeron los valores de bootstrap en cada rama correspondiente. (B): árbol filogenético generado a partir de las secuencias de la mitad del exón 5 de cada uno de los genes. Se incluyeron más órdenes de comparación. Se muestra en negrita la clona obtenida en este trabajo, subrayada la clona de PRP de gato. Fue utilizado el programa de máxima parsimonia del paquete PHYLIP.

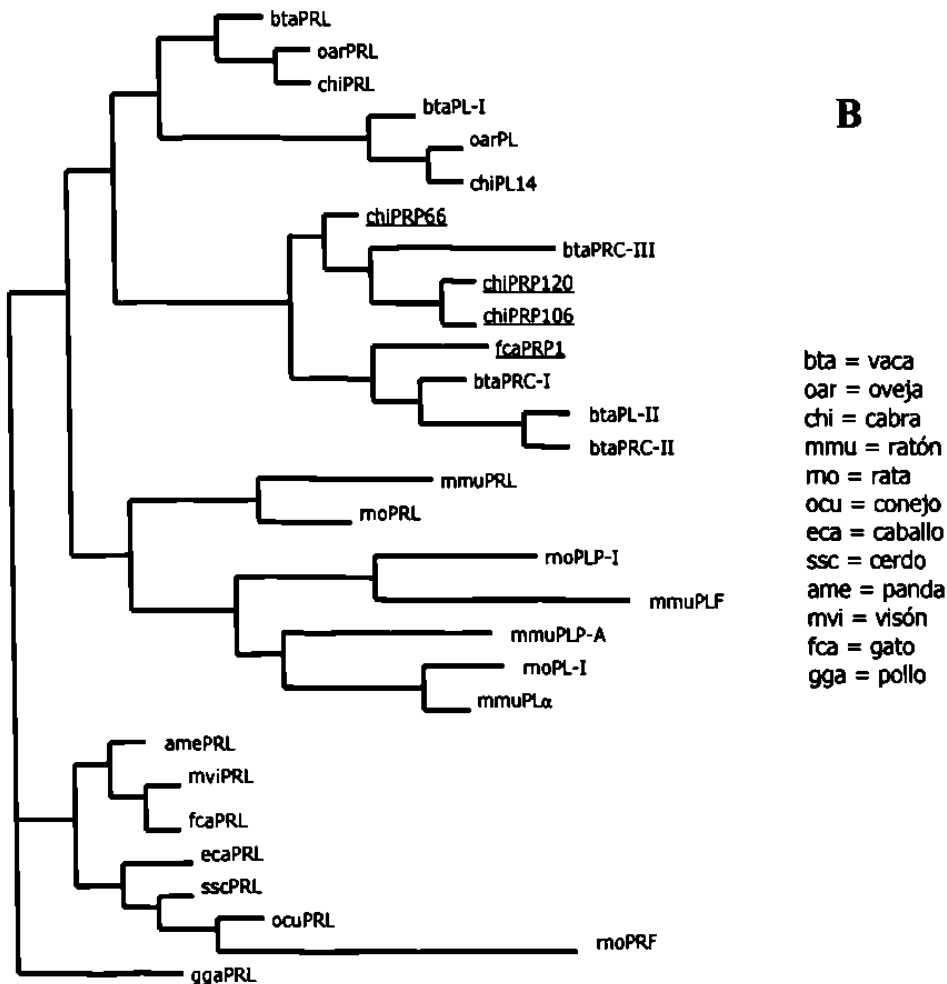
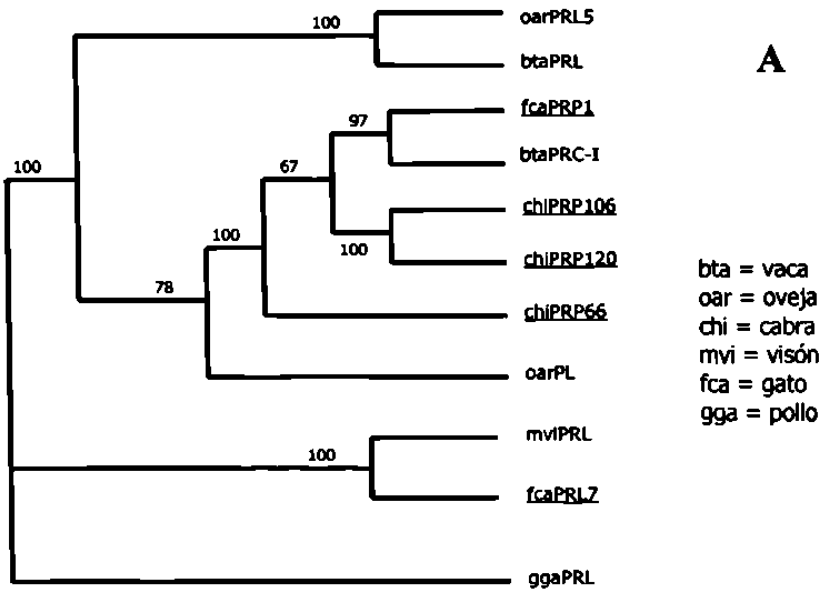


Figura 31: Árboles filogenéticos de las secuencias nucleotídicas. Reconstrucción de los árboles filogenéticos a partir de las secuencias nucleotídicas de los extremos 3' de los genes obtenidos. [A]: Árbol generado a partir de las secuencias del extremo 3' (intrón 4 - exón 5); se incluyen los valores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

6.6.3 Alineamiento aminoacídico de los exones 5.

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

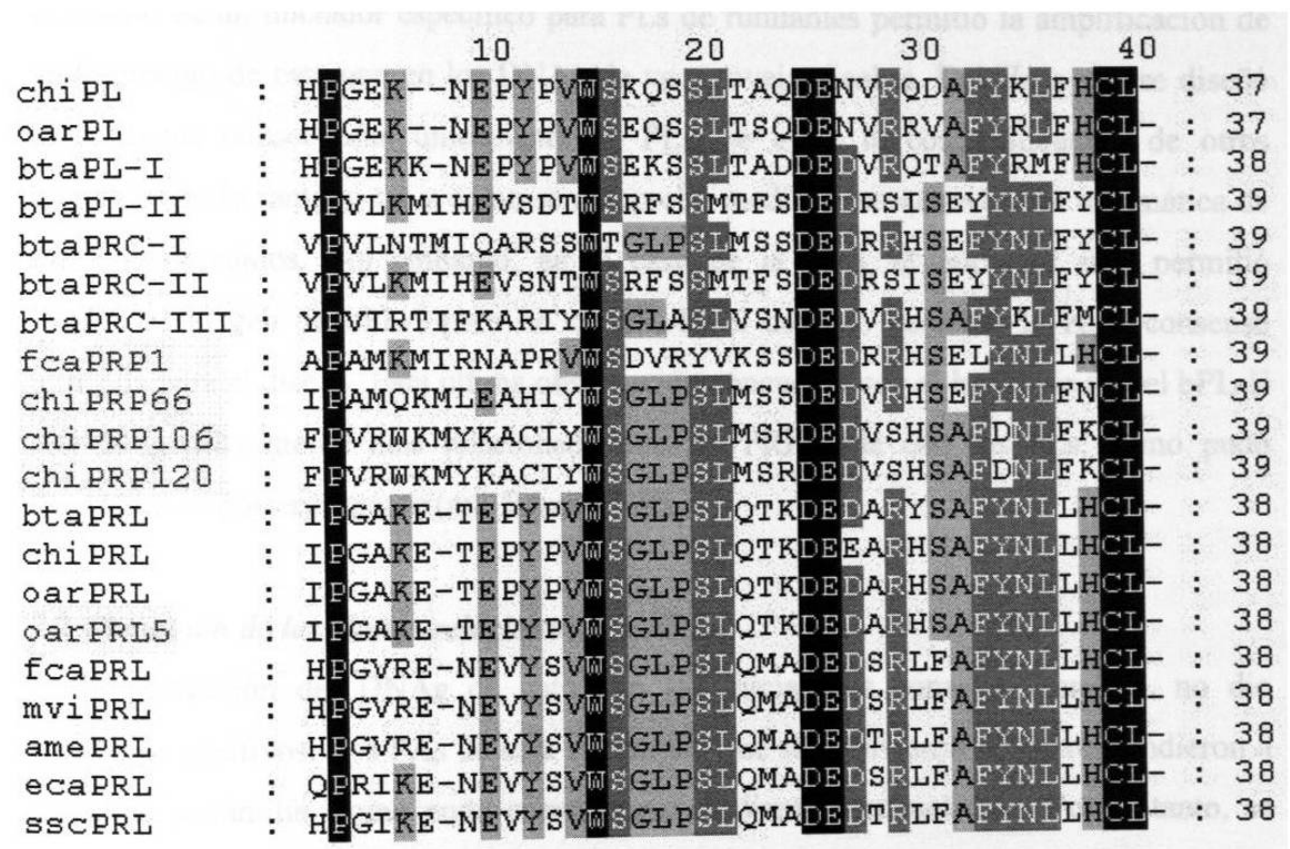


Figura 32: Alineamiento aminoacídico de las secuencias obtenidas. Ilustración del alineamiento de las secuencias aminoacídicas correspondientes a los fragmentos del exón 5 de las clonas de gato, cabra y oveja. Se observan zonas muy conservadas en todas las secuencias así como cambios específicos del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

CAPÍTULO VII

DISCUSIÓN

7.1 Obtención de la clona de PL ovino.

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

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

7.2 Obtención de las clonas relacionadas a PRL.

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

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

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

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

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

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

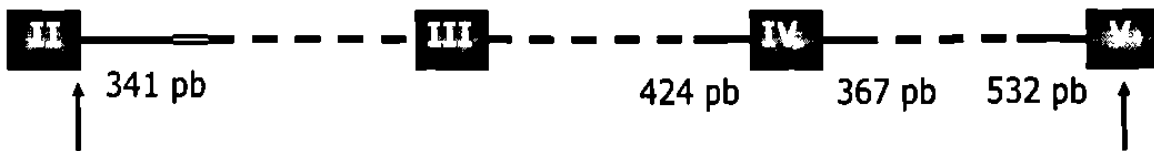
7.2.2 Clonas relacionadas a PRL en el gato.

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

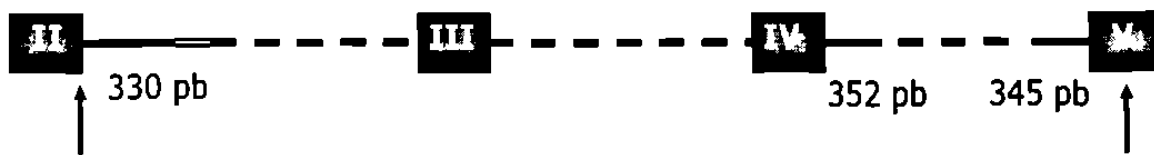
inicio del intrón 2 hasta la mitad del exón 5, mientras que el inserto pequeño únicamente comprendía el intrón 2 en su totalidad. Se secuenciaron los extremos de cada uno de los insertos, así como fragmentos de los intrones flanqueantes al exón 4 en las clonas más grandes.

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

fcaPRL-A7



fcaPRL-B8



fcaPRL-C4

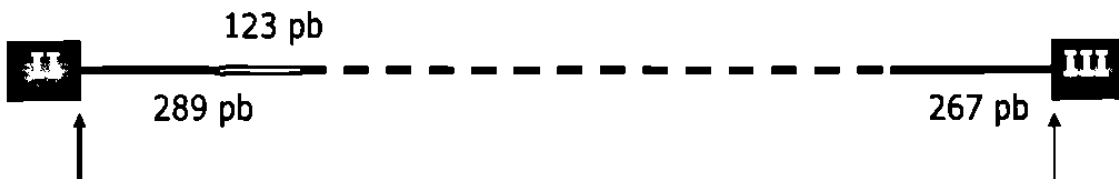


Figura 33: Secuenciación de las clonas fcaPRL. Se esquematiza la extensión de los insertos, limitados por las flechas, de los tres tipos de clonas obtenidas mediante clonación directa del producto de PCR. Las líneas continuas indican el avance de la secuenciación de las mismas, cuya identidad con la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

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

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

7.2.3 Clonas relacionadas a PRL en cabra y oveja.

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

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

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

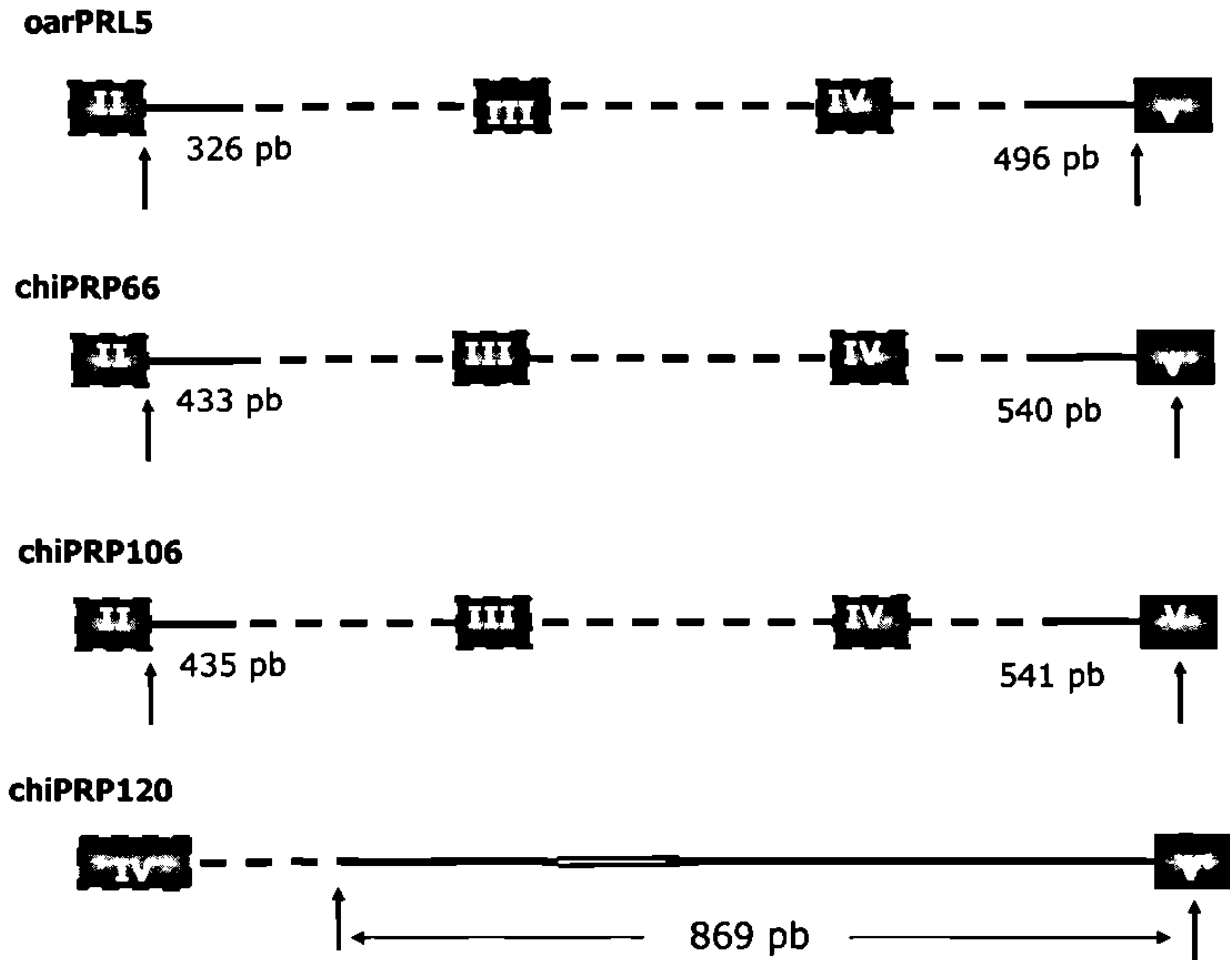


Figura 34: Secuenciación de las clonas relacionadas a PRL de rumiantes. Se esquematiza la extensión de los insertos, limitados por las flechas, de los cuatro tipos de clonas obtenidas mediante clonación directa del producto de PCR. Las líneas continuas indica el avance de la secuenciación de las mismas.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

7.3 Elementos repetitivos en la familia GH/PRL.

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

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

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

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

7.4 Hibridación tipo Southern.

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

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

7.5 Alineamiento nucleotídico y aminoacídico de las secuencias obtenidas.

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

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

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

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

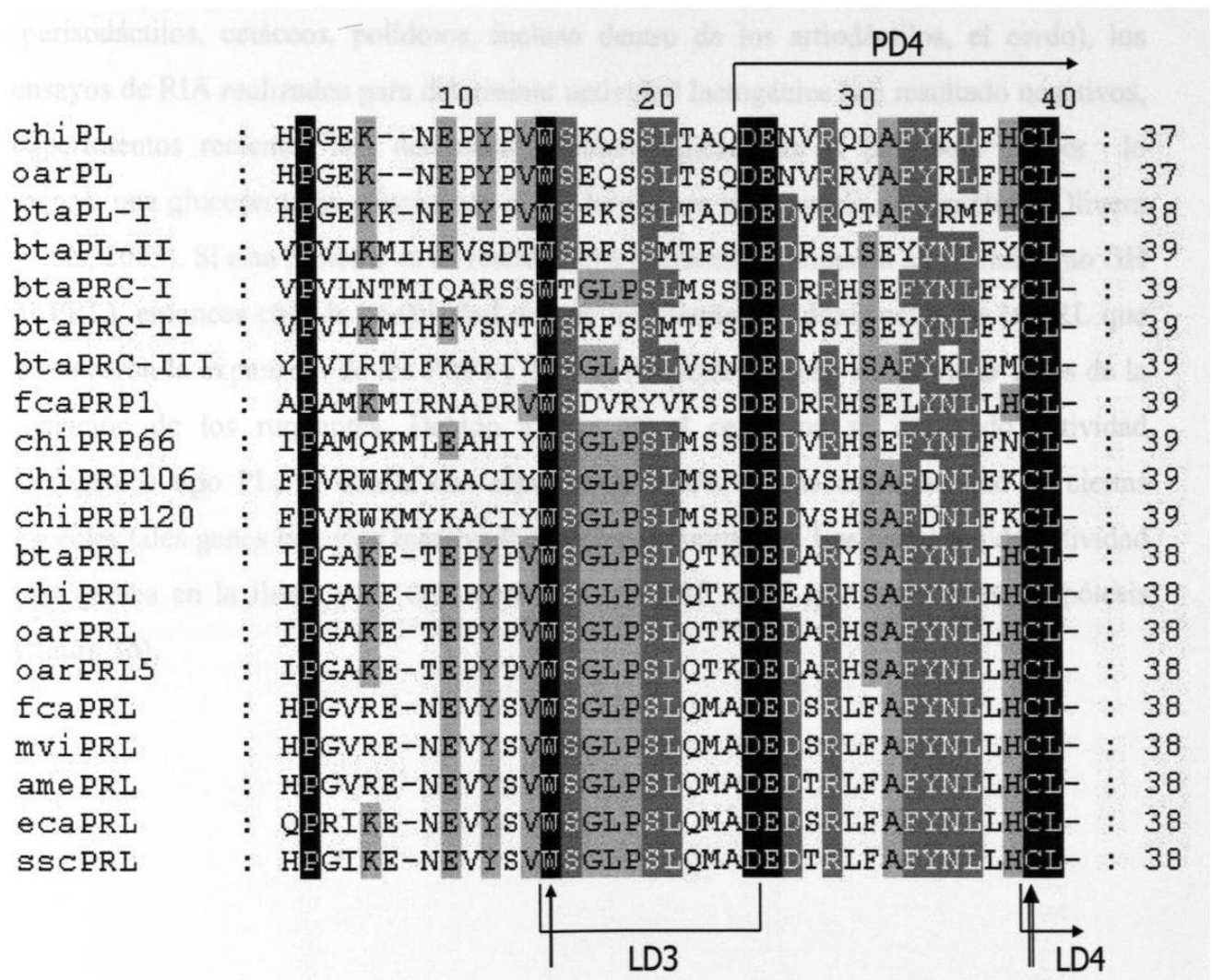


Figura 35: Cambios aminoacídicos de la PRP de gato. Los recuadros indican las zonas comprendidas dentro de los dominios proteínicos conservados (PD4: dominio prolactínico 4; LD3: dominio lactogénico 3; LD4: dominio lactogénico 4) de las hormonas, necesarios para su unión con el receptor y/o actividad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

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

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

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

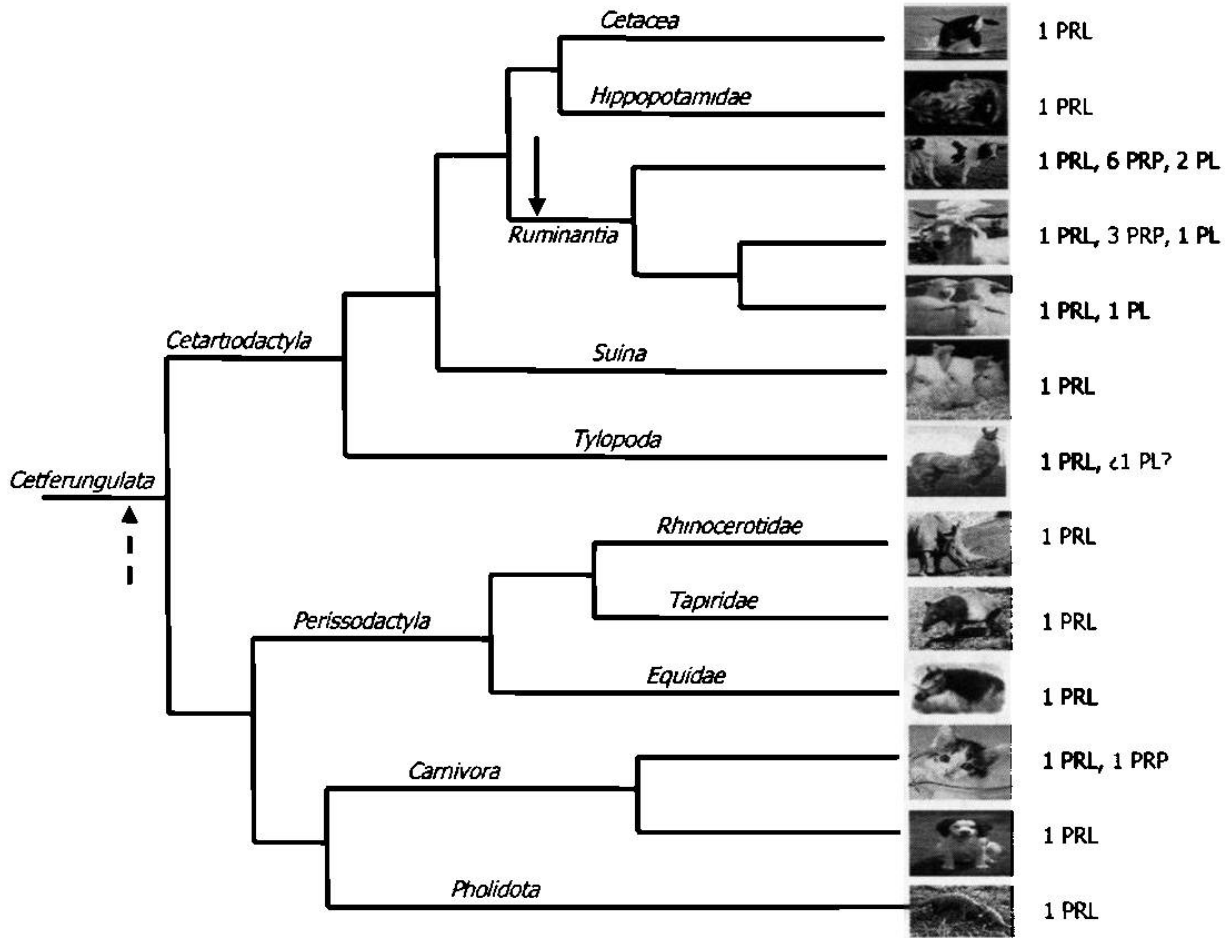


Figura 36: Hipótesis del inicio de la expansión de los genes relacionados a PRL en el superorden *Cetferungulata*. Se indican sobre las ramas del árbol los órdenes y subórdenes respectivos. A la derecha se enlistan: en negro los genes de la familia reportados hasta la fecha para la especie respectiva;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

CAPÍTULO VIII

CONCLUSIONES

Este trabajo permitió concluir lo siguiente:

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

CAPÍTULO IX

BIBLIOGRAFÍA

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

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

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

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



