



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO**

**ESCUELA NACIONAL DE ESTUDIOS PROFESIONALES  
"IZTACALA"**

**DISTRIBUCION FILOGENETICA Y EXPRESION DEL  
GEN DE LA HORMONA LIBERADORA  
DE TIROTROPINA.**

**T E S I S**

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE

**B I O L O G O**

P R E S E N T A :

**Manuel Salvador Rodríguez Medina**



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

Este trabajo fué realizado en el Laboratorio de Neuroendocrinología Molecular del Centro de Investigaciones Sobre Ingeniería Genética y Biotecnología, U. N. A. M., bajo la dirección del Dr. Luis Covarrubias Robles, y con el apoyo del CONACYT.

Agradezco a los Doctores Jean Louis Charli y Patricia Joseph-Bravo la oportunidad y apoyos brindados para que este trabajo fuese realizado en su laboratorio .

## I N D I C E

ABREVIATURAS.....	3
INTRODUCCION.....	4
ANTECEDENTES	
I . 1. Los Péptidos y sus funciones.....	6
2. Distribución Filogenética de los Péptidos.....	9
3. Biosíntesis de Péptidos.....	12
4. Estructura de los Precursores Peptidicos.....	15
II. 1. Evolución Molecular.....	18
2. Teorías de Evolución Molecular.....	22
3. Evolución de Péptidos.....	25
III.1. La Hormona Liberadora de Tirotropina.....	29
2. Distribución Filogenética de la TRH.....	31
3. Metabolismo de la TRH.....	34
4. Precursores de la TRH.....	36
OBJETIVOS.....	39
MATERIALES Y METODOS	
IV. 1. Material biológico utilizado.....	41
2. Extracción y purificación de ADN.....	42
3. Valoración de la calidad y cantidad de ADN extraído...44	
4. Transferencia e Hibridación tipo Southern.....	45
5. Extracción de ARN citoplásmico total.....	47
6. Valoración de la calidad del ARN extraído.....	48
7. Transferencia e Hibridación tipo Northern.....	49
8. Purificación de Plásmidos y extracción de los fragmentos de TRH.....	49
9. Marcaje radiactivo de las sondas por Nick Traslation..52	

RESULTADOS

V . 1. Calidad y cantidad de ADN extraído.....	55
2. Digestiones con endonucleasa Eco-RI.....	55
3. Hibridaciones con la sonda de TRH de rata.....	57
4. Hibridaciones con la sonda de TRH de sapo.....	63
5. Hibridaciones con la sonda de $\alpha$ -Actina.....	66
DISCUSION.....	68
APENDICE 1.....	74
BIBLIOGRAFIA.....	79

## ABREVIATURAS

a.a.	- aminoácido
ACTH	- Hormona Adrenocorticotrópica
ADN	- Acido Desoxirribonucleico
ADnc	- Acido Desoxirribonucleico complementario
Ala	- Alanina
Arg	- Arginina
ARN	- Acido Ribonucleico
ARNm	- Acido Ribonucleico mensajero
Asn	- Asparagina
Asp	- Acido aspártico
CGRF	- Péptido Relacionado con el Gen de la Calcitonina
CRF	- Factor Liberador de Corticotropina
Cys	- Cisteina
FMRFamida	- Phe-Met-Arg-Phe-NH <sub>2</sub>
FSH	- Hormona Estimuladora de los Foliculos
GH	- Hormona del Crecimiento
Gln	- Glutamina
Glu	- Acido glutámico
Gly	- Glicina
HCl	- Acido clorhídrico
His	- Histidina
HCPC	- Hormona Concentradora de Pigmento de Crustáceos
Ile	- Isoleucina
Leu	- Leucina
LH	- Hormona Luteinizante
LHRH	- Hormona Liberadora de la Hormona Luteinizante
Lys	- Lisina
Met	- Metionina
MSH	- Hormona Estimuladora de los Melanocitos
nt	- nucleótidos
Phe	- Fenilalanina
POMC	- Proopiomelanocortina
p.p.	- polipéptido
PRL	- Prolactina
Pro	- Prolina
Ser	- Serina
SN	- Sistema Nervioso
SNC	- Sistema Nervioso Central
Thr	- Treonina
TRH	- Hormona Liberadora de Tirotropina
Trp	- Triptófano
TSH	- Hormona Estimuladora de la Tiroides (Tirotropina)
Tyr	- Tirosina
Val	- Valina
VIP	- Péptido Vasoactivo Intestinal

## INTRODUCCION

A través de la historia de la humanidad el hombre siempre ha manifestado un gran interés por conocer el más mínimo detalle de cuanto fenómeno le rodea. Especialmente le han llamado la atención los fenómenos biológicos, muchos de los cuales hasta hace algunas décadas solo eran conocidos de forma superficial. Actualmente, gracias al desarrollo de nuevas tecnologías ha sido posible conocer a nivel molecular algunos de estos procesos.

Durante los últimos años, grandes progresos han sido alcanzados en el área de Biología Molecular gracias a la aplicación de las técnicas de Ingeniería Genética. Estas técnicas permiten aislar, amplificar y determinar la estructura de secuencias nucleotídicas de genes y ARN mensajeros que codifican para proteínas (1).

Muchos genes de hormonas polipeptídicas han sido aislados y amplificados en bacterias para poder ser utilizados en distintos estudios que van desde su secuenciación, hasta su expresión. Con esta información se empiezan a comprender mecanismos y patrones de regulación y evolución génica (2).

Dentro de los ARN mensajeros que han sido caracterizados se encuentra el del precursor de la Hormona Liberadora de Tirotropina (TRH), estudiado inicialmente de la piel de sapo (3) y posteriormente de hipotálamo de rata (4), en donde se han realizado diversos trabajos sobre la regulación de la expresión del gen (5,6).

El análisis de la secuencia de ambos precursores (3,4) indica que la TRH se encuentra repetida 5 veces, alternando con péptidos intermedios con función aún desconocida (7). Además, queda bien



establecido que solo las secuencias que originan la TRH en ambas prohormonas tienen similitud, ya que aquellas de los péptidos intermedios difieren no solo en la secuencia, sino también en el tamaño (3,4).

La amplia divergencia entre las dos prohormonas y las distintas funciones que han sido sugeridas para la hormona en diversas especies (8), nos instaron a determinar el proceso evolutivo del gen de la TRH.

Aquí se presentan los resultados del rastreo del gen del precursor de la TRH en distintas especies, utilizando las sondas específicas de rata y Xenopus laevis, con los cuales se propone el patrón evolutivo del gen en una escala filogenética parcial, hecho que ayudará a un mejor entendimiento de dicho fenómeno, a la vez que permitirá replantear desde un punto de vista evolutivo la posibilidad de que los péptidos intermedios originados de secuencias aparentemente no esenciales del precursor, pudiesen tener una función, tal como ha sido propuesto (9,10).

## ANTECEDENTES

### I.1. Los Péptidos y sus funciones.

Las células vivas producen una gran diversidad de macromoléculas (proteínas, ácidos nucleicos, lípidos y polisacáridos) que sirven como componentes estructurales, catalizadores biológicos, hormonas, receptores ó reservorios de la información genética. Estas macromoléculas son polímeros constituidos por unidades monoméricas; para los lípidos dichas unidades son los ácidos grasos y el glicerol, para los polisacáridos son los azúcares, para los ácidos nucleicos son los nucleótidos y para las proteínas son los aminoácidos (11).

Comúnmente se le llaman péptidos a pequeñas proteínas que constan de entre 2 y 50 residuos aminoácídicos unidos covalentemente entre si por enlaces peptídicos. Existen un gran número de péptidos difundidos en la naturaleza (12), algunos de ellos contiene otras moléculas en su estructura además de los aminoácidos ó bien estos se encuentran modificados (acetilados, sulfatados, etc. ); sin embargo la estructura tridimensional y muchas de las propiedades biológicas están determinadas por las clases de aminoácidos presentes, el orden en el que están dispuestos en una cadena peptídica y la relación espacial de un aminoácido con otro (13).

La variedad estructural de los péptidos permite que los efectos fisiológicos sean también bastante variados. Hay péptidos que son antibióticos, ó bien, forman parte de la estructura global de alguno de ellos. Ejemplos de este tipo de péptidos (14) los encontramos en la Bacitrasina A y la Actinomicina D (Fig. I.1). Otros péptidos participan en el mantenimiento de la unidad estructural de las

proteínas celulares como es el caso del glutatión ( $\gamma$ -Glutamil-Cisteinil - Glicina); su capacidad de experimentar oxidación-reducción reversible por pérdida ó ganancia de dos hidrógenos, lo hace proteger los grupos -SH de las proteínas estructurales de una posible oxidación, de esta manera la proteína no se modifica estructuralmente, sino el glutatión (14).

Dentro de todas las funciones que realizan los péptidos, destaca su papel como intermediarios en la comunicación celular. Desde este punto de vista, los péptidos resultan ser muy importantes debido a su participación en la transferencia de información, función fundamental en la integración funcional de un organismo (15).

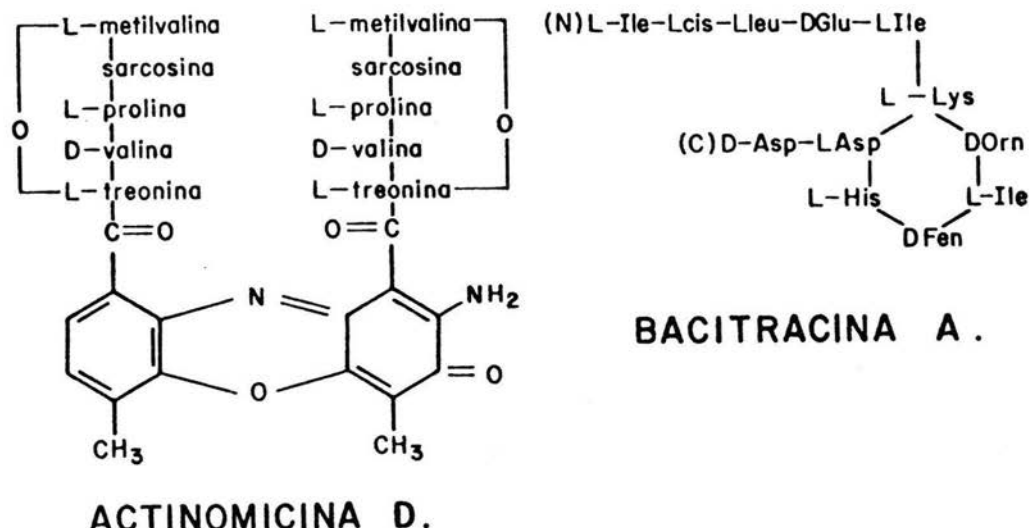


Fig.I.1. Péptidos Antibióticos. A.- Actinomycin D, una de las varias actinomicinas producidas por cepas de Streptomyces. B.- Bacitracina A producida por cepas de Bacillus Licheniformis; es parcialmente cíclica con D y L aminoácidos. (14).

Numerosos péptidos funcionan como hormonas, regulando uno o más procesos fisiológicos (16). Las funciones hormonales de péptidos han sido mejor caracterizadas para aquellos secretados por el Sistema Neuroendócrino, muchos de ellos actúan regulando uno ó más procesos fisiológicos: algunos ejemplos de estos y otros péptidos con función en la intercomunicación celular, aparecen en la tabla I.1.

Péptido	No. de a.a.	Funciones mejor caracterizadas
TRH	3	Estimula liberación de TSH en Hipofisis
FMRF-amida	4	Efecto cardioregulador
Enkefalinas	5	Modulan la actividad de distintos neurotransmisores en el SNC.
Oxitocina	9	Aumenta contracción del musculo liso y evacuación de leche de las mamas durante la lactancia.
Vasopresina	9	Produce constricción de vasos sanguíneos produciendo aumento en presión sanguínea y efectos antidiuréticos.
LHRH	10	Regula liberación de LH y FSH de la pituitaria.
Gastrina	17	Estimula secreción de HCl en estomago.
Secretina	27	Estimula flujo de secreción pancreática
VIP	28	Estimula flujo de secreción pancreática y regula la actividad en el SN.
Glucagon	29	Estimula la ruptura de glucógeno y contribuye a elevar los niveles de glucosa en sangre.
Calcitonina	32	Inhibe la reabsorción osea, disminuyendo así el nivel de calcio en sangre.
P.P. pancreático	36	Regula las funciones pancreáticas y gastrointestinales.
ACTH	39	Estimula producción de Hormonas suprarrenales.
CRF	41	Estimula producción ACTH de pituitaria.

Tabla I.1. Algunos péptidos y sus funciones mejor caracterizadas. (16,17).

## I.2. Distribución Filogenética de los Péptidos.

Debido a su gran diversidad funcional podemos encontrar a los péptidos distribuidos en todos los seres vivos; en equinodermos, el factor que causa la puesta de huevos es un péptido, como lo es también el que causa el mismo efecto en opistobranquios, un gasterópodo pulmonado; la hormona que controla la puesta de huevos (ELH) en *Aplysia*, un molusco marino, es un péptido que ha sido muy estudiado (18). En peces, la ovulación es inducida por un neuropéptido similar a la Hormona Liberadora de la Hormona Luteinizante (LHRH), que en mamíferos regula a nivel neuroendócrino la ovulación. En todos los casos un mismo fenómeno (control reproductivo) es mediado por distintos péptidos, sugiriendo una alta conservación evolutiva de tales moléculas (2).

Para ampliar aun más nuestra visión, mencionaremos que un mismo péptido puede ser encontrado en diversas especies. Una larga lista de péptidos dentro de los que se encuentra la Insulina, la Hormona Adrenocorticotrópica (ACTH) y Endorfinas, han sido localizadas inmunoreactivamente tanto en organismos eucarióticos unicelulares (e. g. *Tetrahymena*), como en pluricelulares (e. g. mamíferos) (19). Aunque en la mayoría de los casos, el papel de estos péptidos en organismos inferiores no ha sido determinado, se ha propuesto que les pueden representar algún tipo de ventaja en su supervivencia.

A otros péptidos se les ha caracterizado una misma función en distintas especies, como es el caso del Glutathión y un gran número de péptidos con función hormonal (20). Sin embargo, de mayor interés resulta el hecho de que un mismo péptido pueda tener distintas

funciones en distintas especies, tal como ocurre con el Péptido Relacionado al Gen de la Calcitonina (CRGP), el cual fué caracterizado inicialmente como neuropéptido, el cual causa hipertensión (via intracerebroventricular) e hipotensión (via sistémica), posteriormente se le observó un efecto antinociceptivo en humano, al igual que una inhibición en la contracción del utero y trompas de Falopio. Recientemente se ha visto que en ratón CGRP estimula la síntesis de receptores de acetilcolina en motoneuronas de la medula espinal. Estos y otros efectos (21) del CGRP, dejan ver la versatilidad funcional que un péptido puede llegar a desarrollar en sistemas biológicos diferentes.

El estudio de los péptidos en muchos casos ha sido enfocado en gran parte sobre una sola Clase animal, debido a que su función ha sido mejor caracterizada ahí. Un ejemplo de esto lo constituyen las Encefalinas, las cuales han sido estudiadas generalmente en mamíferos. A saber, estudios sobre la regulación de su síntesis han sido llevados a cabo en humano, cerdo, res, cuyo, rata, etc.(22, 23, 24), sin embargo, su importancia como regulador de la actividad neurotransmisora en el sistema nervioso de invertebrados ha sido poco estudiada, no obstante estas han sido encontradas en neuronas de sanguijuelas y lombrices, en fotoreceptores de langosta y en la red nerviosa de la hydra, entre otros.

Recientemente un neuropéptido cardioactivo de molusco, la FMRF-amida (Phe-Met-Arg-Phe-NH<sub>2</sub>) ha sido localizada por radioinmunoensayo e inmunocitoquímicamente en el cerebro de distintos vertebrados (2); al igual que este, distintos péptidos invertebrados han sido encontrados en sistemas vertebrados y viceversa (tabla I.2). Las identidades

químicas de estos han sido bien establecidas en la mayoría de los casos (2, 18), a pesar de ello, a la fecha es difícil decir en que grado se encuentran relacionados los sistemas peptidérgicos de vertebrados e invertebrados. Posiblemente, la alta conservación estructural y de los sistemas de comunicación celular en todos los organismos, sea lo que permita que los péptidos posean una amplia distribución.

---

Péptido	Vertebrados		Urocordados	Invertebrados
	Mamíferos		Ciona	Hydra
Substancia P	cerebro	intestino	cerebro	red nerviosa
Neurotensina	cerebro	intestino	cerebro	red nerviosa
Somatostatina	cerebro	intestino	cerebro	
Gastrina	cerebro	intestino		red nerviosa
Vasopresina	cerebro			red nerviosa
Encefalinas	cerebro	intestino	cerebro	red nerviosa
Colecistocinina	cerebro	intestino		red nerviosa
ACTH	cerebro		cerebro	
MSH	cerebro		cerebro	

---

Tabla I.2. Distribución de algunos neuropéptidos en miembros del Phylum Cordata (Vertebrados y Urocordados) y del Phylum Ctenophora. (16, 17).

### I.3. Biosíntesis de Péptidos

Los péptidos pueden ser sintetizados por dos vías: por medio de acciones catalíticas de enzimas ó por síntesis ribosomal a través de un precursor de alto peso molecular que origina finalmente al péptido. El ejemplo más común de péptido originado por la primera vía es el Glutathion, quizás por que fué el primer mecanismo biosintético vía enzimática establecido para un péptido de mamífero (14). Otros ejemplos de péptidos originados por esta vía son la Carnosina y péptidos antibióticos.

La mayoría de los péptidos biológicamente activos son sintetizados vía ribosomal a través de un precursor de alto peso molecular (15, 25). Actualmente han sido caracterizados muchos precursores que originan péptidos con funciones muy diversas: podemos citar al Glucagon, la Somatostatina, la Gastrina, la Neurofisina y las Encefalinas, entre otros. Todos estos péptidos tienen en común la forma como son sintetizados. El gen que codifica para el péptido inicia su transcripción cuando la ARN Polimerasa II se une a la doble cadena de ADN, en donde con ayuda de la cadena templado (cadena sencilla de ADN) empieza a incorporar ribonucleótidos, uniéndolos covalentemente al extremo 3' de la cadena. Los nucleótidos son sucesivamente incorporados creciendo en dirección 5'-3' formándose un híbrido ARN-ADN con el templado y la cadena nueva. Cuando la transcripción termina, el híbrido se disuelve, de esta manera la cadena sencilla de ARN es liberada generando un transcrito primario. Antes de salir del núcleo, el ARN precursor es procesado por medio de modificaciones del extremo 5' (casquete), adición de colas de



poliadenina (poli A) y eliminación de secuencias interruptoras ó intrones, por medio del empalme (en inglés "splicing") (fig I.2). El ARN mensajero maduro es transportado al citoplasma y posteriormente traducido en los ribosomas (de ahí el nombre de la vía) del retículo endoplásmico rugoso, generando un prepropéptido, el cual sufrirá una serie de modificaciones postraduccionales antes de producir el ó los péptidos activos. La primera de ellas ocurre en la cisterna del retículo endoplásmico rugoso (RER), donde se elimina la secuencia

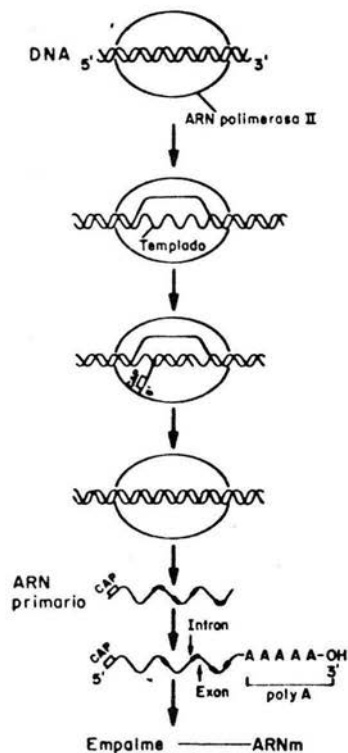


Fig. I.2. Transcripción y formación de ARN mensajero maduro. (25).

líder y el precursor se convierte en propeptido. El propeptido puede ser glicosilado y es transportado posteriormente al aparato de golgi donde probablemente sea nuevamente modificado (sulfatado, acetilado, etc.). En el aparato de golgi y principalmente en los gránulos secretorios generados en él, la molécula precursora es cortada proteolíticamente y también pueden ocurrir modificaciones en las terminales amino y carboxilo de los péptidos. Toda esta serie de eventos se resume en la figura I.3.

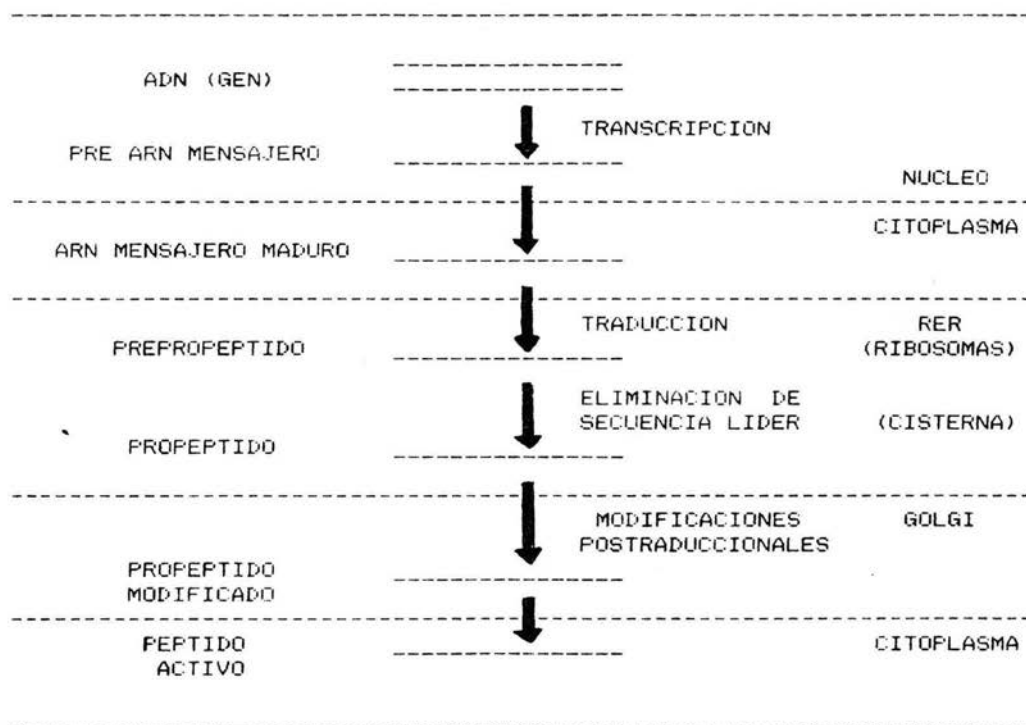


Fig I.3. Síntesis y Procesamiento de un péptido (via ribosomal). (15, 25,26).

#### I.4. Estructura de los Precursores Peptídicos

La mayoría de los péptidos caracterizados hasta el momento son sintetizados por vía ribosomal (de aquí deriva la importancia de esta vía) a través de un precursor peptídico.

Para fines didácticos, clasificaremos a los precursores peptídicos de acuerdo al número de péptidos que originen en: polimensajeros (a aquellos que contengan varios mensajes) y monomensajeros (a aquellos que contengan un solo mensaje). Podemos encontrar dos tipos de precursores polimensajeros: aquellos que originan distintos péptidos y los que originan un solo péptido. Cabe hacer la aclaración de que aunque un precursor polimensajero tiene potencialmente la capacidad de originar varios mensajes, no necesariamente serán generados todos, pues aquí intervienen factores específicos celulares que propician o no la expresión de cada péptido. Algunos ejemplos de precursores peptídicos y sus productos aparecen en la tabla I.3.

El precursor de la Proopiomelanocortina (POMC) (Fig. I. 4) contiene 241 aminoácidos que originan la Hormona Adrenocorticotrópica (ACTH) de 39 aminoácidos, la  $\beta$ -Endorfina de 31 aminoácidos, la  $\beta$ -Lipotropina de 93 aminoácidos y la Hormona Estimuladora de los Melanocitos ( $\alpha$ -MSH) de 13 aminoácidos (27). Este precursor se encuentra presente en el lóbulo anterior y lóbulo intermedio de la hipófisis de rata (28), no obstante, su procesamiento para originar las diferentes hormonas varía: en el lóbulo anterior se produce ACTH y  $\beta$ -Endorfina, mientras que en el lóbulo intermedio se procesa hasta  $\alpha$ -MSH (28). Por otra parte el control de la liberación de los productos

de la POMC, así como la expresión del gen, está regulada por factores diferentes en ambos lóbulos (28). Actualmente el precursor de la POMC constituye uno de los precursores más estudiados en cuanto a la regulación de su expresión se refiere.

Un ejemplo de precursor polimensajero que origina el mismo mensaje, es el de las Encefalinas (ENK). El gen de la proencefalina humana consiste de 4 exones que originan el precursor peptídico, de los cuales el exon IV contiene a todos los péptidos biológicamente activos conocidos: 6 copias de Met-Encefalinas y una de Leu-Encefalina (29). Las 7 copias de encefalinas se encuentran interrumpidas por péptidos intermedios de tamaño y secuencia variables. En todos los casos, para que se originen los péptidos es necesario el corte proteolítico del precursor. Dicho corte siempre se hará en donde exista un par de aminoácidos básicos (2, 18, 30) Lys - Lys, Arg - Arg, Lys - Arg, tal como se aprecia en la figura I. 4.

Propéptido	No. de a.a. en propéptido	Productos	No. de a.a. en producto
Proinsulina	86	Insulina	51
Prosomatostatina	103	Somatostatina	14
Proglucagon	78	Glucagon	29
Progastrina	110	Gastrina	17
Procalcitonina-CGRP	118	Calcitonina	32
		CGRP	37
Provasopresina	147	Vasopresina	9

Tabla I.3. Algunos precursores peptídicos y sus productos (2, 18)

La importancia de los precursores peptídicos y su estudio reside en que su síntesis constituye un punto más, a través del cual la célula puede regular sus productos. Ha sido sugerido para algunos precursores, que pueden llegar a responder aumentando la tasa de síntesis del péptido que contiene, como respuesta a una disminución en la cantidad del péptido disponible (31).

El estudio de los péptidos, sus precursores y los genes que los codifican a avanzado a pasos agigantados, gracias al empleo de las técnicas de ingeniería genética en la biología molecular (apéndice 1). Esto ha permitido comprender mejor no solo los mecanismos que regulan la expresión de los genes y sus productos, sino también los patrones de evolución génica, a través de los cuales los organismos finalmente se adaptan a un medio ambiente cambiante.

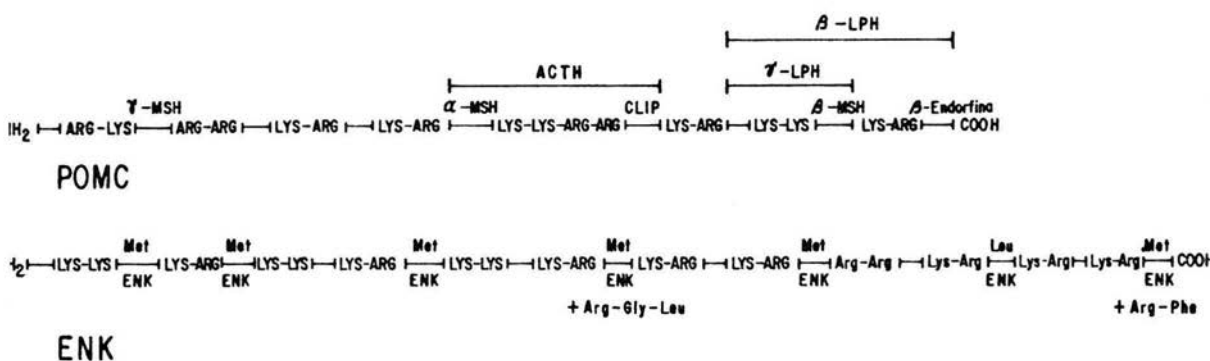


Fig I.4. Representaciones esquemáticas del precursor de la POMC y Proencefalina. Se pueden observar los péptidos generados por cada uno de los precursores, así como los sitios de corte proteolítico (2, 18).

## II.1. Evolución Molecular

Los seres vivos se caracterizan por su diversidad y por su similitud; aunque estos dos aspectos parecen ser antagónicos, pueden ser entendidos a través de concepto de evolución. Actualmente existen 5 millones de especies diferentes, además de muchos millones que se han extinguido (32); esto nos dá idea de tal diversidad, pues dentro de todas estas especies existen entidades tan complejas y distintas como las moscas y las ballenas ó como los musgos y las palmeras; aquí mismo comprendemos su similitud cuando nos percatamos de la existencia de estructuras moleculares semejantes entre estos organismos.

Para que toda esta diversidad de especies existiera fué necesario que los cambios que se presentaran en un individuo, fueran transmitidos de generación en generación hasta que se constituyera una población con características propias, diferente a las especies preexistentes. Pero, ¿cómo y dónde ocurren estos cambios?. La Selección Natural Darwiniana describe los cambios en los organismos como variaciones lentas y espontaneas en el genotipo, sometidas a selección en el momento en que se expresan en el fenotipo (32). Es entonces comprensible que cualquier cambio manifestado en el organismo es reflejo de un cambio suscitado a nivel molecular.

En la actualidad sabemos que la sustitución de un aminoácido por otro puede alterar la estructura y funcionamiento de la molécula a la cual pertenece. Este cambio de aminoácido puede ser causado por un solo cambio de base en el ADN y es conocido como mutación puntual, las cuales pueden producirse por distintas mecanismos: removimiento, adición y cambio de bases. Además de las mutaciones puntuales

(mecanismo primordial de evolución molecular), existen otros mecanismos como la transposición, la transcripción reversa y el rearrreglo genómico, que contribuyen significativamente al desarrollo de dicho fenómeno.

Las diferencias entre los genes de una especie y otra pueden medirse directamente examinando la secuencia de ADN de los genes o indirectamente al examinar las proteínas codificadas por los genes estructurales. Los métodos más usados para estimar el cambio genético durante la evolución son: la hibridación del ADN, la determinación de la secuencia de péptidos, polipéptidos y proteínas, la inmunología, mediante el uso de anticuerpos contra proteínas (homologas entre especies) que comparten determinantes antigénicos y el análisis de patrones electroforéticos de proteínas y de ácidos nucleicos.

Distintas filogenias han sido deducidas mediante el análisis de los aminoácidos que componen una proteína, dentro de estas, las más estudiadas son las basadas en globinas en vertebrados (33) y la del Citocromo C (34, 35). El Citocromo C es una proteína que interviene en la respiración celular, razón por la cual se encuentra presente en todos los organismos aerobicos. La filogenia propuesta para esta proteína actualmente ha sido complementada matemáticamente, al medir el número mínimo de diferencias de nucleótidos necesarios para explicar las diferencias de aminoácidos. En la figura II.1 aparece el dendrograma basado en esta matriz de datos. Las relaciones filogenéticas corresponden muy bien con la filogenia determinada por registro fósil y otras fuentes. No obstante hay discrepancias, por ejemplo, los pollos aparecen más íntimamente emparentados con los pingüinos que con los patos y las palomas (33). A pesar de ello, es

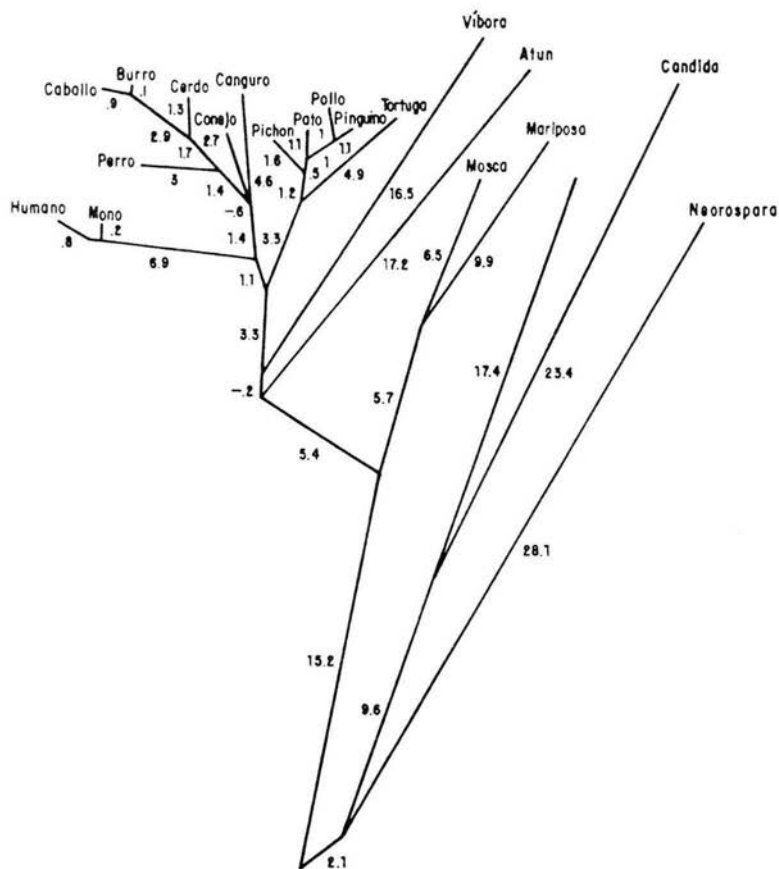


Fig. II.1. Arbol Filogenético elaborado a partir de el análisis de secuencia de la proteína Citocromo C. Los números de los brazos representan el número mínimo de diferencias de nucleótidos necesarios para explicar las diferencias de aminoácidos.



notable que el estudio de una sola proteína produzca una información tan parecida a la obtenida por varios métodos (estudios morfofisiológicos, paleontológicos, etc.) en su conjunto. Esto nos lleva a afirmar que las secuencias de aminoácidos de las proteínas (y la información genética contenida en ellas) almacenan una considerable información evolutiva.

En las últimas décadas se han desarrollado técnicas (36, 37) para determinar la secuencia de nucleótidos de las moléculas de ADN (o de ARNm que ha sido transcrito de las secuencias de ADN (ver apéndice 1). Estas técnicas están siendo aplicadas en estudios filogenéticos, sin embargo, aislar y secuenciar genes en distintas especies para ser comparados entre sí, es un trabajo bastante laborioso por lo que esto solo se ha hecho para algunos péptidos y proteínas.

Una alternativa que nos ofrece resultados similares (38, 39) consiste en estimar la semejanza interespecífica de un gen (o varios) de un péptido determinado (o varios), mediante la hibridación del ADN que codifica para la molécula en cuestión (apéndice 1). La técnica consiste básicamente en marcar radiactivamente el gen (ADN) y ponerlo a hibridar con el ADN cromosomal de varias especies que fué previamente disociado (cadena sencilla) para que se llevara a cabo la hibridación. Las secuencias homologas se unirán para formar las cadenas duplex; la formación de híbridos radiactivos dá una estima de la proporción de las cadenas de ADN que son similares. Las secuencias que forman los duplex no necesitan ser complementarias para todos los nucleótidos. La proporción de nucleótidos no complementarios en duplex interespecíficos de ADN puede estimarse por la velocidad a la cual se separan las cadenas de ADN al aumentar la temperatura. Cabe mencionar

que las condiciones de hibridación son seleccionadas previamente para reflejar distintos grados de relajamiento (ó estringencia) en la formación de híbridos (ver apéndice 1).

Con todos los datos obtenidos por las distintas técnicas, se empiezan a comprender mecanismos y patrones de evolución en las especies. Distintas teorías que proponen la interpretación de estos y otros datos han sido postuladas, sin embargo, algunos puntos permanecen oscuros (19). Un camino largo deja ver al final la comprensión del origen y futuro de la vida: su evolución.

## II.2. Teorías de Evolución Molecular

La reconstrucción de una filogenia a partir de semejanzas genéticas se basa en la suposición de que el grado de semejanza refleja el grado de parentesco filogenético (35). Esto parece una suposición razonable porque la evolución es un proceso de cambio gradual, sin embargo, existen diferencias en las tasas de cambio genético entre linajes de especies y aún en un mismo linaje al existir proteínas que evolucionan rápidamente y otras lentamente, por lo tanto la filogenia inferida de la secuencia de aminoácidos de una proteína puede llegar a ser errónea (33).

Recientemente Motoo Kimura y colaboradores (40, 41) han propuesto una hipótesis en la que sugieren que la tasa de sustituciones de aminoácidos en las proteínas y de las sustituciones de nucleótidos en el ADN pueden ser aproximadamente constantes debido a que la gran mayoría de tales cambios son generalmente neutros, dicho de otra manera, ocurren a nivel nucleotídico, pueden o no repercutir a nivel aminoacídico, pero no afectan la funcionalidad de la molécula. La

Teoría Neutralista de la evolución propuesta por este grupo, admite que, para cualquier gen, una gran proporción de los mutantes posibles son perjudiciales para sus portadores; estos mutantes se eliminan ó se conservan a muy baja frecuencia por efecto de la selección natural, sin embargo, se supone que algunos mutantes favorables en un alelo nuevo (llamado así, por presentar una mutación que lo hace diferente al alelo que lo originó), presentan una eficacia biológica idéntica, es decir, adaptativamente equivalente a los alelos establecidos; estos mutantes no se sujetan a selección natural porque no afectan la eficacia biológica de sus portadores, con lo cual el alelo nuevo resultaría neutro.

Los alelos neutros, apesar de que son definidos como poseedores de una eficacia biológica idéntica, no son iguales a los alelos establecidos, difieren mínimamente en sus secuencias; por lo tanto los cambios por alelos neutros se deberán más a la deriva génica (aparición aleatoria y gradual de mutantes) que a la selección natural (40).

La aparición de mutantes resulta ser entonces un fenómeno susceptible de ocurrir en cualquier punto del genoma con la misma probabilidad. Se ha propuesto que la participación de intrones en la amortiguación de mutantes es muy importante, puesto que estas secuencias disminuyen la probabilidad de que por deriva génica se afecten regiones codificantes de algún péptido ó proteína (42). Alternativamente se había sugerido que si los intrones son regiones que son finalmente eliminadas, no debieran poseer gran presión selectiva (42), sin embargo a la fecha ha sido comprobado que pueden existir regiones regulatorias en ellas que si bien no

codifican para ningún péptido, participan en su transcripción, lo cual resulta ser de igual importancia (43). Este hecho no ha modificado sustancialmente las interpretaciones, ya que para que siga siendo válido bastaría suponer que no todas las regiones en el intrón son relevantes. Una situación similar pudiera postularse para los péptidos intermedios de los precursores mencionados en la sección I.4.

El gen que codifica para la enzima trifosfato isomerasa posee diferente número de intrones en diferentes especies; en pollo y humano el número de intrones es de seis, en Aspergillus nidulans es de cinco y en bacterias (*E. coli*), el gen no presenta ningún intrón. Al respecto se ha opinado que dichos intrones juegan un papel relevante en la evolución del gen, puesto que las mutaciones de las regiones codificantes, aparecen con mayor frecuencia en especies con número de intrones menor, sobre aquellas con un número de intrones mayor (42). Este hecho permite cuestionar la interpretación de que los intrones desaparecieron por presión selectiva en el contenido de ADN (tal como ha sido sugerido para las bacterias, 26), pues de ser cierto su papel como amortiguador de las mutaciones, su presencia estaría beneficiando a los organismos.

Si la tasa de sustituciones de nucleótidos y aminoácidos fuese constante, tal como lo predice la Teoría Neutralista, la evolución de proteínas y de ADN serviría de reloj evolutivo (39). El grado de diferencia genética existente entre las especies sería una medida de relación filogenética y por lo tanto resultaría justificable contruir filogenias basándose en la diferencias genéticas.

El reloj molecular postulado por la teoría neutralista, no es un reloj que mida un tiempo exacto, es mas bien un reloj estocástico, por

que aunque la probabilidad de cambio es constante, ocurren algunas variaciones; no obstante, en periodos de tiempo muy largos este reloj es muy preciso (40). Además, si consideramos que cada gen o proteína representan un reloj distinto (por que cambian a tasas diferentes), quizá el resultado conjunto de varios genes o proteínas constituyan un reloj aún más exacto.

El que sea o no correcta la Teoría Neutralista y la exactitud del reloj molecular, son temas de controversia en la actualidad. Las pruebas existentes sugieren que la variación en la tasa evolutiva es mayor a la predicha por esta teoría, sin embargo, la evolución molecular parece ser suficientemente regular para servir de reloj evolutivo.

### II.3. Evolución de Péptidos

Nuestro entendimiento de las relaciones evolutivas entre los péptidos se encuentran en pleno desarrollo. Algunos de los estudios filogenéticos entre péptidos han sido llevados a cabo entre péptidos con función hormonal (2, 18); el problema es que este tipo de péptidos funcionan dentro de un sistema (sistema de comunicación intercelular), en donde cada una de sus partes (receptor, transporte, etc) evolucionan en conjunto, por lo tanto la evolución de este tipo de péptidos debiera de considerarse del sistema en conjunto y no de la molécula individualmente. Como esto ha sido hecho de esta última forma (18, 19), creemos que la visión alcanzada hasta el momento pudiera resultar muy parcial, sin embargo, y desde otro punto de vista, estos datos han sido de vital importancia para comprender algunos de los patrones de evolución de péptidos y sus genes.

El análisis de la secuencia de aminoácidos de varios péptidos ha dejado ver una alta homología entre algunos de ellos; este hecho permitió proponer la existencia de familias peptídicas (fig.II.2), posiblemente originadas por sucesivos eventos de duplicación génica (19, 44). Se supone que la duplicación de un gen peptídico (que origina un péptido con una función determinada) genera una copia redundante, que sin presión selectiva es libre de mutar y de poder llegar a adquirir las propiedades estructurales necesarias que lo hagan ser funcional (fig. II.3). No obstante el fenómeno es más complicado, pues la funcionalidad del péptido dependerá directamente

Péptido	s e c u e n c i a   a m i n o a c i d i c a
FMRF-amida	Phe - <u>Met</u> - Arg - <u>Phe</u> - NH <sub>2</sub>
Arg-Phe-Met-Enk	<u>Tyr</u> - Gly - <u>Gly</u> - Phe - <u>Met</u> - Arg - <u>Phe</u> - NH <sub>2</sub>
Met-Enk	<u>Tyr</u> - Gly - <u>Gly</u> - Phe - <u>Met</u>
B-Endorfina	<u>Tyr</u> - Gly - <u>Gly</u> - Phe - <u>Met</u> - Thr - Ser - ...
Colecistocinina	... - <u>Tyr</u> - Met - <u>Gly</u> - Trp - <u>Met</u> - Asp - <u>Phe</u> - NH <sub>2</sub>
Gastrina	... - <u>Tyr</u> - - - <u>Gly</u> - Trp - <u>Met</u> - Asp - <u>Phe</u> - NH <sub>2</sub>
A	
HCP-Crustáceos	<u>pGlu</u> - <u>Leu</u> - Asn - <u>Phe</u> - Ser - <u>Pro</u> - Gly - <u>Trp</u> - NH <sub>2</sub>
H.Adipocinética	<u>pGlu</u> - <u>Leu</u> - Asn - <u>Phe</u> - Thr - <u>Pro</u> - <u>Asn</u> - <u>Trp</u> - Gly-
Neurohormona D	<u>pGlu</u> - Val - Asn - <u>Phe</u> - Ser - <u>Pro</u> - <u>Asn</u> - <u>Trp</u> - NH <sub>2</sub>
F.Mioactivador	<u>pGlu</u> - <u>Leu</u> - Thr - <u>Phe</u> - Thr - <u>Pro</u> - <u>Asn</u> - <u>Trp</u> - NH <sub>2</sub>
B	

Fig II.2. Familias de péptidos. Dos familias de péptidos relacionados (A y B) mostrando la similitud de sus secuencias aminoacídicas (44).

de su reconocimiento por las otras partes que integran el sistema de comunicación intercelular (que desde el punto de vista evolutivo son también cambiantes, 19). Obviamente es más fácil que un duplicado hormonal evolucione a partir de factores ya funcionales (procesamiento, almacen, transporte, etc.).

En algunos estudios se ha visto que el o los péptidos originados de un duplicado génico, presentan una función igual ó relacionada con el original, tal como ocurre con los duplicados génicos de la somatostatina en peces (45) y de las encefalinas en sapo (29). Un ejemplo clásico de esto, lo encontramos en las hemoglobinas, en donde se ha propuesto que los genes que originan las cadenas  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\delta$ ,  $\epsilon$  y  $\gamma$  de las hemoglobinas adultas  $A_1$  ( $\alpha_2, \beta_2$ ),  $A_2$  ( $\alpha_2, \delta_2$ ) y fetales  $E$  ( $\alpha_2, \epsilon_2$ ) y  $F$  ( $\alpha_2, \gamma_2$ ), provienen de duplicados génicos y presentan funciones similares entre sí (12). Sin embargo, la función desarrollada por el o los péptidos originados de un duplicado génico no tiene que ser necesariamente igual al original, de hecho (como ya se mencionó), se ha propuesto a la duplicación génica como evento primordial a través del cual se originaron las familias de péptidos relacionados, cuyas funciones son diferentes entre sí.

Otra "tendencia" observada en la evolución de genes peptídicos, es la alta conservación (en distintas especies) de las regiones que codifican al péptido funcional; al parecer, la hipervariabilidad de las regiones es inversamente proporcional a su importancia (21, 46, 47). Esto no resulta ser extraño pues son justamente las regiones de importancia las que poseen mayor presión selectiva y las regiones de menor importancia las que soportan los efectos de la deriva génica (40). Esta observación se vé apoyada por distintos trabajos en donde

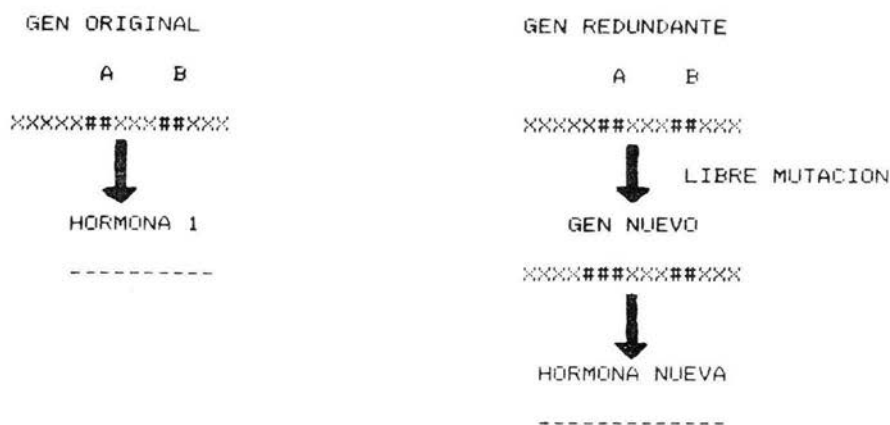


Fig II.3. Representación esquemática de la evolución de una nueva hormona originada por duplicación génica. A y B representan las regiones codificantes que originan al péptido hormonal.

se aprecia la misma "tendencia"; podemos citar a los 3 genes de actina ( $\alpha_k$ ,  $\alpha_e$  y  $\beta$ ) de ratón (48), el gen de la subunidad  $\beta$  de la Hormona Luteinizante en perro, rata, res y humano (47), el gen del Polipéptido Prepropancreático en rata y humano (46), el gen de la Hormona que controla la puesta de huevos (ELH) en el género *Aplisia* (49), el gen de Calcitonina/CGRP en humano, rata, pollo y salmón (21) y el gen de Encefalinas en res, humano y *Xenopus* (29), entre otros. Como podemos ver, no pocas evidencias apoyan la conservación de las regiones funcionalmente importantes; al parecer la tasa de mutación se encuentra más baja en estas regiones, contrario a lo que sucede con las regiones pertenecientes a intrones ó a péptidos interruptores presentes en el precursor peptídico.



### III.1. La Hormona Liberadora de Tirotropina

La Hormona Liberadora de Tirotropina (TRH) es un tripéptido de estructura: pGlu-His-Pro-NH<sub>2</sub>. Este se encuentra distribuido ampliamente en el Sistema Nervioso Central (SNC); en los mamíferos las más altas concentraciones de TRH se hallan en la eminencia media del hipotálamo (50) y también se ha detectado en algunos núcleos del hipotalámicos, tales como el paraventricular, dorsomedial y supraquiasmático (51), demás de otras regiones cerebrales (bulbo olfatorio, núcleo acumbens, tallo cerebral, medula espinal, etc., 51).

La función o funciones desarrolladas por este péptido fueron estudiadas inicialmente en el hipotálamo de mamíferos (52, 53), en donde se encontró que participaba en el eje hipotálamo-hipofisario estimulando la liberación de Tirotropina (hecho por el cual se le llamó Hormona Liberadora de Tirotropina). Posteriormente fué sugerida su participación en la liberación de prolactina durante la lactancia y el ciclo estral (54, 55).

La TRH liberada de la eminencia media del hipotálamo es vertida al sistema porta-hipotalámico-hipofisario, a través del cual, alcanza la adenohipófisis, en donde interacciona con receptores de alta afinidad que se encuentran en la membrana plasmática de los tirotrópos. Esto activa un sistema de segundos mensajeros (aparentemente la vía del "fosfatidil inositol" 56) que provocan la liberación de Tirotropina (TSH), la cual llega a través de la circulación general a la tiroides en donde estimula la secreción de Triiodotironina (T<sub>3</sub>) y Tiroxina (T<sub>4</sub>), hormonas que a su vez afectan diversos procesos metabólicos. Esto es a grandes rasgos el evento en

cascada que ocurre cuando se libera la TRH (fig. III.1), sin embargo actualmente se conocen a nivel molecular muchos de los fenómenos antes mencionados y mecanismos a través de los cuales estos pueden ser regulados (57, 58, 59, 60, 61).

Recientemente se ha postulado que la TRH además de su papel como neurohormona funciona también como neuromodulador (62). Este hecho se vé apoyado por la amplia distribución del péptido en el Sistema Nervioso Central (51), su localización en las terminales nerviosas (que además, responden a depolarización con alto potasio, 63, 64 ),

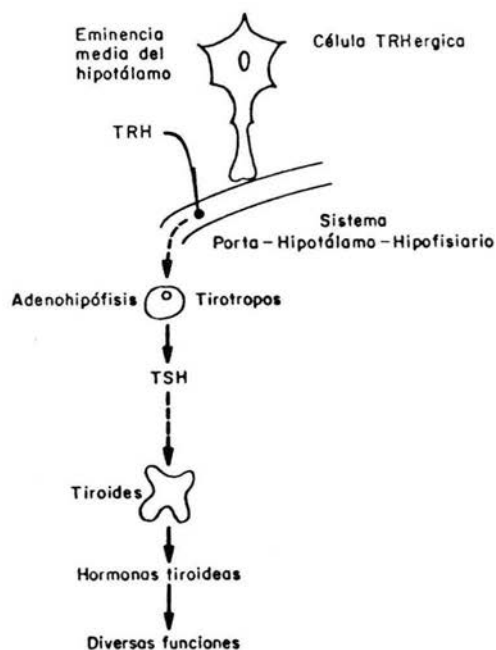


Fig III.1. Eventos que ocurren durante la liberación de la TRH.

la existencia de mecanismos de inactivación (65, 66, 67) y la presencia de receptores de alta afinidad en el cerebro (61). No obstante el papel neuromodulador de la TRH no es claro aún. Algunos de los efectos que le atribuyen el papel de neuromodulador son el aumento del recambio de catecolaminas y la liberación de Dopamina de hipotálamo y núcleo acumbens de rata (68,69).

Se ha sugerido también que la TRH es una prohormona (70), debido a que el corte enzimático por una piroglutamato aminopeptidasa genera un fragmento que posee actividad biológica: la Histidil-Prolina-Dicetopiperazina ( His-Pro-DKP ). Este metabolito resulta ser más efectivo que el mismo tripéptido en antagonizar la narcosis por etanol y en elevar el Guanocin Monofosfato cíclico (GMPC) cerebelar (70). Además posee una actividad de factor inhibidor de la prolactina y causa hipotermia, mientras que la TRH promueve los efectos contrarios.

La TRH también ha sido encontrado en el tracto gastrointestinal y en el páncreas de rata, específicamente localizada en los islotes de Langerhans, en donde se ha postulado que el péptido puede jugar un papel importante en la regulación de la actividad secretoria de estas células (70). De igual manera TRH-inmunoreactivo ha sido localizado en placenta, próstata, testículo, epidídimo, vesícula seminal y retina, no obstante su función en estos tejidos no ha sido definida (71, 72, 73).

### III.2. Distribución Filogenética de la TRH.

La distribución de la TRH no se concreta únicamente a distintos tejidos en distintos mamíferos ( ha sido localizada en el Sistema Nervioso Central de humano, rata, ratón, cuyo, conejo, hamster, gato,

perro, mono, cerdo y res, 74), sino que ha sido encontrada en otras especies pertenecientes a otras clases: aves, reptiles, anfibios y peces (tabla III.1).

A pesar de que está bien establecido que en general la función del péptido en los mamíferos es la misma (74), el significado funcional de la molécula para cada especie no ha sido comprobado. Datos sobre la vida media de la TRH en diversos sistemas biológicos, muestran muy variadas vidas medias para el péptido (70); este hecho permite cuestionar si los mecanismos de degradación de la TRH son igualmente regulados en todas las especies. Quizás la importancia de la molécula en cada especie sea entonces diferente.

El papel de la TRH en las especies de otras familias no ha sido tan bien definido. Estudios en pollo sugieren que el papel del péptido en el eje pituitario-tiroideo es similar al de mamíferos (8), además Harvey y colaboradores (75), encontraron que el TRH también estimulaba la secreción de Hormona del Crecimiento (GH) en esta misma especie.

En reptiles existen pocos datos (8); además de la medición del péptido en regiones cerebrales de víbora y el posible papel que se le ha sugerido como regulador de la actividad gástrica del Lagarto Americano, el área parece más bien inexplorada.

En anfibios, inicialmente se le había postulado un posible papel en la metamorfosis de salamandra y ajolote (8). Estudios en Xenopus laevis parecían sugerir que el TRH podría jugar un papel importante en la metamorfosis de estas especies a través de la estimulación del eje tiroideo (76), en virtud de que es bien conocido que las hormonas tiroideas aceleran la metamorfosis de anfibios. Datos contradictorios muestran por un lado, la correlación de los niveles de TRH, TSH y

hormonas tiroideas (77), esto podría sugerir la participación de estas hormonas en el eje tiroideo y por lo tanto inferir la participación de la TRH en la metamorfosis de anfibios; sin embargo en otros estudios (8) pudo apreciarse que TRH no estimula la liberación de TSH (y por consiguiente de  $T_3$  y  $T_4$ ) en esta clase de organismos, entonces, el supuesto papel de la TRH en la metamorfosis de anfibios no tendría veracidad. Tal parece que la alta concentración del péptido en hipotálamo no tuviese una justificación (conocida hasta el momento). Las altas concentraciones de la TRH localizadas en la piel de anfibios, está siendo más bien explicadas por la importancia que puede tener en el transporte de agua y electrolitos a través de la piel, órgano importante en el mantenimiento de la homeostasis de dichas especies.

VERTEBRADOS	TSH	PRL	GH	OTROS
MAMIFEROS	ESTIMULA	ESTIMULA	ESTIMULA	ESTIMULA LIBERACION DE ACTH EN ENFERMEDAD DE CUSHING'S
AVES	ESTIMULA	ESTIMULA	ESTIMULA	DESCONOCIDOS
ANFIBIOS	NO EFECTO	ESTIMULA	-----	ESTIMULA LIBERACION DE MSH
PECES	NO EFECTO O INHIBE ?			

Tabla III.1. Efectos hipofisiotrópicos de la TRH en Vertebrados (8).

Estudios en varias especies de peces (8) indican que altas concentraciones de TRH no estimulan el eje tiroideo y fué encontrado un efecto inhibitor de la liberación de prolactina. Un resumen de los efectos reportados para la TRH en vertebrados aparece en la tabla III.1.

### III.3. Metabolismo de la TRH

La TRH al igual que la mayoría de los péptidos caracterizados hasta el momento es sintetizada via ribosomal a través de un precursor de alto peso molecular y por lo tanto, los pasos seguidos para su síntesis son los mismos descritos en la biosíntesis de péptidos (fig.III.2). El precursor de la TRH contiene repetida la secuencia cinco veces, las cuales se encuentran flanqueadas por residuos de lisina-arginina ó arginina-arginina, que son los posibles sitios de ruptura del precursor (30). Las modificaciones encontradas en las terminales de la TRH son originadas posterior a la ruptura de éste a nivel de los pares de aminoácidos básicos. Al quedar libre la glutamina (Glu) esta se cicliza ( de manera espontánea ó mediante una enzima reportada recientemente, 78) para formar piroglutámico (pGlu). Por otro lado, la amidación de la prolina (Pro) proviene de la acción de una enzima que reconoce la glicina (Gly) todavía presente en el extremo carboxiterminal de la TRH y la oxida con la consiguiente producción de TRH y ácido glioxílico (79).

Una vez formado TRH, se almacena en las terminales nerviosas y se libera por un mecanismo dependiente de calcio, en respuesta a estímulos depolarizantes (63). El péptido liberado ejerce su acción y

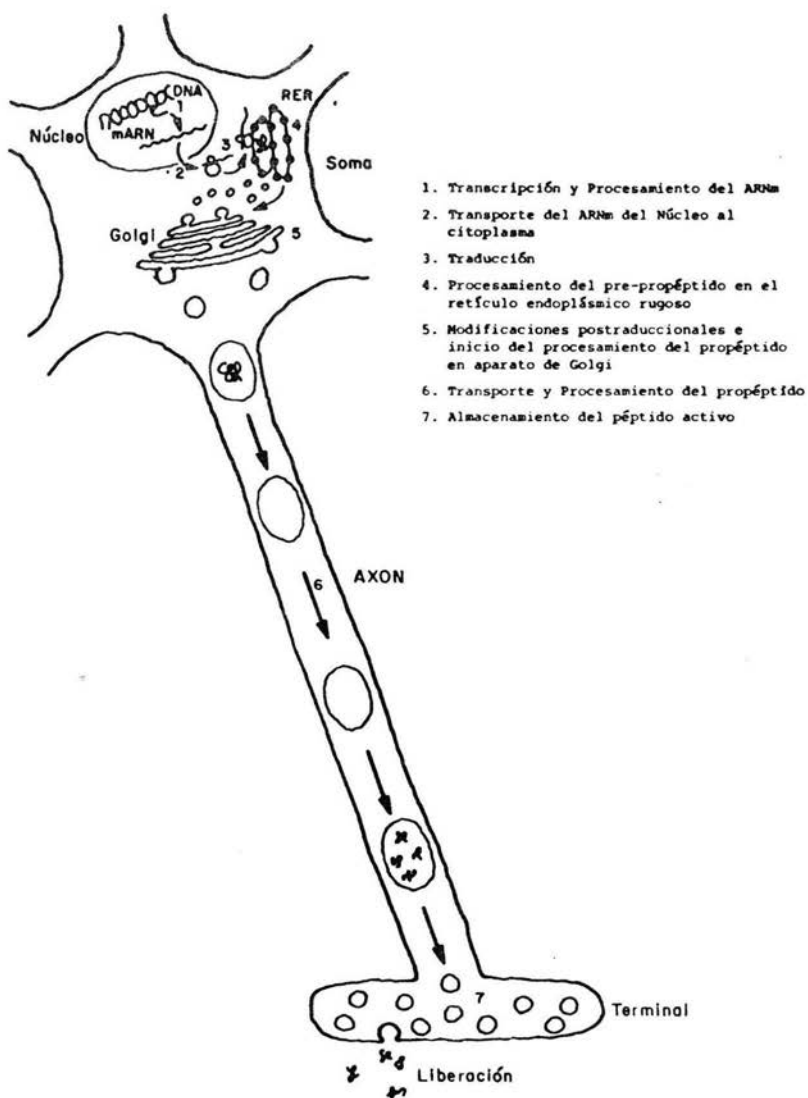


Fig. III. 2. Metabolismo de la TRH

posteriormente este es inactivado. Se han descrito 4 probables enzimas responsables de este efecto (80): dos enzimas altamente específicas, una piroglutamato aminopeptidasa (PGA) llamada Tiroliberinasa que actúa en suero rompiendo el enlace entre el pGlu e His-Pro-NH<sub>2</sub> y la PGA II (cuya acción es la misma a la tiroliberinasa), una enzima concentrada en las terminales nerviosas, la cual ha sido propuesta como reguladora de los niveles extracelulares del péptido; y dos enzimas poco específicas, la PGA I que actúa en cerebro y la Prolilendopeptidasa (PE) que genera TRH ácido (pGlu-His-Pro-OH).

### III. 4. Precursores de la TRH

En 1984 R. Richter (3) reporta la secuencia parcial del ADN complementario (para mas información ver apéndice 1) del precursor de la TRH encontrado en la piel de Xenopus laevis. Este ADNc de 478 pares de bases (pb) codifica para 123 aminoácidos dentro de los cuales se encuentran cuatro copias que originan TRH. Aproximadamente dos años después Cockle (81), reporta datos que sugieren la presencia de una quinta copia de TRH detectada por radioinmunoensayo (RIE). Mas ó menos al mismo tiempo Lechan (4) publica la secuencia del precursor de TRH obtenida a través de la secuenciación de ADN complementario al ARN poly A, extraído de hipotálamo de rata. Muy recientemente, Lee S.L. (82) dá a conocer la secuencia completa del gen de TRH. De esta manera quedó establecido que el precursor de la TRH contiene 5 secuencias codificantes del péptido, las cuales se encuentran interrumpidas por regiones que originan péptidos intermedios de función desconocida hasta el momento (83).



El análisis comparativo de los precursores que originan TRH en rata y Xenopus (fig.III.3) deja ver que solo las regiones que forman la hormona son semejantes, mientras que aquellas que conforman los péptidos interruptores varían en tamaño y secuencia nucleotídica y aminoacídica.

En estudios recientes (83, 7) se ha observado una amplia distribución de los péptidos intermedios en distintas regiones cerebrales de rata. Por RIA también fué posible detectar la presencia de algunos de estos péptidos en donde el precursor se encuentra presente y la TRH no (9). Esto ha sugerido la posibilidad de que tales péptidos posean actividad biológica. Actualmente se trabaja al respecto.

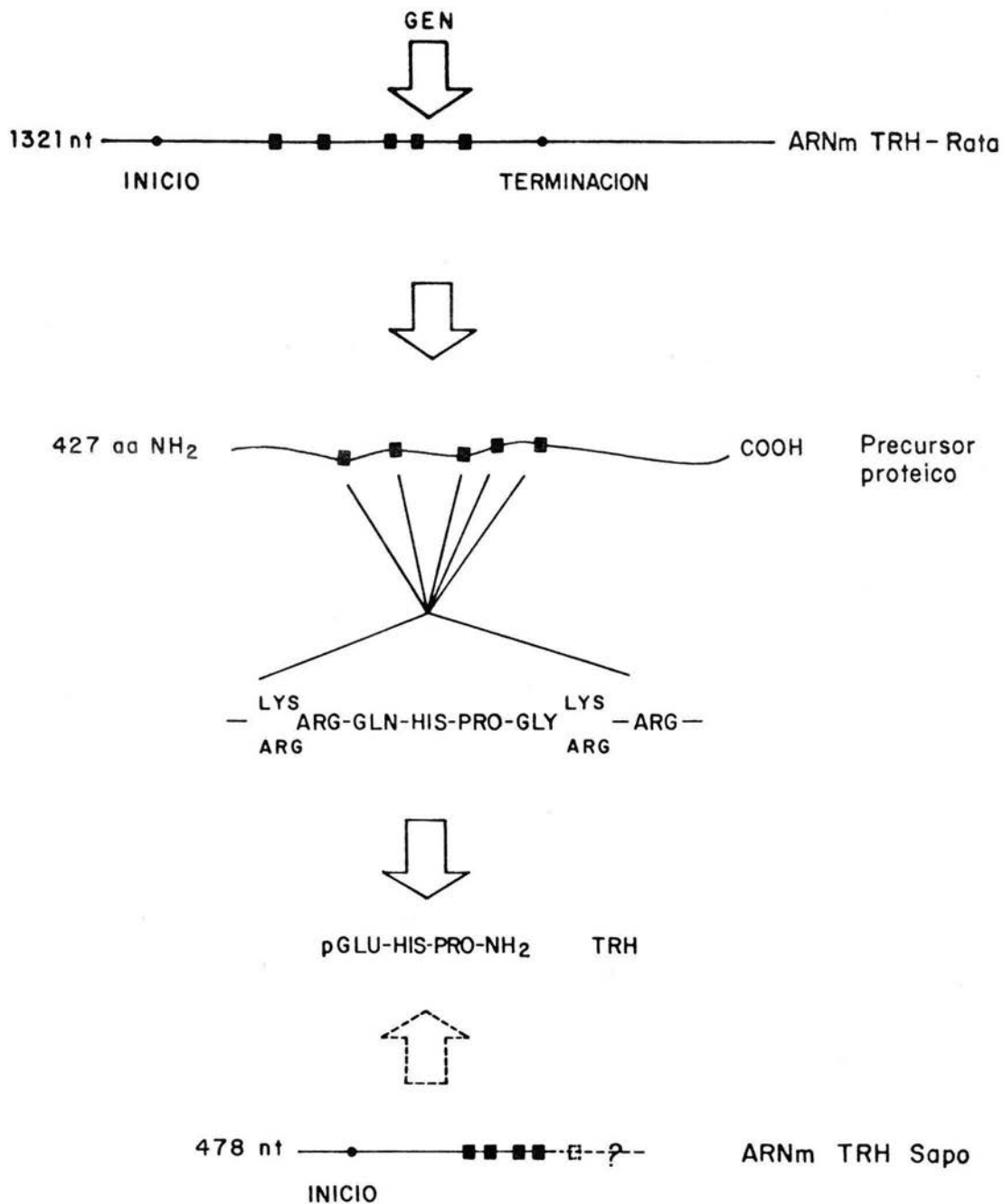


Fig.III. 3.

*Precursores de TRH en rata y sapo*

## OBJETIVOS

Varios antecedentes de los antes mencionados fueron importantes para el planteamiento de este trabajo:

- Por un lado, la gran diferencia existente entre los precursores de TRH aislados de rata y de Xenopus laevis sugería la posibilidad de cuando menos dos orígenes evolutivos para el gen ó una amplia divergencia de los péptidos intermedios. Esta misma diferencia por otro lado, permitía cuestionar si los precursores de TRH utilizados por las diferentes especies de la escala filogenética, pudiesen presentar similitud con uno de los dos precursores caracterizados al momento.

- El papel que ha sido sugerido para los péptidos intermedios, nos lleva a plantear la posibilidad de una alta conservación filogenética de las regiones que los codifican con motivo de su importancia funcional, tal como se ha observado en otros genes peptídicos (previamente citados).

En este orden, los objetivos principales de este trabajo fueron:

- Estudiar la distribución filogenética del gen de TRH de rata y Xenopus laevis, mediante la detección de secuencias homologas al ADNc respectivo (sondas). Las especies fueron elegidas contemplando: la representación de determinadas clases de la escala evolutiva, dendrogramas basados en la evolución de otras moléculas, la presencia del péptido en sus tejidos y la realización de estudios sobre TRH en diversos modelos biológicos (principalmente mamíferos). Las clases

estudiadas fueron: mamíferos (humano, rata, ratón, cuyo, conejo, hamster, cerdo, res, vampiro), aves (pollo), reptiles (lagartija), anfibios (sapo), peces (carpa de israel) y artropodos (acocil).

- A través del estudio de la filogenia del gen de TRH proponer un patrón evolutivo para dicho gen.

- En virtud de que nuestras sondas detectan regiones continuas de 50 ó más nucleótidos, utilizar este mismo estudio como vía factible para detectar la conservación de las secuencias intermedias del precursor en las diferentes especies. De esta manera obtendremos datos sobre la importancia funcional de dichos péptidos.

## MATERIALES Y METODOS.

### IV. I. Material biológico

Las especies con las que se trabajó, su nombre científico y la fuente de donde se obtuvieron, aparecen en la tabla IV. 1.

---

N. común	N. Científico	Fuente de Obtención
humano	<u>Hommo sapiens</u>	M.S. Rodríguez
rata	<u>Rattus norvegicus</u>	Bioterio del CIIGB
ratón	<u>Mus musculus</u>	Bioterio del CIIGB
cuyo	<u>Cavia porcellus</u>	Bioterio del CIIGB
conejo	<u>Oryctolagus coniculus</u>	Bioterio del CIIGB
hamster	<u>Mesocricetus aurata</u>	Bioterio del CIIGB
cerdo	<u>Sus scrofa</u>	Bioterio del CIIGB
res	<u>Bos taurus</u>	Bioterio del CIIGB
vanpiro	<u>Desmodus rotundus</u>	Dr. Alagón del CIIGB
pollo	<u>Gallus sp.</u>	Dr. Alanis de la UEEAR
lagartija	<u>Phrynosoma orbiculare</u>	Dr. Covarrubias del CIIGB
sapo	<u>Xenopus laevis</u>	Dr. Merchant del IIB
carpa	<u>Cyprinus carpio</u>	Criadero de Atlacomulco Mor.
acocil	<u>Procambarus bouvieri</u>	Dr. Arechiga del CINVESTAV

---

Tabla IV.1. Especies utilizadas. Se muestran los nombres comunes y científicos de las especies utilizadas, así como el lugar de donde proceden. CIIGB ( Centro de Investigación sobre Ingeniería Genética y Biotecnología de la U.N.A.M.), UEEAR ( Unidad Experimental de Electrofisiología Arturo Rosenberg, institución privada), IIB ( Instituto de Investigaciones Biomédicas de la U.N.A.M.), CINVESTAV ( Centro de Investigaciones de Estudios Avanzados del I.P.N.).

Para la extracción del ADN se utilizó el baso de las especies antes mencionadas, empleando como tejidos alternativos músculo y sangre, para el caso de las especies que carecían de este (e.g. pollo) ó que era difícil su obtención (e.g. humano).

#### IV. 2. Extracción y purificación de ADN

La técnica utilizada para la extracción de ADN fué la misma (84) para musculo y baso (A) y diferente (85) para sangre (B).

A). 100 mg. de tejido fueron macerados en nitrógeno líquido y colectados en 2 ml. de solución 0.1 M EDTA / 0.05 M tris pH. 7.8 / 0.5 % SDS con la cual se homogenizó suavemente. Posteriormente se agregó 500 µg/ml. de proteinasa K (BRL) e incubó a 55°C toda la noche (≈ 16 h.). La digestión fué suavemente mezclada por 20 min. con un volumen (≈ 2 ml.) de fenol saturado con 0.2 M tris. HCl pH. 7.8 / 0.5 M NaCl (UNC-fenol) e inmediatamente después con un volumen (≈ 2 ml.) de cloroformo / alcohol isoamilico 24:1 (solución clorofórmica), el mismo tiempo que el paso anterior. Las fases fueron separadas por centrifugación, 15 min. a  $5 \times 10^3$  rpm. La fase superior (acuosa) fué removida y tratada nuevamente con UNC-fenol / solución clorofórmica. Después de la recuperación de la fase acuosa se procedió a tratar la muestra con 20 µg. de ARNasa y se procedió a dializar (bolsas Sigma 8000 herbidas 15 min. en EDTA 5mM.) toda la noche (≈ 16 h.) contra 2 l. de solución TE (10 mM tris pH 7.8 / 1 mM EDTA pH. 7.8). Posteriormente se hizo una extracción UNC-fenol / solución clorofórmica y a la fase acuosa se le adicionó 1/25 de NaCl 5M y un volumen de etanol absoluto para precipitar el ADN. La malla previa homogenización cuidadosa fué colectada en un tubo esteril en donde se

lavó con etanol al 70% y se secó al vacío. La pastilla obtenida fué resuspendida cuidadosamente en una cantidad mínima ( $\approx$  1 ml.) de solución TE. Esta técnica rinde de 2 a 3  $\mu$ g de ADN/mg de baso y de 1.5 a 2  $\mu$ g de ADN/mg de músculo.

B). Este ADN se aisló de los núcleos de linfocitos usando la técnica de Kunkel (85) modificada por nosotros.

20 ml. de sangre se colectaron en un tubo con 4 ó 5 gotas de EDTA al 10% y después de su homogenización se centrifugaron a  $5 \times 10^3$  rpm. a  $4^\circ\text{C}$  durante 15 min. El plasma fué removido y se le realizaron 3 lavados a la pastilla con 10 ml. de NaCl 0.9% (solución isotónica) cada uno. Se adicionan 10 ml de solución isotónica y posteriormente 90 ml de solución 0.32 M de sacarosa / 10 mM tris.HCl pH. 7.8 / 5 mM  $\text{MgCl}_2$  / 1% tritón X-100 a  $4^\circ\text{C}$  por 15 min. para lisar las células. Los nucleos fueron colectados por centrifugación a  $5 \times 10^3$  rpm. /  $4^\circ\text{C}$  por 15 min. La pastilla fué resuspendida en 4.5 ml. de 75 mM NaCl / 24 mM EDTA pH. 7.8. Después se adicionaron 0.5 ml. de SDS 5% y 2 mg/ml de proteinasa K con lo cual la muestra se incubó 12 h. a  $37^\circ\text{C}$ . La digestión fué suavemente mezclada por 20 min. con un volumen ( $\approx$  5 ml) de UNC-fenol e inmediatamente después con un volumen ( $\approx$  5 ml) de solución clorofórmica, el mismo tiempo que el paso anterior. Las fases se separaron por centrifugación 15 min. a  $5 \times 10^3$  rpm. La fase acuosa (superior) se removió y trató nuevamente con UNC-fenol / solución clorofórmica. Después de la recuperación de la fase acuosa se procedió a tratar la muestra con 20  $\mu$ g de ARNasa para que de esta forma se sometiera a dializar toda la noche ( $\approx$  16 h.) contra 2 l. de solución TE. Posteriormente se procedió a hacer una extracción UNC-fenol / solución clorofórmica; a la fase acuosa de aquí obtenida se le

adicionó 1/25 de NaCl 5M y un volumen de etanol absoluto (precipitación). La malla formada previa homogenización cuidadosa fué colocada en un tubo esteril en donde se lavó con etanol al 70% y se secó al vacío. La pastilla obtenida fué resuspendida cuidadosamente en una cantidad mínima ( $\approx$  1 ml) de solución TE. De 20 ml. de sangre se obtienen de 400 a 600  $\mu$ g de ADN.

#### IV. 3. Valoración de la calidad y cantidad de ADN extraído

La calidad del ADN extraído se valoró (84) primero al espectrofotómetro (densidades ópticas = OD a 260 nm y a 280 nm). Si el cociente de ambas lecturas resultó mayor a 1.8, la pureza del ADN fué aceptable; si resultó de alrededor de 1.5 el ADN pudiese contener hasta un 50% de proteína, en tal caso se hizo una nueva extracción UNC-fenol/ solución clorofórmica para eliminar dichas proteínas y posteriormente se sometió la muestra a un dializado / precipitado / resuspensión.

Se valoró la concentración de ADN considerando la lectura a 260 nm (1 OD = 50  $\mu$ g/ml) con este cálculo se estimó la cantidad total de ADN extraído y se tomaron alícuotas ( $\approx$  0.2  $\mu$ g), cantidades iguales para todas las muestras y se hizo una electroforesis en gel de agarosa : agarosa 1% disuelta en amortiguador Tris-Boratos-EDTA 1X (TBE 10X : 0.89 M tris base, 0.89 M ácido bórico, 20mM de EDTA pH. 8). Para colocar las muestras en los pozos del gel, estas se mezclaron previamente con 1/5 de volumen final de colorante BPB ( 0.25% xileno / 0.25% BPB / 50% glicerol en agua), el cual sirvió como referencia para ubicar la distancia a la cual el ADN migró. La electroforesis se corrió por 30 min. a 80 volts. Este gel se tiñó con bromuro de etidio



1X (4 µg/ml) por 5 min. A luz ultravioleta (UV) se observaron una sola banda por carril, que indicó la integridad del ADN. Se fotografió el gel y se realizó una densitometría (densitómetro Hoefer) con lo cual se corroboró la concentración calculada al espectrofotómetro (Ultrospec II.4050 LKB) usando una curva estandar.

#### IV. 4. Transferencia e hibridación tipo Southern

El ADN se digirió con una enzima de restricción (Eco-RI). 50µg de ADN se trataron con 2 µl de enzima en un medio que contenía 50 µl de amortiguador alto 10X ( 100 mM NaCl / 50 mM tris.HCl pH. 7.8 / 10 mM MgCl<sub>2</sub> / 1 mM ditiotreitól ), 20 µl de espermidina 0.5 M en un volumen final de 500 µl ( concentración de ADN 0.1 µg/µl de reacción ). La reacción se realizó durante toda la noche (≈ 16 h.) a 37°C. La digestión se extrajo con un volumen de UNC-fenol / solución clorofórmica, separando las fases por centrifugación 3 min. a 1x10<sup>4</sup> rpm. La fase acuosa (superior) se precipitó por 1 h. a -70°C con 1/25 NaCl 5M / 2 volúmenes de etanol (≈ 1 ml.). Se centrifugó 5 min. / 1x10<sup>4</sup> rpm. a 4°C. La pstillla fué separada por decantación y secada al vacío para su posterior resuspensión en 50 µl de solución TE (concentración final 1 µg de ADN/µl).

15 µg de ADN por carril se sometieron a electroforesis en gel de agarosa (0.9% disuelta en amortiguador TBE 1X) sumergido en amortiguador TBE 1X. Las muestras corrieron a 25 mA ≈ 15 volts, por 16 h. ( equivalente a 11 cm. de migración del azul de bromofenol ). Se fotografió el gel expuesto a U.V.

Para su transferencia al soporte sólido (86), el gel fué lavado previamente 2 x 45 min. con 0.5 M NaOH / 1.5 M NaCl y 2 x 60 min. con

0.5 M tris pH. 7.5 / 3M NaCl. El gel se colocó según dispositivo (figura IV.1.), utilizando para transferir membrana de nitrocelulosa (Schleicher & Schuell), 20X SSC ( 3M NaCl / 0.3 M citrato de sodio pH.7) y papel whatman 3 MM. La transferencia por capilaridad se realizó durante 20 h. a temperatura ambiente. Una vez transcurrido este tiempo, la membrana fué horneada a 80°C por 2 h. y almacenada en bolsas para su posterior hibridación (87, 88).

Antes de la hibridación las membranas fueron prehibridadas en 5X SSC, 0.1% Albúmina Sérica Bovina (BSA), 0.1% ficol, 0.1% polivinilpirrolodona, 250 µg/ml de ADN de esperma de salmón sonificado y herbido 5 min., 50 mM NaPO<sub>4</sub> pH. 7, 0.1% SDS y 43% de formamida desionizada, a 37°C por 3 h. Después de transcurrido este tiempo, el amortiguador de prehibridación fué removido de la bolsa. La hibridación fué realizada con el mismo amortiguador conteniendo 10x10<sup>6</sup> cpm/ml de la sonda marcada radiactivamente por Nick traslation (ver materiales y métodos IV.9) a 37°C por 36 h.

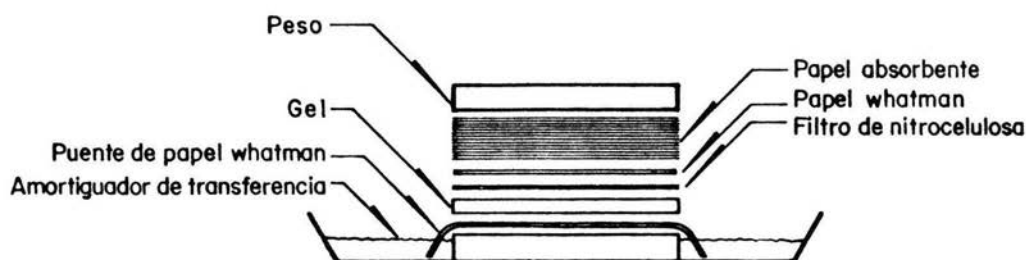


Fig. IV. 1. Dispositivo para transferencia de geles a soportes sólidos.

Para obtener condiciones de hibridación (89) de baja estringencia (apéndice 1), los filtros se lavaron 2X SSC, 5 min. a temperatura ambiente por 3 veces y 2X SSC, 15 min. a 50°C por 2 veces. Para alta estringencia se realizó un lavado más 0.1X SSC, 15 min. a 50°C. Después de los lavados las membranas se expusieron a placas autorradiográficas (hyper films Amersham) por varios días (ver resultados) y posteriormente estas fueron reveladas (revelador y fijador Kodak).

#### IV. 5. Extracción de ARN citoplásmico total.

Para la extracción de ARN citoplásmico total (90), 50µg de tejido (bulbo olfatorio ó hipotálamo) de rata y conejo fueron homogenizados en 250 µl de solución 1 ( 50 mM tris pH. 7.4 / 25 mM NaCl / 5 mM MgCl<sub>2</sub> ). El homogenizado se transfirió a un tubo eppendorf de 1.5 ml esteril, al cual se le adicionaron 8 µl de triton X-100 25% y se mezcló fuertemente con el vortex. Posteriormente se agregaron 100 µl de sacarosa al 72% para sedimentar los núcleos y se centrifugó 10 min. a 1x10<sup>4</sup> rpm a 4°C. El sobrenadante se colectó en un nuevo tubo eppendorf y se le adicionó 100 µl de solución 2 ( 6% SDS / 0.4 M NaCl / 40 mM EDTA ). La muestra así procesada se sometió a 3 extracciones con un volumen de fenol saturado toda la noche con 25 mM tris.HCl pH. 7.4 / 0.1 M NaCl / 10 mM EDTA y un volumen de solución clorofórmica. La fase acuosa (superior) se colocó en otro tubo y se le agregaron dos volúmenes de etanol absoluto frío y una concentración final de 0.2 M NaCl. Se almacenaron los tubos por 12 h. a -80°C, una vez transcurrido este tiempo se centrifugó 15 min. a 1x10<sup>4</sup> rpm. a 4°C. Se decantó el sobrenadante y la pastilla se secó al vacío para su posterior

resuspensión en agua tridestilada esteril tratada con dietilpirocarbonato. Las muestras se almacenaron a  $-80^{\circ}\text{C}$  hasta su uso. Todos los pasos antes de las extracciones con fenol fueron realizados lo más rápido posible para que la calidad del ARN fuese aceptable (84).

#### IV. 6. Valoración de la calidad del ARN extraído

Se calculó la concentración de las muestras de ARN al espectrofotómetro ( O.D. 260 nm., 1 O.D. = 40  $\mu\text{g}/\text{ml}$  ) para tomar alícuotas que correspondían a 5  $\mu\text{g}$  de ARN para ser sometidas a electroforesis desnaturalizante en minigel ( agarosa 1%, 2.2 M formaldehído y 10 mM de amortiguador de fosfato de sodio pH. 7.5 ). La electroforesis horizontal del gel fué realizada sumergiendo a este en amortiguador de fosfatos 1X (10mM fosfato de sodio pH. 7.5) a un voltaje de 30v por 2.5 h., reciclando el amortiguador durante todo este tiempo. Antes de colocar las muestras en los pozos, estas fueron desnaturalizadas con 2.2 M de formaldehído, 1X amortiguador de fosfatos y 50% formamida a  $65^{\circ}\text{C}$  por 15 min., colocándose inmediatamente en hielo después de la incubación y antes de ponerlas en el gel junto con el colorante ( 0.125% xilencianol / 0.125% BPB / 0.125 mM EDTA pH.8 ).

Los ARNs fueron observados en el gel por exposición a U.V. después de teñirlo con bromuro de etidio (4 $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) por 5 min. y lavarlo toda la noche en agua. Posteriormente se toma una fotografía del gel con exposición a U.V.; se observaron las bandas nítidas del ARN ribosomal (subunidades 28s y 18s) que indican la calidad del ARN extraído. Se realizó una densitometría con la fotografía tomada y se

ajustaron las concentraciones que por espectrofotometría habían sido determinadas. Cantidades iguales de ARN fueron utilizadas para la detección del mensajero.

#### IV. 7. Transferencia e hibridación tipo Northern

Se realizó una electroforesis en gel desnaturalizante tal como cuando se valoró la calidad del ARN extraído, solo que este gel no fué teñido con bromuro de etidio, sino que se transfirió a membrana de nitrocelulosa inmediatamente después de terminada la electroforesis. La transferencia, hibridación y lavados (86) a la membrana se llevaron a cabo de igual manera que con el Southern, de hecho, el filtro con ARN se hibridó en la misma bolsa de hibridación que contenía la membrana con ADN.

El ARNm de TRH fué detectado después de la exposición de la membrana a placas autorradiograficas (Kodak films) por 2 días y de su posterior revelado (revelador y fijador Kodak).

#### IV. 8. Purificación de plásmidos y extracción de fragmentos de TRH

Los plásmidos TRH Xenopus-PUC8 y TRH rata-PUC12 (ambos con resistencia a ampicilina) proporcionados por el Dr. Kreil y el Dr. Goodman respectivamente, venían clonados en cepas de E.Coli. Para su purificación (84), dichas cepas se crecieron por separado en medio sólido: 0.6% bacto agar, medio luria ( bacto triptona 1% / bacto extracto de levadura 0.5% / cloruro de sodio 1% pH. 7.5) y 100 µg/ml de ampicilina; de esta manera se evitó la contaminación por bacterias que no contuviesen el plásmido.

Se hizo crecer un inóculo de las bacterias transformadas en 10 ml de medio luria mas 100 µg/ml de ampicilina a 37°C con agitación toda la noche. De este medio se tomaron 50 µl para inocular un litro de medio luria con antibiótico a la misma concentración, el cual fué incubado a 37°C con agitación, hasta alcanzar 0.8 O.D. a 660 nm. En este momento se le adicionó cloranfenicol 200 µg/ml para inhibir el crecimiento de la bacterias y amplificar los plásmidos en ellas existentes. La amplificación se realizó por 16 h. a 37°C en agitación.

Se centrifugaron las células a  $7 \times 10^3$  rpm. (Beckman J2-21) por 15 min. a 4°C; se obtuvo una pastilla que se lavó con NaCl 10mM (cada pastilla obtenida fué perfectamente resuspendida para favorecer la lisis celular). Se colectaron nuevamente las células por centrifugación a  $7 \times 10^3$  rpm. 15 min. a 4°C. La pastilla se congeló en hielo seco/etanol por 15 min. y se resuspendió en 10 ml. de solución: sacarosa 25% / tris.HCl 50 mM pH. 8 / EDTA 1 mM manteniéndose 30 min. en hielo. Transcurrido este tiempo se agregaron 1.5 ml. de 0.5 M EDTA pH. 8, 10 mg de lisozima (sigma), 0.1 ml ARNasa ( 10 mg/ml ), se mezcló y se incubó 30 min. en hielo. Posteriormente se agregaron 3 ml de mezcla lítica ( 3 ml. tritón X-100 al 10% / 75 ml de EDTA 0.25 M / 15 ml de tris.HCl 1M pH. 8 / 7 ml. de agua ) y se incubó nuevamente en hielo por 30 min. Se centrifugó a  $1.8 \times 10^4$  rpm. 40 min. a 4°C. Se tomó el sobrenadante y se agregó un volumen de agua para posteriormente extraerse 2 veces con un volumen de fenol saturado ( con tris.HCl 50 mM. / NaCl 100 mM pH. 7.5 ) y un volumen de cloroformo. A la fase acuosa de aquí obtenida se le agregó 0.2 volúmenes de 5 M NaCl y 0.33 volúmenes de polietilenglicol (PEG<sup>6000</sup>) al 30%. Una vez mezclado se almacenó a 0°C por  $\approx 16$  h., después se centrifugó a  $9 \times 10^3$  rpm por 20

min. (Beckman SS34). La pastilla se resuspendió en TNE (tris 10 mM pH. 7.5 / EDTA 1 mM / NaCl 0.2 M) y se precipitó con etanol. Finalmente se resuspende en 2.1 ml. de solución TE.

Para eliminar el ADN cromosomal (84, 86) se realizó un gradiente de cloruro de cesio (ultra-Beckman SW 50.1) con 2.15 g CsCl, 2.1 ml. de solución ADN ( $\approx$  500  $\mu$ g), 216  $\mu$ l de bromuro de etidio (10 mg/ml) colocados en un tubo de polipropileno (Beckman) y cubiertos con 2.3 ml de aceite mineral. La ultracentrifugación se llevó a cabo a  $3.8 \times 10^4$  rpm durante 20 h. Posteriormente se selecciona la banda que corresponde al ADN de plásmido (banda inferior), la cual fué lavada 4 veces con butanol / TE 2:1 para eliminar el bromuro de etidio. Se tomó la fase acuosa (inferior) y se precipitó con etanol. Finalmente se resuspendió en 2 ml. de TE.

Se tomó una alícuota del plásmido (1  $\mu$ l) y se leyó al espectrofotómetro (260 nm) para calcular su concentración y poder determinar la cantidad de enzima necesaria para la extracción de los fragmentos de TRH. La digestión de 25  $\mu$ g de PUC8-TRH Xenopus se hizo con 2  $\mu$ l de Pst I (15 unidades/ $\mu$ l) en un medio que contenía 5 mM NaCl, 1 mM tris.HCl pH. 7.5, 1 mM MgCl<sub>2</sub>, 0.1 mM ditiotreitól en un volumen de 60  $\mu$ l. La digestión de 25  $\mu$ g de PUC12-TRH rata se hizo con 2  $\mu$ l de Eco-RI (9 unidades/ $\mu$ l) en un medio que contenía 10 mM NaCl, 5 mM tris.HCl pH. 7.5, 1 mM MgCl<sub>2</sub>, 0.1 mM ditiotreitól, en un volumen final de 60  $\mu$ l. Ambas digestiones se hicieron a 37°C por 1 h. Se extrajeron las digestiones con fenol / solución clorofórmica, se recuperó la fase acuosa, se precipitó con etanol y se resuspendió en un volumen mínimo de TE ( $\approx$  100  $\mu$ l).

Se toma una alícuota de la muestra y se hace una electroforesis (80 volts / 30 min.) en gel de agarosa al 0.8%, disuelto en amortiguador TBE 1X y sumergido en el mismo amortiguador. El gel se tiñó con bromuro de etidio (4 µg/ml); se localizaron las bandas a U.V. y se cortó el gel adelante de la banda correspondiente al fragmento, para colocar ahí tiras de papel DE81. Se corrió nuevamente el gel 15 min. a 60 volts para que la banda quedase atrapada en el papel de alta afinidad. El papel con el fragmento se colocó en una jeringa de 1 ml. que a su vez se encontraba en el interior de un tubo de 15 ml, aquí se realizaron 4 lavados con 100 µl de 0.1 M NaCl, 0.1 mM EDTA y 10 mM tris pH. 8, centrifugando entre cada lavado a  $2 \times 10^9$  rpm. por 30 seg. (el ADN no se desprende durante este paso). Posteriormente se colocó un tubo eppendorf entre la jeringa y el tubo de 15 ml. y se realizaron 4 lavados para desprender el ADN con 100 µl de NaCl 1 M cada uno, centrifugando en cada lavado. Finalmente el ADN quedó en el tubo eppendorf en donde se realizó una extracción con butanol y luego otra con fenol / solución clorofórmica, para su posterior precipitación con 3 volúmenes de etanol (≈ 1.2 ml) en hielo seco 10 min. Se colectó el ADN a  $1 \times 10^4$  rpm./ 10 min., se secó al vacío y se resuspendió en 20 µl de solución TE.

Los fragmentos así purificados fueron checados al correr minigeles de prueba en donde a la vez se pusieron plásmidos con varias enzimas y poder corroborar el tamaño de los fragmentos (datos no mostrados en este reporte).



#### IV. 9. Marcaje radiactivo de las sondas por Nick traslation.

Para el marcaje por Nick traslation (84, 86) se utilizó un paquete comercial (Amersham). Se mezcló 0.1  $\mu\text{g}$  de ADN (sonda), 1.25 unidades de ADN polimerasa I, 25  $\mu\text{g}$  de ADNasa I, 5  $\mu\text{l}$  de deoxinucleótidos trifosfatados (dATP, dGTP, dTTP,  $\approx 1.5 \mu\text{M}$  de cada uno) y 50  $\mu\text{Ci}$  ( $\approx 5 \mu\text{l}$ ) de deoxicitosintrifosfato (dCTP) marcado en la posición  $\alpha$  con  $\text{P}^{32}$ , en un medio con 0.02 M tris.HCl pH. 7.5, 10 mM  $\text{MgCl}_2$ , 50  $\mu\text{g/ml}$  de BSA y 1 mM de ditiotreititol (volumen final 25  $\mu\text{l}$ ). La reacción se llevó a cabo por 2 h. a  $15^\circ\text{C}$ . Un diagrama que ilustra lo que ocurre en la reacción aparece en la fig IV.2.

Se checó la incorporación mediante precipitación en papel whatman 3 MM con TCA al 30% por 15 min. a  $4^\circ\text{C}$ . La reacción se paró con 5  $\mu\text{l}$  de EDTA 0.5 M y se pasó por una columna de biogel, equilibrada con 5mM tris pH. 7.8 / 0.5 mM EDTA pH. 7.8. Se colectaron alícuotas en varios tubos; típicamente se observaron con el detector de radiactividad (geiger) 2 picos: el primero correspondió a la sonda marcada y el segundo a la marca no incorporada. Se juntaron las alícuotas del primer pico ( $\approx 0.5 \text{ ml.}$ ), se contaron 2  $\mu\text{l}$  de esta solución con 5 ml de tolueno-PP0 ( para 1 l.: 8 g. PP0, 0.1 g. POPOP en tolueno) en el contador  $\beta$  Beckman (canal de fósforo). Se calculó la cantidad de marca incorporada (actividad específica de  $2 - 5 \times 10^6 \text{ cpm}/\mu\text{g}$ ).

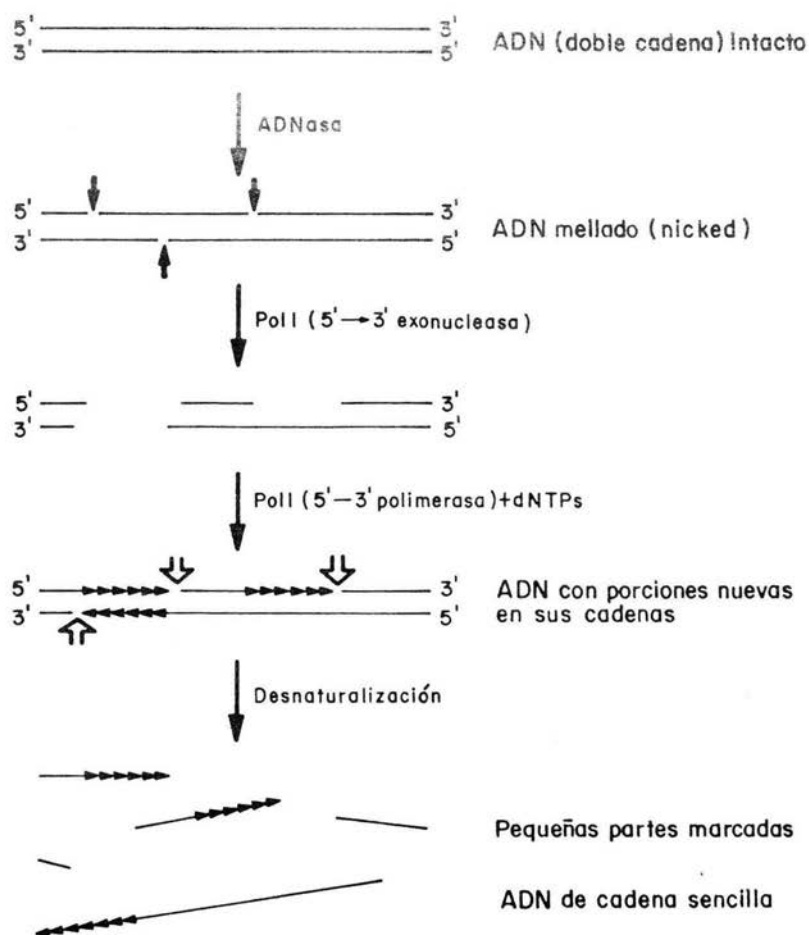


Fig. IV. 2. Preparación de sondas marcadas radiactivamente por Nick Translation. Las flechas oscuras indican la posición original del mellado (nicked) y las flechas vacías la posición final.  $\blacktriangleright$  = cadena marcada. Pol I = ADN polimerasa I de E. Coli. dNTPs = desoxirribonucleótidos trifosfatados.

## RESULTADOS

### V. 1. Calidad y cantidad de ADN

Para que los resultados encontrados en experimentos de hibridación de ácidos nucleicos pudieran ser comparados entre una especie y otra, se manejaron las mismas condiciones de hibridación: temperatura y tiempo de hibridación, porcentaje de formamida, concentración de sales, concentración de la sonda y concentración de ADN.

La calidad y cantidad del ADN extraído fué lo primero en ser valorado. Para esto, a todas las muestras de ADN de las 14 especies elegidas se les calculó la concentración con el espectrofotómetro (absorbancia a 260 nm). En base a este cálculo se tomaron alícuotas similares de ADN de cada una de las especies y se corrieron en un gel de prueba. Este gel fué teñido con bromuro de etidio, pudiéndose observar (por la integridad de las bandas) que la calidad del ADN era aceptable (Fig. V. 1.). Con respecto a las concentraciones, estas fueron ajustadas de acuerdo a un estándar (ADN de concentración conocida) y por densitometría (densitómetro Hoefer).

### V. 2. Digestiones con Eco-RI

Una vez ajustadas las concentraciones, se digirieron muestras de ADN de cada especie con enzima Eco-RI. Una alícuota de la digestión fué checada después de 5 h. en un gel analítico, el cual contenía además de las muestras un marcador de peso molecular (figura V. 2.).

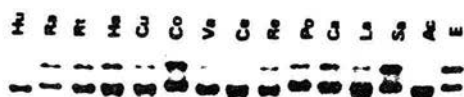


Fig.V. 1. Valoración de la integridad y cantidad del ADN extraído. En la figura se observa la fotografía de una electroforesis en gel de agarosa al 1%, correspondiente a muestras de ADN de humano (Hu), rata (Ra), ratón (Rt), hamster (Ha), cuyo (Cu), conejo (Co), vampiro (Va), cerdo (Ce), res (Re), pollo (Po), carpa (Ca), lagartija (La), sapo (Sa), acocil (Ac) y estándar (E). El gel fué teñido con bromuro de etidio y posteriormente fotografiado con exposición a U.V. La cantidad de ADN por carril (2 µg) fué calculada por espectrofotometría (260 nm). La integridad de las bandas refleja la calidad del ADN, las variaciones en las concentraciones detectadas por el análisis densitométrico de la fotografía fueron ajustadas.

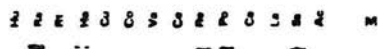


Fig. V. 2. Digestion de ADNs con enzima de restricción Eco-RI. La figura muestra la fotografía de una electroforesis de gel de agarosa al 1%, correspondiente a alícuotas (0.8 µg) de ADN de las 14 especies (50 µg) digerido con 2 µl de Eco-RI (20 unidades por µl) a 37°C. El último carril (M) corresponde a 0.5 µg de ADN de fago lambda digerido con Hind-III, cuyo patrón de restricción se conoce, el cual sirvió para valorar las digestiones.

Bajo condiciones estandarizadas, 2  $\mu$ l de enzima (20 unidades/ $\mu$ l), resultaron suficientes para digerir 50  $\mu$ g de ADN en 16 h. No obstante la cantidad de enzima y tiempos de digestión pueden variar dependiendo de la pureza del ADN.

### V. 3. Hibridaciones con la sonda de TRH de rata.

Alicuotas iguales de ADN de cada especie digerido con Eco-R1 fueron sometidas a electroforesis horizontal en geles de agarosa. Posteriormente el gel fué teñido con bromuro de etidio y expuesto a luz U.V. para ser fotografiado (fig. V. 3.). Este gel fué tratado para su transferencia tal como se describe en materiales y métodos. La membrana fué hibridada según Mc Ginnis (89), con la sonda de TRH de rata. La figura V. 4. muestra la autorradiografía correspondiente a esta hibridación.

Los resultados muestran que en condiciones de mediana estringencia y con la sobreexposición de la membrana (Fig. V. 5 A.), es posible detectar secuencias homologas al gen del precursor de TRH de rata en todos los mamíferos. Sin embargo, no se encontraron secuencias homólogas en pollo, sapo y acocil. Cabe hacer notar que algunas bandas de hibridación ( las encontradas en cuyo, conejo, carpa y lagartija) son muy tenues; este hecho refleja la baja homología que tienen con esta sonda. La misma membrana fué lavada para reflejar condiciones de hibridación más estringentes, con lo cual la especificidad del híbrido aumenta. En la figura V. 5 B. se puede observar la autorradiografía correspondiente en la cual se aprecia que secuencias altamente homólogas al gen del precursor de TRH de rata se encuentran presentes en humano, ratón, hamster, vampiro y cerdo\*. Para

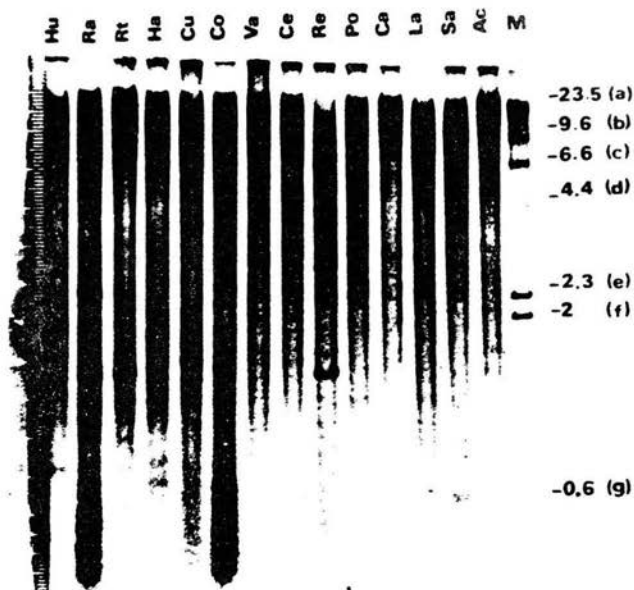


Fig. V. 3. Gel de agarosa para transferir a nitrocelulosa. En la figura se observa la electroforesis en gel de agarosa al 0.9% correspondiente a 15  $\mu$ g de ADN de las 14 especies digerido con Eco-RI y a ADN de fago lambda digerido con Hind-III (M). A la derecha aparecen los pesos moleculares de los fragmentos originados de la digestión del fago: a=23.5, b=9.6, c=6.6, d=4.4, e=2.3, f=2, g=0.6. El gel fue teñido con bromuro de etidio y fotografiado a U.V. Se observan digestiones completas valoradas con el marcador de peso molecular.

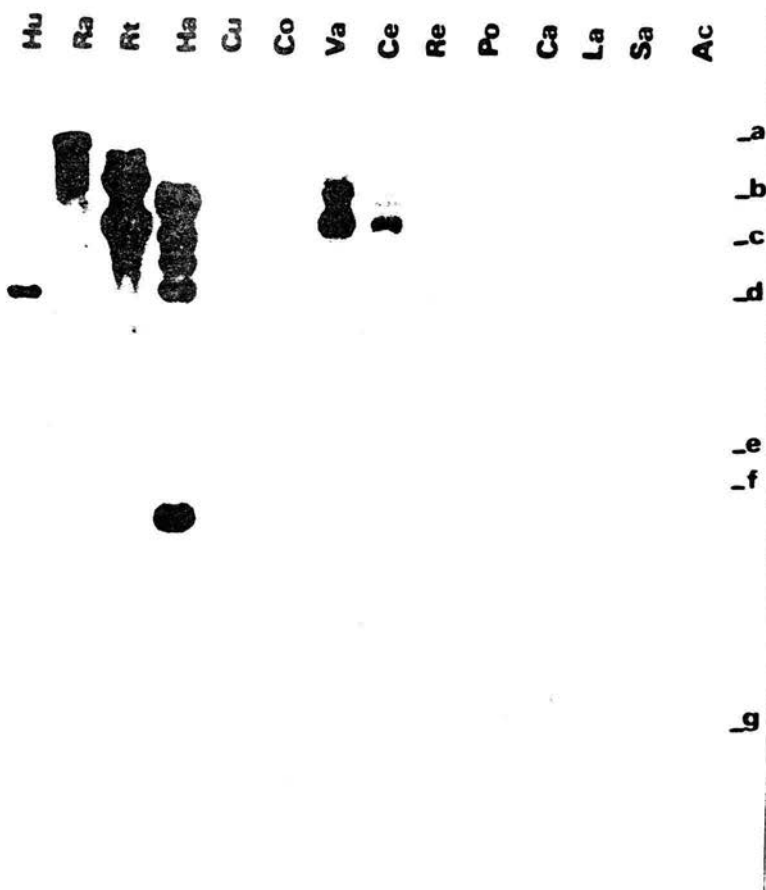


Fig. V. 4. Hibridación tipo Southern con la sonda de TRH de rata. Mediana estringencia. La figura muestra la hibridación de 15 µg de ADN de humano (Hu), rata (Ra), ratón (Rt), hamster (Ha), cuyo (Cu), conejo (Co), vampiro (Va), cerdo (Ce), res (Re), pollo (Po), carpa (Ca), lagartija (La), sapo (Sa) y acocil (Ac), con la sonda del gen del precursor de TRH de rata. Se hibridó a 37°C en un medio con 43% de formamida, 5X SSC, 0.1% BSA, 0.1% ficol, 0.1% polivinilpirrolidona, 50 mM NaPD<sub>4</sub>, pH. 7, 0.1% SDS y 10x10<sup>6</sup> cpm/ml de la sonda marcada por nick traslation con una actividad específica de 10x10<sup>6</sup> cpm/µg de ADN, durante 36 h. Los filtros se lavaron 2X SSC 5 min. a temperatura ambiente por 3 veces y 2X SSC 15 min a 50°C por 2 veces. La exposición (autorradiografía) se realizó en hyper films durante 24 h.

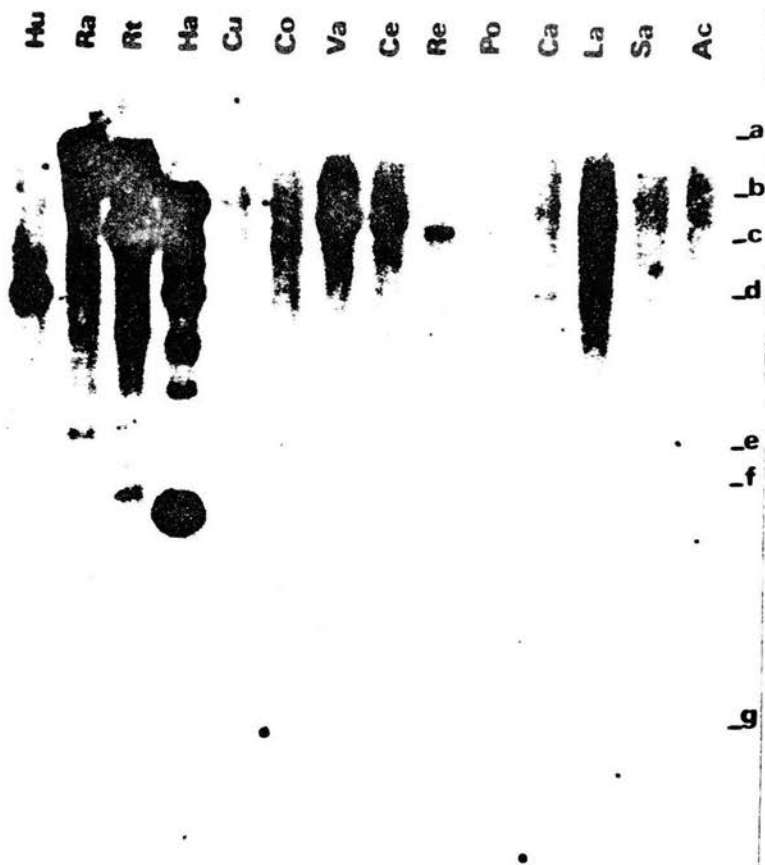


Fig. V. 5 A. Hibridación tipo Southern con la sonda de TRH de rata. Mediana estringencia. Sobreexposición. La figura muestra la hibridación de 15 µg de ADN de humano (Hu), rata (Ra), ratón (Rt), hamster (Ha), cuyo (Cu), conejo (Co), vampiro (Va), cerdo (Ce), res (Re), pollo (Po), carpa (Ca), lagartija (La), sapo (Sa) y acocil (Ac) con la sonda del gen del precursor de TRH de rata. Las condiciones de hibridación son las mismas que en la figura V. 4, al igual que los lavados. La membrana fué sometida a una sobreexposición durante 4 días.



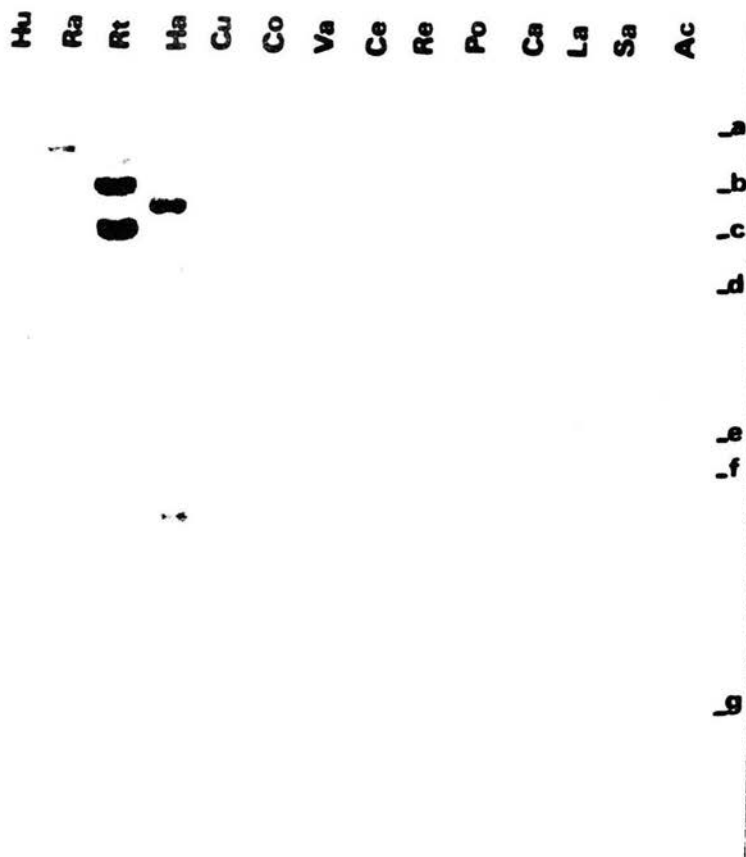


Fig. V. 5 B. Hibridación tipo Southern con la sonda de TRH de rata. Alta estringencia. El mismo filtro fué lavado con 0.1X SSC 15 min. a 50°C. La membrana se expuso en hyper films durante 2 dias. (\* es muy probable que algunas de las bandas tenues desaparezcan con la impresión).

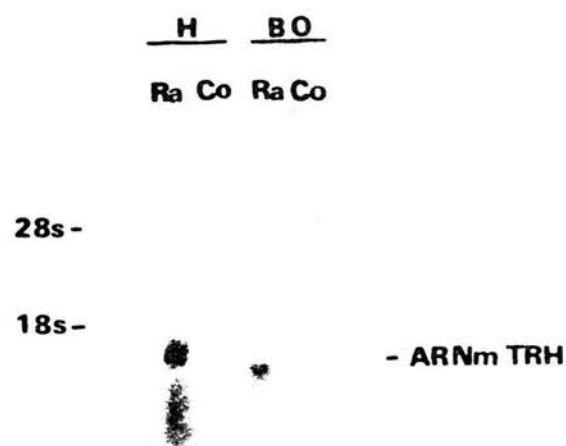


Fig. V. 6. Hibridación tipo Northern con la sonda de TRH de rata. Mediana Estringencia. La figura muestra la hibridación de 10 µg de ARN de hipotálamo (H) y bulbo olfatorio (BO) de rata (Ra) y conejo (Co) con la sonda (ADNc) de TRH de rata. Se hibridó bajo las mismas condiciones que se indican en la figura V.4. Los filtros se lavaron 2X SSC 5 min. a temperatura ambiente por 3 veces y 2X SSC 15 min. a 50°C por 2 veces. La exposición se realizó en kodak films por 24 h.

que el resultado fuese manejado semicuantitativamente, se les realizó un análisis densitométrico (soft laser scanning densitometer/ Bio Med slr-2d-1d) a las autorradiografías obteniendo: humano 60%, ratón 90%, hamster 80%, cuyo 15%, conejo 15%, vampiro 70%, cerdo 40%, res 30%, carpa 20% y lagartija 20% de homología con la sonda de TRH de rata.

La baja homología en dos de los mamíferos estudiados (cuyo y conejo) se corroboró mediante la búsqueda del ARN mensajero de TRH en una de estas especies. La figura V. 6. explica con mayor detalle la hibridación tipo Northern (90) realizada para buscar ARNm de TRH en conejo, utilizando como control positivo la hibridación del ARNm de TRH de rata. Se puede observar que bajo estas condiciones no es posible detectar mensajero de TRH en ninguna de las dos regiones estudiadas (regiones del SNC donde se sintetiza en mayor concentración el péptido) para conejo.

#### V. 4. Hibridaciones con la sonda de TRH de sapo.

El mismo tipo de hibridación bajo las mismas condiciones fué realizado con la sonda de TRH de Xenopus. La figura V. 7 A. muestra la autorradiografía correspondiente al Southern realizado a mediana estringencia. Secuencias homologas fueron encontradas en acocil y en pollo. Se realizó una densitometría observando: 60% de homología en acocil y 35% en pollo. La membrana hibridada a mediana estringencia fué lavada para detectar hibridos más específicos (alta estringencia). La figura V. 7 B. muestra la autorradiografía correspondiente en la cual no se aprecian secuencias homologas en ninguna especie bajo estas condiciones, excepto el control (Xenopus).

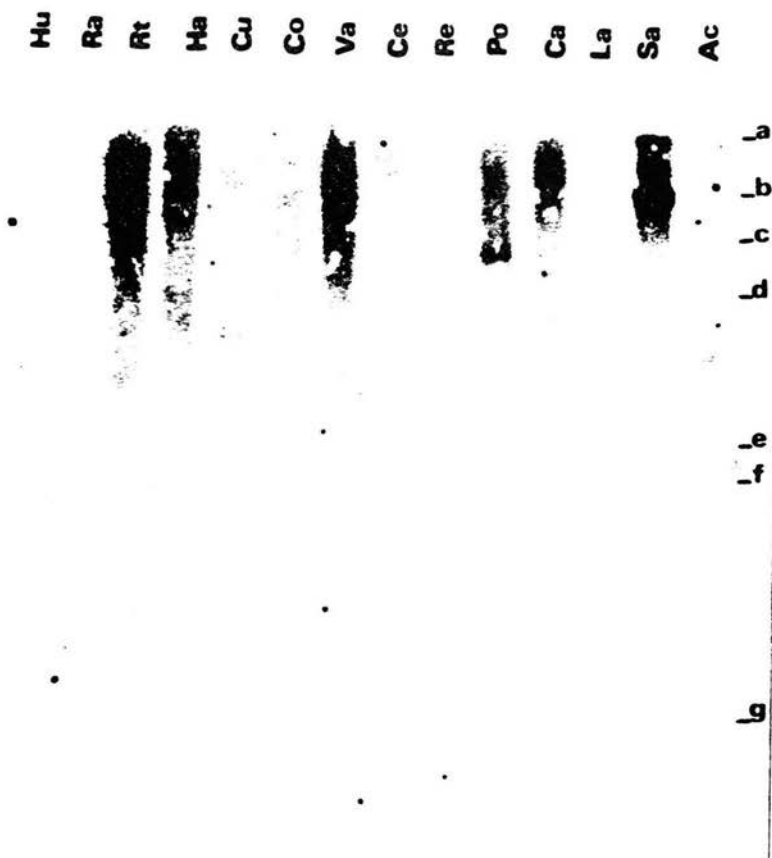


Fig. V. 7 A. Hibridación tipo Southern con la sonda de TRH de *Xenopus*. Mediana estrictencia. La figura muestra la hibridación de 15 µg de ADN de humano (Hu), rata (Ra), ratón (Rt), hamster (Ha), cuyo (Cu), conejo (Co), vampiro (Va), cerdo (Ce), res (Re), pollo (Po), carpa (Ca), lagartija (La), sapo (Sa) y acocil (Ac), con la sonda del gen del precursor de TRH de *Xenopus*. Las condiciones de hibridación son las mismas que en la figura V. 4. al igual que los lavados. La exposición (autorradiografía) se realizó en hyper films por 24 h.

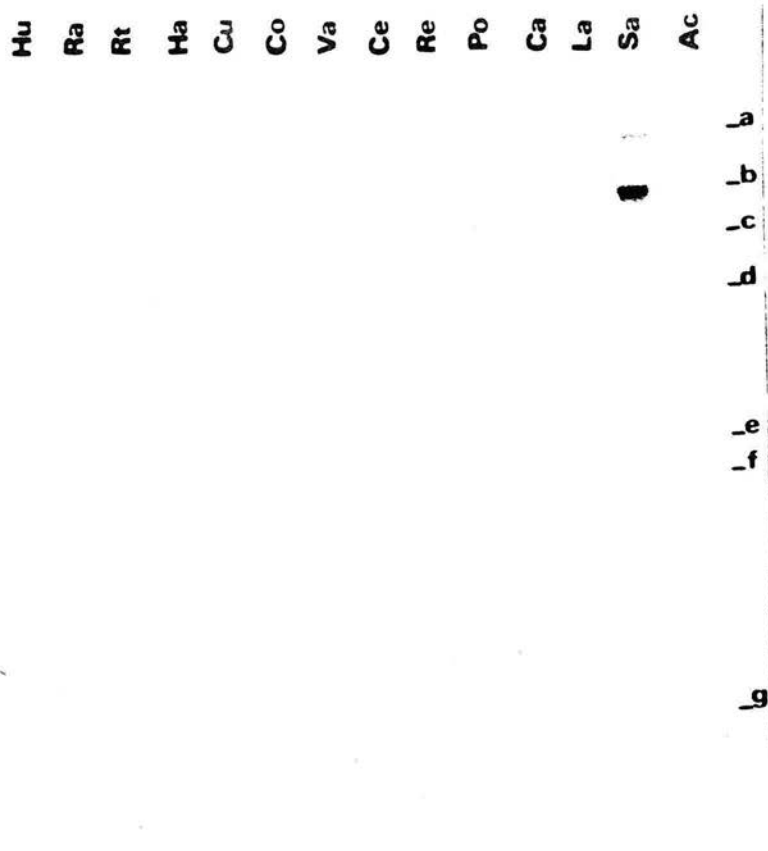


Fig. V. 7 B. Hibridación tipo Southern con la sonda de TRH de Menopus. Alta estringencia. El filtro anterior fué lavado con 0.1% SSC 15 min. a 50°C. La membrana se expuso en hyper films durante 2 días.

#### V. 5. Hibridaciones con la sonda de $\alpha$ -Actina de ratón.

La capacidad de hibridación del ADN de las 14 especies, fué demostrada rehibridando las membranas con la sonda de  $\alpha$ -Actina de ratón, que por ser una molécula con una amplia distribución filogenética debería de estar presente en todos estos organismos. La figura V. 9. muestra la autorradiografía correspondiente, en la cual se aprecian regiones homologas a la sonda de  $\alpha$ -Actina, en mayor o menor grado en todas las especies.

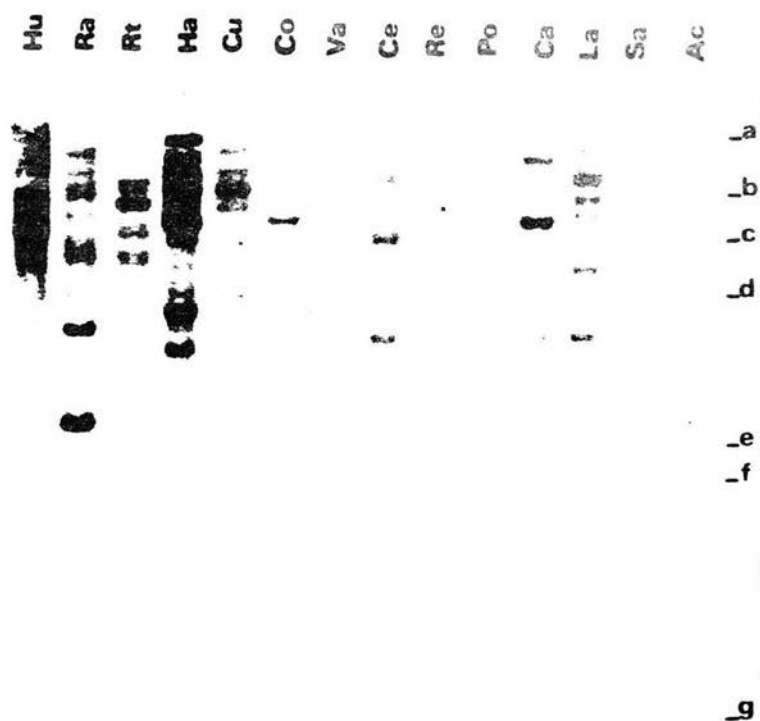


Fig. V. 8. Hibridación tipo Southern con la sonda de  $\alpha$ -Actina de ratón. Mediana estrictancia. La figura muestra la hibridación de 15  $\mu$ g de ADN de las 14 especies con la sonda del gen de  $\alpha$ -Actina de ratón. Las condiciones de hibridación, los lavados y el tiempo de exposición de la autorradiografía fué el mismo que en las figuras V.4 y V.8.

## DISCUSION

La relevancia de las secuencias nucleotídicas y aminoacídicas de una proteína para la reestructuración de la historia evolutiva de las especies, es en la actualidad un hecho incuestionable (33, 35). El análisis de secuencia ha sido utilizado en distintos estudios en donde se ha podido dislumbrar la relación evolutiva existente entre especies de distintas familias y clases (34, 91) y entre especies de un mismo género (49). Actualmente, la homología detectada por estudios de hibridación constituyen un nuevo parámetro para el análisis de las relaciones filogenéticas (38, 91); este método resulta mucho más rápido que el de secuenciación, y la información obtenida por ambos es muy similar. Sin embargo para estudios mas detallados sobre la secuencia (aminoacídica ó nucleotídica) de una proteína, la secuenciación resulta inevitable.

Las sondas utilizadas en este estudio provienen de ADN complementarios al ARNm (el cual es traducido a proteína); por lo tanto las regiones que resultaron homólogas a las sondas reflejan directamente homología a nivel de ácidos nucléicos. Existen evidencias (21, 47) que indican que las diferencias detectadas a nivel nucleotídico corresponden casi exactamente con aquellas detectadas a nivel de secuencia aminoacídica. Este hecho es de suma importancia, pues al hablar de homología a nivel nucleotídico, nuestra visión tendrá que ampliarse y comprender su trascendencia a nivel protéico.

Nuestros resultados de las hibridaciones hechas con la sonda de TRH de rata muestran una alta conservación del gen de TRH en



mamíferos, lo cual nos lleva a sugerir la posibilidad de que exista un gene ancestral para ellos, sin embargo, creemos que en determinados linajes evolutivos (cuyo y conejo) la presión selectiva se encuentra más relajada, propiciando un mayor número de mutaciones, y que por lo tanto la homología detectada por nosotros fuera escasa. En las hibridaciones hechas con la sonda de TRH de sapo encontramos que pollo y acocil presentan regiones homologas a baja estringencia. Resultó extraño que ni lagartija ni pez mostraran homología con esta sonda, pues estas especies se encuentran filogenéticamente más cercanas al sapo. Por el contrario, pez y lagartija resultaron homologos a la sonda de rata. Es posible que en este caso y en el de pollo (que presenta secuencias homólogas a Xenopus), se hayan conservado algunas secuencias en ciertos linajes, aunque también existe la posibilidad de que haya ocurrido convergencia evolutiva.

En los Southernns realizados a mediana y alta estringencia con la sonda de TRH de rata pudieron observarse varias bandas de homología en los carriles correspondientes a ADNs de algunas especies. Este resultado puede explicarse en razón de los sitios de restricción para Eco-RI, presentes en la región que resultó homologa a nuestra sonda; es decir, el número de bandas detectadas correspondería al número de sitios de restricción presentes en la secuencia homologa a la sonda. Sin embargo, si todas estas bandas se generaran a partir de una misma secuencia cortada en varios fragmentos, al aumentar la estringencia disminuiría la intensidad de las bandas simultáneamente. Esto no ocurre así en hamster y ratón, pues al aumentar la estringencia algunas bandas desaparecen; esto sugiere que las bandas de homología provienen de distintas regiones que son homologas a la sonda en

diferente proporción. Existe la posibilidad de que se trate de secuencias duplicadas (varios genes) que hayan divergido, propiciando así la diferencia en la homología. No obstante nuestros resultados no son suficientes para demostrar una duplicación.

Datos nuestros y de Lechan y cols. (4) indican que los precursores de TRH de rata y de Xenopus son poco homólogos (solo en las regiones que originan TRH), al grado de que no pueden ser detectados en hibridaciones cruzadas con el ADNc de TRH de cada uno. Esta observación y nuestros resultados de variabilidad en la homología presentada por todas las especies estudiadas, nos hace creer que el precursor de TRH al igual que los precursores de otros péptidos (21, 44, 46, 48, 49) pudiera presentar mayor presión selectiva en las regiones que originan al péptido ( en este caso TRH ), mientras que las demás regiones hipervarian dependiendo de la presión de selección, la cual es directamente proporcional a su funcionalidad. Por lo tanto los péptidos intermedios originados del precursor podrían no ser funcionales, pues de ser así, estarían conservados en la filogenia. Esto resulta contrapuesto a lo sugerido por el grupo de Jackson (7, 10, 82) quienes proponen la funcionalidad de los péptidos intermedios en virtud de su presencia en el SNC de rata en lugares en donde no fué detectado previamente TRH. No obstante no podemos descartar la posibilidad de que estos pudieran desarrollar ó acoplarse a una función en alguna especie particular. Por otro lado, es factible que estas secuencias intermedias sirvan como señales para el procesamiento proteolítico, lo cual es importante para poder generar el péptido. Otra función en la cual pudieran estar vinculadas estas secuencias es en la amortiguación de las mutaciones que se llevan a cabo en el

precursor, pues al no haber presión selectiva en ellos, los efectos por deriva génica son retenidos en estas regiones. Se ha propuesto que los intrones (antes del splicing) juegan un papel similar a este (26, 42).

En la mayoría de los estudios filogenéticos realizados a la fecha, se utiliza el análisis y la comparación de las secuencias aminoacídicas y nucleotídicas de péptidos y proteínas con el afán de establecer las relaciones evolutivas las especies que los contienen. A nosotros, la filogenia de TRH nos ayudó, por un lado a definir si las sondas que tenemos pueden ser utilizadas para estudios en donde se mida la biosíntesis de TRH (a través de los niveles de ARNm) en otras especies además de la rata; esto parece ser factible para ratón y hamster y quizá para vampiro y humano. Cabe hacer notar que cuyo y conejo (modelos biológicos utilizados para estudios sobre TRH) no son recomendables para medir niveles de ARNm con estas sondas, pues la homología presentada por estos fué muy baja. Por otro lado delimitar que especies contienen un precursor parecido, podría hablar de la importancia que el péptido (TRH) o los péptidos contenidos en en precursor tienen para cada especie.

Aunque para la TRH se han postulado varias funciones en distintas especies de mamíferos, aves, reptiles y anfibios, la potencialidad funcional de la molécula quizá sea mayor a la descrita. Descubrir todas las posibles funciones es con seguridad una tarea muy difícil, puesto que se desconoce en que tipo de eventos además de los ya conocidos pudiera estar el péptido o su precursor vinculados.

Basándonos en los resultados obtenidos y en filogenias realizadas con otras moléculas, proponemos una distribución del gen del precursor

de TRH de rata y Xenopus en las especies estudiadas (Fig. VI. 1). Es factible que exista un gen ancestral común para rata y Xenopus en virtud de que ambos precursores contienen repetida la molécula (TRH) el mismo número de veces. Sin embargo es difícil decir en que momento divergieron uno del otro para constituir líneas evolutivas diferentes. Posiblemente existan además de estas, otras líneas evolutivas para el gen del precursor de la TRH (e.g. la del pez y la del pollo), puesto que las homologías detectadas con nuestras sondas fueron muy bajas. Quizá el dendrograma podría completarse realizando hibridaciones con el gen de otros péptidos. Lo que si parece ser claro, es la existencia de un gen ancestral común para los mamíferos, conservado quizás por la importancia que la molécula (TRH) tiene para estos organismos.

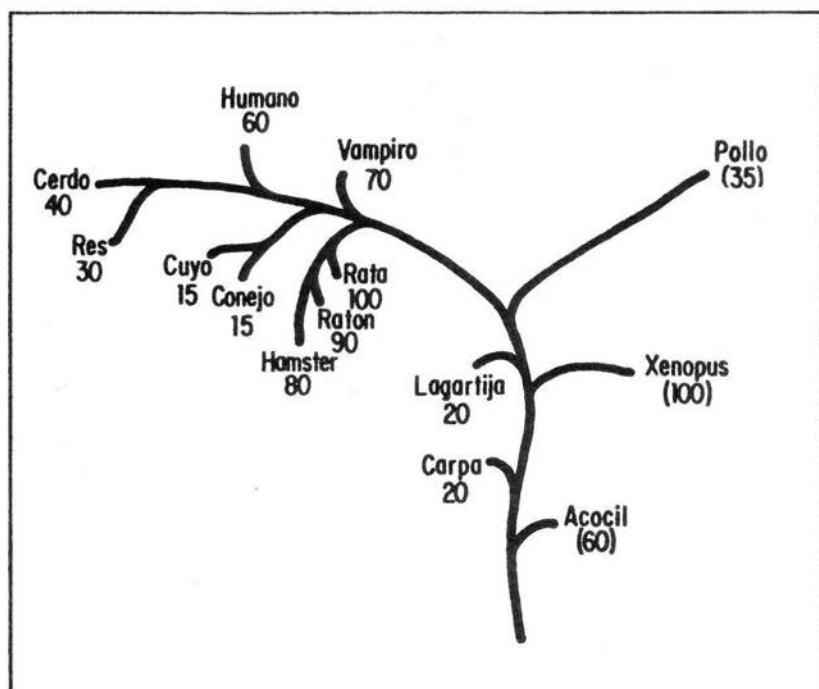


Fig. VI. 1. Distribución filogenética del precursor de la Hormona Liberadora de Tirotropina. El dendrograma fué realizado basándose en la homología detectada por densitometría (expresada en porcentaje) de los ADNs de todas las especies con las sondas de rata y Xenopus (cifras encerradas en paréntesis)

## APENDICE 1

### El ADN recombinante. Principios y aplicaciones.

Las técnicas del ADN recombinante constituyen actualmente una herramienta fundamental para el estudio de la biología molecular. Estas permiten el aislamiento, purificación y determinación de la estructura precisa (secuencia nucleotídica) de genes y ARN mensajeros. Distintos genes de hormonas polipeptídicas han sido clonados en bacterias y sus secuencias nucleotídicas determinadas. Esta información ha traído grandes avances en el entendimiento de los mecanismos de evolución de genes y de su regulación metabólica.

Dos elementos han sido esenciales para la construcción y propagación de la molécula de ADN recombinante. Por un lado el uso de moléculas de ADN autorreplicable (e.g. plásmidos y bacteriófragos) en bacterias y fácilmente purificables, las cuales sirven de vehículo (vector) del ADN exógeno; y por otro lado el empleo de las endonucleasas de restricción. Estas enzimas cortan el ADN en secuencias específicas de nucleótidos, los cuales son generalmente de 4 a 6 pares de bases. Cada enzima es absolutamente específica para la secuencia de nucleótidos que reconoce, por lo que los fragmentos obtenidos son siempre reproducibles.

El ADN recombinante se construye cortando el vector y el ADN que se desea amplificar con la misma enzima de restricción y posteriormente estos son unidos por medio de una ADN ligasa. Esta molécula de ADN recombinante (quimera) así construida puede amplificarse mediante su introducción en bacterias y de esta manera obtener cantidades ilimitadas del segmento de ADN deseado. Mediante el

uso de esta estrategia es posible obtener un banco genómico (figura 1), es decir, una colección de moléculas recombinantes, las cuales representan al genoma completo. Así mismo es posible aislar secuencias representativas del ARN mensajero a partir de un banco de ADN complementario (ADNc); el ADNc es una copia de ADN lograda a partir de transcripción reversa del ARNm (figura 2).

Un gen ó un ADNc específico pueden ser seleccionados usando oligonucleótidos (secuencias de ácidos nucleicos) correspondientes a la secuencia aminoacídica de la proteína ó péptido de interés. Una vez identificada la clona que contenga la secuencia deseada, esta puede ser usada en distintos estudios que incluyen la estructura del gen, regulación de su expresión, identificación de sitios de regulación, etc.

Recientemente se han realizado algunos estudios en los que utilizan como sonda las secuencias nucleotídicas correspondientes a péptidos ó proteínas para el análisis de las relaciones filogenéticas existentes entre las especies que los contienen ( 32, 33, 35 ). La base experimental se apoya en el principio de complementariedad de los ácidos nucleicos (Adenina-Timina ó Uracilo y Guanina-Citosina); los enlaces de hidrógeno que se forman entre los nucleótidos son altamente específicos por lo que las bases solo pueden aparearse con aquellas que sean complementarias. Así, una secuencia nucleotídica determinada se unirá en mayor ó menor grado con aquella que presente cierta similitud; el grado de hibridación reflejará la homología de las secuencias (figura 3). El híbrido estará formado por un lado por la sonda y por el otro lado por el ADN de la especie en la cual se rastreó la secuencia. Las condiciones bajo las cuales se realiza la

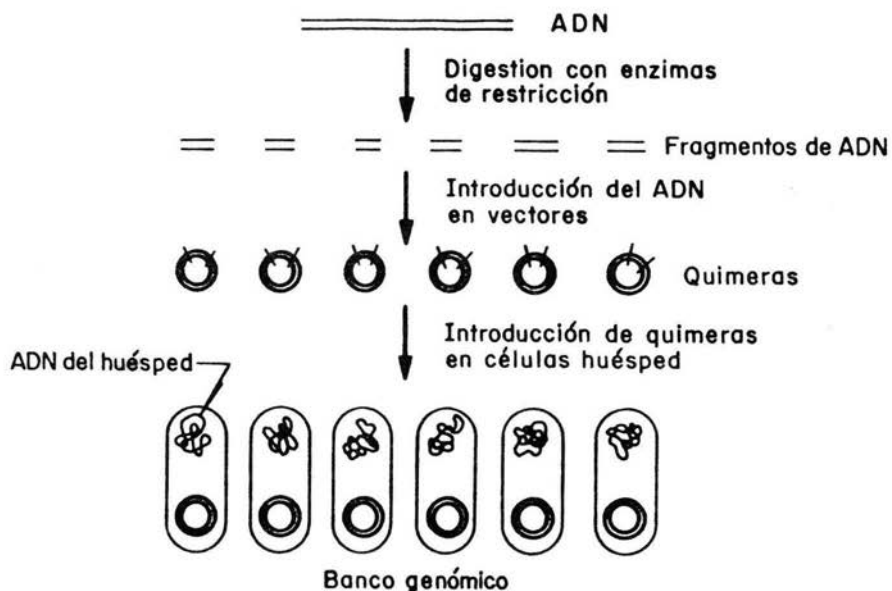


Fig. 1. Clonación molecular de ADN: En el diagrama se aprecian los pasos a seguir para clonar ADN exógeno en vectores de clonación (en este caso plásmidos), formando así, quimeras de ADN. La figura corresponde a la clonación de ADN cromosomal para la fabricación de un banco genómico.



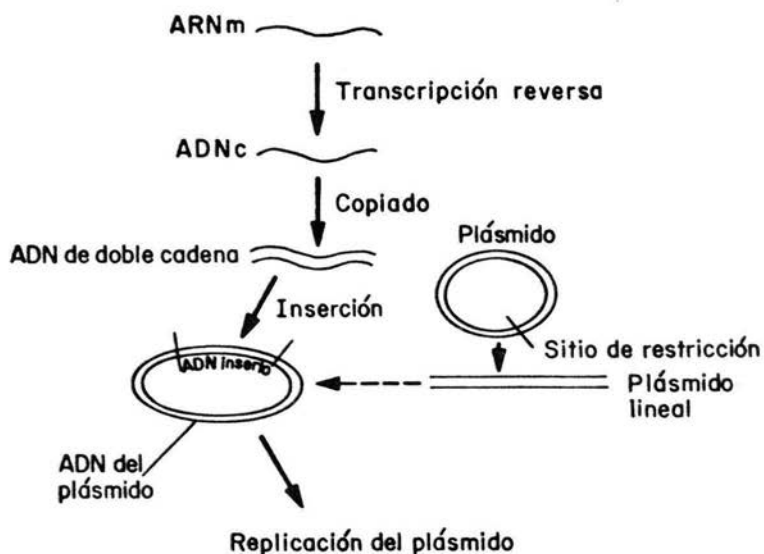


Fig. 2. Síntesis y clonación de ADNc. El ARNm es copiado a ADNc con la enzima reversa transcriptasa. Posteriormente la cadena sencilla es copiada por la ADN polimerasa I para formar la doble cadena que será insertada dentro del vector, el cual ha sido previamente digerido por una endonucleasa de restricción. El plásmido (vehículo de clonación) será replicado en una bacteria para poder amplificar ilimitadamente la secuencia de interés.

hibridación pueden manejarse de manera tal que reflejen condiciones de alta especificidad del híbrido (alta estringencia) ó condiciones mas relajadas para la formación de éste (baja estringencia). Esto puede lograrse gracias al manejo de distintos factores tales como

concentración de ADN, concentración de la sonda, tiempo de hibridación y concentración de sales y de formamida\*.

La detección de las regiones homólogas se puede observar mediante el marcaje radiactivo de la sonda, esto permite que el o los híbridos sean visibles en una autorradiografía. Otro tipo de estudios basados en este principio es la medición de la síntesis de un péptido mediante la detección del ARNm que lo codifica.

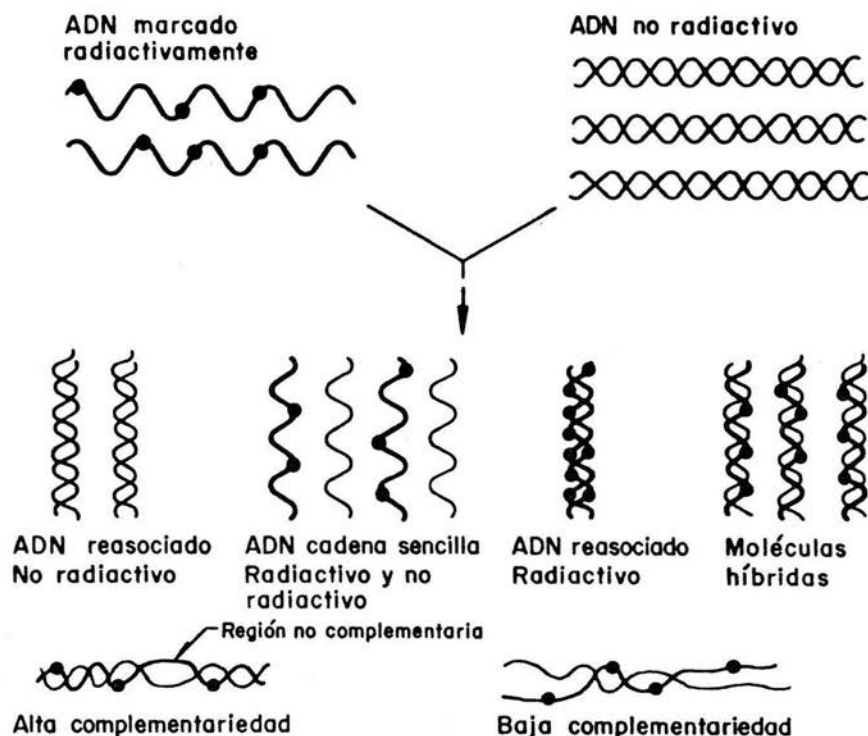


Fig. 3. Hibridación de ácidos nucleicos. En la figura se observa la hibridación de ADN con sondas radiactivas (ADN marcado). Se puede apreciar los tipos de híbridos formados y la homología de sus secuencias.

\* La formamida es un compuesto que baja la temperatura media ( $T_m$ ) del ADN duplex,  $0.72^\circ\text{C}$  por cada por ciento de formamida en la solución. Al bajar la  $T_m$  del ADN, el híbrido se hace más específico, esto es, entre más formamida se tenga, las hibridaciones que se logren serán mucho más específicas (alta estringencia).

## BIBLIOGRAFIA

1. Hames B.D. and Higgins S.J. (1985) *Nucleic Acid Hybridisation. A practical approach.* IRL press. U.K.
2. Miller W.L. et al. (1983) *Brain Peptides.* Wiley-interscience. USA
3. Richter K. et al. (1984) Biosynthesis of Thyrotropin Releasing Hormone in the skin of *Xenopus laevis*: partial sequence of the precursor deduced from cloned cDNA. *EMBO Journal*, 3:3, 617-621.
4. Lechan R. et al (1986) Thyrotropin Releasing Hormone precursor: characterization in rat brain. *Science*, 231: 159-161.
5. Koller K.J. et al (1987) Thyroid hormones regulate levels of Thyrotropin Releasing Hormone mRNA in the paraventricular nucleus. *PNAS USA*, 84: 7329-7333.
6. Sevarino K.A. et al (1988) Biosynthesis of Thyrotropin Releasing Hormone by a rat medullary thyroid carcinoma cell line. *Journal of Biochem.*, 263: 2, 620-623.
7. Wu P. and Jackson I.M.D. (1988) Post-translational processing of Thyrotropin Releasing Hormone precursor in rat brain: identification of 3 novel peptides derived from pro-TRH. *Brain Res.*, 456: 22-28.
8. Jackson I.M.D. and Bolaffi J.L. (1983) "Phylogenetic distribution of TRH: significance and function", in: *Thyrotropin Releasing Hormone.* Raven press. N.Y. 191-201.
9. Segerson T.P. et al (1987) Localization of Thyrotropin Releasing Hormone prohormone messenger Ribonucleic Acid in rat brain by in situ hybridization. *Endocrinol.* 121: 1, 98-107.
10. Wu P. et al (1987) Identification and characterization of Thyrotropin Releasing Hormone precursor peptides in rat brain. *Endocrinol.* 121: 1, 108-115.
11. Martin D.V. et al (1982) *Bioquímica de Harper.* Ed Manual Moderno. Mex. 14-30.
12. Stryer L. (1981) *Biochemistry.* W.H. Freeman and Co. N.Y.
13. Lehninger A.L. (1983) *Bioquímica. Las bases moleculares de la estructura y función celular.* Ed Omega. Barcelona. 97-124.
14. Bohinski R.L. (1978) *Bioquímica.* Ed Fondo Educativo Interamericano. Mex. 96-110.
15. Darnell J. et al (1986) *Molecular Cell Biology.* Scientific American Books. USA. 51-103.

16. Barker J.L. et al (1980) The Role of Peptides in Neuronal Function. Marcel Dekker Inc. USA.
17. Aréchiga H. et al (1983) Aminoácidos y Péptidos en la Integración de Funciones Nerviosas. Publicaciones UNAM. Méx.
18. Millar R.P. et al (1980) Neuropeptides, Biochemical and Physiological studies. Churchill Livingstone. N.Y.
19. Niall H.D. (1982) The Evolution of Peptide Hormones. Ann. Rev. Physiol. 46: 615-624.
20. Koch G. et al (1983) Biochemical and Clinical Aspects of Neuropeptides. Academic press Inc. USA.
21. Fischer J.A. and Born W. (1987) Calcitonin Gene products: evolution, expression and biological targets. Bone and Mineral, 2: 347-359.
22. Kilpatrick D.L. et al (1981) A highly potent 3200 dalton adrenal opioid peptide that contains both a Met and Leu Enkephalin sequence. PNAS USA, 78: 5, 3265-3268.
23. Noda M. et al (1982) Isolation and structural organization of the human preproenkephalin gene. Nature, 297: 431-434.
24. Seizinger B.R. et al (1985) Isolation and structure of a novel C-terminally amidated opioid peptide, Amidorphin, from bovine adrenal medulla. Nature 313: 57-59.
25. Alberts B. et al (1983) Molecular Biology of the Cell. Garland Publishing Inc. N.Y.
26. Lewin B. (1987) Genes III. John Wiley and Sons Inc. Singapore.
27. Roberts J.L. et al (1983) Analysis of POMC gene expression by transcription In: Molecular Neurobiology XLVIII Cold Spring Harbor Simposia on Quantitative Biology. Cold Spring Harbor Laboratory. USA.
28. Smith A.I. and Fand Funder J.W. (1988) Proopiomelanocortin processing in the pituitary, central system and peripheral tissues. Endocrine reviews 9: 1, 159-179.
29. Martens G.J.M. and Herbert E. (1984) Polymorphism and absence of Leu-enkephalin sequences in proenkephalin genes in *Xenopus laevis*. Nature 310: 251-254.
30. Turner A.J. (1984) Neuropeptide processing enzymes. TINS. July, 258-260.
31. Covarrubias L. et al (1988) Neuronal TRH synthesis: developmental and circadian TRH mRNA levels. Biochem. Biofis. Res. Com. 151: 1, 615-622.

32. Savage J.M. (1985) Evolución. Ed CECSA. Mex.
33. Ayala F.J. (1980) Evolución Molecular. Omega. Barcelona.
34. Dickerson R.E. (1971) The structure of the Cytochrome C and the rates of molecular evolution. *J. Mol. Evol.*, 1: 26-45.
35. Dobzhansky Th.F.J. et al (1977) Evolution W.H. Freeman. San Francisco.
36. Soreg. H. et al (1984) Molecular Biology approach to the Neurosciences. John Wiley and Sons. U.K.
37. Perbal B. et al (1984) A practical guide to Molecular Cloning. John Wiley and Sons. USA.
38. Klenk H.P. et al (1986) Hybridization homology: A new parameter for the analysis of phylogenetic relations, demonstrated with the Urkingdom of the archaebacteria. *J.Mol.Evol.*, 24: 167-173.
39. Martin R.L. et al (1986) Visual pigment homologies revealed by DNA hybridization. *Science*, 232: 1266-1269.
40. Kimura M. (1987) Molecular Evolutionary Clock and the Neutral Theory. *J.Mol.Evol.*, 26: 24-33.
41. Li W.H. et al (1987) An evaluation of the Molecular Clock Hypothesis using Mammalian DNA sequences. *J.Mol.Evol.*, 25: 330-342.
42. Gilbert W. et al (1986) On the antiquity of introns. *Cell*, 46: 151-154.
43. Leff S.E. et al (1987) Splice commitment dictates Neuron-specific alternative RNA processing in Calcitonin/CGRP gene expression. *Cell*, 48: 517-524.
44. Richter U.K. (1987) Zur Evolution peptiderger Information subertragung- Tatsachen und Gedanken. *Biol. Rundsch.*, 25: 93-108.
45. Su Ch.J. et al (1988) Structure and evolution of Somatostatin genes. *Mol.Endocrinol.*, 2: 3, 209-216.
46. Yamamoto et al. (1986) Mosaic evolution of prepropancreatic polypeptide. *J.Biol.Chem.*, 261: 14, 6156-6159.
47. Wolf D.L. et al (1987) Nucleic acid and aminoacid sequences of dog  $\beta$ -LH: comparison to rat, cow and human  $\beta$ -LH. *Nucleic Acid Res.*, 15: 24, 10602.
48. Alonso J. et al (1986) Comparision of three Actin-coding sequences in the mouse; evolutionary relationships between the actin genes of warm-blooded vertebrates. *J.Mol.Evol.*, 23: 11-22.

49. Nambu J.R. and Scheller R.H. (1986) Egg-Laying Hormone Genes of Aplysia: Evolution of the ELH gene family. *J.Neuroscience.*, 6: 7, 2026-2036.
50. Brownstein M.J. et al (1974) Thyrotropin releasing Hormone in specific nuclei of rat brain. *Science*, 185: 267-269.
51. Hokfelt F. et al (1979) Localization of Hypophysiotropic peptides and other biologically active peptides within the brain. *Ann.Rev.Physiol.*, 41: 587-602.
52. Schally A.V. et al (1969) Isolation and properties of TRH. *J.Mol.Chem.*, 244: 4077-
53. Burgus R. et al. (1970) Characterization of ovine hypothalamic hypophysiotropic TSH releasing Factor. *Nature*, 226: 321-325.
54. Aizawa T. and Greer M.A. (1981) Delineation of the hypothalamic area controlling Thyrotropin secretion (TSH): stimulation by a hypothalamic peptide (TRF). *Endocrinol.*, 73: 564-572.
55. Plotsky P.M. and Neill J.D. (1982) Interactions of Dopamine and Thyrotropin Releasing Hormone in the regulation of Prolactin release in lactating rats. *Endocrinol.*, 111: 1, 168-173.
56. Martínez de la Escalera G. and Weiner R.J. (1988) Mechanism(s) by which the transient removal of Dopamine regulation potentiates the Prolactin-releasing action of Thyrotropin Releasing Hormone. *Neuroendocrinol.*, 47: 186-193.
57. Laverrier J.N. et al (1988) Preferential role of calcium in the regulation of prolactin gene transcription by Thyrotropin Releasing Hormone in GH<sub>3</sub> pituitary cells. *Endocrinol.*, 121: 1,
58. Lippman S.S. et al (1986) Discordant effects of Thyrotropin (TSH)-Releasing Hormone on pre and posttranslational regulation of TSH biosynthesis in rat pituitary. *Endocrinol.*, 119: 343.
59. Taylor T. (1988) Hypothalamic Hypothyroidism caused by lesions in rat paraventricular nuclei alters the carbohydrate structure of secreted Thyrotropin. *Endocrinol.*, 122: 283-290.
60. Carr F.E. et al (1985) Regulation of TSH subunit mRNAs by Thyroid Hormones. *Endocrinol.*, 117: 1272-1278.
61. Oron Y. et al (1987) Decreased Thyrotropin Releasing Hormone Receptor mRNA activity precedes homologous downregulation: Assay in oocytes. *Science*, 238: 1406-1408.
62. Jackson I.M.D. and Lechan R.M. (1987) Thyrotropin Releasing Hormone in: *Brain Peptides Update* (Martin J.B. et al) Vol.1 John Wiley and Sons. 107-118.

63. Méndez M. et al (1987) Regional distribution of in vitro release of Thyrotropin Releasing Hormone in rat brain. *Peptides*, 8: 291-298.
64. Iriuchisima T. and Wilber J.F. (1987) Thyrotropin Releasing Hormone and Histidyl-Proline DKP: Stimulation of secretion from hypothalamic fragments in vitro by depolarizing Agents. *Endocrinol.*, 120: 3, 915-918.
65. Garat B. et al (1985) Presence of a membrane bound pyroglutamyl amino peptidase degrading Thyrotropin Releasing Hormone in rat brain. *Neuropeptides*, 6: 461-469.
66. Taylor W.L. et al (1978) Characterization of a pyroglutamate aminopeptidase from rat serum that degrades Thyrotropin Releasing Hormone. *J.Biol.Chem.*, 253: 6934-6940.
67. Ponce G. et al (1988) Tissue-specific regulation of Pyroglutamate Aminopeptidase II activity by Thyroid Hormones. *Neuroendocrinol.*, 48: 211-213.
68. Horst W.D. et al (1979) Influence of Thyrotropin Releasing Hormone on the synaptic availability of Catecholamines in brain. In: *Central Nervous System Effects of Hypothalamic Hormones and other peptides* (Colluct R. et al) Raven Press N.Y. 141-143.
69. Kerwin R.W. and Pycocock C.J. (1979) Thyrotropin Releasing Hormone stimulates release of H-Dopamine from slices of rat nucleus accumbens in vitro. *J. Pharmacol.*, 67: 323-325.
70. Brewster D. et al (1983) Species variations in TRH inactivation: advantages of stable analogues. In: *Thyrotropin Releasing Hormone*. Raven Press. N.Y. 109-118.
71. Cockle S.M. and Smyth D.G. (1988) Processing of Thyrotropin Releasing Hormone-related peptides in rabbit hypothalamus and prostate. *Biochem.Soc.Trans.*, 16: 784-785.
72. Martino et al (1980) Ontogenetic patterns of TRH-like material in rat hypothalamus, pancreas and retina: defective effect of light deprivation. *PNAS.USA*, 77: 7, 4345-4348.
73. Dutour A. et al (1987) Ontogenesis of TRH-mRNA in the rat pancreas. *Biochem.Biofis.Res.Com.*, 146: 1, 354-360.
74. Jackson I.M.D. (1983) TRH: distribution in mammalian species and its functional significance. In *Thyrotropin Releasing Hormone*. Raven Press. N.Y. 3-16.
75. Harvey et al (1978) *Neuroendocrinology* 26: 249-260.
76. Kollros J.J. (1961) Mechanisms of amphibian metamorphosis: hormones. *Am.Zool.*, 1: 107-114.

77. Bray T. and Sicard R.E. (1982) Correlation among the changes in the levels of Thyroid Hormones, Thyrotropin and TRH during the development of *Xenopus laevis*. *Expl.Cell.Biol.*, 50: 101-107.
78. Busby W.H. et al (1987) An enzyme(s) that converts Glutamyl-peptides into pyroglutamyl peptides. *J.Biol.Chem.*, 262: 8532-8535.
79. Mains R.E. et al (1985) Hormonal drug and dietary factors affectin peptidyl glycine alfa amidating momooxygenase activity in various tissues of the adult male rat. *Endocrinol.*, 116: 2505-
80. Vargas M.A. (1988) Relevancia fisiológica de una PGA membranaral que degrada al TRH en el SNC de la rata. Tesis de Maestría en Investigación Biomédica Básica. UACPyP del CCH UNAM.
81. Cockle S.M. and Smyth D.G. (1986) Processing of the TRH precursor in *Xenopus* skin and bovine hypothalamus: Evidence for the existence of extended forms of TRH. *Reg. Peptides*, 14: 217-227.
82. Lee S.L. et al (1988) Structure of the gene encoding rat Thyrotropin releasing Hormone. *J.Biol.Chem.*, 263: 32, 16604-16609.
83. Lechan R.M. et al (1987) Immunocytochemical distribution in rat brain of putative peptides derived from TRH prohormone. *Endocrinol.*, 121: 5, 1879-1891.
84. Ausbel F.M. et al (1987) Current protocols in Molecular Biology. Greene Publishing Associates and Wiley-Interscience. USA.
85. Bell G.I. et al (1981) Polymorphic DNA region adjacent to the 5' end of the human insuline gene. *PNAS. USA.*, 78: 5759-5763.
86. Maniatis T. et al (1982) Molecular Cloning. Cold Spring Harbor Laboratory.
87. Howley P.M. et al (1979) A rapid method for detecting and mapping homology between heterologous DNAs. *J.Biol.Chem.* 254: 11, 4876-4883.
88. Hames B.D. and Higgins S.J. (1985) Nucleic acid hybridisation. IRL press. U.K.
89. Mc Ginnis W. et al (1984) A homologous protein-coding sequence in *Drosophila* homeotic genes and its conservation in other metazoans. *Cell*, 37: 403-408.
90. Uribe V.R.M. (1988) Regulación de la expresión del gene de TRH en el hipotálamo de rata. Tesis de Maestría en Investigación Biomédica Básica. UACPyP del CCH UNAM.
91. Field G.K. et al (1988) Molecular Phylogeny of the animal kingdom. *Science*, 239: 748-753.