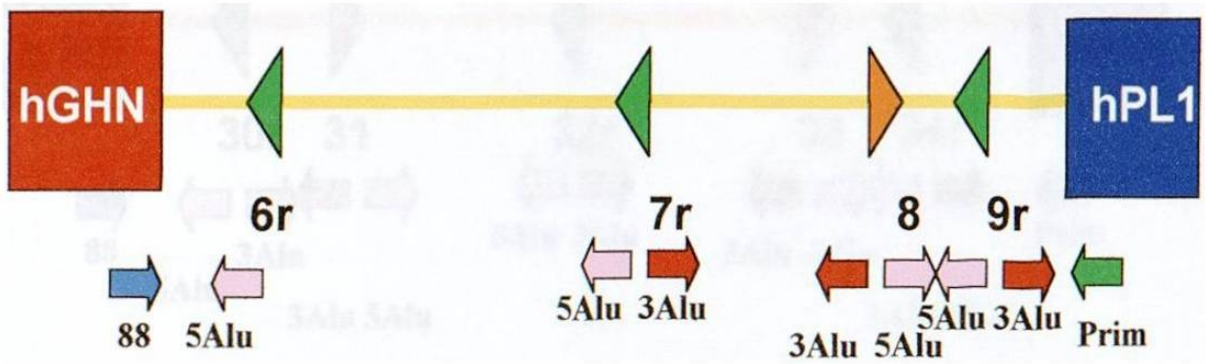
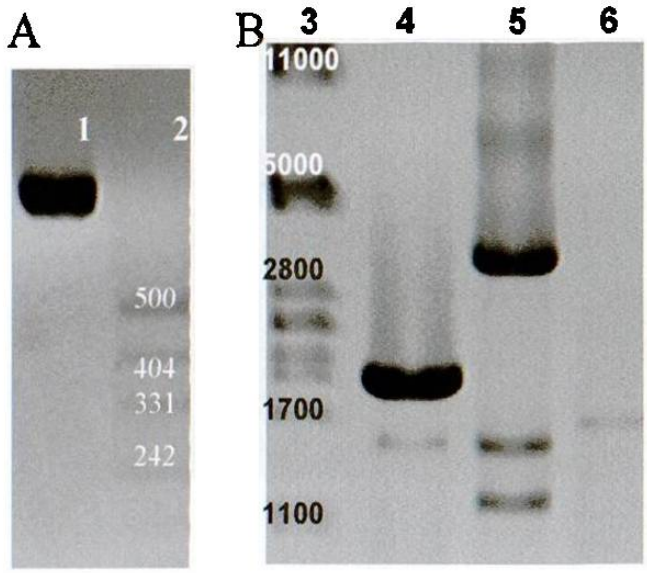
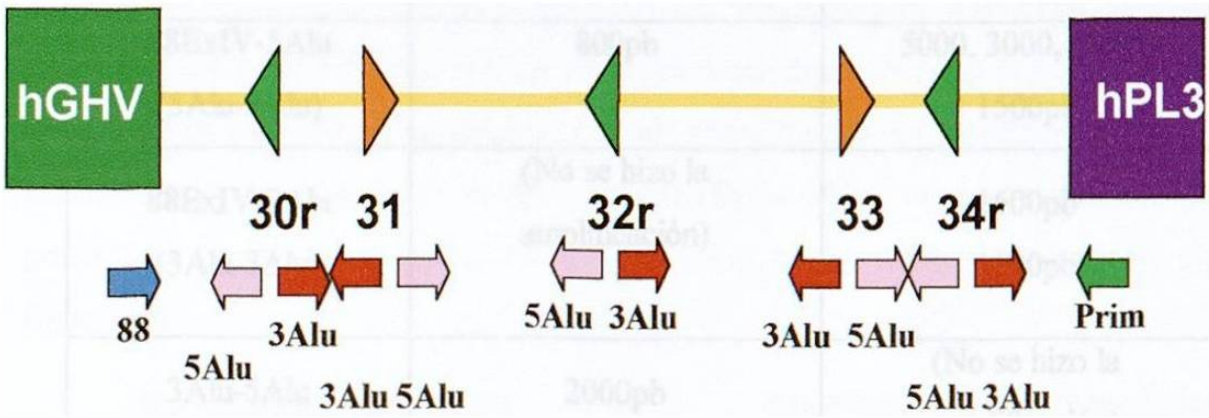
4 iniciadores antes mencionados. Estas amplificaciones se realizaron también sobre las clonas tipo I y II. En estas figuras (31 y 32) se muestran los geles que contienen los resultados de dichas amplificaciones, para ambas clonas.

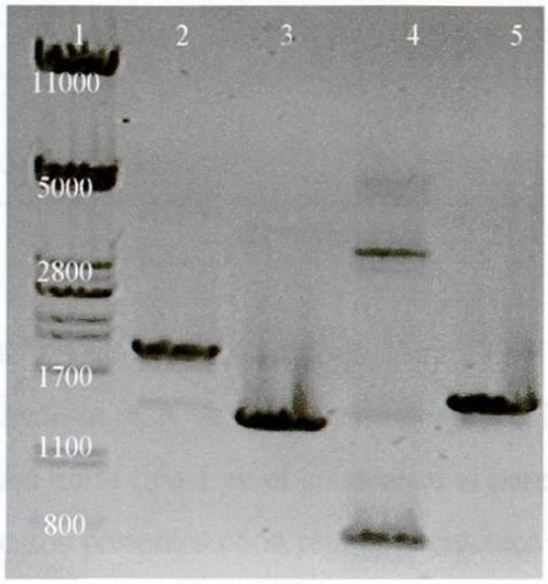




1. 88ExIV-5Alu
2. Marcador PM, pUC + *Msp I*, pb
3. Marcador PM, λ + *Pst*I, pb
4. 3Alu-5Alu
5. 3Alu-Prim
6. 5Alu-Prim

Figura 31. Análisis de la distribución de los elementos Alu en la clona tipo I. Se muestra la localización de los elementos Alu (6r, 7r, 8 y 9r) y los sitios de alineamineto de los iniciadores 88, 5Alu, 3Alu, y Prim, sobre la intergénica corta humana No. 1. También se analizaron en un gel de agarosa al 2% (A) y en otro al 0.8% (B) los productos amplificados a partir de la clona IntCch1, utilizando los juegos de iniciadores 88ExIV-5Alu (carril 1), 3Alu-5Alu (carril 4), 3Alu-Prim (carril 5) y 5Alu-Prim (carril 6), para conocer la distribución de elementos Alu en la intergénica corta tipo I del chimpancé.





1. Marcador PM, λ + *Pst*I, pb
2. 5Alu-Prim
3. 3Alu-Prim
4. 88ExIV-5Alu
5. 88-ExIV-3Alu

Figura 32. Análisis de la distribución de los elementos Alu en la clona tipo II. Se muestra dónde están localizados los elementos Alu (30r, 31, 32r, 33, 34r) y los sitios de alineamineto de los iniciadores 88, 5Alu, 3Alu, y Prim sobre la intergénica corta humana No. 2. Los productos amplificados a partir de la clona IntCch2 utilizando los iniciadores 5Alu-Prim (carril 2), 3Alu-Prim (carril 3), 88ExIV-5Alu (carril 4) y 88ExIV-3Alu (carril 5) se analizaron en un gel de agarosa al 1.2%.

También en la tabla 12 se hace un resumen de los tamaños de las bandas obtenidas para cada juego de iniciadores en ambas clonas: tipo I y II.

Tabla 12. Comparación de los productos obtenidos con las clonas tipo I y II.

Iniciadores	Bandas obtenidas con la clona tipo I	Bandas obtenidas con la clona tipo II
88ExIV-5Alu (5Alu-5Alu)	800pb	5000, 3000, 800pb 1500pb
88ExIV-3Alu (3Alu-3Alu)	(No se hizo la amplificación)	1600pb 1500pb
3Alu-5Alu (3Alu-3Alu)	2000pb 1600pb	(No se hizo la amplificación)
3Alu-Prim (3Alu-3Alu)	3600, 1200pb 1600pb	3700, 1500pb 3700, 1500pb
5Alu-Prim (5Alu-5Alu)	1770pb	2000pb 1500pb

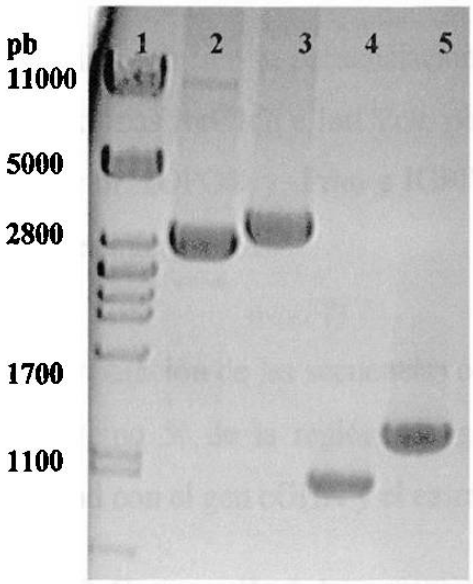
Al hacer las amplificaciones sobre la clona tipo I se obtuvieron todas las bandas que dio como resultado la PCR virtual con la intergénica humana corta número 1. Esto indicó que la intergénica corta tipo I en el chimpancé al parecer posee 4 elementos Alu homólogos a los 4 elementos presentes en la región intergénica corta humana no. 1 (6r, 7r, 8 y 9r). Por otro lado, y como se observa, para la clona tipo II se obtuvieron los productos que se esperaban según la PCR virtual de la región intergénica humana número 2. Según parece, la región intergénica corta tipo II del chimpancé tiene 5 elementos Alu que corresponden a los elementos 30r, 31, 32r, 33 y 34r de la región intergénica corta número 2 del humano.

5.10 Identificación de la secuencia Kpn en el locus GH-PL del chimpancé.

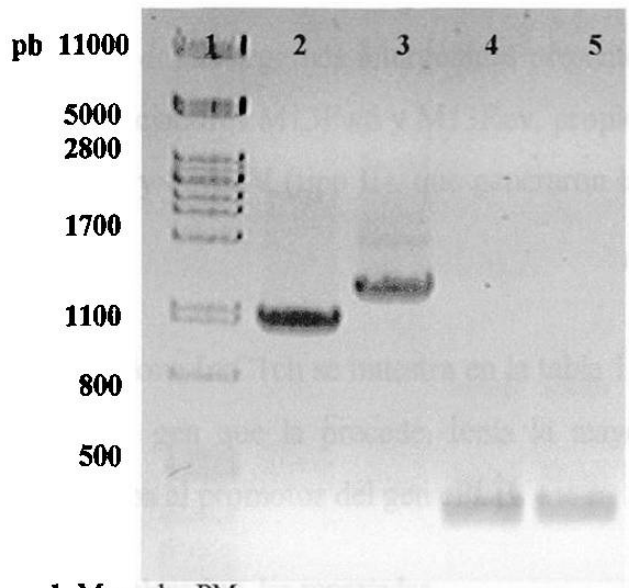
El elemento repetitivo Kpn es una secuencia que se encuentra en la región intergénica corta 2 en el locus GH-PL humano. Esta inserción de 200pb se puede evidenciar en el ser

humano por medio de PCR, al amplificar los promotores distales y medio de los genes hPL3 y hPL1.

Al realizar la PCR sobre las clonas tipo I y II con los iniciadores 5Ed1-Prim, 5Ed2-Prim y 430-Prim, que amplifican respectivamente el promotor distal, medio y proximal, se observó una inserción que pudiera corresponder al elemento Kpn en las amplificaciones para los promotores distal y medio de la clona tipo II (figura 33). También se observó que los promotores proximales de ambas clonas (430-Prim) no mostraban diferencias de tamaño (figura 33).



1. Marcador PM
2. Amplificación 5Ed1-Prim Clona Tipo I
3. Amplificación 5Ed1-Prim Clona Tipo II
4. Amplificación 5Ed2-Prim Clona Tipo I



1. Marcador PM
2. Amplificación 5Ed2-Prim Clona Tipo I
3. Amplificación 5Ed2-Prim Clona Tipo II
4. Amplificación 403-Prim Clona Tipo I
5. Amplificación 403-Prim Clona Tipo II

Figura 33. Amplificaciones de los promotores distal, medio y proximal. En la figura se muestran las bandas resultantes de la amplificación del promotor distal (5Ed1-Prim), medio (5Ed2-Prim) y proximal (403-Prim). Se puede observar una inserción de unos 200pb en el promotor distal y medio de la clona tipo II, con respecto a la clona tipo I. Las bandas se resolvieron en geles de agarosa al 1 y 1.8%, respectivamente.

Una vez que se detectó la presencia de una inserción en la clona tipo II, cuyo tamaño aproximado era de 200pb, se procedió a secuenciar el promotor medio de esta clona para comprobar si la inserción correspondía al elemento Kpn que se encuentra en el caso del locus humano.

Las secuencias obtenidas se compararon entre sí, y con las secuencias reportadas para el locus humano, mediante los programas BLAST y ClustalW. Este análisis corroboró que la clona tipo II contiene una inserción de aproximadamente 200pb (ver Anexo 1), correspondiente al elemento Kpn. Esta secuencia Kpn del chimpancé tiene un 96-97% de similitud con el elemento repetitivo Kpn que se encuentra en el locus GH-PL humano, según los datos arrojados por los programas antes mencionados.

5.11 Orden de las regiones intergénicas tipo I y II en el locus GH-PL del chimpancé.

Se realizó también la secuenciación de los extremos de las regiones intergénicas presentes en las clonas IntC1ch e IntC2ch, por medio de los iniciadores M13Fwd y M13Rev, propios del vector TOPO® y Prim e IGPIV (tipo I) o Prim y 88ExIV (tipo II), que generaron las regiones intergénicas.

La comparación de las secuencias obtenidas para la clona IntC1ch se muestra en la tabla 13. El extremo 5' de la región intergénica, es decir el gen que la precede, tenía la mayor similitud con el gen cGHN y el extremo 3' representaba al promotor del gen cPLB.

Tabla 13. Comparación de las secuencias obtenidas para la clona I vs. las reportadas.

Gen	Final del gen	Promotor
cGHN	**98%**	95%
cGHV	93%	93%
cPLC	91%	93%
cPLB	92%	**97%**
cPLA	91%	90%
cPLD	92%	93%

En resumen, la región intergénica corta tipo I del chimpancé está precedida por el gen cGHN y es seguida por el gen cPLB.

Así mismo, la comparación de las secuencias obtenidas para la clona IntC2ch se muestran en la tabla 14. El extremo 5' de la región intergénica, correspondía al gen cGHV y el extremo 3', representaba al promotor del gen cPLD.

Tabla 14. Comparación de las secuencias obtenidas con la clona II vs. las reportadas.

Gen	Final del gen	Promotor
cGHV	**99%**	91%
cGHN	92%	88%
cPLC	89%	94%
cPLB	90%	91%
cPLD	89%	**99%**
cPLA	89%	92%

Por tanto, la región intergénica corta tipo II del chimpancé está precedida por el gen cGHV y es seguida por el gen cPLD.

CAPÍTULO SEXTO

DISCUSIÓN

El estudio de los genomas de diferentes especies y su comparación, da información acerca de la historia evolutiva de los seres vivos. Al analizar ciertas regiones génicas de otras especies y compararlas con regiones del genoma humano, que es el más ampliamente estudiado, se pueden hacer modelos que permitan explicar cómo han cambiado durante la evolución, los distintos genomas de las especies que conocemos hoy en día.

El hombre pertenece al orden de los primates y en este grupo se encuentran los organismos cuyos genomas son, evolutivamente hablando, los más cercanos o parecidos al humano. Por ejemplo, hay estudios que han registrado hasta un 99.4% de semejanza en ciertos sitios de los genomas del humano y del chimpancé.

Una de las formas en que se han estudiado los genomas es a través de las familias multigénicas, las cuales están constituidas por grupos de genes que comparten un ancestro común y que se distribuyen a lo largo de los genomas. Los distintos genes de estas familias pueden estar distribuidos en sitios tan lejanos que se presentan hasta en cromosomas distintos. En otros casos, los genes pertenecientes a estas familias se encuentran en sitios muy cercanos, formando grupos o locus, lo que indicaría que su evolución es más reciente.

La familia multigénica GH-PRL incluye varios miembros, como el gen de la GH y el de la PRL, que se encuentran en los genomas de vertebrados tan distintos al ser humano como los peces. El locus GH-PL forma también parte de esta familia multigénica. Esta región presenta en los primates un gran dinamismo, y permite hacer estudios evolutivos muy interesantes, que llevarán a una mejor comprensión de los fenómenos que dieron origen al genoma humano.

Las secuencias génicas de los seis miembros del locus GH-PL del chimpancé han sido reportadas y se han comparado con las de los cinco genes que forman el locus humano (Revol y col., 2004). Aunque el locus humano ha sido ampliamente estudiado, las teorías que han surgido en cuanto a su formación no son todavía definitivas.

Este trabajo se realizó con el objeto de tener mayor información acerca del locus en el chimpancé (*Pan troglodytes*), que permitiera explicar de una manera más precisa y completa los sucesos evolutivos que llevaron a la evolución del locus GH entre los grandes monos y el ser humano.

6.1 Las regiones intergénicas del locus GH-PL del chimpancé

Se obtuvieron cinco regiones intergénicas para el locus del chimpancé, dos cortas (de aprox. 6000pb) y tres largas (de unos 8, 10 y entre 12 y 13kb, respectivamente). En comparación, el locus humano presenta también dos regiones intergénicas cortas de tamaño similar, pero en el caso de las regiones largas el genoma humano posee sólo dos regiones intergénicas largas de aproximadamente 13kb cada una.

La amplificación de las regiones intergénicas no ocurrió con igual eficiencia para todas las regiones: cuando se evidenció la obtención de estas regiones por medio de geles de agarosa, se pudieron observar bandas muy intensas para las dos regiones cortas; mientras que las regiones largas se amplificaron pobremente. De hecho, sólo las de 8 y 10kb se pudieron observar en los geles de agarosa y la región de 12kb sólo se pudo evidenciar durante los ensayos de hibridación posteriores. Estas diferencias en la amplificación de las regiones intergénicas se pudieran explicar por: 1) el uso de iniciadores consenso que no se alinean de manera igual con las secuencias y 2) la diferencia de tamaño de los productos.

Una vez que se obtuvieron las regiones intergénicas, se realizó su clonación por medio de un vector comercial. Sólo tuvimos éxito con las regiones intergénicas cortas, y en particular con la que fue el producto mayoritario en la amplificación. Por lo tanto el resultado de la

clonación reflejo: 1) el tamaño de las regiones (las secuencias largas, arriba de 8kb quizá sobrepasaron la capacidad del vector) y 2) la eficiencia de la amplificación.

Para clonar la otra región corta se tuvo que hacer un cambio en la estrategia, seleccionando una enzima de restricción (*Cla* I), que diferenciaba las dos secuencias intergénicas amplificadas del chimpancé (cortando la que ya estaba clonada). Los dos tipos de clonas fueron caracterizados con más detalle posteriormente.

Al observar que la clonación por medio de vector comercial de las regiones intergénicas largas no se pudo lograr, se decidió intentar la clonación por medio de la recombinación homóloga. Esta técnica requería de un vector con regiones homólogas a los extremos de las regiones intergénicas, el cual se derivó de las clonas que contenían a una de las regiones intergénicas cortas.

Una vez producido el vector, mediante ensayos de clonación de un producto amplificado derivado de las regiones intergénicas cortas, se comprobó su efectividad y funcionalidad. Este vector podrá utilizarse para clonar las regiones intergénicas largas, que no se pudieron clonar por medio del vector comercial, también se podrán hacer estudios a partir de mezclas de productos amplificados para observar el funcionamiento diferencial del vector con cada uno de ellos.

Otra de las posibles aplicaciones de este vector es que teóricamente podría facilitar la clonación de regiones intergénicas de los loci GH-PL de cualquier especie de primates.

6.2 Análisis detallado de las regiones intergénicas del chimpancé

La caracterización de las regiones intergénicas cortas del locus GH del chimpiancé dio indicios de cuáles genes la flanquean. Estos resultados se confirmaron mediante secuenciación parcial de los extremos de las clonas. La región intergénica corta I está precedida por el gen cGHN y en el otro extremo está flanqueada por el gen cPLB, mientras que la II se encuentra entre los genes cGHV y cPLD. Por lo tanto, los genes que flanquean

a ambas regiones cortas son ortólogos a los que flanquean a su vez las regiones cortas del locus humano. En efecto, los genes cGHV y hGHV, cGHN y hGHN, cPLB y hPL1 y por último, cPLD y hPL3 son los genes más cercanos entre sí al hacer las comparaciones filogenéticas entre los genes del humano y el chimpancé, (ver figura 8), y además se encuentran flanqueando las regiones cortas de la misma forma en ambos loci.

Aparte de la organización del locus GH del chimpancé, en este trabajo se trató de indagar un poco más sobre su funcionalidad. El locus humano tiene la particularidad de estar integrado por genes que se expresan en tejidos diferentes, principalmente en la pituitaria y la placenta, además de incluir un gran número de secuencias repetitivas del tipo Alu que han sido involucradas en la formación de esta región (Chen y cols., 1989; Revol y cols., 2004). Por lo tanto, se hizo el análisis de la distribución de los elementos reguladores y repetitivos a lo largo del locus del chimpancé para compararla con la del locus humano y así hacer inferencias sobre la conservación de los mecanismos de regulación génica en estas dos especies.

La hibridación fue la técnica que se escogió para este primer análisis, además permitió evidenciar la amplificación de tres regiones intergénicas largas. Todas las regiones intergénicas del chimpancé, tanto las dos regiones cortas como las tres largas, dieron señal para el inhibidor. De la misma manera, en el ser humano este elemento se presenta en todas las regiones intergénicas (Walker y cols., 1991). A diferencia de esto, se encontró el potenciador sólo en las tres regiones intergénicas largas, y no en las cortas. Por lo tanto, ambos elementos reguladores presentan la misma distribución que en el locus humano (Chen y col., 1988). Sin embargo, cabe remarcar que los experimentos de hibridación no permiten concluir sobre la funcionalidad de estas secuencias. De hecho en el humano los tres potenciadores no presentan la misma actividad: mientras que el potenciador en la región 3' de hPL3 es totalmente funcional, los dos otros (atrás de hPL1 y hPL2) tienen poca actividad (Walker y cols., 1991). La secuenciación de estos elementos y experimentos de funcionalidad permitirán completar este estudio. Sin embargo, la conservación de la distribución de estos elementos sugiere que los mecanismos de regulación de la expresión de los genes se conservaron entre los grandes monos y el humano. Probablemente, se inhibe

la transcripción en el tejido pituitario de los genes distintos a los GH-N, mientras que los factores transcripcionales presentes en el tejido placentario, por el contrario, podrían activar estos genes como ocurre en la especie humana, pero con la diferencia de que todos los genes en el caso del chimpancé parecen ser funcionales y podrían presentar transcritos y productos proteicos. En cambio, el ser humano presenta un "pseudogen": el hPL-1. (Walker y cols., 1991).

Por otra parte, los elementos repetitivos Alu están distribuidos a lo largo del locus GH del chimpancé. Las cinco regiones intergénicas de este locus dieron señal para este elemento, de la misma manera que se observa en nuestra especie. Los elementos repetitivos se encuentran ampliamente distribuidos en los genomas de los primates y se esperaba encontrar una presencia fuerte de los mismos en el locus GH-PL del chimpancé, como también la tienen en el locus humano.

La distribución de los elementos Alu en las regiones intergénicas cortas del locus GH del chimpancé, fue estudiada más detalladamente mediante PCR. Se compararon los resultados de las amplificaciones virtuales sobre esta región del genoma humano, con los obtenidos al hacer las amplificaciones sobre las regiones intergénicas clonadas del chimpancé. En la comparación se pudo observar que los productos de ambas amplificaciones (utilizando los mismos juegos de iniciadores) son muy parecidos, por lo que podemos asumir que los elementos Alu presentan una distribución muy semejante en las regiones intergénicas cortas de los loci humano y del chimpancé.

El elemento Kpn presente en la región intergénica corta dos del locus humano, también se encontró en la respectiva región intergénica corta del chimpancé. Además, se obtuvo la secuencia del elemento para el chimpancé, se comparó con el elemento humano y ambos resultaron sumamente parecidos.

6.3 Evolución del locus GH-PL entre el chimpancé y el humano

Resumiendo, la comparación general de los loci GH-PL del chimpancé y el humano nos indica que existen 6 y 5 genes para cada locus, respectivamente, así como 5 y 4 regiones intergénicas en cada uno. Estas regiones intergénicas se presentan en distintos tamaños: las regiones cortas son muy semejantes en su tamaño en ambas especies (unos 6kb), pero las tres largas del locus GH del chimpancé, además de diferir de las humanas en número (el locus humano sólo presenta dos regiones largas) presentan tamaños distintos, pues según la hibridación, las regiones largas del chimpancé miden unos 8, 10 y 12kb y las regiones largas del humano miden cerca de 13kb (ambas).

La distribución de las secuencias Alu en las regiones cortas del locus del chimpancé y también la presencia de una secuencia Kpn en la misma posición que en el locus humano, refuerzan la idea de que las regiones intergénicas cortas en ambos loci tienen una estructura interna muy parecida.

Por lo tanto, las regiones intergénicas cortas en ambos loci GH están muy conservadas: presentan similar estructura y están flanqueadas por genes que son claramente ortólogos entre sí.

Sin embargo, las regiones intergénicas largas del locus del chimpancé presentan características más variables. Su número y tamaño son distintos, y los genes tipo PL restantes del locus no presentan una contraparte directa con los genes PL del locus humano. Por lo tanto, esta región interna del locus GH-PL del chimpancé tuvo una evolución distinta a la del locus humano.

CAPÍTULO SÉPTIMO

CONCLUSIONES

- Cinco regiones intergénicas integran el locus GH-PL del chimpancé: 2 cortas y 3 largas, las cuales se amplificaron por PCR- larga. En este estudio se realizo la clonación y la descripción de las dos regiones cortas.

- Se implemento la técnica de clonación por recombinación homologa para obtener clonas de las regiones intergénicas del locus GH-PL.

- En el locus GH-PL del chimpancé, las dos regiones intergénicas cortas separan a los genes cGHN / cPLB y cGHV/cPLD, como se presentan sus contrapartes en el locus humano.

- Se detectó la presencia de secuencias potenciadoras, inhibidoras y Alu a lo largo del locus, distribuidas como en el locus humano y se evidencio la secuencia repetitiva Kpn en la segunda región intergénica corta.

- Con los hallazgos anteriores se puede asumir que la evolución del locus GH-PL entre el chimpancé y el humano ocurrió de manera independiente, ya que en esta región del genoma se encontraron regiones muy conservadas y otras muy dinámicas y variables.

CAPÍTULO OCTAVO

BIBLIOGRAFÍA

- Adkins, R.M., A. Nekrutenko y W.-H. Li. 2001. Bushbaby growth hormone is much more similar to nonprimate growth hormones than to rhesus monkey and human growth hormones. *Mol. Biol. Evol.*, **18**, 55-60.

- Alberts, B., D. Bray, A. Johnson, J. Lewis, M. Raff, K. Roberts y P. Walter. 1998. Essential Cell Biology. 1ª. Edición. Garland Publishing Inc. , E.U.A.

- Barsh, G.S., P.H. Seeburg y R.E. Gelinas. 1983. The human growth hormone gene family: structure and evolution of the chromosomal locus. *Nucleic Acid Res.*, **11**, 3939.

- Bohinski, R.C. 1991. Bioquímica. 5ª. Edición. Addison-Wesley Iberoamericana, México.

- Britten, R.J. 1994. Evolutionary selection against change in many Alu repeat sequences interspersed through primate genomes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, **91**, 5992-5996.

- Castro-Peralta, F. y L.P. Villarreal. 2000. The use of oligonucleotide directed cleavage of DNA and homologous recombination in the production of large recombinant adenoviral vectors. *Gene Ther.*, **7**, 583-586.

- Cooke, N.E., J. Ray, M.A. Watson, P.A. Estes, B.A. Kuo y S.A. Liebhaber. 1988. Human growth hormone gene and the highly homologous growth hormone variant gene display different splicing patterns. *J Clin Invest.*, 82, 270-275.

- Corrales Félix, G.L., 2000. Evolución de las regiones intergénicas del locus GH-PL en los primates del viejo mundo. Tesis de Maestría. Facultad de Medicina, Universidad Autónoma de Nuevo León.

- Chartier, C., E. Degryse, M. Gantzer, A. Dieterlé, A. Pavirani y M. Mehtali. 1996. Efficient generation of recombinant adenovirus vectors by homologous recombination in *Escherichia coli. J. Virol.,* **70**, 4805-4810.

- Chen, E.Y., Y.-Ch. Liao, D.H. Smith, H.A. Barrera-Saldaña, R.E. Gelinas y P.H. Seeburg. 1988. The human growth hormone locus: nucleotide sequence, biology and evolution. *Genomics,* **4**, 479-497.

- Chuzhanova, N.A., M. Krawczak, L.A. Nemytikova, V.D. Gusev y D.N. Cooper. 2000. Promoter shuffling has occurred during the evolution of the vertebrate growth hormone gene. *Gene,* **254**, 9-18.

- DeNoto F.M., D.D. Moore y H.M. Goodman. 1981. Human growth hormone DNA sequence and mRNA structure: possible alternative splicing. *Nucleic Acids Res,* **9**, 3719-3730.

- Esquivel-Escobedo, D.C., 1999. Organización del locus del complejo GH-PL en el mono araña (*Ateles geoffroyi*). Tesis de Maestría. Facultad de Medicina. Universidad Autónoma de Nuevo León.

- Forsyth, I.A. 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**, 886-903.

- Forsyth, I.A. 1994. Comparative aspects of placental lactogens: structure and function. *Exp. Clin. Endocrinol.,* **102,** 244-251.

- Frankenne, F., Closset, J., Gómez, F., Scippo, M.L., Smal, J., Hennen, G. 1988. The physiology of growth hormones (GHs) in pregnant women and partial characterization of the placental GH variant. *J Clin Endocrinol Metab,* **66**, 1171-1180.

- Fujiyama, A., H. Watanabe, A. Toyoda, T. D. Taylor, T. Itoh, S.-F., Tsai, H.-S. Park, M.-L Yaspo, H. Lehrach, Z. Chen, G. Fu, N. Saitou, K. Osoegawa, P.J. de Jong, Y. Suto, M. Hatrori, e Y. Sakaki. 2002. Construction and analysis of a human-chimpanzee comparative clone map. *Science*, **295**, 131-134.

- Golos, T.G., M. During, J.M. Fisher y P.D. Fowler. 1993. Cloning of four growth hormone/chorionic somatomammotropin-related complementary deoxyribonucleic acids differentially expressed during pregnancy in the rhesus monkey placenta. *Endocrinology,* **133**, 1744-1752.

- Griffiths, A.J.J., W.M. Gelbert, J.H. Miller, R.C. Lewontin, 2000. Genética Moderna. 1ª. Ed. McGraw Hill Interamericana, España.

- Gross-Bellard, M., Oudet, P., Chambon, P. 1973. Isolation of high-molecular-weight DNA from mammalian cells. *Eur J Biochem*, 36, 32-38.

- Harrison, L.M. y R. Carrington (Eds.). 1973. Atlas del mundo animal. 1ª. Ed., Selecciones del Reader's Digest, México.

- Hayashida, T., S.W. Farmer y H. Papkoff. 1975. Pituitary growth hormones: further evidence for evolutionary conservatism based on immunochemical studies. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, **72**, 4322-4326.

- Johnson, M.E., L. Viggiano, J.A. Balley, M. Abdul-Rauf, G. Goodwin, M. Rocchi y E.E. Eichler. 2001. Positive selection of a gene family during the emergence of humans and African apes. *Nature*, **413**, 514-518.

- Kay, R.F., C. Ross, B.A. Williams. 1997. Anthropoid Origins. *Science,* **275**, 797-804.

- Krawczak, M., N.A. Chuzhanova y D.N. Cooper. 1999. Evolution of the proximal promoter region of the mammalian growth hormone gene. *Gene,* **237**, 143-151.

- Liu, J.-Ch., K.D. Makova, R.M. Adkins, S. Gibson y W.-H. Li. 2001. Episodic evolution of growth hormone in primates and emergence of the species specificity of human growth hormone receptor. *Mol. Biol. Evol.,* **18**, 945-953.

- López-Rodríguez, A.M., 2002. Obtención de los genes de la hormona del crecimiento en el mono verde (*Cercopithecus aethiopis*), especie representativa de los monos del viejo mundo. Tesis de Maestría. Facultad de Medicina. Universidad Autónoma de Nuevo León.

- Lueders K.K. y J.W. Fewell. 1994. Hybridization of DNA in dried gels provides increased sensitivity compared with hybridization to blots. *Biotechniques,* **16**, 66-67.

- Messier, W. y C.-B. Stewart. 1997. Episodic adaptive evolution of primate lisozymes. *Nature,* **385**, 151-154.

- Moreno Rocha, J.C. 1993. Biología molecular de los genes del lactógeno placentario humano: análisis computacional y transcripción en un sistema procariote. Tesis Profesional. Facultad de Ciencias Biológicas. Universidad Autónoma de Nuevo León.

- Moreno Rocha, J.C. 1997. Biología molecular del complejo multigénico hGH-hPL: potencial transcripcional de sus genes en un sistema de transcripción *in vitro.* Tesis de Maestría, Facultad de Medicina, Universidad Autónoma de Nuevo León.

- Novacek, M.J. 1992. Mammalian phylogeny: shaking the tree. *Nature,* **356,** 121-125.

- Ohkubo, T., A. Tsukada, M. Tanaka y K. Nakashima. 1998. Cloning and expresión of pigeon growth hormone receptor cDNA in COS-7 monkey kidney cells. *Comp. Biochem. Physiol. B Biochem. Mol. Biol.*, **120**, 449-455.

- Revol de Mendoza, A., D. Esquivel-Escobedo, D. Santiago-Alarcón y H. Barrera-Saldaña. 2001. Independent duplication of the growth hormone gene in three anthropoidean lineages. *J. Endoc. Genet.,* **2,** 151-159.

- Revol de Mendoza, A., D. Esquivel-Escobedo, I. Martínez Dávila y H. Barrera-Saldaña. 2004. Expansion and divergence of the GH locus between New World monkeys and anthropoideans. *Gene,* **336,** 185-193.

- Rey, P. 1967. Las hormonas. 1ª. Ed, Editorial Diana, México.

- Richardson, B.D., R.A. Langland, C.J. Bachurski, R.G. Richards, C.A. Kessler, Y.-H. Cheng y S. Handwerger. 2000. Activator protein-2 regulates human placental lactogen gene expression. *Mol. Cell. Endocrinol.,* **160,** 183-192.

- Sambrook, S., Fritsch, E.F., Maniatis, T. 1990. Molecular Cloning: A Laboratory Manual. Cold Spring Harbor Laboratory Press, EUA.

- Sifuentes Rincón, A.M. 2000. Estudio de la familia génica GH-PL en el gato doméstico (*Felis catus*): un modelo molecular para precisar la evolución de los carnívoros. Tesis Doctoral. Facultad de Medicina. Universidad Autónoma de Nuevo León.

- Su, Y., S.A. Liebhaber y N.E. Cooke. 2000. The human growth hormone gene cluster locus control region supports position independent pituitary- and placenta-specific expression in the transgenic mouse. *J. Biol. Chem.*, **275**, 7902-7909.

- Toda, Y., M. Tomita. 1997. Alu elements as an aid in deciphering genome rearrangements. *Gene,* **205**, 173-176.

- Treviño Alvarado, V. M., 1999. Obtención de nuevos genes de la hormona del crecimiento en vertebrados. Tesis de Maestría. Facultad de Medicina. Universidad Autónoma de Nuevo León.

- Villee, C.A., 1996. Biología. 8ª. Edición. McGraw Hill Interamericana. México.

- Walker, W.H., S.L. Fitzpatrick, H.A. Barrera-Saldaña, D. Resendez-Perez y G.F. Saunders. 1991. The human placental lactogen genes: structure, function, evolution and transcriptional regulation. *Endocr. Rev.,* **12,** 316-328.

- Wallis, M. 1981. The molecular evolution of pituitary growth hormone prolactin and placental lactogen: a protein family showing variable rates of evolution. *J. Mol. Evol.,* **17**, 10-18.

- Wallis, M. 1994. Variable evolutionary rates in the molecular evolution of mammalian growth hormones. *J. Mol. Evol.,* **38**, 619-627.

- Wallis, O.C., y M. Wallis. 1995. Cloning and characterization of the rabbit growth hormone-encoding gene. *Gene,* **163**, 253-256.

- Wallis, M. 1996. The molecular evolution of vertebrate growth hormones: a pattern of near-stasis interrupted by sustained bursts of rapid change. *J. Mol. Evol.,* **43,** 93-100.

- Wallis, O.C., Y.P. Zhang y M. Wallis. 2001. Molecular evolution of GH in primates: characterization of the GH genes from slow loris and marmoset defines an episode of rapid evolutionary change. *J. Mol. Endocrinol.*, **26,** 249-258.

- Wallis, O.C. y M. Wallis. 2002. Characterisation of the GH gene cluster in a new-world monkey, the marmoset (*Cakkutrix jacchus). J. Mol. Endocrinol.* **29**, 89-97.

- Wildman, D. E., Uddin M., Liu G., Grossman L.I. y Goodman M. 2003. Implications of natural selection in shaping 99.4% nonsynonymous DNA identity between humans and chimpanzees: Enlarging genus *Homo. Proc. Natl. Acad. Sci.* **100**, 7181-7188.

ANEXOS

Anexo 1.
Secuencia del elemento Kpn de la clona tipo II (IntC2ch) del chimpancé.

TCTTTTTTTAATTATTATTATTATTTTACTTTAAGTTTTAGGGTACATGTGCACA
ATGTGCAGGTTAGTTACATGTGTATaCCTGTGCCATGCTGGTGTGCTGCACCCAT
TAACTTGTCATTTAGCATTAGGTATATCTCCTAAAGCTaTCCCTCCCCCCTCCCC
CAACCCCACAACAGTCCCCAGAgTGTGATGTTCCCCTGAGACTCAA

TIPO DE ADQUISICION
DONATIVO