

**UNIVERSIDAD AUTONOMA DE NUEVO LEON
FACULTAD DE MEDICINA**



**ESTUDIO DE LA FAMILIA GENICA GH-PL EN EL
GATO DOMESTICO (*Felis catus*): UN MODELO
MOLECULAR PARA PRECISAR LA EVOLUCION
DE LOS CARNIVOROS**

Por

M.C. ANA MARIA SIFUENTES RINCON

**Como requisito parcial para obtener el Grado de
DOCTORADO EN CIENCIAS
con Especialidad en Biología Molecular e Ingeniería Genética**

Mayo del 2000

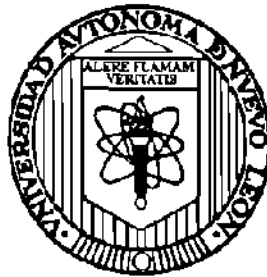
TD
SF442
.S5
c.1



1080098297

UNIVERSIDAD AUTONOMA DE NUEVO LEON

FACULTAD DE MEDICINA



**ESTUDIO DE LA FAMILIA GENICA GH-PL EN EL GATO
DOMESTICO (*Felis catus*): UN MODELO MOLECULAR PARA
PRECISAR LA EVOLUCION DE LOS CARNIVOROS**

Por

M.C. ANA MARIA SIFUENTES RINCON

**Como requisito parcial para obtener el Grado de
DOCTORADO EN CIENCIAS
con Especialidad en Biología Molecular e Ingeniería Genética**

mayo del 2000

TD
SF442
.S5

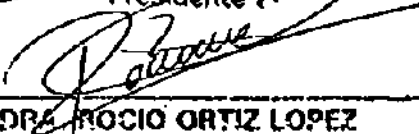


ESTUDIO DE LA FAMILIA GÉNICA GH-PL EN EL GATO DOMÉSTICO (*Felis catus*): UN MODELO MOLECULAR PARA PRECISAR LA EVOLUCIÓN DE LOS CARNÍVOROS

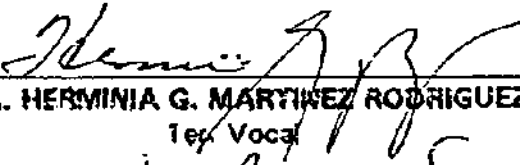
Aprobación de la Tesis:



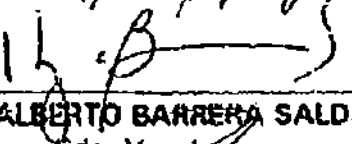
DRA. AGNES REVOL DE MENDOZA
Presidente



DRA. ROCÍO ORTIZ LÓPEZ
Secretario



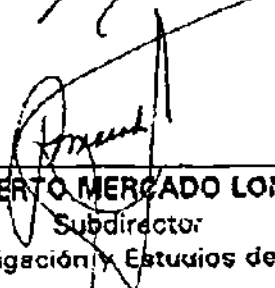
DRA. HERMINIA G. MARTÍNEZ RODRÍGUEZ
1er. Vocal



DR. HUGO ALBERTO BARRENA SALDAÑA
2do. Vocal



DR. ROBERTO MENDOZA ALFARO
3er. Vocal



DR. ROBERTO MERCADO LONGORIA
Subdirector
de Investigación y Estudios de Posgrado

El presente trabajo se llevó a cabo en el Laboratorio de Biología Molecular de la Unidad de Laboratorios de Ingeniería y Expresión Genéticas del Departamento de Bioquímica de la Facultad de Medicina de la UANL, bajo la dirección de la Dra. Agnès Revol de Mendoza y la co-dirección del Dr. Hugo A. Barrera Saldaña.

DEDICATORIA

A mis padres por su esfuerzo y voluntad de mantenernos juntos en el camino.

A mis hermanos Hilda y Jesús por su paciencia y cariño. Ismael y Claudia, gracias por compartirnos sus bellísimas familias.

A mi tía Guadalupe Rincón Aviña por ser la "pupa" que todos quieren.

A la familia Rico-Rincón por su gran apoyo y cariño.

Con gran cariño en memoria de mi abuelita Sotera y mi tía Teresa.

AGRADECIMIENTOS

A la **Dra. Agnès Revol**: mi directora y asesora de tesis, gracias por su amistad, dedicación, enseñanzas y por ser ejemplo de firmeza y entusiasmo aún cuando se oscurece el camino.

Al **Dr. Hugo A. Barrera Saldaña**, por las oportunidades y apoyo que me ha brindado durante todo este tiempo de aprendizaje.

A la **Dra. Herminia Martínez Rodríguez**, por su apoyo y sugerencias para finalmente terminar el programa.

A mi comisión de tesis.

A **Feli y Ata** por compartir conmigo algunas de sus aventuras y por "resguardarme" durante mi estancia en California.

A la familia **Rojas-Ortiz** por brindarme un agradable alojamiento durante mi estancia en Houston.

Al **Dr. Grady Saunders** y todo su personal por permitirme llevar a cabo parte de este trabajo en su laboratorio.

A mis grandes amigas y compañeras **Feli e Irma**, por todo lo que hemos aprendido y compartido desde el momento que iniciamos este viaje.

A mis compañeros durante todos estos años, **Dolores, Carmen V., Normita, Eddy, Alma Rosa, Irma, Claudio, Iván, Martín, Pablo, Mario I., Mario F., Sandra, Víctor T., Maribel, Fermín, Luis Lauro, Celia, Hugo L., Ana Laura, Jorge A., Ata, Feli, Ana Cecilia, Javier, Ruy, Déctor, Carmen B.**, y a toda la entrañable vieja y a la nueva ULIEG.

A **Karen, Silvia, Edelmiro, Catty, Kvita, Anabel, Nin, Esther, Ana Laura M., Marinita, Blanca, Selene**, por todos los buenos momentos compartidos.

A todas las secretarias **Raquel, Vicky, Ale**, por todo su apoyo alegría y disponibilidad. De manera muy especial a **Patty** por su amistad y clases secretariales.

A todo el personal de la ULIEG, **Don Pancho, Don Raúl, Don Pedrito, Daniel, Sandra, Edu Gerardo**.

INDICE

CONTENIDO	PAGINA
LISTA DE TABLAS	i
LISTA DE FIGURAS	ii
NOMENCLATURA	iii
RESUMEN	iv
CAPITULO I. INTRODUCCION	
1.1 Uso de la Biología Molecular en el estudio de la Evolución	1
1.2 Importancia de las familias multigénicas en los procesos evolutivos	3
1.3 La familia de la hormona del crecimiento (GH) y prolactina (Prl) como modelo evolutivo	
1.3.1 Estructura y evolución de las GHs en mamíferos	4
1.3.2 El gen de la GH como modelo molecular para precisar la evolución de los Carnívoros	7
1.3.3 Reconstrucción de árboles filogenéticos de los mamíferos utilizando el gen de la GH: importancia de los grupos de comparación	9
1.3.4 Estructura y evolución de la familia GH-Prl-PL en mamíferos	10
1.3.4.1 Origen de los PLs en primates	12
1.3.4.2 Origen de los PLs en no primates: roedores y rumiantes-artiodáctilos	13
1.3.4.3 Origen de los PLs en otros ordenes de no primates	14

CAPITULO II. OBJETIVOS	
2.1 Objetivo general	16
2.2 Objetivos específicos	16
CAPITULO III. ESTRATEGIA GENERAL	17
CAPITULO IV. MATERIALES Y METODOS	
4.1 Origen de los reactivos	18
4.2 Material Biológico	19
4.3 Métodos	
4.3.1 Extracción de DNA genómico	20
4.3.2 Obtención de RNA total	20
4.3.3 Obtención de las secuencias de GH de gato y tlacuache	
4.3.3.1 Retrotranscripción del RNA hipofisiario del tlacuache	22
4.3.3.2 Reacciones de amplificación	23
4.3.4 Clonación y determinación de la secuencia nucleotídica de las GHs de gato y tlacuache	23
4.3.5 Identificación de DNACs relacionados con la familia GH-PL en tejido placentario de gato	
4.3.5.1 Obtención de una porción del DNAC de Prl del gato	25
4.3.5.2 Análisis por Northern blot del RNA proveniente de tejido placentario de gato	25
4.3.5.3 Análisis por Western blot de las proteínas obtenidas a partir de tejido placentario de gato	25
4.3.5.4 Construcción y tamizaje de una biblioteca de DNAC de la placenta de gato	
4.3.5.4A Construcción de la biblioteca	27
4.3.5.4B Tamizaje de la biblioteca	27
4.3.6 Amplificación por PCR y caracterización molecular de los DNACs relacionados con la familia GH-PL en tejido placentario de gato	28
4.3.7 Reconstrucción de arboles filogenéticos	30

CAPITULO V. RESULTADOS

5.1 Obtención de las secuencias de GH de gato y tlacuache	
5.1.1 GH del gato	
5.1.1.1 Organización del gen de la GH del gato	32
5.1.1.2 Región promotora	33
5.1.1.3 Secuencias intrón-exón	34
5.1.2 GH del tlacuache	36
5.2 Caracterización molecular y obtención de DNACs relacionados con la familia GH-PL en tejido placentario de gato	
5.2.1 Obtención del DNAC de Prl	39
5.2.2 Análisis por Northern blot del RNA placentario	40
5.2.3 Análisis por Western blot de las proteínas placentarias	40
5.2.4 Obtención de la biblioteca de DNAC de placenta de gato	42
5.2.5 Tamizaje de la biblioteca	43
5.2.6 Aislamiento y caracterización de los DNACs de tejido placentario de gato	44
5.3 Análisis de las nuevas secuencias de GH y reconstrucción de árboles filogenéticos	
5.3.1 Determinación de las velocidades de cambio de la GH en Carnívoros	49
5.3.2 Reconstrucción de árboles filogenéticos	50
5.3.3 Secuencia ancestral de la GH	53
5.3.4 Comparación de las secuencias de GH	54
5.4 Análisis de las proteínas placentarias relacionadas a Prl	55
CAPITULO VI. DISCUSION	57
6.1 Evolución de la GH en carnívoros	58
6.2 Evolución de la familia GH-PL-Prl	62
CAPITULO VII. CONCLUSIONES	65
CAPITULO VIII. BIBLIOGRAFIA	66

LISTA DE TABLAS

PAGINA

Tabla 1. Características estructurales y localización cromosómica de los PLs.	13
Tabla 2. Condiciones estándar para las PCRs.	23
Tabla 3. Iniciadores utilizados en la PCR para amplificar el DNAc de tejido placentario.	25
Tabla 4. Condiciones del tamizaje de las clonas de DNAc	30
Tabla 5. Comparación de los intrones del gen GH entre algunos mamíferos.	36
Tabla 6. Velocidades de cambio para el gen GH en Carnívoros	51

LISTA DE FIGURAS

PAGINA

Figura 1. Estructura tridimensional de la GH del humano.	5
Figura 2. Modelo de la evolución del gen GH.	7
Figura 3. Evolución de los vertebrados	10
Figura 4. Orígenes de los genes PLs.	12
Figura 5. Sitios de apareamiento de iniciadores.	22
Figura 6. Construcción de una biblioteca de DNAc.	28
Figura 7. Obtención de la secuencia del gen GH del gato.	33
Figura 8. Secuencia del gen GH del gato.	35
Figura 9. Amplificación del DNAc de la GH del tlacuache.	37
Figura 10. Secuencia del DNAc de la GH del tlacuache.	38
Figura 11. Obtención del DNAc de la Prl del gato.	39
Figura 12. Análisis por Northern blot de los RNAs relacionados a Prl en el tejido placentario del gato.	41
Figura 13. Análisis por Western blot de las proteínas relacionadas a Prl en tejido placentario.	42
Figura 14. Síntesis de la primera y segunda cadena de DNAc.	43
Figura 15. Obtención de las clonas relacionadas a Prl a partir de tejido placentario de gato.	46
Figura 16. Comparación de la secuencia nucleotídica de la Prl hipofisaria de gato y las secuencias de los DNAs placentarios relacionados a Prl.	47
Figura 17. Análisis de la expresión de RNAs relacionados a Prl por medio de RT-PCR y Southern blot de los productos de PCR.	49
Figura 18. Reconstrucción de arboles filogenéticos de las GHs de mamíferos.	52
Figura 19. Secuencia ancestral de las GHs de mamíferos.	53
Figura 20. Conservación de los exones entre las GHs.	54
Figura 21. Reconstrucción del árbol filogenético de las proteínas placentarias relacionadas a Prl.	56

NOMENCLATURA

μg	Microgramo
μM	Concentración micromolar
$^{\circ}\text{C}$	Grados centígrados
cm^2	Centímetros al cuadrado
aa	Aminoácidos
DEPC	Dietil pirocarbonato
DNA	Acido desoxirribonucleico
DNAc	DNA complementario al RNA
dATP	Desoxiadenosina trifosfato
dNTPs	Desoxirribonucleosidos trifosfato
EDTA	Acido etilen-diamino-tetra-acético
g	Gramos
h	Horas
M	Concentración molar
min	Minutos
mg	Miligramos
mM	Concentración milimolar
ml	Mililitro
mm	Milímetro
ng	Nanogramos
nm	Nanómetros
pb	Pares de bases
PCR	Reacción en Cadena de la Polimerasa
pfu	Unidades formadoras de placas
pH	$-\log [\text{H}^+]$
rpm	Revoluciones por minuto
RNA	Acido ribonucleico
RNA _m	RNA mensajero
RNA _{sa}	Ribonucleasa
s	segundo
S	Unidades Svedberg
SDS	Lauril sulfato de sodio
Taq	DNA polimerasa de <i>Thermus aquaticus</i>
UV	Ultravioleta
v	volúmen
X	Veces la concentración

RESUMEN

Facultad de Medicina de la U.A.N.L.

M.C. Ana María Sifuentes Rincón

Título del Estudio: ESTUDIO DE LA FAMILIA GENICA GH-PL EN EL GATO DOMESTICO (*Felis catus*): UN MODELO MOLECULAR PARA PRECISAR LA EVOLUCION DE LOS CARNIVOROS.

Número de páginas: 84

Candidato al grado de Doctor en Ciencias con especialidad en Biología Molecular e Ingeniería Genética.

Objetivo y método del estudio: La familia de la Hormona del crecimiento (GH)/ Prolactina (Prl), la cual incluye también los genes para Lactógeno placentario (PL) y otras proteínas relacionadas a Prolactina (PRP), representa uno de los grupos proteicos más grandes y fisiológicamente más diversos que se sabe han evolucionado por duplicación génica. Esta constituye un excelente modelo molecular para estudiar la evolución de un gen y/o de una familia multigénica en las diferentes clases de vertebrados y utilizar los datos generados para llevar a cabo inferencias filogenéticas. Las relaciones filogenéticas entre los diferentes órdenes de mamíferos, por ejemplo el de los carnívoros, aun no están completamente definidas. Utilizando el gato doméstico (*Felis catus*) y tomando como modelo a la familia génica GH-PL, en este trabajo nos propusimos aportar nuevos datos moleculares, que ayuden a describir los mecanismos que dieron lugar a la formación de esta familia en el orden carnívora, y utilizar esta información para precisar las relaciones filogenéticas de este orden de mamíferos.

Este trabajo se enfocó a la obtención de las secuencias génicas de la familia GH-Prl-PL en el gato a partir del DNAg y RNAs placentarios. Para completar el estudio e introducir en los análisis filogenéticos una especie de comparación cercana a los mamíferos placentarios, se aisló la secuencia del DNAc de la GH del tlacuache (*Didelphis marsupialis*).

Conclusiones y contribuciones: Con la obtención de la secuencia del gen de la GH del gato, se logró llevar a cabo el análisis filogenético de éste, determinando las velocidades de cambio en el orden carnívora. El patrón obtenido permitió establecer que las GHs de este orden muestran una evolución "lenta" como la observada para algunas especies del orden artiodáctila. Este resultado corrobora la estrecha relación de los carnívoros con este último orden más que con roedores y primates. Esta relación se confirmó al evidenciar la presencia de RNAs relacionados a la Prl en la placenta del gato. Por lo tanto, en el orden carnívora como en rumiantes-artiodáctilos y roedores hubo también duplicación del gen de la Prl, con lo cual se abre un extenso campo de estudio para identificar y tratar de definir el papel evolutivo y fisiológico de estas proteínas, así como los mecanismos moleculares que las originaron.

FIRMA DEL ASESOR:



CAPITULO I

INTRODUCCION

1.1 Introducción de los datos moleculares en el estudio de la Evolución

La Evolución es una de las áreas más importantes de la Biología moderna, ya que su estudio une bajo un marco teórico todos los campos de esta disciplina. Charles Darwin (1859), el gran protagonista de la teoría evolutiva, nos demostró que la evolución biológica es el resultado de variaciones heredables, moduladas por mutaciones y selección natural. Por más de un siglo, los estudios evolutivos se han basado en los datos generados por áreas como la Anatomía comparada, Paleontología, Geología, Embriología y Bioquímica (1). Recientemente, la integración en éstos de la Tecnología del DNA recombinante consolidó el nacimiento de la Evolución Molecular. Con esta nueva área se ha hecho posible el estudio de la evolución en su nivel más básico: explorar los cambios que ocurren en el material genético. Un proceso básico en la evolución de las secuencias del DNA, son los cambios nucleotídicos que éstas sufren en función del tiempo, la comparación y determinación del número de sustituciones entre secuencias homólogas en diferentes especies, son la base de los estudios de evolución molecular. Las raíces de esta nueva área, datan de 1965 cuando E. Zuckerkandl y L. Pauling propusieron el concepto del reloj molecular. Esta hipótesis se basa en que las mutaciones ocurren a velocidad constante entre genes homólogos a lo largo del periodo evolutivo (2,3). En consecuencia, la cantidad de cambios genéticos entre las secuencias de los genes, depende del tiempo que ha pasado desde que las especies divergieron. Así, comparando la

cantidad y patrón de divergencia génica entre diferentes especies, se pueden inferir relaciones filogenéticas y relacionarlas con escalas de tiempo (datación).

La Evolución Molecular abarca dos áreas de estudio: 1) la evolución de las macromoléculas, en la cual se determinan las velocidades y patrones de cambio que se presentan en las secuencias de DNA y sus productos (proteínas) a lo largo del periodo evolutivo, proponiendo además los mecanismos responsables de tales cambios y, 2) la filogenia molecular, en la cual se hacen inferencias sobre la historia evolutiva de los organismos y macromoléculas a partir de datos moleculares; por tal razón, ambos campos de estudio están interrelacionados y los avances en la primer área facilita el estudio de la segunda (4).

Actualmente los datos moleculares obtenidos a partir de comparaciones de secuencias de genes seleccionados, son integrados con la información obtenida a partir de la Anatomía comparada y Paleontología para precisar numerosos aspectos de las relaciones evolutivas entre los organismos. A la fecha, el estudio de la filogenia en mamíferos, representa un gran reto; ya que aun integrando todo el conocimiento generado tanto por los métodos moleculares como clásicos, la filogenia de esta clase de vertebrados aun no está completamente establecida. Se ha sugerido que la evolución molecular y la morfológica presentan patrones contrastantes (5,6), sin embargo, en ciertos órdenes (primates) y superórdenes (Paenungulata) de mamíferos, puede considerarse que existe congruencia entre los resultados taxonómicos obtenidos por medio de datos moleculares y clásicos, pero aun existen discrepancias para ciertos órdenes tales como los Carnívoros e Insectívoros entre otros (5). Li y cols han sugerido que estas diferencias pueden ser minimizadas mediante el estudio de nuevos sistemas génicos y/o proteícos que aporten mayor evidencia a nivel molecular (4).

1.2 Importancia de las familias multigénicas en los procesos evolutivos

El genoma de los organismos superiores es bastante complejo. Una porción muy extensa de éste, está compuesta de segmentos de DNA repetidos en forma idéntica o variable de dos a millones de veces. Una familia multigénica, es un tipo de estas secuencias repetitivas dentro del genoma y puede ser definida como un grupo de genes derivados de la duplicación de un gen ancestral, y que comparten un grado de similitud entre ellos del 50% o menos (7).

Durante los procesos de duplicación se pueden presentar cambios en una de las copias, y éstos pueden llevar a la adquisición de nuevas funciones. A la fecha se conoce un número cada vez mayor de familias multigénicas, algunos ejemplos son las inmunoglobulinas y los citocromos P450. En estas proteínas, las regiones codificantes de los miembros de la familia tienen funciones especializadas dentro del mismo organismo. En otros casos, la diferenciación de regiones regulatorias tales como promotores o potenciadores son más importantes que las de las regiones codificantes, como en el caso de las familias de la lactato deshidrogenasa y esterasa. Finalmente, hay ejemplos de familias en las cuales la diferenciación se presenta en ambas regiones como son la familia de la globina y de la hormona del crecimiento (GH), entre otras (8).

Los procesos de desarrollo de los organismos están gobernados por la expresión diferencial en espacio y tiempo de varias familias multigénicas. Esta compleja organización del material genético es el producto de la evolución, por lo que el estudio de la reorganización de genes por mecanismos tales como la duplicación o recombinación son muy importantes para inferir la historia evolutiva del genoma y de los organismos (8). Las familias génicas y/o proteicas pueden ser utilizadas para llevar a cabo estudios evolutivos ya sea a nivel de un gen específico o incluyendo todos los genes que la conforman. Una de las familias

multigénicas que ha sido ampliamente estudiada es la de la GH y prolactina (Prl). La publicación de las primeras secuencias de GH y Prl, permitió establecer que estas hormonas eran homólogas (9,10), y la disponibilidad cada día mayor de secuencias tanto nucleotídicas como aminoacídicas de estas hormonas en diferentes especies de vertebrados ha permitido conocer más acerca de la evolución de esta familia multigénica y establecerla como un excelente modelo para llevar a cabo estudios no solo evolutivos (incluyendo las inferencias filogenéticas), sino también para tratar de establecer los mecanismos que regulan la expresión específica de tejido en mamíferos.

1.3 La familia de la Hormona del crecimiento (GH) y Prolactina (Prl) como modelo evolutivo

1.3.1 Estructura y evolución de las GHs en mamíferos.

Las GHs en mamíferos son proteínas constituidas por 190 a 200 residuos aminoacídicos y tienen un peso molecular de 22 kDa. Estas hormonas son secretadas principalmente por la pituitaria anterior y están generalmente involucradas en procesos fisiológicos relacionados con el crecimiento y morfogénesis (11). De manera directa, la GH es esencial para la regulación del metabolismo de carbohidratos, lípidos y proteínas, así como para la proliferación y diferenciación celular. La estimulación del crecimiento somático la ejerce de manera indirecta a través de las somatomedinas, también llamadas factores de crecimiento insulino-agonistas (IGF-I) (12, 13).

La síntesis y liberación de GH, es regulada por una gran variedad de factores, dentro de los cuales el factor transcripcional Pit 1 o GHF-1 juega un papel clave para su expresión específica de tejido (14).

Se ha determinado la estructura tridimensional de las GHs en humano y en el cerdo (15), de forma general están formadas por 4 hélices alfa antiparalelas. La molécula presenta dos enlaces disulfuro que conectan la hélice 4 con el extremo carboxilo terminal de la proteína, y la hélice 1 con la 4 (Figura 1). Dentro de una familia de proteínas homólogas, generalmente puede asumirse que similitudes en la secuencia primaria de éstas, se correlacionan con similitudes en las propiedades estructurales y funcionales. El número cada vez mayor de secuencias de GH en mamíferos es una poderosa herramienta para el diseño de experimentos enfocados a predecir los residuos funcionalmente importantes de esta hormona, basándose en comparaciones de secuencias aminoacídicas (16).

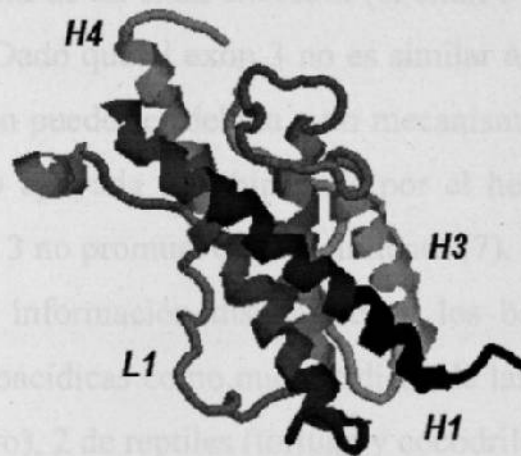


Figura 1. Estructura tridimensional de la GH de humano. Se muestran las 4 hélices α (H) y uno de los lazos que las unen (L1). La estructura tridimensional de la GH en porcino muestra los mismos 4 motivos y plegamiento, razón por la cual se piensa que esta estructura pudiera ser compartida por todos los miembros de la familia GH-PL-Prl (11). Recreada con RasMol v 2.6 a partir del reporte del GenBank.

El creciente interés en utilizar las GHs recombinantes con fines biomédicos y agropecuarios, ha promovido la clonación molecular de sus genes y/o DNAs, no solo en mamíferos sino en muchas especies de otros vertebrados (6,17,18).

Esto ha permitido establecerla como un buen modelo para llevar a cabo estudios de evolución molecular.

La GH muestra en general una alta conservación en su estructura génica, la cual consta de cinco exones y cuatro intrones. Esta estructura génica es la encontrada en la GH de todos los mamíferos y algunos peces (por ej. la carpa). Sin embargo, en tilapia y dos especies de salmónidos, el exón cinco está dividido, lo cual sugiere que la aparición de un quinto intrón fue reciente y ocurrió después de la divergencia de los peces y tetrápodos (19). Se ha propuesto que una amplificación de los exones contribuyó a la presente estructura del gen (Figura 2). El primer exón y parte del segundo codifican para el péptido señal. Los exones 2, 4 y 5 son similares entre sí, sugiriendo que provienen de la amplificación en tandem de un exón ancestral (el exón 5 contiene dos copias de la región homóloga). Dado que el exón 3 no es similar a los otros, su presencia en la estructura del gen puede ser debida a un mecanismo de adquisición de un exón "ajeno", estando apoyada esta hipótesis por el hecho de que el péptido codificado por el exón 3 no promueve el crecimiento (7).

Actualmente se tiene información disponible en los bancos de datos de las secuencias tanto aminoacídicas como nucleotídicas de las GHs en 3 especies de aves (pollo, pato y pavo), 2 de reptiles (tortuga y cocodrilo) y 2 de anfibios (rana toro y *Xenopus*), además de una gran variedad de peces teleosteos, condrosteos y 1 holosteo (6). Existen reportes de 17 secuencias nucleotídicas y 8 aminoacídicas de GHs ubicadas en diferentes órdenes de mamíferos placentarios y solamente 1 secuencia de un marsupial (20); la mayoría de las secuencias provienen de especies dentro del orden artiodáctila debido al interés biotecnológico que representa. Esta falta de homogeneidad en la distribución de las especies para las cuales ha sido reportada la GH, dificulta la reconstrucción

de la historia evolutiva del gen en los vertebrados y aun en clases específicas como la de los mamíferos.

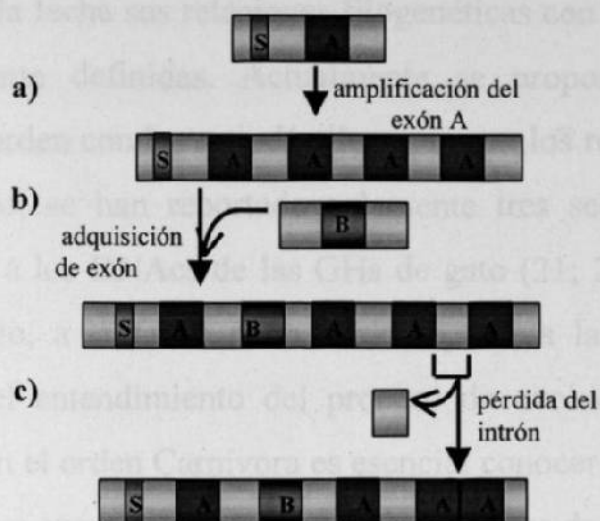


Figura 2. Modelo de la evolución del gen GH. El modelo propuesto para la evolución del gen de la GH involucra los siguientes pasos: a) repetición en tandem de un exón ancestral (A), b) inserción de un exón (B) y pérdida del quinto intrón (7).

Los análisis de las velocidades de cambio de las GHs reportadas hasta 1996 para los mamíferos, permitió establecer que esta hormona presenta patrones evolutivos lentos y algunos periodos de rápida aceleración solamente durante la evolución de los primates y rumiantes-artiodáctilos, razón por la cual se propone que los cambios en estos órdenes pueden ser debidos a cambios adaptativos y de selección (6,18).

1.3.2 El gen de la GH como modelo molecular para precisar la evolución de los Carnívoros.

Como se mencionó anteriormente, dentro de las secuencias nucleotídicas reportadas para GHs en mamíferos, las del orden artiodáctila son las más

abundantes, siendo los primates, roedores y carnívoros otros órdenes para los cuales hay reportes de GHs. El estudio de este último orden resulta de particular interés, ya que a la fecha sus relaciones filogenéticas con otros órdenes no están aún completamente definidas. Actualmente se propone una relación más estrecha de este orden con los artiodáctilos, que con los roedores y primates (5). En los carnívoros, se han reportado solamente tres secuencias nucleotídicas correspondientes a los DNAs de las GHs de gato (21; 22), perro (23) y visón (24). Sin embargo, a la fecha no ha sido reportada la secuencia de un gen completo. Para el entendimiento del proceso de evolución molecular de los genes de la GH en el orden Carnívora es esencial conocer la estructura génica de la hormona, ya que cuando se determinan los patrones de cambio, los resultados observados en las secuencias codificantes (exones) deben ser corroborados con los patrones y valores de las secuencias no codificantes (intrones) (25).

Por lo anterior, en este trabajo nos propusimos la obtención del gen de la GH del gato doméstico para contribuir con mayores datos moleculares a determinar el tipo de evolución de la GH dentro de los carnívoros y precisar con los datos obtenidos la filogenia molecular de este orden con otros mamíferos. El gato doméstico (*Felis catus*) se encuentra dentro de la familia Felidae, la cual empezó a divergir hace 40-60 millones de años (26), y ha sido utilizada por muchos años como un importante modelo animal para llevar a cabo estudios de Fisiología, Oncología, Neuroquímica y Genética (27). El conocimiento de la estructura génica de la GH del gato podrá, adicionalmente, aportar datos importantes sobre la regulación de esta hormona ya que ha sido reportado que los mecanismos que gobiernan la secreción en esta especie son poco sensibles o

incluso insensibles a los mecanismos que provocan la secreción de la GH de primates (28).

1.3.3 Reconstrucción de árboles filogenéticos de los mamíferos utilizando al gen de la GH: importancia de los grupos de comparación

En los estudios de Filogenia Molecular, las relaciones entre un grupo de organismos son ilustradas por árboles filogenéticos, siendo importante que los datos moleculares que sirven como herramienta para su reconstrucción incluyan a un grupo de comparación adecuado, el cual está definido por una especie que se sabe por información paleontológica, divergió más temprano que la especie en estudio.

Los placentarios y marsupiales constituyen un grupo monofilético, el cual de acuerdo a evidencia Paleontológica, divergieron de un ancestro común durante el periodo Cretácico hace aproximadamente 130 millones de años (Figura 3) (29). Así, los marsupiales constituyen el grupo de comparación más adecuado para estudiar la radiación de los placentarios (4,30).

El tlacuache (*Didelphis marsupialis*) es considerado como un “fósil viviente” que ha cambiado muy poco desde el periodo Cretácico al presente (29), por lo que estudiando al tlacuache se puede tener una idea muy cercana de un mamífero primitivo.

Existen reportes utilizando al oposum (*Didelphis virginiana*) como grupo de comparación para determinar la evolución de los mamíferos placentarios (30,31). Sin embargo, ésta se lograría conocer mejor al incrementar el número de secuencias reportadas para marsupiales, en genes de interés evolutivo. Existe solamente el reporte de una secuencia de DNAc de GH del possum (*Trichosorus vulpecula*) por lo que es importante buscar otras secuencias de GHs de marsupiales.

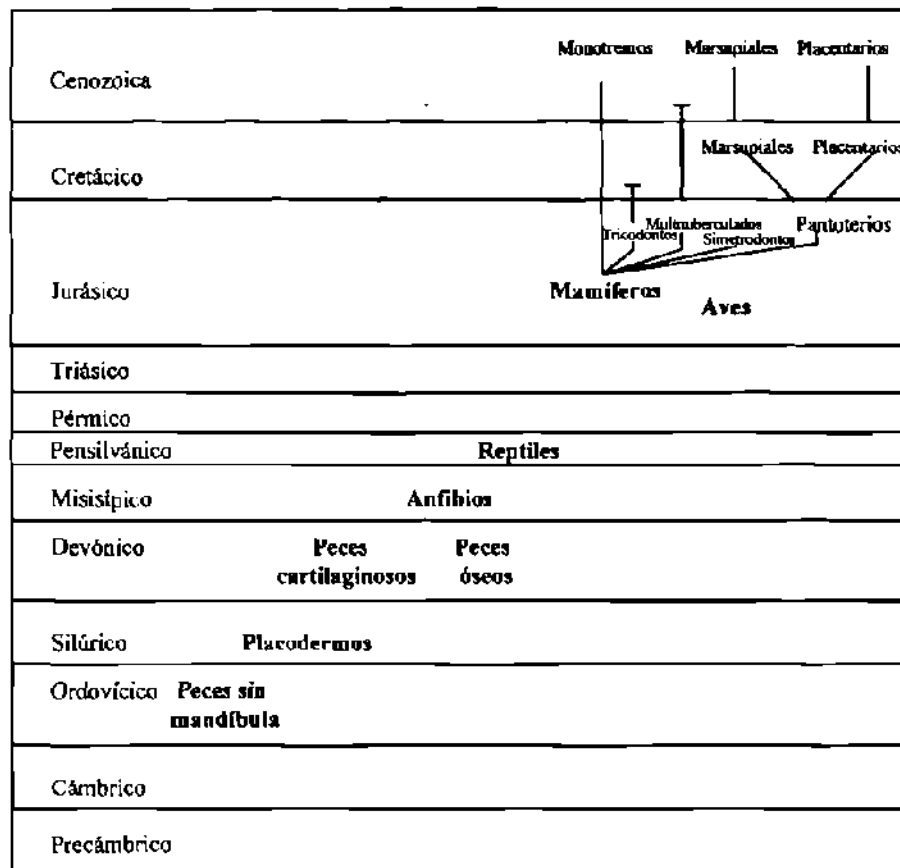


Figura 3. Evolución de los vertebrados. Se esquematizan los periodos de aparición de las diferentes clases de vertebrados, poniendo énfasis en la radiación de los mamíferos.

1.3.4 Estructura y evolución de la familia de la GH-Prl-PL en mamíferos

La familia de la GH/Prl incluye a los genes de Lactógeno Placentario (PL), Proliferina (PLF), proteínas relacionadas a Prl (PRP), proteínas semejantes a Prl (PLP), somatolactina (SL), así como también algunos pseudogenes. Esta familia multigénica representa uno de los grupos proteicos fisiológicamente más diversos que han evolucionado por duplicación génica (32).

En la mayoría de las especies de vertebrados, la GH y Prl son expresadas en hipófisis, así como también la SL, pero a la fecha solo se ha reportado la

existencia de esta última en algunas especies de peces (33). El resto de los genes que conforman la familia han sido reportados solo en mamíferos y su expresión se restringe a la placenta. Por tal razón, esta familia es considerada un excelente modelo para realizar estudios evolutivos y de expresión específica de tejido (34). Las hormonas de esta familia actúan sobre sus células blanco mediante la unión a receptores membranales específicos, que pertenecen a la familia de las citocinas. A la fecha existe aun controversia sobre si todos los miembros de esta familia comparten los mismos receptores o bien, si ejercen sus acciones vía receptores específicos (11). Como ya ha sido mencionado, la GH participa en procesos fisiológicos relacionados al crecimiento, metabolismo y morfogénesis, la Prl participa principalmente en fenómenos tales como la lactación, reproducción, osmorregulación e inmunomodulación. Dependiendo de las especies, los PLs llevan a cabo funciones semejantes a Prl y/o GH y actúan tanto a nivel del feto como de la madre. Finalmente, en el caso de las proteínas placentarias relacionadas a Prl, a la fecha se desconocen cuales podrían ser sus funciones durante el embarazo (35,36). En mamíferos, son tres los órdenes en los cuales esta familia ha sido ampliamente estudiada, el análisis de las secuencias de estos genes ha permitido establecer que al menos dos eventos de duplicación fueron necesarios para la formación de esta familia (Figura 4). En el primero, la GH y Prl divergieron de un gen ancestral común hace >400 millones de años (10), ambos genes evolucionaron independientemente segregándose en cromosomas diferentes (Tabla 1).

Un segundo evento de duplicación dió lugar a la formación de los lactógenos placentarios, siendo el origen evolutivo de éstos de particular interés, ya que en

primates estas hormonas están más relacionadas al gen de GH, en tanto que en roedores y rumiantes, tienen una estrecha similitud con el de la Prl. Nuevamente, la co-localización cromosómica de estos genes ya sea con los genes GH o Prl apoya el origen diferente de los genes PLs en diferentes órdenes (37).

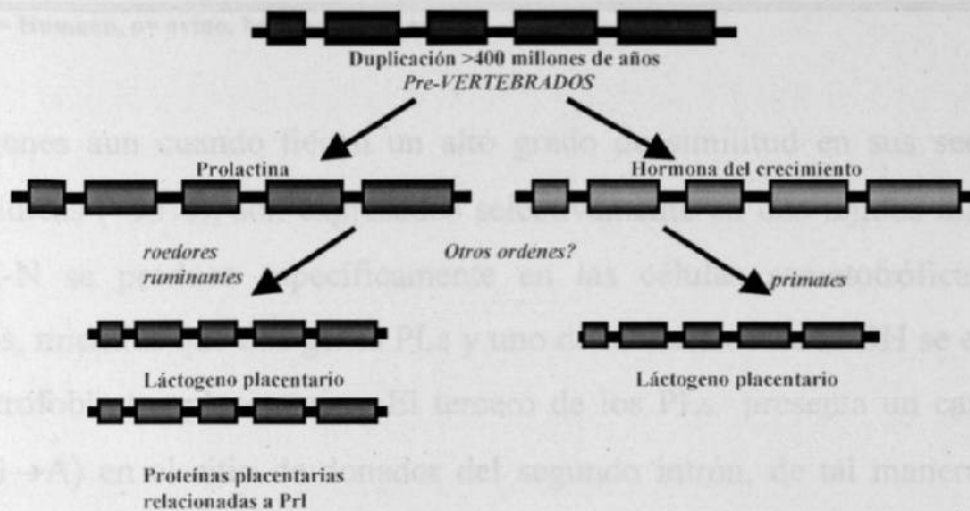


Figura 4. Orígenes de los PLs. En la figura se esquematizan los dos eventos de duplicación que dieron origen a la familia multigénica en diferentes órdenes de mamíferos.

1.3.4.1 Origen de los PLs en primates.

En simios y humanos, el locus de la GH está constituido por 5 genes altamente conservados: dos GHs y tres PLs. En el humano éste se encuentra localizado en el brazo largo del cromosoma 17 entre las bandas q22-24 y se extiende sobre aproximadamente 50 000 pb (38,39).

Tabla 1. Características estructurales y localización cromosómica de los PLs

Especie	Número de aa	Similitud de secuencia aa		Co-localización cromosómica con el gen de
		Prl	GH	
hPL	191	27	85	GH
oPL	198	49	28	?
bPL	200	51	20	Prl
mPL-I	194	33	21	Prl
mPL-II	191	38	21	Prl

h= Humano, o= ovino, b= bovino, m= ratón

Estos genes aun cuando tienen un alto grado de similitud en sus secuencias nucleotídicas (~95%), son expresados selectivamente en dos tejidos diferentes. La GH-N se produce específicamente en las células somatotróficas de la hipófisis, mientras que dos genes PLs y uno de la variante de la GH se expresan en los trofoblastos placentarios. El tercero de los PLs presenta un cambio de base (G→A) en el sitio de donador del segundo intrón, de tal manera que el RNAm no es correctamente procesado y por lo tanto no se produce un transcrito maduro (38).

La determinación de la secuencia nucleotídica del locus de la GH en humano ha permitido describir los mecanismos evolutivos que dieron lugar a su formación. Se propone que 3 eventos de duplicación de una secuencia ancestral, en conjunto con procesos de recombinación homóloga desigual entre las secuencias de estos genes, e incluso conversión génica, fueron necesarios para llegar al locus actual (18,38).

1.3.4.2 Origen de los PLs en no primates: roedores y rumiantes-artiodáctilos.

La clonación y análisis de los genes de la familia GH-Prl en especies ubicadas en órdenes diferentes al de primates, permitió establecer que los PLs en al

menos dos de los órdenes estudiados (roedores y rumiantes-artiodáctilos), se derivaron del gen de la Prl (11,40).

En roedores, el tejido placentario de rata y ratón es la fuente de una amplia variedad de proteínas relacionadas a la Prl hipofisiaria (35,41,42). Las Prls placentarias son producidas por las células trofoblásticas y tienen influencia sobre el metabolismo materno y fetal, así como también el de la propia placenta (43,44). Hasta 1999, la familia en roedores constaba de 18 genes diferentes (40), que incluyen PL-I y II, en rata, ratón y hamster, proteínas relacionadas a Prl (m y r-PRP), proteínas semejantes a Prl (m y r-PLP) y a proliferinas. Con excepción de los PLs, para los cuales se ha demostrado que tienen una potente actividad lactogénica, la función de los otros miembros de proteínas relacionadas a Prl en roedores aun permanece sin ser explorada (11,35,42).

En bovino, han sido descritos PLs producidos por las células binucleadas de trofoblasto (45). Además de estas proteínas, en la placenta de bovino se sintetizan al menos seis proteínas relacionadas a Prl (bPRL-I a VI). Poco se conoce a cerca el papel fisiológico de estas proteínas en rumiantes, estando actualmente los estudios enfocados a determinar los mecanismos que regulan la expresión de los lactógenos placentarios y PRPs en especies dentro de este orden.

1.3.4.3 Origen de los PLs en otros órdenes de no primates

Poco se sabe de la existencia de proteínas relacionadas a la familia GH-Prl en tejido placentario de órdenes de mamíferos diferentes a los antes descritos. Forsyth en 1986 reportó una serie de estudios encaminados a detectar la presencia de estas proteínas utilizando bioensayos y radioinmunoensayos (46). Mediante estos ensayos no fue posible detectar actividad lactogénica ni

semejante a GH o a Prl. Las especies incluidas en el estudio pertenecen a los siguientes órdenes: Insectívora, Edentada, Logomorfa, Perisodáctila, Artiodáctila (diferentes a rumiantes: cerdo) y Carnívora. Sin embargo, este resultado no descarta la existencia de este tipo de genes, ya que cabe la posibilidad de que en estas especies, los PLs no compartan los receptores de GH y/o Prl. Por tal razón y con el fin de contribuir a determinar los mecanismos que dieron lugar a la formación de esta familia en mamíferos, nos enfocamos a la búsqueda a nivel molecular de nuevos miembros de la familia génica GH-Prl partiendo de tejido placentario del gato doméstico (*Felis catus*), especie ubicada dentro del orden Carnívora. Para ello, nos propusimos los objetivos general y específicos que se describen en el siguiente capítulo.

CAPITULO II

OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GENERAL:

Precisar la evolución de los genes GH-PL en carnívoros tomando como modelo al gato doméstico (*Felis catus*) y como grupo de comparación al tlacuache (*Didelphis marsupialis*).

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS:

2.2.1 Aislar por clonación molecular y determinar la secuencia nucleotídica del gen de la GH del gato (*Felis catus*) y el DNAC de la del tlacuache (*Didelphis marsupialis*).

2.2.2 Identificar los DNACs relacionados a la familia GH-PL en tejido placentario de gato, mediante:

- a) **Construcción y tamizaje de una biblioteca del DNAC de placenta de gato.**
- b) **Obtención y caracterización de los DNACs relacionados a la familia GH-PL en tejido placentario de gato.**

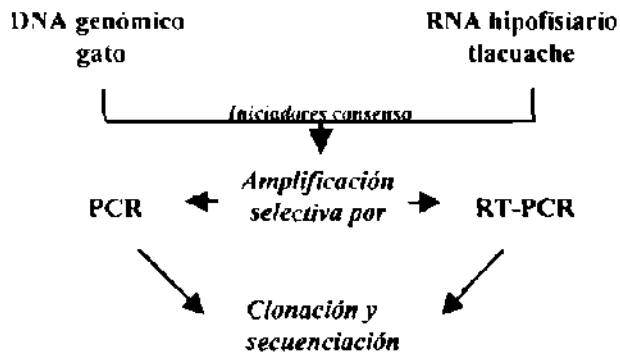
2.2.3 Reconstruir árboles filogenéticos correspondientes a la familia GH-PL en mamíferos mediante la inclusión en éstos de los resultados obtenidos en el estudio.

CAPITULO III

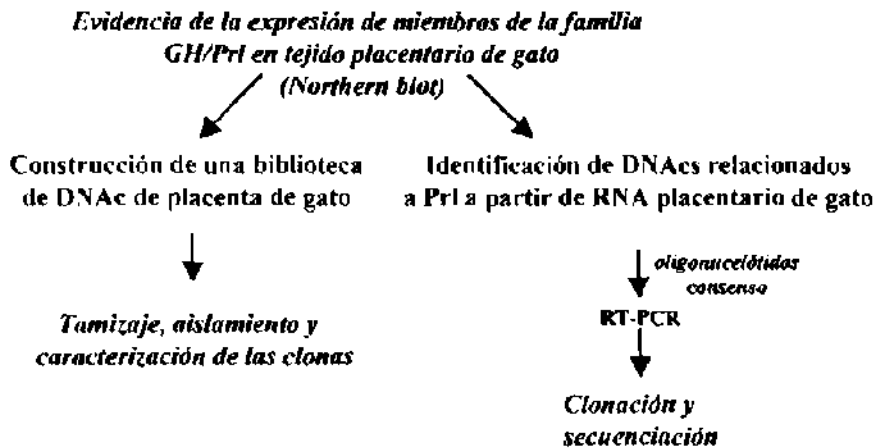
ESTRATEGIA GENERAL

La estrategia general consistió de los siguientes pasos:

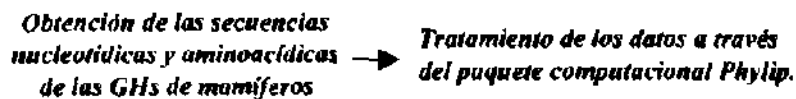
3.1 Obtención de las secuencias nucleotídicas de las GHs del gato y tlacuache.



3.2 Búsqueda de nuevos miembros relacionados a la familia GH/Prl en tejido placentario de gato.



3.3 Análisis de las secuencias y reconstrucción de árboles filogenéticos.



CAPITULO IV

MATERIALES Y METODOS

4.1 Origen de los reactivos.

Los reactivos para llevar a cabo las Reacciones en Cadena de la Polimerasa (PCRs) fueron obtenidos de las siguientes casas comerciales: la enzima DNA polimerasa Taq y el $MgCl_2$ de Promega Corporation (Madison, Wi, EUA) y los dNTP's de GIBCO- BRL (Gaithersburg, MD,EUA). El estuche para llevar a cabo las reacciones de Transcripción reversa (RT)-PCR fue de la compañía Perkin Elmer-Roche Molecular Systems, Inc., (Branchburg, NJ, U.S.A.). Las enzimas de restricción y de modificación utilizadas fueron de GIBCO, BRL y de New England Biolabs (Beverly, MA, USA). Para la clonación de los fragmentos de RT-PCR provenientes del tejido placentario de gato se utilizó el estuche "TA Cloning Kit" de la compañía Invitrogene (Carlsbad, CA, USA).

Las enzimas tales como DNAsa, RNAsa y proteinasa K fueron de SIGMA (St. Louis, MO, USA).

Las extracciones de RNA a partir de algunos tejidos se llevaron a cabo utilizando el estuche comercial "Totally RNA Extraction Kit" de la compañía Ambion Inc. (Woodward. Austin, Tx). El inhibidor de RNAsa (RNAsin) utilizado para la conservación del RNA extraído fue de la casa comercial Promega.

Los RNAs mensajeros fueron obtenidos a partir del RNA total y utilizando el estuche comercial "Oligotex" de QIAGEN (GmbH, Alemania).

La biblioteca de DNAc de tejido placentario de gato fue construida utilizando el estuche comercial "ZAP Express™DNAc Synthesis Kit" y "ZAP Express™DNAc Gigapack®II Gold Cloning Kit", de la compañía Stratagene

(La Jolla, California, EUA). Las membranas de hibridación fueron de Amersham International (Buckinghamshire, UK). Para el marcaje de las sondas se utilizó el estuche comercial “RadPrime labelling system” de GIBCO, BRL.

La secuenciación se llevó a cabo utilizando el estuche comercial “Amplicycle Sequencing Kit” de Perkin Elmer. Los nucleótidos radiactivos provinieron de Amersham International.

La mayor parte de los oligonucleótidos consenso fueron obtenidos de la oligoteca de la ULIEG, Dpto. de Bioquímica de la Facultad de Medicina, y el resto fue sintetizado por la compañía GIBCO-BRL. El sitio de apareamiento y la secuencia de éstos será descrita en su apartado correspondiente.

El suero de conejo anti-ovine Prl-IFC-1, fue proporcionado por el NIDDK Pituitary Hormones & Antisera Ctr. (Harbor-UCLA Medical Center). El anticuerpo anti-conejo IgG conjugado con fosfatasa alcalina fue adquirido de Sigma Immuno Chemicals.

4.2 Material biológico.

Para la clonación de los genes de GHs se utilizó el plásmido pBS SK y la cepa XL1-blue de *E. coli*, ambos provenientes de la colección de plásmidos y cepas de la ULIEG.

Las muestras de tejido placentario de gato a diferentes periodos de gestación fueron obtenidas de clínicas veterinarias privadas. Los tejidos control de gato tales como hipófisis, hígado, pulmón, sangre, cerebro, etc. fueron obtenidos del Departamento de Fisiología de la Facultad de Medicina. Las placentas de ratón (BALB/c) y de vaca fueron obtenidas del Departamento de Inmunología de la misma facultad y a través del personal de veterinaria del Rastro Municipal de Monterrey, respectivamente.

El tejido hipofisiario del tlacuache, así como muestras de sangre de este animal fueron obtenidos a partir de especímenes de muerte reciente, rescatados por personal de la Facultad de Medicina.

Todas las muestras después de ser recolectadas fueron almacenadas a -70°C .

4.3 Métodos

4.3.1 Extracción del DNA genómico.

Los DNAs genómicos (DNAg) de gato y tlacuache fueron obtenidos a partir de tejido sanguíneo y hepático, respectivamente. En ambos casos se utilizó la técnica descrita por Gross-Bellard et al (47). Brevemente, el tejido fue molido en presencia de nitrógeno líquido, posteriormente se adicionó 1.2 ml de buffer de digestión por cada 100 mg de tejido (100mM NaCl, 10mM Tris-Cl pH 8, 25mM EDTA pH 8, 0.5% SDS y 0.1mg/ml proteinasa K). Las muestras fueron incubadas a 50°C durante 18 h, después de lo cual se realizaron dos extracciones en una mezcla a partes iguales de fenol y Sevag (cloroformo-alcohol isoamílico 24:1). Finalmente el DNAg fue precipitado utilizando 0.5V de NH_4OAc 7.5M y 2V de etanol al 100% y el exceso de sales se eliminó con un lavado utilizando 1V de etanol al 70%. El RNA residual fue removido de las preparaciones agregando 0.1% de SDS y $1\mu\text{g/ml}$ de RNAsa y haciendo una incubación de las muestras a 37°C por 1 h. Para obtener el DNAg se realizó nuevamente una extracción fenol-Sevag y la precipitación de la misma forma antes descrita. El DNAg obtenido se cuantificó por espectrofotometría (48).

4.3.2 Obtención del RNA total. Los RNAs placentarios de gato y vaca fueron preparados siguiendo la técnica descrita por Barrera-Saldaña (49), la cual se describe a continuación: a 25g de tejido se agregó 100ml de buffer de

extracción frío (0.2M Tris-Cl pH 8, 0.025 EDTA-NaOH, 0.1M LiCl y 1% SDS), 50 ml fenol (saturado con agua DEPC) y 50 ml de Sevag. Se homogenizó en una licuadora a alta velocidad durante 5 min en frío. Posteriormente se separaron las fases mediante centrifugación a 5000 rpm durante 10 min a 4°C. A la fase acuosa se le agregó proteinasa K (50µg/ml) y se incubó durante 1h a 37°C. Se realizaron dos extracciones fenol-Sevag (50:50). La fase acuosa se precipitó con 2.5V de etanol al 100% y se incubó toda la noche a -20°C. Se centrifugó durante 20 min a 5000 rpm y la pastilla se resuspendió en 10 ml de H₂O DEPC. Luego se agregaron 2V de NaOAc 5M pH 4 y se incubó durante 2 h a -20°C. Nuevamente se centrifugó a 5000rpm 10 min y la pastilla recuperada se resuspendió en 10 ml de H₂O DEPC, se agregó NaOAc suficiente para dejar a una concentración 0.2M y finalmente se agregaron 2V de etanol al 100% incubando a -20 °C durante toda la noche. El RNA fue recuperado por centrifugación, lavado con un volumen de etanol al 70% y resuspendido en H₂O DEPC con 1U/ml de RNAsin y conservado a -70°C.

Los RNAs de tejido hipofisiario y tejidos utilizados como testigos (hígado, pulmón, etc.) se obtuvieron utilizando el estuche comercial de la compañía Ambion .

Los RNAm necesarios para la construcción de la biblioteca de DNAc fueron purificados a partir de RNA total, utilizando el estuche comercial "Oligotex" de la compañía QUIAGEN.

La integridad de cada uno de los RNAs fue verificada en geles de agarosa con isotiocianato de guanidina, siguiendo la técnica descrita por Goda y cols. (50). La calidad y concentración de los RNAs fue determinada por espectrofotometría (48).

4.3.3 Obtención de las secuencias de GH del gato y tlacuache.

Las secuencias génica y del DNAC de GH del gato y tlacuache respectivamente, fueron obtenidas por PCR a partir de DNAg y RNA hipofisiario, respectivamente. En ambos casos, los iniciadores utilizados fueron diseñados a partir de las secuencias de GHs reportadas para mamíferos (Figura 5).

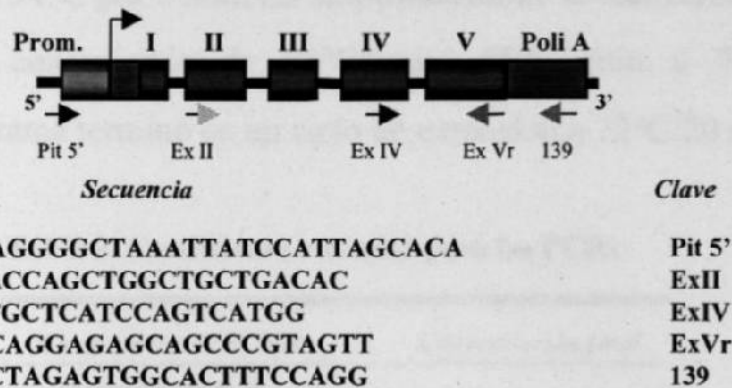


Figura 5.- Sitios de apareamiento de iniciadores. Se ilustran los sitios de apareamiento y las secuencias de los iniciadores utilizados en la PCR para la obtención de las secuencias de GH de gato y tlacuache.

4.3.3.1 Retrotranscripción del RNA hipofisiario del tlacuache.

En el caso del DNAC de la GH del tlacuache, previo a la amplificación se realizó una reacción de retrotranscripción. Este último fue preparado utilizando el estuche comercial "RNA PCR Kit", de la compañía Perkin Elmer; 500 ng de RNA hipofisiario fueron retrotranscritos utilizando 2.5U/ μ l de la enzima MuLV, 1mM de dNTPs, 5mM de MgCl₂, 1U/ μ l de inhibidor de RNAsa y 2.5 μ M de hexámeros al azar. La reacción fue incubada durante 10 min a temperatura ambiente, llevándose posteriormente a cabo los siguientes pasos: 42°C/15min,

99°C/5min y finalmente 5°C/5min, después del cual la reacción se almacenó a -20°C hasta su uso.

4.3.3.2 Reacciones de amplificación.

Las PCRs a partir de DNAg de gato y DNAc de hipófisis del tlacuache se llevaron a cabo utilizando diferentes pares de oligonucleótidos, bajo las condiciones estándar de reacción descritas en la tabla 2. Después de un paso de desnaturalización a 94°C por 3 min, las amplificaciones se realizaron durante 30 ciclos, cada uno consistiendo de 94°C/1min, 55°C/1min y 72°C/1 min. Finalmente el programa terminó en un ciclo de extensión a 72°C/20 min.

Tabla 2. Condiciones estándar para las PCRs

<i>Componentes de la PCR</i>	<i>Concentración final</i>
Amortiguador de la reacción 10X	1X
MgCl ₂ 25 mM	1.5mM
dNTP's 10 mM	0.2mM
Iniciador 5' 5µM	0.1 µM
Iniciador 3' 5µM	0.1 µM
DNA polimerasa Taq	0.05U/µl
H2O mQ estéril cbp	50µl

4.3.4 Clonación y determinación de la secuencia nucleotídica de las GHs de gato y tlacuache.

La enzima Taq DNA polimerasa utilizada en la PCR tiene actividad transferasa terminal independiente de templado, lo cual permite la adición de una desoxiadenosina monofosfato (A) en los extremos 3' de los productos de PCR.

Esta propiedad ha sido ampliamente explotada para la clonación de este tipo de insertos en vectores plasmídicos preparados para llevar en sus extremos 3' residuos de timina complementarios a los de adenina (51). Esta estrategia se seleccionó para la clonación de las GHs del gato y tlacuache.

Las clonaciones se realizaron en el vector de clonación utilizado pBS SK de la compañía Stratagene. Para la preparación del vector T, 2.5 μg del DNA plasmídico previamente linearizado con la enzima de restricción *Eco* RV, fueron tratados con 1.25 U/ μg de la enzima DNA polimerasa Taq, 2mM de dTTP y 1.5mM de MgCl_2 , en un volumen de 40 μl . La reacción se incubó durante 2h a 70°C, tiempo después del cual se precipitó el vector T y se mantuvo a -20°C.

Los productos de PCR se sometieron a ligación en un volumen final de 10 μl con una relación inserto: vector T de 1:3 y 2U de DNA ligasa. La reacción se incubó a 16°C toda la noche y la mitad del volumen fue utilizada para transformar células XL1-blue Ca^{++} competentes (52).

La selección y caracterización de las clonas portadoras de los insertos de interés se llevaron a cabo a partir del DNA plasmídico preparado por el método de lisis alcalina descrito por Sambrook y cols. (48) y utilizando enzimas de restricción características de los genes GHs, como son *Pst* I, *Pvu* II y *Sma* I.

La secuencia de las clonas resultantes se determinó por secuenciación cíclica (AmpliCycle Kit) y utilizando $\alpha^{32}\text{PdATP}$. El uso de iniciadores consenso internos (Figura 5) durante las reacciones de secuenciación facilitó la obtención de la totalidad de la secuencia nucleotídica del inserto.

4.3.5 Identificación de DNACs relacionados a la familia GH-PL en tejido placentario de gato.

4.3.5.1 Obtención de una porción del DNAC de la Prl de gato

Durante la búsqueda de DNACs relacionados a la familia GH-Prl en tejido placentario de gato, se utilizó como sonda una porción del DNAC de la Prl de esta especie. Esta fue obtenida por RT-PCR a partir de RNA hipofisiario del gato. La estrategia de amplificación y clonación utilizada fue básicamente la descrita en las secciones 4.3.3.1 y 4.3.4, siendo los iniciadores utilizados para la amplificación diseñados a partir de las secuencias reportadas para la Prl en diferentes especies de carnívoros, incluyendo las de algunos rumiantes. Sus secuencias se muestran en la tabla 3.

Tabla 3. Iniciadores utilizados en la PCR para amplificar el DNAC de tejido placentario

<i>Secuencia</i>	<i>Clave</i>
ATGTTCAACGAATTTGATAA	PRL 5'
GAATGTAGGCTTAGCAGTTGC	PRL 3'
AGAGGTTTCATCCCAGG	PL3'
TTCATTACCAAGGCCATCAAC	PRP5'
TGAGAAATGTTCAACGAATT	PLP5'a

4.3.5.2 Análisis por Northern blot del RNA proveniente de tejido placentario de gato.

Veinte microgramos del RNA placentario de gata a mitad y término del periodo de gestación así como de vaca, fueron separados en un gel de agarosa-isotiocianato de guanidina (50). Posteriormente se realizó la transferencia por

capilaridad a una membrana de nylon (48). El RNA transferido fue fijado a 80°C durante 2h en un horno con vacío y luego la membrana fue prehibridada durante 2 h a 50°C, utilizando 5ml de la solución de prehibridación (0.5M Na₂HPO₄ · H₃PO₄, 7% SDS, pH 7.2) por cm². La hibridación se realizó durante 16 h a 50°C en la misma solución de prehibridación, pero agregando la sonda marcada con α³²P-dATP (~10⁶ cuentas/ml de solución). Después de este tiempo, la membrana fue lavada a 55°C por dos ciclos de 15 minutos c/u con las siguientes soluciones: 6X SSC/0.1% SDS, 3X SSC/0.1% SDS, 2X SSC/0.1% SDS y finalmente 1 ciclo a 65°C con la solución 0.1X SSC/0.1% SDS. La membrana fue expuesta a una película de autorradiografía y revelada 24 h después.

4.3.5.3 Análisis por Western blot de las proteínas obtenidas a partir de tejido placentario de gato.

Para el análisis por Western blot, se prepararon extractos proteicos totales a partir de hígado, pulmón y placenta de gato (mitad y término), vaca y ratón, utilizando la técnica descrita por Pollard y Walker (52). Brevemente, 0.5 mg de tejido se disoció mecánicamente con 500 µl de buffer de extracción frío (0.5% Tritón X-100, 10mM Tris-Cl pH 7.5, 1mM MgCl₂, 20mM KCl, 0.2 mM DTT y 10% glicerol) y la mezcla se incubó a 4°C por 30 min con agitación suave. Posteriormente se centrifugó durante 1 h a 16,000 rpm y 4°C. El sobrenadante recuperado fue cuantificado utilizando el método de Bradford (54) y almacenado en alícuotas a -70°C. Aproximadamente 15µg de cada uno de los extractos proteicos fueron separados en un gel de poliacrilamida al 12% (54). Las proteínas fueron electrotransferidas a una membrana de nitrocelulosa (55). El

ensayo de Western blot fue realizado bajo las siguientes condiciones (56): la membrana fue bloqueada durante 1 h a 37°C con una solución de 5% leche descremada/1:1000 Tween 20 en buffer PBS (0.136M NaCl, 2.68mM KCl, 10.1mM Na₂HPO₄, 1.76mM KH₂PO₄). Después de este tiempo, ésta se lavó 3 veces con 0.3% leche descremada/0.1% Tween 20 en buffer PBS haciendo cambio de la solución cada 5 min. Posteriormente, la membrana se incubó durante 1 h a 37°C con el antisuero anti-Prl de ovino diluido 1:500 en PBS. Nuevamente, la membrana se lavó para finalmente incubarse con el anticuerpo anti-conejo conjugado con fosfatasa alcalina durante 1 h a temperatura ambiente. El ensayo fue revelado con la adición del sustrato BCIP/NBT (48)

4.3.5.4 Construcción y tamizaje de una biblioteca de DNAc de la placenta de gato.

4.3.5.4A. Construcción de la biblioteca.

En una biblioteca de DNAc se representa la información codificada por los RNAs mensajeros (RNAm) del tejido específico de interés. En este trabajo, se llevó a cabo la construcción de una biblioteca a partir del RNAm proveniente de tejido placentario de gato a mitad del periodo de gestación. Para lograrlo, se utilizó el estuche comercial previamente descrito (materiales) siguiendo las instrucciones de la casa comercial, las cuales se esquematizan en la Figura 6.

4.3.5.4B. Tamizaje de la biblioteca.

Para el tamizaje de la biblioteca se utilizaron 20 cajas de Petri de 150-mm de diámetro con medio de cultivo NZCY (1% NZ-amina, 0.5% NaCl, 0.5% Extracto de levadura, 0.1% Casa-aminoácidos, 0.2% MgSO₄.7H₂O). Estas cajas son suficientes para realizar el tamizaje de un título de 10⁶ pfu (50,000 pfu/caja). La infección se llevó a cabo utilizando las células XL1-blue MRF'y 8 ml de

NZCY de top-agarosa por placa. Las placas fueron incubadas a 37°C durante 8 h, después de este tiempo se dejaron 2 h a 4°C para prevenir que el top-agar se pegue a las membranas de nylon durante la réplica (lift) de las cajas. Después de orientar las membranas y la caja utilizando una aguja impregnada con tinta china, se realizó la transferencia por duplicado. Posteriormente, las membranas

Síntesis del cDNA

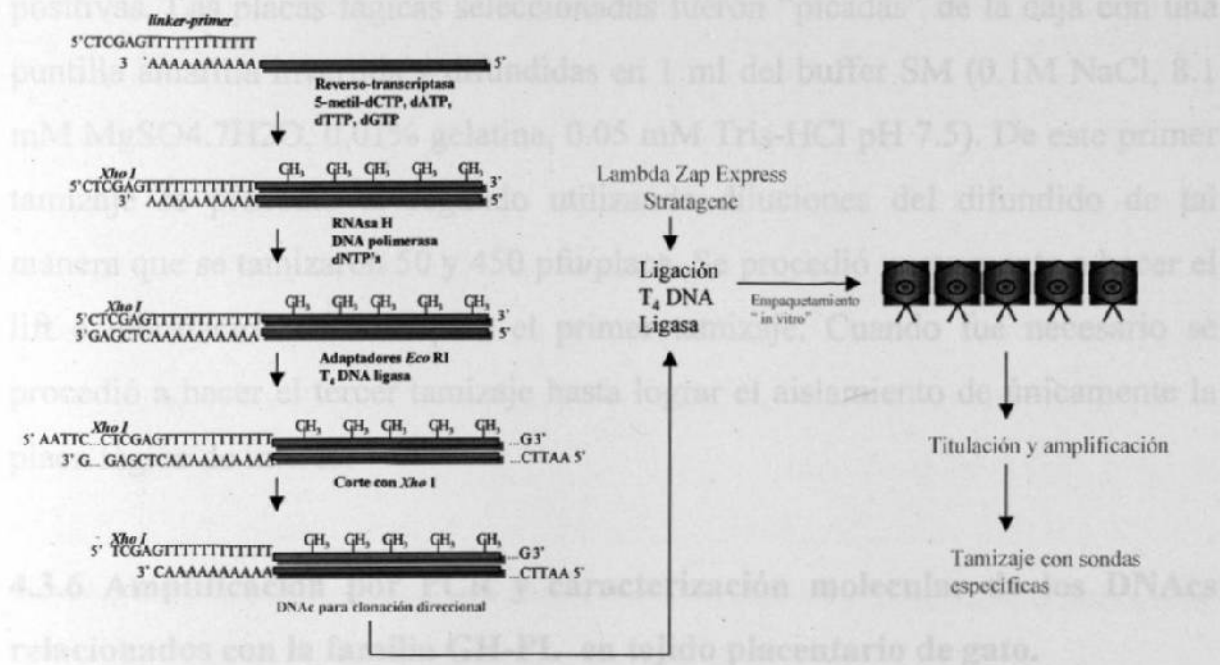


Figura 6.- Construcción de una biblioteca de DNAs (Stratagene). La estrategia incluye los siguientes pasos: 1. Síntesis de DNAs para la clonación direccional; 2. Ligación a los brazos del vector λ Zap Express; 3. Empaquetamiento "in vitro" en la partículas fágicas; 4. Titulación y amplificación de la biblioteca.

fueron desnaturalizadas y neutralizadas para finalmente fijarlas a 80°C durante 2h en un horno con vacío. Todas las membranas se prehibridaron durante 2 h a

50°C, utilizando 0.5ml de la solución de prehibridación (0.5M Na₂HPO₄, 7% SDS, pH 7.2 con H₃PO₄) por cm² de las membranas. Después de este tiempo, la solución de prehibridación fue cambiada por un volumen igual de solución de hibridación, la cual contenía la sonda marcada (~10⁶ cuentas/ml de solución). Esta última fue marcada siguiendo al pie de la letra las instrucciones del estuche comercial “RadPrime Labelling System”.

Finalmente, las membranas fueron expuestas a películas ultrasensibles y después del revelado las autorradiografías se utilizaron para identificar las señales positivas. Las placas fágicas seleccionadas fueron “picadas” de la caja con una puntilla amarilla invertida y difundidas en 1 ml del buffer SM (0.1M NaCl, 8.1 mM MgSO₄·7H₂O, 0.01% gelatina, 0.05 mM Tris-HCl pH 7.5). De este primer tamizaje se procedió al segundo utilizando diluciones del difundido de tal manera que se tamizaron 50 y 450 pfu/placa. Se procedió nuevamente a hacer el lift e hibridación descrito para el primer tamizaje. Cuando fue necesario se procedió a hacer el tercer tamizaje hasta lograr el aislamiento de únicamente la placa fágica de interés.

4.3.6 Amplificación por PCR y caracterización molecular de los DNAs relacionados con la familia GH-PL en tejido placentario de gato.

Las reacciones de amplificación se llevaron a cabo a partir de RNA placentario de gato a dos periodos de gestación (mitad y término) además de RNA placentario de vaca como control positivo de las reacciones. Previo a la amplificación se realizó una retrotranscripción del RNA utilizando la retrotranscriptasa MuLV y el protocolo antes señalado (ver 3.3.3.1). Las condiciones de la PCR fueron las estándar (Tabla 2) y las secuencias de los iniciadores se describen en la tabla 3.

Los productos de amplificación de ambas placentas se ligaron sin previa purificación, al vector de clonación "TA cloning vector" de la compañía Stratagene, en presencia de 4U de la enzima T₄ DNA ligasa. La mitad del producto sirvió para transformar células Top 10 Ca⁺⁺ competentes. La selección de las clonas recombinantes portadoras de los insertos de interés fue realizada mediante un tamizaje por PCR (Yi Hog-Chou, comunicación personal), utilizando iniciadores que se aparean en el vector. Las colonias blancas fueron picadas individualmente de la caja de Petri y resuspendidas en 20µl de H₂O mQ estéril. A 10µl de esta suspensión se le agregó una gota de aceite mineral y las células fueron lisadas en el termociclador mediante un ciclo con las siguientes temperaturas: 96°C/5 min, 50°C/1.5 min, 96°C/1.5 min, 45°C/1.5 min, 96°C/1 min y 40°C/1 min. Posteriormente, a cada tubo se agregaron 10 µl de la mezcla de PCR de la tabla 4 y todos fueron sometidos a amplificación durante 30 ciclos con los siguientes pasos: 94°C/1min, 60°C/1 min y 72°C/1 min. Las clonas recombinantes fueron seleccionadas en base al tamaño esperado del inserto más 175pb que son amplificados del vector TA (los iniciadores se aparean en la secuencia del vector). Las clonas obtenidas fueron sometidas a secuenciación bajo las condiciones ya descritas (ver 4.3.4).

Tabla 4. Condiciones del tamizaje de las clonas de DNAc.

<i>Componentes de la PCR</i>	<i>Concentración final</i>
Amortiguador de la reacción 10X	1X
MgCl ₂ 25 mM	1.5mM
dNTP's 10 mM	0.2mM
*Iniciador 5' 20µM	0.3mM
**Iniciador 3' 20µM	0.3mM
DNA polimerasa Taq	0.5U/ µl
H ₂ O mQ estéril cbp	20µl

* secuencia 5'-CGTAATACGACTCACTATAGGGC-3'

** secuencia 5'-GGAAACAGCTGTGACCATGATTAC-3'

4.3.7 Reconstrucción de árboles filogenéticos.

A partir de las secuencias nucleotídicas obtenidas, se infirieron las aminoacídicas, utilizando el programa DNA Strider. Estas se compararon con las secuencias de GH reportadas en el GenBank.

En la reconstrucción de los árboles filogenéticos se utilizaron diferentes paquetes computacionales. El primero de ellos fue el Clustal W (58), con el que se llevaron a cabo alineamientos de las secuencias obtenidas de GHs del gato y tlacuache, así como de otras GHs de mamíferos obtenidas del GenBank. Los alineamientos obtenidos fueron posteriormente utilizados para la obtención de árboles filogenéticos con los programas de Máxima Parsimonia (DNAPARS), DNADIST, PROTPARS y Neighbor-Joining/UPGMA que se encuentran dentro del paquete computacional Phylip (59).

CAPITULO V

RESULTADOS

5.1 Obtención de las secuencias de GHs de gato y tlacuache.

5.1.1 GH del gato.

Para la obtención del gen de la GH del gato, se llevó a cabo una serie de reacciones de amplificación utilizando combinaciones de los pares de iniciadores mostrados en la Figura 5. Debido a que estos iniciadores son consenso para GHs de mamíferos, en la mayoría de las reacciones de amplificación se obtuvieron bandas adicionales a las esperadas, sin embargo, mediante dos reacciones de PCR y utilizando los pares de iniciadores Pit5'/ExV y ExII/139, se logró la obtención del gen completo de la GH del gato (Figura 7). El primero de los fragmentos (1.5 Kb) abarca 200 pb de la región promotora hasta la mitad del exón V, y el segundo (1.2 kb) va de la mitad del exón II hasta unos cuantos pares de bases después de la señal de poliadenilación. Después de la clonación de cada uno de los fragmentos en el vector pBS SK, las clonas recombinantes seleccionadas fueron sometidas a secuenciación y el traslape entre los dos fragmentos de amplificación permitió corroborar la secuencia interna del gen (exón II-V).

5.1.1.1 Organización del gen de la GH del gato.

El análisis de la secuencia nucleotídica de la GH del gato (Figura 8) mostró que el tamaño del gen es de 1.7 Kb y que éste presenta la estructura clásica de las GH's: 5 exones y 4 intrones. Todas las uniones intrón-exón siguen la regla GT-AG (60).

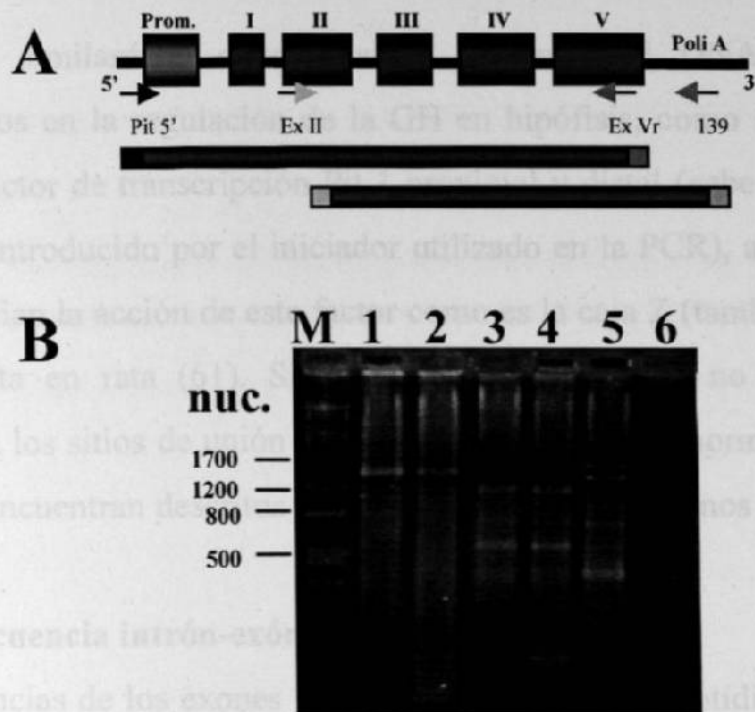


Figura 7.- Obtención del gen de la GH del gato. A. El esquema muestra una representación de la anatomía típica de un gen de GH, las flechas indican los sitios de apareamiento de los iniciadores utilizados para obtener el gen y las barras el tamaño esperado del producto de amplificación. B. En los carriles 1 y 2 se muestra el producto de amplificación obtenido a partir del DNAg de gato utilizando el par de iniciadores Pit 5'/149 , 3 y 4 corresponden a la amplificación con el par ExII/ExV, mientras que 5 y 6 corresponden a la amplificación del DNAg del tlacuache (iniciadores Pit 5'/149) y al testigo negativo de la reacción, respectivamente. M= marcador de peso molecular λ *Pst* I.

5.1.1.2 Región promotora

La región 5' del gen es muy similar a la secuencia promotora consenso para las GHs de mamíferos. La alta conservación observada en esta región permite suponer que el sitio de inicio de la transcripción está ubicado a la misma distancia que el reportado para los genes de las GHs de cerdo y humano (~ 23 pb después de la caja TATA). Se pudo identificar además la presencia de

secuencias similares a algunos sitios de unión al DNA que han sido involucrados en la regulación de la GH en hipófisis, como son los sitios de unión al factor de transcripción Pit 1 proximal y distal (cabe aclarar que este último es introducido por el iniciador utilizado en la PCR), así como algunos que potencian la acción de este factor como es la caja Z (también llamado Zn-15) descrita en rata (61). Sin embargo, la secuencia no reveló regiones similares a los sitios de unión para glucocorticoides y/o hormona tiroidea, los cuales se encuentran descritos en los genes de GH de algunos mamíferos (38).

5.1.1.3 Secuencia intrón-exón

Las secuencias de los exones presentan 8 cambios nucleotídicos con respecto a las dos secuencias reportadas para el DNAC del gato. Como se observa en la figura 8, seis de ellos fueron sinónimos mientras que los restantes resultaron en sustituciones aminoacídicas, una de ellas (Ala←Th) es compartida con la secuencia inferida a partir del DNAC reportado por Castro-Peralta y Barrera-Saldaña (21), y la segunda (Val→Leu) no está presente en ninguna de las secuencias reportadas para el gato. Sin embargo, este cambio de aminoácido se observa en la GH de bovino (62). La longitud de los exones es básicamente la observada para la mayoría de las GHs de mamíferos y su secuencia se asemeja a la de los exones del gen de la GH del cerdo. En el caso de la longitud de los intrones, como es de esperarse, se encontró mayor variación con respecto a otras GHs, lo que se muestra en la Tabla 5.

Tabla 5. Comparación de los intrones del gen GH en algunos mamíferos

	<i>Intrón 1</i>	<i>Intrón 2</i>	<i>Intrón 3</i>	<i>Intrón 4</i>
Gato	248	211	157	273
Bovino	246	226	226	272
Cerdo	241	209	196	277
Ratón	182	187	167	197

5.1.2 GH del tlacuache.

Para la obtención del gen de GH del tlacuache, se aplicó la misma estrategia que la utilizada para el gato. Sin embargo, aun cuando con el par de iniciadores Pit 5'/149 se obtuvieron bandas de amplificación de un tamaño aproximado al esperado (Figura 7), la clonación y posterior caracterización por secuenciación, mostró que se trataba de amplificación inespecífica.

Debido a lo anterior, se decidió utilizar el par de iniciadores diseñados sobre las zonas más conservadas entre las GHs como son ExII/ExV para amplificar el DNAc obtenido por retrotranscripción del RNA hipofisiario del tlacuache. En estos ensayos, se utilizó RNA de tejido placentario de humano como testigo positivo de la RT-PCR, dada la abundancia de transcritos de hPLs amplificables en este tejido con el par de iniciadores utilizado. Como se muestra en la Figura 9, el producto de amplificación obtenido tiene un tamaño de aproximadamente 430 pb. La obtención de la secuencia nucleotídica de las clonas portadoras de este fragmento, confirmó que efectivamente se trataba de una porción del DNAc de la GH del tlacuache, lo cual fue posteriormente corroborado con el primer reporte en el GenBank de la secuencia de GH proveniente de un marsupial, el possum (*Trichosurus vulpecula*, número de acceso al GenBank AF052192).

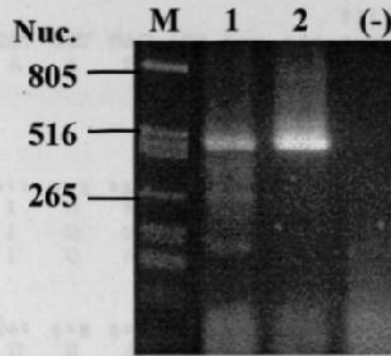


Figura 9.- Amplificación del DNAc del tlacuache. Después de la reacción de retrotranscripción una alícuota del DNAc al RNA hipofisiario del tlacuache fue amplificada con los iniciadores ExII/ExV (carril 1). M= marcador de peso molecular λ /Pst I, el carril 2 corresponde al producto de amplificación del DNAc placentario humano y (-) corresponde al testigo negativo de la reacción de PCR, sin DNA molde.

En la Figura 10 se indica la secuencia aminoacídica inferida a partir de la secuencia nucleotídica obtenida para la GH del tlacuache. Esta se comparó con la reportada para el possum, así como con la secuencia ancestral para las GHs en mamíferos propuesta por Wallis, misma que corresponde a la secuencia reportada para el cerdo (18). Como puede observarse, existe una gran cantidad de cambios entre las GHs de los marsupiales con respecto a la propuesta por Wallis. Interesantemente, la comparación entre las dos secuencias de marsupiales muestra que existe solo un cambio aminoacídico entre ellas, el cual parece ser específico de especie.

	1/1										31/11										
	CTG	CAC	CAG	CTG	GCT	GCT	GAC	ACA	taa	aa	gag	ttt	gag	cga	acc	taa	att	cca			
TLACUACHE	L	H	Q	L	A	A	D	T	Y	K	E	F	E	R	T	Y	I	P			
POSSUM									Y	K	E	F	E	R	T	Y	I	P			
ANCESTRAL									Y	K	E	F	E	R	A	Y	I	P			
	61/21										91/31										
	cag	aga	cat	tcc	atc	cag	agt	acc	cag	aca	gct	ttc	tgt	ttc	tct	gaa	acc	atc			
TLACUACHE	Q	R	H	S	I	Q	S	T	Q	T	A	F	C	F	S	E	T	I			
POSSUM	Q	R	H	S	I	Q	S	T	Q	T	A	F	C	F	S	E	T	I			
ANCESTRAL	Q	R	Y	S	I	Q	N	A	Q	A	A	F	C	F	S	E	T	I			
	121/41										151/51										
	ccc	act	ggc	agc	gat	gag	gcc	cag	cag	aga	act	gat	gtc	gag	ttg	ctt	cgt	ttt			
TLACUACHE	P	T	G	K	D	E	A	Q	Q	R	T	D	V	E	L	L	R	F			
POSSUM	P	T	G	K	D	E	A	Q	Q	R	S	D	V	E	L	L	R	F			
ANCESTRAL	P	T	G	K	D	E	A	Q	Q	R	S	D	V	E	L	L	R	F			
	181/61										211/71										
	ctg	ctt	atc	cag	tct	tgg	ctc	agc	cct	gta	cag	ttc	ctc	agc	aga	gtc	ttc	acc			
TLACUACHE	L	L	I	Q	S	W	L	S	P	V	Q	F	L	S	R	V	F	T			
POSSUM	L	L	I	Q	S	W	L	S	P	V	Q	F	L	S	R	V	F	T			
ANCESTRAL	L	L	I	Q	S	W	L	G	P	V	Q	F	L	S	R	V	F	T			
	241/81										271/91										
	ctg	gtc	ttc	ggc	acc	tca	gac	cgt	gtc	tat	gag	aa	ctg	agg	gac	ctg	gan	gag			
TLACUACHE	L	V	F	G	T	S	D	R	V	Y	E	K	L	R	D	L	E	E			
POSSUM	L	V	F	G	T	S	D	R	V	Y	E	K	L	R	D	L	E	E			
ANCESTRAL	L	V	F	G	T	S	D	R	V	Y	E	K	L	K	D	L	E	E			
	301/101										331/111										
	cag	gat	ctc	atg	cag	gag	ctg	gaa	gac	ggc	agt	tca	aga	ggt	ggt	atg	gtc	ctc			
TLACUACHE	Q	A	L	M	Q	E	L	E	D	G	S	S	R	G	G	L	V	L			
POSSUM	Q	A	L	M	Q	E	L	E	D	G	S	S	R	G	G	L	V	L			
ANCESTRAL	Q	A	L	M	R	E	L	E	D	G	S	P	R	A	G	Q	I	L			
	361/121										391/131										
	acc	tat	gac	aaa	ttt	gac	acc	aac	cta	cgc	agt	gat	gag	gcg	ctg	ctc	sag	AAC			
TLACUACHE	T	Y	D	K	F	D	T	N	L	R	S	D	E	A	L	L	K	N			
POSSUM	T	Y	D	K	F	D	T	N	L	R	S	D	E	A	L	L	K				
ANCESTRAL	T	Y	D	K	F	D	T	N	L	R	S	D	D	A	L	L	K				
	421/141																				
TLACUACHE	CTG	CTC	TCC	TGC	TTC	ATC															
	L	L	S	C	F	I															

Figura 10. Secuencia del DNac de la GH del tlacuache. En la parte superior se muestra la secuencia nucleotídica de una porción (ex II-exV) de la GH del tlacuache. El alineamiento que se presenta en la parte inferior, se obtuvo utilizando el programa Clustal W. A partir de la secuencia nucleotídica de la GH del tlacuache se infirió la aminoacídica, lo que también se hizo para las GHs del possum y la ancestral (cerdo). Las letras mayúsculas en la secuencia nucleotídica indican la secuencia de los iniciadores, las letras azules las diferencias entre la secuencia ancestral y las de los marsupiales y las rojas las diferencias entre las dos especies de marsupiales en comparación.

5.2 Caracterización molecular y obtención de DNACs relacionados con la familia GH-PL en tejido placentario de gato.

5.2.1 Obtención del DNAC de Prl

A partir del RNA hipofisiario de gato y utilizando iniciadores específicos durante la PCR (PRL 5'/PRL3', Tabla 3), se logró la amplificación de un fragmento correspondiente al DNAC de la Prl. Este fragmento fue clonado, caracterizado y parcialmente secuenciado para corroborar su identidad con la secuencia previamente reportada (22). La Figura 11 muestra el producto de amplificación obtenido, así como un mapa con las principales enzimas de restricción utilizadas para la caracterización.

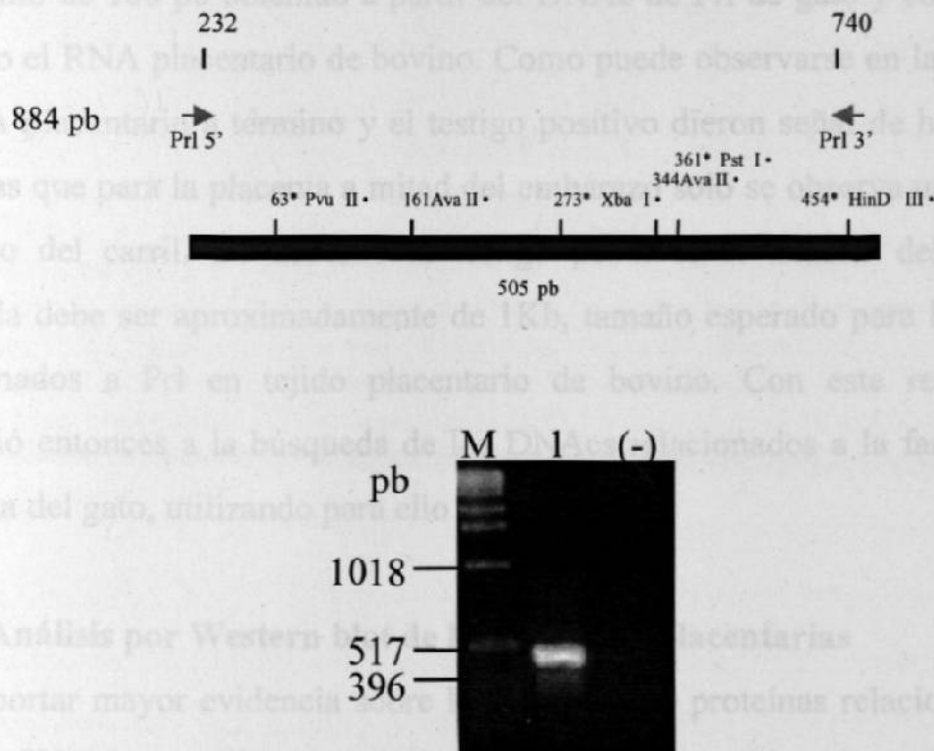


Figura 11. Obtención del DNAC de la Prl del gato. El esquema muestra los sitios de apareamiento de los iniciadores utilizados y el mapa de restricción del fragmento de amplificación correspondiente a la Prl. En la parte inferior se muestra el resultado de la amplificación obtenida a partir del DNAC de tejido hipofisiario de gato (1), M corresponde al marcador de peso molecular de 1Kb (BRL) y (-) al testigo negativo de la reacción. El gel fue transferido a una membrana de nylon e hibridado con el fragmento de 500pb purificado y marcado con ^{32}P .

Cabe señalar que además del producto de amplificación de ~500pb teóricamente esperado, se obtuvo una banda de tamaño inferior (Figura 11), que podría resultar de un splicing alternativo ya que después de realizar un ensayo de Southern blot utilizando el fragmento de amplificación de 500 pb, esta banda inferior mostró hibridación (datos no mostrados).

5.2.2 Análisis por Northern blot del RNA placentario.

A partir del RNA de placenta de gato en dos periodos de gestación (mitad y término) se realizaron ensayos de Northern blot utilizando como sonda un fragmento de 180 pb obtenido a partir del DNAc de Prl de gato y como testigo positivo el RNA placentario de bovino. Como puede observarse en la figura 12, el RNA placentario a término y el testigo positivo dieron señal de hibridación, mientras que para la placenta a mitad del embarazo solo se observa un barrido a lo largo del carril. De acuerdo al testigo positivo, el tamaño de la banda obtenida debe ser aproximadamente de 1Kb, tamaño esperado para los DNacs relacionados a Prl en tejido placentario de bovino. Con este resultado se procedió entonces a la búsqueda de los DNacs relacionados a la familia en la placenta del gato, utilizando para ello RT-PCR.

5.2.3 Análisis por Western blot de las proteínas placentarias

Para aportar mayor evidencia sobre la expresión de proteínas relacionadas a la familia GH-Prl, se realizaron ensayos de Western blot utilizando anticuerpos en contra de la Prl de ovino. El antisuero utilizado fue capaz de reconocer la Prl presente en los extractos hipofisarios, como se muestra en la Figura 13. Además de la banda de 24 KDa se obtuvo una banda adicional de un peso molecular ligeramente mayor (~26KDa), la cual podría corresponder a una forma

glicosilada como ha sido observado en la Prl de ovino (NHDDK, Pituitary Hormones & Antisera Ctr).

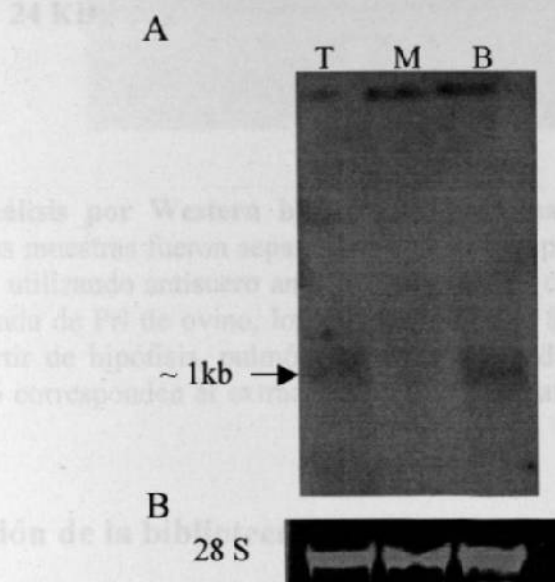


Figura 12.-Análisis por Northern blot de los RNAs relacionados a Prl en tejido placentario. A. Veinte μ g de RNA extraído a partir de tejido placentario de gato a mitad (M) y término (T) del periodo de gestación así como de bovino (B), fueron resueltos en un gel de agarosa-isotiocianato de guanidina al 1%, transferidos a una membrana de nylon e hibridados con una sonda marcada con 32 P proveniente del DNAc de Prl del gato. B. Se muestra la banda de RNA ribosomal (28S) teñida con bromuro de etidio, lo cual asegura la calidad e integridad del RNA.

Aun cuando en los carriles correspondientes a los extractos placentarios de gato se lograba observar una banda a nivel de la de 26 KDa (previamente observada en los extractos hipofisarios), la señal fue muy débil, lo cual podría sugerir una expresión muy baja en placenta o bien que las proteínas presentan poca reacción cruzada con el antisuero utilizado.

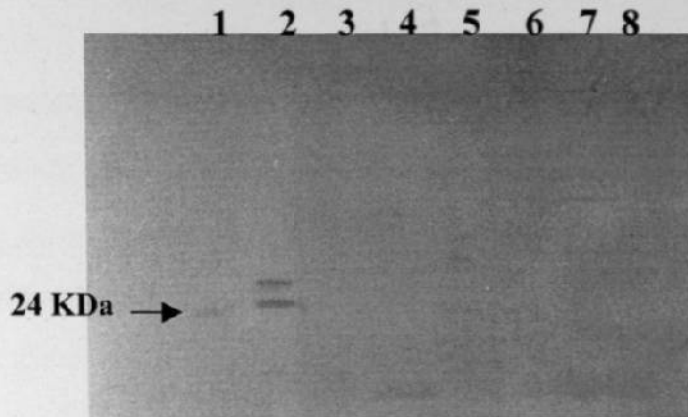


Figura 13. Análisis por Western blot de las proteínas relacionadas a Prl en tejido placentario. Las muestras fueron separadas en un gel de poliacrilamida al 12% y analizadas por inmunoblot utilizando antisuero anti-Prl de ovino. El carril 1 corresponde a 2.5 ng de la proteína purificada de Prl de ovino, los carriles 2, 4, 7 y 8 a los extractos proteicos de gato obtenidos a partir de hipófisis, pulmón, placenta a mitad y término, respectivamente. Los carriles 3, 5 y 6 corresponden al extracto de corazón de ratón y tejido placentario de ratón y vaca.

Las muestras fueron visualizadas después por autoradiografía.

5.2.4 Obtención de la biblioteca del DNAc de placenta de gato.

La biblioteca fue construída siguiendo las instrucciones que se describen en materiales y métodos. Los puntos clave dentro del procedimiento fueron la obtención de la primera y segunda cadenas del DNAc. En la Figura 14 se muestra la autorradiografía del gel alcalino donde se pudo verificar la integridad de ambos DNAs por el rango de tamaños obtenido en el barrido. El DNAc de doble cadena después de ser fraccionado por gradiente de sacarosa (10 a 40), se ligó a los brazos del fago lambda y posteriormente fue empacado *in vitro* en cápsides vacías. Finalmente, la biblioteca fue amplificada y el título obtenido fue de 1.4×10^6 pfu/ μ l.

En consecuencia, se hizo un cambio en la estrategia y se decidió utilizar la RT-PCR para identificar miembros de esta familia génica en la placenta de gato.

1 2



Figura 14. Síntesis de la primera y segunda cadena de DNAc. A partir del RNAm obtenido de tejido placentario de gato a mitad del periodo de gestación, se llevó a cabo la síntesis de la primera (1) y segunda cadena (2) de DNAc para posteriormente proceder a su clonación en los brazos del fago λ . Ambas cadenas fueron corridas en un gel de agarosa alcalino y las bandas fueron visualizadas después por autorradiografía.

5.2.5 Tamizaje de la biblioteca.

La selección del DNAc de la Prl del gato como sonda para el tamizaje de la biblioteca, se basó en el resultado del Northern (5.2.2) y en la relación filogenética entre las especies de los ordenes carnívora y artiodáctila. Para estos últimos, está bien documentado que las proteínas placentarias relacionadas a la familia GH-PL-Prl, tienen una mayor similitud con la Prl. Se realizaron dos tamizajes de la biblioteca, siguiendo el protocolo descrito en materiales y métodos y sin embargo, no se logró obtener clona alguna con el inserto de interés. En consecuencia, se hizo un cambio en la estrategia y se decidió utilizar la RT-PCR para identificar miembros de esta familia génica en la placenta de gato.

5.2.6 Aislamiento y caracterización de los DNACs de tejido placentario de gato.

El alineamiento de las secuencias reportadas para la Prl, PLs, y proteínas placentarias relacionadas a Prl en roedores y rumiantes-artiodáctilos, permitió el diseño de una serie de iniciadores para ser utilizados en el aislamiento de los DNACs relacionados a la familia génica GH-PL-Prl (PL5'/PL3', tabla 3). Durante el diseño se dió mayor importancia a las secuencias provenientes del orden artiodáctila, ya que éstos se encuentran más relacionados filogenéticamente con los carnívoros (5).

El diseño del primer par de iniciadores Prl 5' y Prl 3' se basó en las secuencias reportadas para la Prl y que están conservadas entre los diferentes DNACs de Prl, sobre todo en el caso del iniciador correspondiente al 5' (éstos fueron los utilizados para la obtención de una porción de la Prl de gato). Un segundo par (PL5' y PL3') fue diseñado tomando en cuenta más específicamente las secuencias reportadas para proteínas placentarias relacionadas a Prl en ratón y bovino (35,36,37,41,63-67). Se realizaron varios ensayos combinando los juegos de iniciadores, siendo el par Prl5'/PL3', el que dió el resultado más satisfactorio. Teóricamente, éste produce con el DNAC de la Prl de gato una banda de amplificación de aproximadamente 180 pb localizada entre los nucleótidos 241-419. Sin embargo, aun cuando esta banda fue obtenida en el control, en los dos tejidos de placenta ensayados (mitad y término de la gestación), así como también en el de bovino, el análisis de las reacciones de RT-PCR permitió observar la presencia de bandas adicionales a la esperada (Figura 15A); por tal razón, se realizó la clonación del producto total de amplificación en el vector TA. A través del tamizaje por PCR y selección en base a tamaño de las clonas

obtenidas (Figura 15B) se logró el aislamiento de dos tipos de clonas representativas de los dos periodos de gestación ensayados.

La comparación de las secuencias nucleotídicas obtenidas con la región de 180 pb del DNAC de la Prl de gato, permitió clasificar las clonas en dos tipos. Las clonas del tipo I son muy similares a la Prl hipofisiaria y fueron encontradas tanto en la placenta a mitad (Ia) y término (Ib) del periodo gestación, mientras que la del tipo II presenta un gran número de diferencias con respecto a la Prl hipofisiaria y solo fue identificada en la placenta a mitad de la gestación. Como se muestra en la Figura 16A, la clona Ia presentó únicamente un cambio nucleotídico, en la tercera posición del codón, por lo tanto la secuencia aminoacídica inferida fue idéntica a la Prl hipofisiaria; sin embargo, la clona Ib presentó dos cambios nucleotídicos en la segunda y tercera posición del codón, lo cual dió como resultado un cambio aminoacídico (His a Arg) con respecto a la de la Prl hipofisiaria. En la Figura 16B se puede observar que la clona tipo II presenta un gran número de cambios con respecto a la secuencia de la Prl hipofisiaria, los resultados del programa Blast mostraron que esta clona comparte cierta similitud con el DNAC de PL II de bovino.

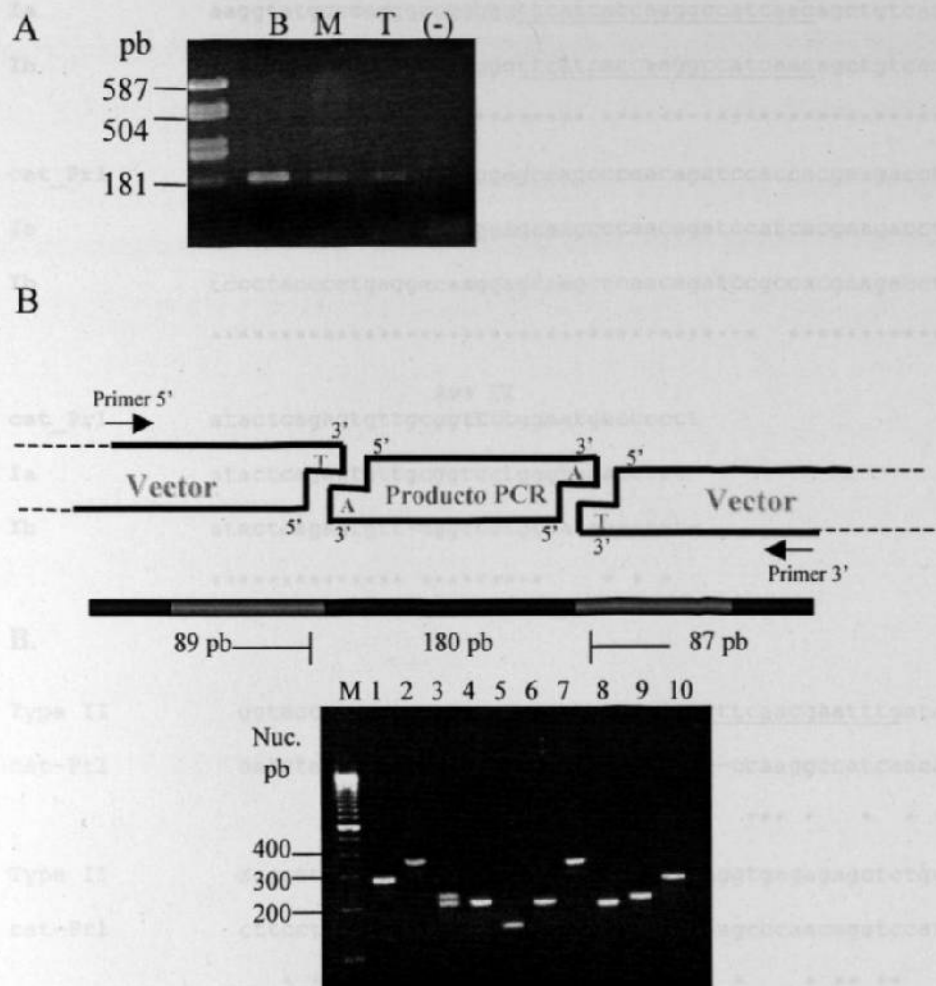


Figura 15.- Obtención de las clonas relacionadas a Prl a partir de tejido placentario de gato. A. Se muestran los resultados de la amplificación del DNAc obtenido por RT a partir de tejido placentario de gato a mitad (M) y término (T) de la gestación. En las reacciones se incluyeron testigos tanto un positivo (RNA placentario de bovino = B), como uno negativo (-) de la reacción de PCR.

B. El esquema representa los sitios de apareamiento y los iniciadores utilizados durante el tamizaje por PCR. La selección se basó en el tamaño de los productos de amplificación el cual para las clonas de interés fue de ~340 pb. Los carriles del 1 al 5 corresponden a clonas obtenidas a partir de la placenta a mitad de la gestación, en tanto que del 6 al 10 se muestran las correspondientes a la placenta a término. (M=marcador de peso molecular 100bp leader).

A

	Pvu II
cat_Prl	aaggtatgccagggcgggggttcattaccaagggccatcaacagctgtcacacttctctcc
Ia	aaggtatgccagggcgggggttcattaccaagggccatcaacagctgtcacacttctctcc
Ib	aaggtatgccagggcgggggttcattaccaagggccatcaacagctgtcacacttctctcc

cat_Prl	tcctaccctgaggacaaggagcaagcccaacagatccatcacgaagacctctgaacgtg
Ia	tcctaccctgaggacaaggagcaagcccaacagatccatcacgaagacctctgaacgtg
Ib	tcctaccctgaggacaaggagcaagcccaacagatccatcacgaagacctctgaacgtg

	Ava II
cat_Prl	atactcagagtgttcgggtcctggaatgacccct
Ia	atactcagagtgttcgggtcctggaactct-
Ib	atactcagagtgttcgggtcctggaactct-
	***** * * *

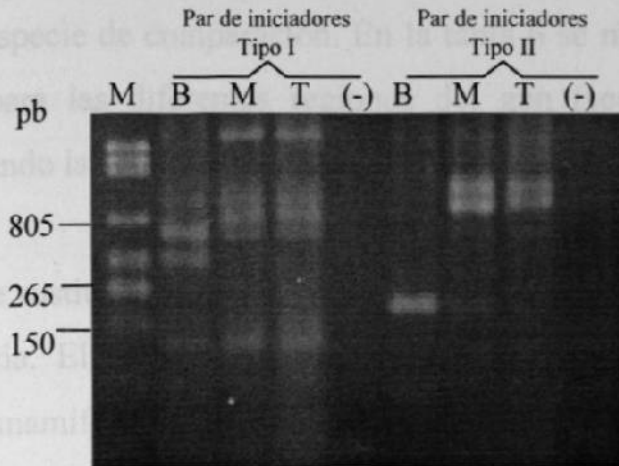
B.

Type II	ggtagccagcagctgttcacgactttgataaatgttcaacgaatttgataaatcgagga
cat-Prl	aaggtat-gcccagggcgggggttcatta----ccaagggccatcaacagctgtcaca
	* * * * * * * * * * * * * * *
Type II	aggcttcattgaggagaggttttagacattg--ttggtgagagagctctggcaggaagtgt
cat-Prl	cttctccctccctaccctgaggacaaggagcaagcccaacagatccatcacgaagacc
	* ** * * **** * * * * * * * * *
Type II	atttaagggaacgtggttcttctcttgaacaaagac
cat-Prl	ttct---gaacgtgatactcagagtgttcgggtcc
	* * * * * * * * * * * * *

Figura 16. Comparación de la secuencia nucleotídica de la Prl hipofisiaria de gato y las secuencias de los DNAs placentarios relacionados a Prl. Utilizando el programa Clustal W se hizo un alineamiento de las secuencias de las clonas obtenidas y el fragmento correspondiente a 180 pb de la Prl hipofisiaria de gato. **A.** Alineamiento de las secuencias del tipo I: clonas Ia y Ib provenientes de tejido placentario a mitad y término, respectivamente. **B.** Comparación de la secuencia nucleotídica de la clona del tipo II derivada de la mitad del periodo de gestación. Las secuencias de los iniciadores 5'específicos de cada tipo de clona se muestran subrayados y con asteriscos indican la similitud entre las secuencias comparadas.

Para probar si como se ha descrito para otras especies (36,43), existe más de un RNA relacionado a Prl en la placenta de gato, se llevaron a cabo una serie de ensayos de RT-PCR con el RNA de dicho tejido a diferentes periodos de gestación, y utilizando dos iniciadores 5' específicos diseñados a partir de las secuencias de las clonas tipo I y II (Figura 16) en conjunto con el mismo iniciador 3'(PL3') previamente descrito. Como puede observarse en la figura 17A, con ambos juegos de iniciadores se obtuvieron bandas de amplificación adicionales a las teóricamente esperadas (~98 pb), razón por la cual el gel fue transferido a una membrana de nylon e hibridado con un fragmento de 98 pb proveniente del DNAC de la Prl. Esta sonda se generó por digestión de la clona portadora del DNAC de Prl con las enzimas *Pvu* II y *Ava* II, lo que permitió eliminar la secuencia de los iniciadores. Aun cuando los patrones de hibridación obtenidos fueron específicos del tipo de clona, los resultados no mostraron diferencias claras en los patrones de expresión entre los dos estadios de desarrollo del tejido placentario (Figura 17B).

A



B

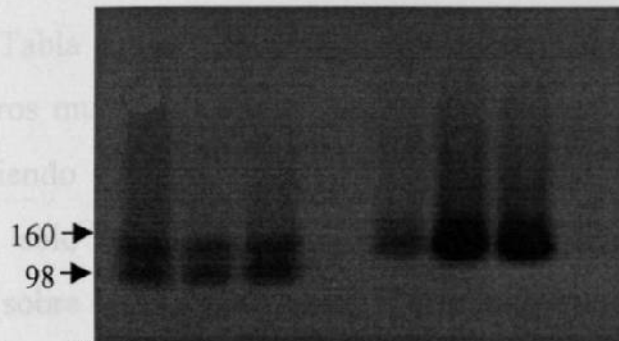


Figura 17.- Análisis de la expresión de RNAm relacionados a Prl por medio de RT-PCR y Southern blot de los productos de PCR. A. El tejido placentario de gato a mitad de la gestación (M) y término de ésta (T), así como el de bovino (B), fueron retrotranscritos y amplificados durante 35 ciclos utilizando dos iniciadores 5' específicos para las clonas del tipo I y II. El testigo negativo (-), no da ninguna señal detectable. M corresponde al marcador de peso molecular λ *Pst* I. B. Después de la transferencia, los productos de PCR fueron hibridados con una sonda derivada de Prl y marcada con α - 32 PdATP.

5.3 Análisis de las nuevas secuencias de GH y reconstrucción de árboles filogenéticos.

5.3.1 Determinación de las velocidades de cambio de la GH en Carnívoros.

Para determinar las velocidades de cambio que presentan los carnívoros, se analizaron las secuencias de los genes del gato y del león (esta última fue determinada en nuestro laboratorio, y no ha sido reportada aun al GenBank),

así como las del cerdo, del bovino, incluyendo también a la secuencia del gen de GH del ratón como especie de comparación. En la tabla 6 se muestran las velocidades obtenidas para las diferentes regiones del gen (secuencia 5', exones e intrones) utilizando la ecuación descrita por Li y Graur (4):

$$r = K/(2T)$$

donde K es el número de sustituciones entre dos secuencias homólogas y T el tiempo de su divergencia. El tiempo utilizado para la divergencia de los principales ordenes de mamíferos fue 75 millones de años, el número de sustituciones fue determinado utilizando el programa DNADIST (59). Como puede observarse en la Tabla 6, las velocidades de cambio obtenidas en las dos especies de carnívoros muestran valores constantes tanto en los intrones como en los exónes, siendo estos comparables con los obtenidos para la secuencia del cerdo, y solo en el caso del bovino se observan valores relativamente mayores (sobre todo en la región 5'), lo cual coincide con lo previamente reportado (18).

5.3.2 Reconstrucción de árboles filogenéticos.

Las secuencias nucleotídicas y aminoacídicas relacionadas con las GHs del gato y tlacuache obtenidas en este estudio, así como las de las GHs de otras especies de mamíferos fueron utilizadas en la construcción de árboles filogenéticos. El análisis en ambos casos, fue restringido a la secuencia codificante que abarca del exón II a la mitad del exón V, con el fin de incluir la secuencia obtenida para el tlacuache.

Tabla 6. Velocidades de cambio* para el GH en carnívoros
(calculadas a partir de la secuencia del ratón)

	<i>Región 5'</i>	<i>Exones</i>	<i>Intrones</i>
Gato	2.77 10⁻⁹	1.21 10⁻⁹	5.56 10⁻⁹
León	2.84 10⁻⁹	1.19 10⁻⁹	5.59 10⁻⁹
Bovino	5.16 10⁻⁹	1.46 10⁻⁹	6.22 10⁻⁹
Cerdo	2.77 10⁻⁹	1.22 10⁻⁹	6.22 10⁻⁹

* sustituciones/sitio/año.

Los alineamientos se llevaron a cabo en el programa Clustal W y los resultados obtenidos fueron sometidos al programa DNAPARS y PROTPARS (58). En la Figura 18A puede observarse la topología del árbol inferido a partir de las secuencias nucleotídicas de las GHs de mamíferos, para lo cual fue incluida la GH del pollo como grupo de comparación. Este árbol muestra claramente los dos periodos de evolución propuestos por Wallis para las GHs, con los primates y ruminantes-artiodáctilos formando un grupo aparte de los roedores, carnívoros y artiodáctilos no ruminantes (cerdo). Esta última especie es de particular interés ya que muestra en todas las topologías obtenidas una estrecha relación con los carnívoros. En la Figura 18B se presenta el árbol obtenido utilizando las secuencias aminoacídicas de las GHs y donde nuevamente la topología muestra una distribución de las especies muy semejante a la obtenida con el árbol construido a partir de las secuencias nucleotídicas. En este caso sin embargo, fueron incluidas las secuencias proteicas reportadas para otras especies de mamíferos, como son las de las GHs del elefante y llama, mismas que se

encuentran distribuidas dentro del grupo de GH de evolución lenta; sin embargo su ubicación dentro del árbol no es muy probable cuando se determinan los valores de bootstrap (método utilizado para obtener valores de alta confiabilidad en el agrupamiento de las especies o secuencias dentro del árbol) (59).

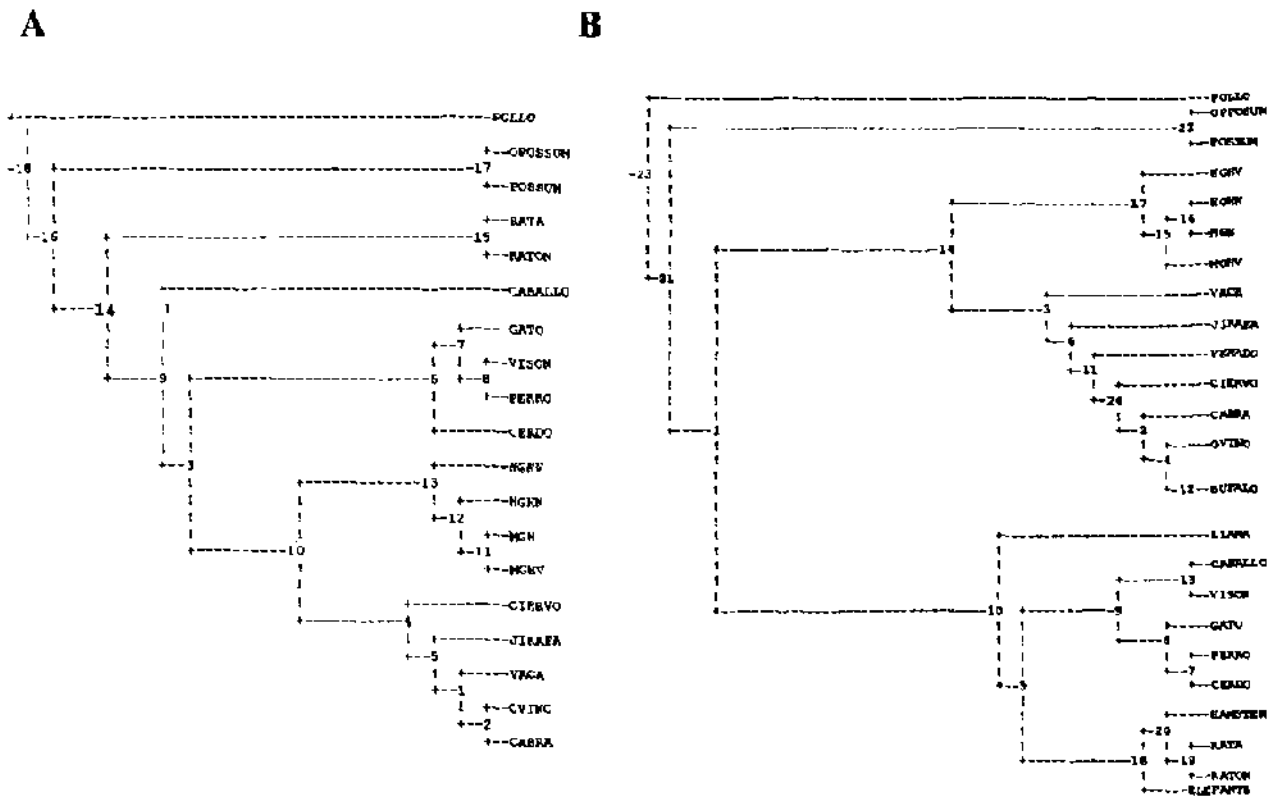


Figura 18.- Reconstrucción de árboles filogenéticos de las GHs de mamíferos. Los árboles fueron construidos utilizando como datos una porción (exón II-V) de las secuencias nucleotídicas (A) y las aminoácidas (B) de las GHs de diferentes especies de mamíferos representativas de los ordenes Marsupiala, Rodentia, Artiodáctila, Primates, Perisodáctila y Probosoidea (elefante, solo en aminoácidas). En ambos casos, el método usado fue el de máxima parsimonia (DNAPARS y PROTPARS, respectivamente).

5.3.3 Secuencia ancestral de la GH.

De la comparación de las secuencias proteicas de GH, con el método de máxima parsimonia, se dedujo una posible secuencia ancestral para las GHs de mamíferos, como puede observarse en la Figura 18B, el árbol incluye como grupo de comparación al pollo, para dar mayor confiabilidad a la secuencia de GH propuesta en los casos en que había duda. En la Figura 19 se observa un árbol filogenético ubicando a las secuencias de GHs de los diferentes ordenes de mamíferos y en las ramas del árbol se describe el número de sustituciones que éstas presentan con respecto a la secuencia ancestral.

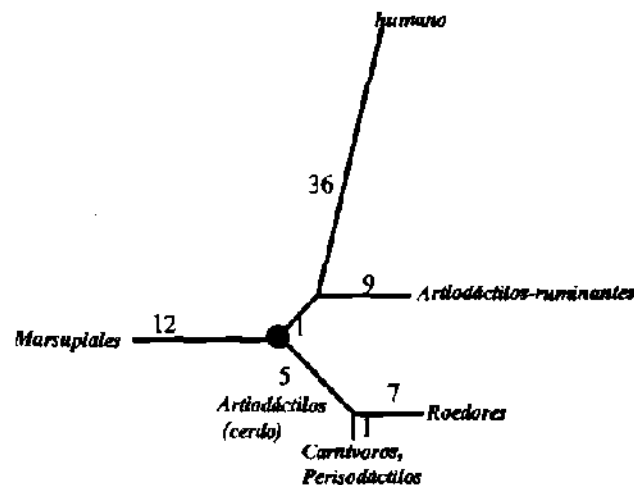


Figura 19.- Secuencia ancestral de las GHs de mamíferos. El árbol estrella fue construido utilizando como datos una porción (exón II-V) de las secuencias aminoacídicas de las GHs de mamíferos. En las ramas se indica el número de sustituciones aminoacídicas con respecto a la secuencia ancestral.

5.3.4 Comparaci3n de las secuencias de GH.

En la Figura 20 se muestra una gràfica en la cual se observan los porcentajes de conservaci3n de los exones de la GH cuando se comparan todas las secuencias de mamíferos reportadas para este gen. De manera general, se puede observar una considerable conservaci3n en la secuencia de los exones, aun cuando dentro del grupo de mamíferos se incluye la secuencia de una ave. De los cinco exones, el segundo es el que muestra mayor variaci3n. Esta variaci3n se sigue observando aun cuando se comparan grupos de especies de los ordenes carnívora, artiodàctila y rodentia, y finalmente solo las especies de carnívoros y artiodàctilos. Este último grupo de especies es de particular interés, ya que como puede observarse en la gràfica el número de sustituciones por sitio es muy bajo, lo cual apoya la propuesta de que ambos ordenes comparten una estrecha relaci3n filogenética.

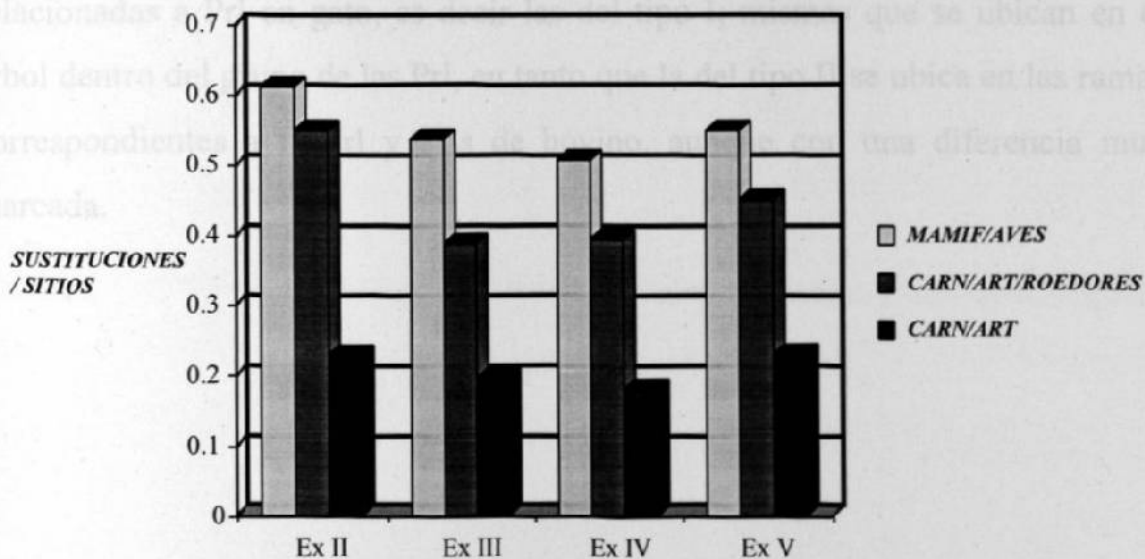


Figura 20.- Conservaci3n de los exones entre las GHs. En la gràfica se encuentra esquematizado el coeficiente del número de sustituciones/longitud de la secuencia, obtenido despuès de alinear con el programa Clustal W las secuencias de cada uno de los exones de las GHs. El análisis se realiz3 agrupando especies de diferentes ordenes de mamíferos (solo en uno de los grupos fue incluida la secuencia de una ave, la del pollo). Las especies dentro de cada grupo fueron: Carnívoros: perro, gato y vis3n; Artiodàctilos: ovino, bovino, cerdo, ciervo y jirafa; Roedores: rata y rat3n; Primates: GH-N de macaco y humano.

5.4 Análisis de las proteínas placentarias relacionadas a Prl.

Las secuencias nucleotídicas de las proteínas placentarias de gato relacionadas a Prl obtenidas en este estudio, así como las Prls de otras especies de mamíferos (humano, bovino y ratón) y los PLs del bovino, fueron utilizadas en la construcción de un árbol filogenético. El análisis fue restringido a la secuencia que abarca el producto de amplificación obtenido con los iniciadores Prl5'/PL3'. El alineamiento se llevó a cabo en el programa Clustal W (57) y los resultados obtenidos del dendograma se graficaron con el programa NJplot. En la Figura 21 puede observarse la topología del árbol inferido a partir de las secuencias nucleotídicas antes descritas, en este caso la Prl del ratón fue utilizada como grupo de comparación. Con el árbol nuevamente se corroboran los resultados previamente descritos para las secuencias de las proteínas placentarias relacionadas a Prl en gato, es decir las del tipo I, mismas que se ubican en el árbol dentro del grupo de las Prl, en tanto que la del tipo II se ubica en las ramas correspondientes a la Prl y PLs de bovino, aunque con una diferencia muy marcada.

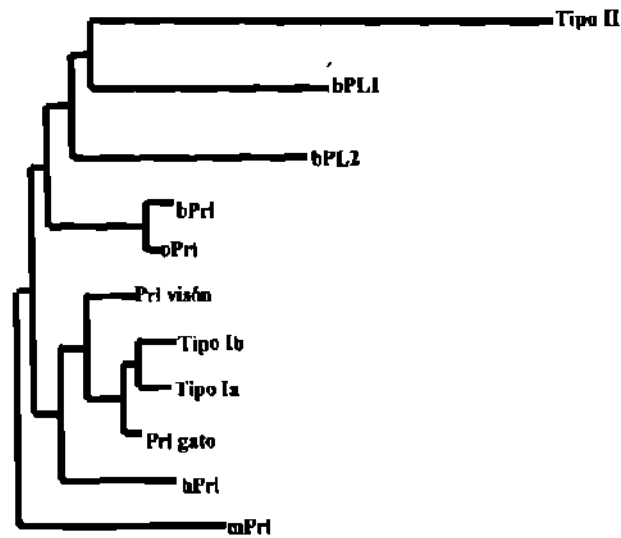


Figura 21.- Reconstrucción del árbol filogenético de las proteínas placentarias relacionadas a Prl. El árbol fue construido utilizando como datos el segmento correspondiente a las 181 pb obtenidas con los iniciadores Pr15'/PL3'. El método utilizado para la reconstrucción fue el Neighbor-Joining del programa Custal W.(m:ratón, b:bovino, o:ovino, h:humano).

CAPITULO VI

DISCUSIÓN

El estudio de la evolución de los organismos utilizando datos moleculares, depende en gran medida de la cantidad y tipo de modelos génicos a partir de los cuales éstos se generan. La familia de la hormona del crecimiento, prolactina y lactógeno placentario constituye un excelente modelo molecular para estudiar la evolución de un gen y/o de una familia multigénica en las diferentes clases de vertebrados. Los datos generados a partir de su estudio, pueden además utilizarse para hacer inferencias filogenéticas, en particular dentro de los diferentes órdenes de los mamíferos. En esta clase de vertebrados, las especies que han sido más estudiadas a la fecha son las de interés agropecuario. Por lo que los huecos que estas investigaciones han dejado contribuyen a que existan todavía muchas incógnitas en la evolución molecular de los genes que forman esta familia multigénica. Adicionalmente, las relaciones filogenéticas entre los diferentes órdenes, por ejemplo los de los carnívoros, aun no están completamente definidas. Utilizando el gato doméstico (*Felis catus*) como especie representativa de este orden, en este trabajo se obtuvieron datos muy relevantes al obtener la primera secuencia del gen de la GH de esta especie, además de evidenciar la expresión en tejido placentario de esta especie, de RNAs relacionados a Prl. Estos nuevos datos, permitieron precisar la evolución de la familia génica, así como las relaciones filogenéticas de especies del orden carnívora.

6.1 Evolución de la GH en carnívoros

Al iniciar este estudio, no existía reporte alguno de la secuencia completa del gen de GH en alguna especie del orden Carnívora. Con la obtención en este trabajo de la secuencia del gen de la GH del gato, se logró obtener mayor evidencia molecular para ayudar a resolver las controversias filogenéticas y evolutivas que existen en este orden.

Dentro de los mamíferos se conoce la secuencia nucleotídica completa para genes de GH solamente en especies de primates, roedores y artiodáctilos. La obtención y análisis del gen completo de la GH del gato, incluyendo una porción de su promotor, generó datos importantes. La estructura exón-intrón del gen de la GH está muy conservada, observándose los 5 exones y 4 intrones que se han descrito para las GHs de otros órdenes. La longitud de los exones es la misma que la descrita para otros órdenes de no primates, sin embargo en el caso de los intrones se observan variaciones que van desde el 0.8% para los más conservados (intrones 1 y 4), hasta un 54% para el exón 3, presentándose ésta aun en las especies de artiodáctilos (Tabla 5).

A partir de la secuencia del gen y respetando los sitios de inicio y término de los intrones, se infirió la secuencia codificante y de ésta se dedujo la secuencia aminoacídica. Al compararlas con las 2 secuencias de DNAc previamente reportadas (21,22), se encontraron 8 cambios nucleotídicos. Dos de ellos resultaron en cambios aminoacídicos, el primero (Ala→Thr) compartido con una de las secuencias reportadas (21) y el otro (Val→Leu) es específico de la secuencia aquí determinada, sin embargo éste es compartido con otras GHs como la bovina, caprina y ovina. Dada la posición donde se encuentran estos cambios (hélice 1 y hélice 2, respectivamente), no parecerían muy relevantes

como para afectar la interacción de la hormona con su receptor. Sin embargo, en el primer cambio (Ala→Thr) se modifica la naturaleza del aminoácido de no polar a polar, lo cual podría tener alguna implicación en la estructura de la proteína. Este tipo de variabilidad en las secuencias de GHs reportadas para una especie ha sido previamente observada en el ovino, donde se demostró que existe duplicación del gen de GH, y que además las copias presentan polimorfismos en su secuencia (68). Adicionalmente, estas GHs de ovino son expresadas en placenta y/o en la hipófisis (68). El resultado obtenido en las comparaciones de las secuencias de GH de gato reportadas con la obtenida en este trabajo, podría entonces explicarse por polimorfismos y/o duplicación de la GH. Esta hipótesis podría ser apoyada por los resultados observados por Treviño-Alvarado (20), en los cuales dada la intensidad relativa obtenida en ensayos de slot blot y utilizando como sonda una secuencia consenso para las GHs de vertebrados, se sugiere la presencia de más de una copia de este gen. Sin embargo, estos resultados deben ser confirmados mediante ensayos de Southern blot o bien encontrando enzimas diagnósticas que evidencien los posibles polimorfismos.

La obtención de la secuencia del gen de GH del gato hizo posible además, la determinación para esta hormona de las velocidades de cambio a nivel nucleotídico en carnívoros. El análisis de las regiones codificantes, no codificantes y 5'flanqueantes, mostró en todos los casos valores bajos cuando son calculados utilizando al ratón como grupo de comparación (tabla 6). Aquí es importante resaltar que en los intrones las velocidades obtenidas a partir de la GH del gato, son muy similares a las obtenidas para el cerdo y bovino (en estos últimos son idénticas), lo cual garantiza que la comparación se está llevando a cabo en genes ortólogos y que las diferencias observadas en las velocidades de

dichas regiones son reales. En el orden artiodáctila, las GHs muestran dos fases de evolución: una rápida para bovino, ovino y cabra y otra lenta para el cerdo y alpaca (6). Dentro del análisis de las velocidades de cambio de los exones, intrones y región 5' en carnívoros, se incluyó también la secuencia nucleotídica de la GH del león. De esta manera se corroboró que las velocidades obtenidas entre ambas especies de carnívoros son casi idénticas sobre todo en los intrones, lo cual refleja más directamente la ortología de las secuencias. Las velocidades de cambio en los exones y región 5' con las GHs del gato y león, son muy similares a las encontradas para la GH del cerdo, por lo cual se puede asumir que en carnívoros las GHs presentan un tipo de evolución lenta como se ha observado en los análisis proteicos (6). Adicionalmente, con estos resultados se puede inferir la estrecha relación de los carnívoros con los artiodáctilos especialmente con aquellos de evolución lenta (suiiformes y tilopoda).

En base a la secuencia parcial del DNAC de la GH del tlacuache obtenida en este trabajo, y a la previamente reportada para otro marsupial, se propuso una secuencia "ancestral" para GH utilizando el método de máxima parsimonia, y tomando como grupo de comparación al pollo. Dada la ubicación paleontológica de los marsupiales, la secuencia obtenida podría acercarse más a la esperada para un ancestro de mamíferos. Sin embargo, cabe resaltar que la secuencia ancestral propuesta no es idéntica a la de los marsupiales, ya que difieren de esta en 12 posiciones. Por lo tanto se podría asumir que en los marsupiales la GH, siguió su propia evolución.

La longitud de esta secuencia ancestral abarca aproximadamente 68% de la totalidad de la proteína, excluyendo la región N-terminal (péptido señal) y la carboxilo terminal (esta última presenta una marcada conservación entre las GHs debido a que está involucrada con la unión a su receptor). La secuencia

ancestral es muy similar a las GHs del cerdo, llama, caballo, visón, perro, gato, hamster, rata y ratón con solo 5 sustituciones (Figura 19). Este resultado concuerda con la secuencia ancestral previamente propuesta por Wallis (18), la cual era idéntica a la del cerdo, y muy probablemente las diferencias encontradas en la secuencia propuesta en este trabajo sean debidas a la inclusión de las dos secuencias de marsupiales y al uso de la secuencia del pollo como grupo de comparación.

El número de sustituciones aminoacídicas fue mayor para las GHs de especies previamente denominadas de rápida evolución con 10 sustituciones para los rumiantes-artiodáctilos y 37 para los primates. En estos últimos, además de las sustituciones se presentan dos inserciones en una región que se sabe es importante para la unión al receptor (loop 1 y hélice 3).

En base a las características de unión con los receptores somatogénicos y lactogénicos, se ha propuesto una clasificación de las diferentes especies de los mamíferos, la cual parece coincidir con las velocidades evolutivas mostradas por el gen de la GH. Dentro de esta clasificación, las especies de carnívoros están ubicadas dentro del grupo que incluye al cerdo, caballo y conejo (69), con lo cual podría asumirse que en este grupo de especies la GH y su receptor evolucionaron en forma paralela.

Se ha reportado, que el tipo de evolución que muestra la GH en mamíferos así como en otros vertebrados, es debido a cambios adaptativos. Sin embargo, no hay evidencia de que estos cambios afecten directamente la función básica de la hormona (promoción del crecimiento). Por tal razón y sobre todo en el caso de la GH de especies de evolución rápida (primates y rumiantes-artiodáctilos), estos cambios deben estar muy relacionados con interacciones específicas con su receptor. Tales interacciones podrían afectar de alguna manera, alguna de las

múltiples funciones metabólicas que lleva a cabo la hormona, sin que a la fecha se pueda precisar cual. En el caso de los carnívoros por ejemplo, se ha determinado que la GH no juega un papel clave en la regulación de los niveles de glucosa sanguíneos, como se ha atribuido en los primates (30). Por tal razón, la evolución de la GH en primates y no primates se podrá elucidar completamente una vez que se conozca el papel fisiológico de esta hormona en mamíferos.

La reconstrucción de árboles filogenéticos basados en la GH y utilizando datos tanto aminoacídicos como nucleotídicos, mostró claramente dos líneas evolutivas distintas para los placentarios: una que abarca a primates y rumiantes artiodáctilos y otra para los no primates. Filogenéticamente en el primero de los casos este trabajo aporta mayor evidencia a nivel molecular que apoya un ancestro común mas cercano entre artiodáctilos-rumiantes y primates (31). En el caso de los carnívoros, las topologías de los árboles favorecieron siempre la ubicación de las especies de este orden junto con las de otros artiodáctilos de evolución lenta, por lo cual se puede asumir la estrecha relación de ambos órdenes. Adicionalmente en el caso de los roedores estos parecen tener una divergencia temprana dentro de la radiación de los placentarios, lo cual coincide con lo previamente observado con otros modelos génicos en los cuales se utilizó como grupo de comparación algún marsupial (30,31).

6.2 Evolución de la familia GH-PL-Prl

Son tres los órdenes de mamíferos en los cuales se han descrito los lactógenos placentarios (PLs), otro miembro de la familia de la GH-Prl. En primates, éstos están más relacionados al gen de la GH, mientras que en roedores y rumiantes-artiodáctilos muestran una estrecha similitud con la Prl. Hasta la fecha, se cuenta

con poca información acerca de la presencia de proteínas relacionadas a la familia GH-PL-Prl en órdenes diferentes a los antes descritos. Por tal razón nos enfocamos en la búsqueda de nuevos miembros de esta familia génica en el tejido placentario del gato doméstico (*Felis catus*), para así contribuir a elucidar los mecanismos que dieron lugar a la formación de esta familia génica en los diferentes órdenes de mamíferos.

Los ensayos de Northern blot a partir de RNA total obtenido de tejido placentario a dos periodos de gestación (mitad y término), dieron evidencia de la expresión de DNACs relacionados a la Prl, sobre todo en tejido placentario a término. Este resultado dió la pauta para el diseño de oligonucleótidos consenso, los cuales se obtuvieron después de alinear las secuencias nucleotídicas reportadas para los DNACs de la Prl y proteínas placentarias relacionadas a Prl en roedores y rumiantes, poniendo mayor énfasis en las especies de este último orden dada su relación filogenética con los carnívoros (5). La clonación del producto total de las reacciones de RT-PCR llevadas a cabo a partir de tejido placentario de gato en los dos periodos de gestación, dió como resultado la obtención de dos tipos de clonas de un tamaño de 180 pb, las cuales en base a su similitud con la Prl hipofisiaria, fueron denominadas como tipo I y tipo II. Las clonas del tipo I fueron encontradas en el tejido placentario a mitad (Ia) y término (Ib), y presentaron un elevado porcentaje de similitud con la secuencia del DNAC de la Prl hipofisiaria del gato. Estas sin embargo, presentaron algunos cambios nucleotídicos que solo en el caso de la clona tipo Ib redundó en un cambio aminoacídico. El tipo II fue encontrado solamente en la placenta a mitad del periodo de gestación, la secuencia de esta clona mostró un número muy alto de sustituciones nucleotídicas y porcentajes de similitud de hasta 36% con la Prl hipofisiaria de gato, así como con la secuencia del PL II de bovino.

Las diferencias encontradas en las clonas del tipo I se pudieran deber a polimorfismos de la Prl hipofisiaria o bien a errores introducidos por la polimerasa durante la amplificación. Aun cuando la clona del tipo II encontrada a mitad del periodo de gestación muestra una mayor similitud con un PL de bovino, ésta no puede ser clasificada como tal hasta no contar con la secuencia completa y ensayos biológicos que demuestren su actividad lactogénica. Sin embargo, la obtención de esta clona parece indicar que no se puede descartar la existencia de más de un DNAC relacionado a Prl en la placenta de gato.

Estos resultados sugieren por lo tanto que también en carnívoros ocurrió la duplicación del gen de la Prl. Sin embargo, estos datos requieren ser confirmados con la obtención del DNAC completo, ya que la región amplificada en este estudio solo abarca una región interna de 180 pb.

La aparente expresión y distribución diferencial de los DNACs en los dos periodos de gestación del gato, sugieren que en esta especie las proteínas placentarias relacionadas a Prl presentan también el mismo patrón de expresión específico de tiempo, como el descrito para roedores y ruminantes (35,36,40,41). Sin embargo, los ensayos realizados en este trabajo no lograron demostrar de manera contundente esta hipótesis, debido muy posiblemente al hecho de que las placentas fueron obtenidas de dos animales diferentes de tal manera que las diferencias de expresión encontradas en los ensayos de Northern blot, pudieran deberse alternativamente a la falta de control sobre las condiciones nutricionales de los dos embarazos ya que se sabe este puede ser un importante factor que afecta la expresión de estas proteínas (44).

Las señales obtenidas en los ensayos de Western blot fueron demasiado débiles como para confirmar la expresión de proteínas relacionadas a Prl en la placenta

de gato, lo cual podría indicar una muy baja expresión de estas proteínas o bien que el anticuerpo no fue capaz de detectarlas, como ya ha sido previamente descrito para algunos PLs de rata, los cuales no presentan reacción cruzada con los anticuerpos anti-Prl (43).

Con este trabajo mostramos evidencia de que en el orden carnívora pudo haber ocurrido duplicación del gen de la Prl, como ha sido descrito para roedores y rumiantes-artiodáctilos, con lo cual se abre un extenso campo de estudio para identificar estas proteínas y tratar de definir su papel durante el embarazo, tal y como a la fecha se esta llevando a cabo para otras especies.

La evolución ha procedido primordialmente por divergencia para dar lugar a la gran diversidad de especies que se presentan actualmente. Es importante examinar como las especies divergieron una de otra para poder considerar el significado de las diferencias que se presentan en ellas. El estudio de la familia génica GH-PL-Prl en mamíferos, ha demostrado que una gran cantidad de factores adaptativos aunados a mecanismos genéticos intervinieron en su formación. Parece evidente, que después de la formación de la GH y Prl en mamíferos fueron dos las vías evolutivas que dieron lugar a los PLs y/o PRPs : una en primates, por duplicación de la GH y la otra para no primates, por duplicación de la Prl. Sin embargo, independientemente de su origen, estas proteínas presentan una evolución convergente en cuanto a su función durante el embarazo. El estudio de un mayor número de especies pertenecientes a diferentes órdenes de mamíferos, permitirá definir en un futuro los mecanismos moleculares que dieron lugar a su formación y relacionarlos con la adquisición de las funciones biológicas específicas que llevan a cabo cada uno de los miembros que conforman esta familia génica.

CAPITULO VII

CONCLUSIONES

En este trabajo se llegó a las siguientes conclusiones :

- La clonación molecular y determinación de la secuencia nucleotídica del gen de la GH del gato, así como de una región que abarca casi la totalidad del DNAc del tlacuache, hicieron posible la reconstrucción de árboles filogenéticos (tanto a nivel nucleotídico como aminoacídico) más precisos, utilizando estas nuevas secuencias de GHs además de las reportadas para otros órdenes de mamíferos. Las inferencias filogenéticas, demuestran que a nivel molecular existe una estrecha similitud de las especies del orden carnívora con los artiodáctilos, específicamente con aquellas especies de evolución lenta (suiforme y tilopoda).
- Con el aislamiento y caracterización molecular de dos clonas que muestran similitud con la Prl hipofisiaria del gato, se demostró que en la placenta de una especie del orden carnívora, existe expresión de RNAs relacionados a la familia GH-PL-Prl. Este resultado, evidenció que en otro orden de no primates (carnívora), ocurrió también la duplicación del gen de la Prl como ha sido reportado para roedores y rumiantes-artiodáctilos, lo cual corrobora la estrecha relación de los carnívoros con este último orden.

CAPITULO VIII**BIBLIOGRAFIA**

1. **Gaylord Simpson G.** 1964. Organisms and Molecules. *Science*. **146**:1535-1538.
2. **O'Brien S and M.T Clegg.** 1993. Genomes and Evolution, editorial overview. *Current Opinion in Genetics and Development*. **3**:835-836.
3. **Li W-H.** 1993. So, What about the molecular clock hypothesis? *Current Opinion in Genetics and Development* **3**:896-901.
4. **Li W-H y Graur D.** 1991. Fundamentals of Molecular Evolution. Sinauer Associates, Inc. Mass, USA.
5. **Novacek M.J.** 1992. Mammalian phylogeny: shaking the tree. *Nature*. **356**, 121-125.
6. **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.
7. **Singer M y Berg P.** 1991. Genes y genomes. A changing perspective. University Science Books. USA.
8. **Otha Tomoko.** 1991. Multigene families and evolution of complexity. *J. Mol. Evol.* **33**:34-41.
9. **Moore DD, Walker MD, Diamond DJ, Conkling MA and Goodman H.** 1981. Structure, Expresión y Evolution of Gowth Hormone Genes. *Recent Progress in Hormone Research* **117-225**.

10. Niall HD, Hogan ML, Sayer R, Rosenblum IY, Greenwood FC. 1971. Sequences of pituitary and placental lactogenic and growth hormones: evolution from a primordial peptide by gene duplication. *Proc Natl Acad Sci USA* **68**:866-869.
11. Goffin V; Shiverick K.T; Kelly P.A y Martial J.A. 1996. Sequence-function relationships within the expanding family of prolactin, growth hormone, placental lactogen, and related proteins in mammals. *Endocrinology*.17(4), 385-410.
12. Rotwein P y Kajimoto Y. 1991. Evolution of the insulin-like growth factor I gene: conservation of structure and function. Modern Concepts of Insuline-like growth factors. Elsevier Science Publishing Co.,Inc.
13. Castro Muñoz Ledo F, Barrera-Saldaña HA, Harcuch WK. 1999. El papel de la hormona del crecimiento en la diferenciación adipocítica. *Ciencia UANL*. II:1:70-78.
14. Bodner M Castrillo JL, Theill LE Deernck T, Ellisman M y Karin M. 1988. The pituitary specific-transcription factor GHF-1 is a homeobox-containing protein. *Cell*. **55**:505-518.
15. De Voss AM, Ultsch M y Kosiakoff AA. 1992. Human growth hormone and extracellular domain of its receptor: crystal structure of the complex. *Science*. **255**:306-312.
16. Watabiki M, Yamamoto M, Yamakawa M, Tanaka M, Nakashima K. 1989. Conserved and unique aminoacid residue in the domains of the growth hormones. *J Biol Chem*. **264**:312-316.
17. 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.
18. Wallis M. 1994. Variable evolutionary rates in the molecular evolution of mammalian growth hormones. *J Mol Evol*. **38**:619-627.

19. Hong Y and Scharl M. 1993. Sequence of the growth hormone gene from silver carp (*Hipophthalmichthys molitrix*) and evolution of GH genes. *BBA*. 1174: 285-288.
20. Treviño-Alvarado VM. 1999. Obtención de nuevos genes de la hormona del crecimiento en vertebrados. Tesis de Maestría. Facultad de Medicina, UANL, Monterey, N.L. México.
21. Castro Peralta F y Barrera-Saldaña HA. 1995. Cloning and sequencing of cDNA encoding the cat growth hormone. *Gene*.
22. Warren WC, Bentle KA y Bogosian G. 1996. Cloning of the cDNA coding for cat growth hormone and prolactin. *Gene*. 168:247-249.
23. Ascacio Martínez JA y Barrera-Saldaña HA. 1994. A dog growth hormone cDNA codes for a mature protein identical to pig growth hormone. *Gene*. 143:277-280.
24. Shoji K, Ohara E, Whatahiki M y Yoneda Y. 1990. Cloning and nucleotide sequence of a cDNA encoding the mink growth hormone. *Nucleic Acids Research*. 18:6424.
25. Ting Ch.T., Tsaor S.Ch, Wu ML and Wu Chung-I. 1998. A rapidly evolving Homeobox at the site of a hybrid sterility gene. *Science*. 282:1501-1504.
26. Wayne R. 1993 Molecular Evolution of the dog family. *TIG* 9 (6): 218-224.
27. O'Brien SJ and Nash WG 1982 Genetic mapping in mammals: Chromosome map of domestic cat. *Science* 216: 257-265.
28. Kokka N, García JF Morgan M and George R. 1971 Immunoassay of plasma growth hormone in cats following fasting and administration of insulin, arginine, 2-deoxyglucose and hypothalamic extract. *Endocrinology* 88:359-366.
29. Colbert EH. 1964 Evolution of the vertebrates. *Science Editions* New York.

30. Janke A, Feldmaier-Fuchs G, Thomas WK, Von Haeseler A. and Pääbo S. 1994 The marsupial mitochondrial Genome and the evolution of placental mammals. *Genetics society of America* 137:243-256.
31. Döner M and Pääbo S. 1995 Nucleotide sequence of a marsupial LINE-1 element and the evolution of placental mammals. *Mol. Biol. Evol.* 12(5): 944-948.
32. Rubin D.A. y Dores R.M. 1994. Cloning of a growth hormone from a primitive bony fish and its phylogenetics relationships. *General and Comparative Endocrinology.* 95:71-83.
33. Amemiya Y, Sogabe Y, Nozaki M, Takahashi A y Kawauchi H. 1998. Somatolactin in the white sturgeon and african lungfish and its evolutionary significance. *General and comparative endocrinology.* 114:181-190.
34. Tanaka M, Yoshitaka H, Masanori W and Nakashima K. 1992. Structure of the chicken growth hormone-encoding gene and its promoter region. *Gene.* 112:235-239.
35. Orwig K.E, Dai G; Rasmussen C.A y Soares M.J. 1997. Decidual/Trophoblast prolactin-related protein: characterization of gene structure and cell-specific expression. *Endocrinology.* 138:2491-2500.
36. Orwig K.E; Ishimura R.; Müller H.; Liu B. y Soares M.J. 1997. Identification and characterization of a mouse homolog for decidual/trophoblast prolactin-related protein. *Endocrinology.* 138(12):5511-5516.
37. Forsyth I.A. 1994. Comparative aspects of placental lactogens: structure and function. *Experimental and Clinical Endocrinology.* 102:244-251.
38. Chen EY, Liao Y-Ch, Smith H, Barrera HA, Gelinis RE and Seeburg PH. 1989. The Human Growth Hormone Locus: Nucleotide Sequence, Biology and Evolution. *Genomics* 4:479-497.
39. Golos TG, Durning M, Fisher JM and Fowler PD. 1994. Cloning of four growth hormone/chorionic somatomammotropin-related complementary deoxyribonucleic acids differentially expressed during pregnancy in the Rhesus monkey placenta. *Endocrinology.* 133:1744-1751.

40. **Friesen H.G.** 1994. Expression, purification, and characterization of recombinant rat placental lactogen-I: a comparison with the native hormone. *Endocrinology*. **134**(1):393-400.
41. **Duckworth M.L.; Kirk K.L y Friesen H.G.** 1986. Isolation and identification of a cDNA clone of rat placental lactogen II.. *Journal of Biological Chemistry*. **261**(23):10871-10878.
42. **Ishibashi K and Imai M.** 1999. Identification of four new members of the rat prolactin/growth hormone gene family. *Biochem Biophys Res Commun*. **7**;262 (3):575-8.
43. **Faria T.N.; Deb S.; Kwok S., Talamantes F. y Soares M.J.** 1990. Ontogeny of placental lactogen-I and placental lactogen-II expression in the developing rat placenta. *Developmental Biology*. **141**:279-291.
44. **Hill D.J.,** 1992. What Is the role of growth hormone and related peptides in implantation and the development of the embryo an fetus. *Horm. Res.* **38**:28-34.
45. **Anthony R.V.; Liang R.; Kayl E.P. y Pratt S.L.** 1995. The growth hormone/prolactine gene family in ruminant placentae. *Journal of Reproduction and Fertility Supplement*. **49**:83-95.
46. **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. *Journal Dairy Science*. **69**:886-903.
47. **Ausbel et al.** 1995. Short Protocols in Molecular Biology 3rd edition. Published by John Wiley & Sons. Inc. USA.
48. **Sambrook J., Fritsch E.F. y Maniatis T.** 1989. Molecular Cloning a laboratory manual. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York.
49. **Barrera-Saldaña HA.** 1982. "Epression of the human placental lactogen genes". Ph.D. Thesis, Graduate School of Biomedical Sciences, The Texas University at Houston.
50. **Goda SK.** 1995. A Simple Procedure for gel electrophoresis and Northern blotting of RNA. *Nucleic Acids Research*. **16**:3357-3358.

51. **Marchuk D, Drumm M, Saulino A y Collins FS.** 1990. Construction of T-vectors, a rapid and general system for direct cloning of unmodified PCR products. *Nucleic Acids Research*. **19(5):1154.**
52. **Inoue H, Nojima H y Okamaya H.** 1990. High efficiency transformation of *E. coli* with plasmids. *Gene*. **96:23-28.**
53. **Pollard J.W. y J.M. Walker.** 1990. *Methods in Molecular Biology*. Humana Press Inc., Clifton, New Jersey.
54. **Bradford MM.** 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem*. **72:248-254.**
55. **Laemmli U.K.** 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*. **227:680-685.**
56. **Mini-V8.10 Vertical Gel Electrophoresis System.** Instruction Manual. Life Technologies. GIBCO BRL.
57. **Vera-Cabrera L., M.C. Salinas-Carmona, O. Welsh and M. Rodríguez.** 1992. Isolation and purification of two immunodominant antigens from *Nocardia brasiliensis*. *J.Clin. Microbiol*. **30:1183-1188.**
58. **Higgins DG, Thompson JD y Gibson TJ.** 1994. CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Research*. **11:22:4673-4680.**
59. **Felsenstein J.** 1993. PHYLIP (Phylogeny Inference Package) version 3.5c. Department of Genetics, University of Washington, Seattle.
60. **Breathnach R y Chambon P.** 1981. Organization and expression of eukaryotic split genes coding proteins. *Annu. Rev.Biochem*. **50:349-468.**
61. **Lipkin SM, Naar KA, Kalla RA y Rosenfeld MG.** 1993. Identification of a novel zinc finger protein binding: a conserved element critical for Pit 1 dependent growth hormone gene expression. *Gen and Dev*. **7:1674-1687.**

62. Keseth E, Rosner A, Berustein Y, Gorecki M, Aviv H. 1981. Cloning of bovine growth hormone gene. *Nucleic Acids Research*. 9:19-30.
63. Shida M.M; Grusby-Jackson L.L; Ross S.R y Linzer D.I. 1992. Placental-specific expression from the mouse placental lactogen II gene promoter. *Biochemistry*. 89:3864-3868.
64. Shida M.M, Soares M.J y Linzer D.I. 1993. Trophoblast-Specific Transcription from Mouse Placental Lactogen-I Gene Promoter. *Molecular Endocrinology*. 7(2):181-188.
65. Vuille JC, Cattini PA, Bock ME, Verstuyf A, Schroedter IC, Duckworth ML and Friesen HG. 1993. Rat prolactin-like protein A partial gene and promoter structure: promoter activity in placental and pituitary cells. *Molecular and Cellular Endocrinology*. 96: 91-98.
66. Cooke EN, Coit D, Weiner RI, Baxter JD and Martial J. 1980. Structure of cloned DNA complementary to rat prolactin messenger RNA. *Journal of Biological Chemistry*. 255:13:6502-6510.
67. Robertson MC, Cosby H, Fresnoza A, Cattini PA, Shiu RPC. 1994. Expression, purification and characterization of recombinant rat placental lactogen-I: a comparison with the native hormone. 134:1:393-400.
68. Ofir R y Gootwine E. 1997. Ovine growth hormone gene duplication-structural and evolutionary implications. *Mammalian genome*. 8:770-772.
69. Amit T, Dibner C. Barkey RJ. 1997. Characterization of prolactin-and growth hormone-binding proteins in milk and their diversity among species. *Molecular and Cellular Endocrinology*. 130:167-180.

