



Universidad Austral de Chile

Facultad de Ciencias

Profesor Patrocinante
Dr. Millón Gallardo N.
Instituto de Ecología y Evolución
Facultad de Ciencias

CARACTERIZACIÓN DEL GEN *Pegl* EN *T. barrerae* Y COMPARACIÓN DE SU SECUENCIA CON ESPECIES CERCANAS

Tesis de Grado presentada como parte
de los requisitos para optar al grado de
Licenciado en Bioquímica y Título
Profesional de ***Bioquímico***

ÍVAN ORLANDO CONEJEROS ESPINOZA

VALDIVIA - CHILE

2006

*Un aspecto curioso de la teoría de la evolución es
que todo el mundo piensa que la comprende.*
Richard Dawkins.

AGRADECIMIENTOS

Quisiera expresar mis más sinceros agradecimientos a mi profesor patrocinante y un gran formador, Dr., Milton Gallardo N., por darme la oportunidad de realizar esta tesis de grado en el Laboratorio de Evolución Molecular, brindándome sin restricciones su tiempo, dedicación y apoyo. Además de haber tenido la oportunidad de conocerlo como persona, lo que sin duda enriqueció mi formación durante mi estadía en su grupo de trabajo.

A mi profesor co-patrocinante, Dra. Gudrun Kausel, por brindarme todo el apoyo necesario cuando el trabajo experimental suponía más problemas que los presupuestados y por todos los momentos en los cuales tuve la suerte de compartir con ella.

A mis compañeros de Laboratorio, a Claudio, con quien tuve la suerte de afianzar una excelente amistad y por su incansable apoyo, crítica y traspaso de conocimiento. Mis agradecimientos también para Annette y Caroline por todos los momentos compartidos. A la “legión extranjera”: Nacho, Gabi, Agustina, Cecilia y Elkin, por haberme dado la posibilidad de conocerlos y compartir experiencias más allá de lo puramente académico.

A la Sra. Nelida y Freddy, por su apoyo y recepción, así también a todos los funcionarios del Instituto de Ecología y Evolución, ya que sin su apoyo esta tesis no hubiese sido posible.

A mis amigos, Fre, Pame, Denisse, Carolina R., Felipe y Boris, por todo los consejos y buenas vibras que me han brindado en esta etapa de mi vida.

Al Dr. Andras Paldi y Thi Mi Anh, quienes hicieron que en mi estadía en Francia me sintiera como en casa.

A todos los estudiantes con los cuales tuve la suerte de compartir en la Federación de Estudiantes, por haberme permitido desarrollarme más allá de lo estrictamente académico.

A mi familia, especialmente a mis viejos, Jaime y Maggie, por haberme permitido estudiar en la Universidad y por brindarme el elemento más importante para cualquier actividad vital, el amor. A mi “abueli” por su eterna preocupación y cariño, a Mónica por su inagotable energía, a Catalina y Panchito, por todo lo que solo las personas puras e inocentes pueden entregar. A mi Tata, por todo lo que me ha enseñado y a mi Lala, que sin duda comparte mi alegría. A Juany, Raúl, Cesar, Etiel y Loreto.

Finalmente, un agradecimiento muy especial a Zahady, con quien he tenido la suerte de compartir mi vida, por apoyarme en todos los momentos difíciles, de ofuscación y frustración, pero por sobre todo, por compartir todas las alegrías y éxitos.

Esta Investigación fue realizada en el Laboratorio de Evolución Molecular del Instituto de Ecología y Evolución de la Universidad Austral de Chile y en el Laboratorio de Epigenética de GENETHON, Evry, Francia. El financiamiento fue otorgado por los proyectos FONDECYT 1010727 y ECOS-CONICYT C01-B02

INDICE DE CONTENIDOS

		Páginas
1	RESUMEN	1
	SUMMARY	2
2	INTRODUCCIÓN	3
3	MATERIALES Y MÉTODOS	9
3.1	Materiales	9
3.1.1	Material biológico	9
3.1.2	Enzimas	9
3.1.3	Reactivos y otros	10
3.2	Métodos	11
3.2.1	Preparación de ADN genómico	11
3.2.2	Cuantificación del ADN	12
3.2.3	Amplificación de secuencias nucleotídicas por PCR	12
3.2.4	Fraccionamiento de ácidos nucleicos en geles de agarosa	13

3.2.5	Clonamiento de productos de amplificación en el vector pCR4-Topo	14
3.2.6	Purificación de ADN plasmidial a pequeña escala	15
3.2.7	Digestión con enzimas de restricción	16
3.2.8	Marcaje de ADN con ³² P	16
3.2.9	Preparación de las células para infección por fago λ	18
3.2.10	Rastreo del gen Peg1 en la biblioteca genómica de <i>T. barrerae</i>	18
3.2.10.1	Titulación de stock de fagos y propagación	18
3.2.10.2	Rastreo en biblioteca genómica	19
3.2.10.3	Preparación de stock de fago lambda	22
3.2.11	Extracción de ADN de fago λ Fix II.	23
3.2.12	Análisis <i>in silico</i> de las secuencias nucleotídicas	24
4	RESULTADOS	26
4.1	Secuencias Peg1 específicas de octodóntidos	26
4.2	Región génica que contiene Peg1 aislada desde biblioteca genómica de <i>T. barrerae</i> .	31

4.3	Análisis comparativo de las secuencias nucleotídicas parciales del gen Peg1 de <i>T. barrerae</i> , <i>P. aureus</i> , <i>O. mimax</i> y <i>O. gliroides</i> .	34
4.4	Análisis filogenético de las secuencias Peg1 de octodóntidos estudiados	38
5	DISCUSIÓN	44
6	CONCLUSION	56
7	BIBLIOGRAFÍA	58

INDICE DE FIGURAS

Figura 1	ADN genómico de <i>T. barrerae</i> fraccionado electroforéticamente en gel de agarosa al 1%.	27
Figura 2	Productos de PCR Peg1 específicos utilizando DNA genómico como templado fraccionados en gel de agarosa 1.5% teñido con EtBr.	29
Figura 3	Caracterización del DNA pTyPeg1-1 por digestión y fraccionamiento en gel de agarosa.	30
Figura 4	Fragmento de ADN Peg1 específico amplificado a partir de solución de stock de λ TyPeg1-1 en gel de agarosa al 1,5 % teñido con EtBr	32
Figura 5	ADN λ TyPeg1-1 en gel de agarosa al 1,0 % teñido con EtBr	33
Figura 6	Esquema de la región de Peg1 secuenciada y ubicación de los partidores utilizados	35
Figura 7	Esquema de la región de Peg1 secuenciada y ubicación de los partidores utilizados.	36
Figura 8	Alineamiento mediante Clustal X de las secuencias Peg1	37
Figura 9	Dendograma de distancia de <i>Peg1</i> usando el modelo de Kimura dos parámetros (K2P)	39
Figura 10	Árbol filogenético basado en secuencias Peg1 analizadas por	40

máxima parsimonia (MP)

- Figura 11** Árbol filogenético basado en secuencias Peg1 analizadas por máxima parsimonia (MP) con búsqueda heurística 42
- Figura 12** Árbol filogenético basado en el análisis de secuencias Peg1 de octodóntidos por análisis de máxima verosimilitud (MI) de Peg1 utilizando como grupo externo a *Mus musculus* y el modelo de HKY+G definido según Modeltest 3.6 43
- Figura 13** Relaciones filogenéticas utilizando secuencias del gen mitocondrial 12S. Las líneas grises corresponden a los especialistas de desierto. Tomado de “*Whole-genome duplications in South American desert rodents (Octodontidae)*”. Gallardo et al., 2004. 46

LISTA DE ABREVIATURAS

A	absorbancia.
Amp	ampicilina.
BSA	albúmina sérica de bovino.
cDNA	ácido desoxirribonucleíco complementario.
DNAsa	desoxirribonucleasa.
dNTPs	deoxinucleotidos trifosfato.
D.O.	densidad óptica.
DNMTs	dinucleótido metil transferasa
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i> .
EDTA	ácido etilendiaminotetraacético.
Et Br	bromuro de etidio.
K2P	Kimura dos parámetros.
kb	kilobase.
kDa	kilodalton(s).
LB	medio de cultivo Luria-Bertani.
Ma	millones de años.
MP	máxima parsimonia.
ML	maximum likelihood.
min	minuto(s).
mM	milimolar.

nM	nanomolar.
nt	nucleótido.
pb	pares de bases.
PCR	reacción en cadena de la polimerasa.
rpm	revoluciones por minuto.
RNAasa	Ribonucleasa.
seg	segundos.
SDS	dodecil sulfato de sodio.
Taq	DNA polimerasa de <i>Termophilus aquaticus</i> .
Tampón TAE	TAE Tris-HCl 89 mM, ácido acético, EDTA 2 mM.
Tris	Tris-hidroximetil-aminometano.
UV	ultra violeta.
V	volt(s).
µg	microgramo.
µL	microlitro.

1. RESUMEN

La expresión diferencial de genes permite explicar como células genéticamente homogéneas se transforman en heterogéneas funcional y estructuralmente. Muchas de las diferencias a este nivel ocurren en el desarrollo y son heredadas a través de la mitosis. Las alteraciones estables de este tipo se definen como epigenéticas, ya que no implican cambios en la secuencia nucleotídica del ADN. El fenómeno epigenético de la impronta genómica involucra la metilación selectiva de un alelo que deriva en la expresión monoalélica de un gen. El gen *Peg1* (*MEST*) es uno de los genes con impronta más ampliamente estudiados expresándose desde el alelo paterno en ratón.

Dado su condición tetraploide *T. barrerae* ($2n=102$), es un excelente modelo para estudiar este fenómeno y así avanzar en la comprensión de su regulación genómica. En la presente investigación se aisló el gen *Peg1* desde biblioteca genómica de *T. barrerae*, se amplificó y secuenció la región exón9 – intrón – exón10 en las especies relacionadas *Pipanaoetomys aureus*, *Octomys mimax* y *Octodontomys gliroides*.

Los resultados muestran un exitoso aislamiento de extensas secuencias génicas de *Peg1* desde la biblioteca genómica de *T. barrerae*. El análisis filogenético de las secuencias presenta consistencia con las filogenias construidas con los genes 12S y del receptor de la hormona del crecimiento (GHR). Además, las secuencias muestran una gran diferenciación entre las especies estudiadas, permitiendo agruparlas por nivel de ploidía

SUMMARY

The differential expression of genes can explain how genetically homogeneous cells become heterogeneous in function and structure. Most difference at this level occurs in development and are heritable through mitosis. These kind of stable alterations are defined as epigenetics alterations, since they are heritable in the short time and do not involve DNA nucleotide sequence changes. The epigenetic phenomena of genomic imprinting involve the selective methylation of an allele which becomes monoallelic in the expression of a gene. The Peg1 (MEST) gene is well-studied imprinted gene and its expression is derived from the paternally allele in mouse.

Due to it's tetraploid condition, *T. barrerae* (2N=102), is an excellent biological model to study this phenomena and to understand its genomic regulation. In this investigation we isolated Peg1 from the *T. barrerae*'s genomic DNA library. We also amplified and sequenced the Peg1 exon9-intron9-exon10 region in the related species *Pipanacoctomys aureus*, *Octomys mimax* and *Octodontomys gliroides*, for phylogenetic comparisons and phylogeny construction. Data is expected to be compatible with other gene trees constructed with nuclear and mitochondrial markers frequently used.

We successfully purified the vector that contains the *T. barrerae*'s Peg1 gene sequences. Phylogenetic analysis shows consistency with the 12S and GHR phylogenies of the octodontids. The Peg1 sequences of octodontids are fairly conserved and the species can be discriminated by ploidy level.

2. INTRODUCCION

Uno de los grandes desafíos de la biología moderna, es comprender como la información genética contenida en el DNA, es regulada y transducida para explicar la complejidad de los organismos (Jenuwein y Allis, 2001). Por ejemplo, los distintos tipos celulares de un organismo multicelular son genotípicamente idénticos; pero funcional y estructuralmente, heterogéneos. Una de las razones por las que ocurre la diferenciación celular es la variación entre los patrones de expresión génica en los diversos tipos celulares (Rakyan et al., 2001).

El concepto de “epigenética” que literalmente significa “fuera de la genética convencional” describe alteraciones estables en la expresión de genes que se perpetúan durante la mitosis y no implican cambios en la secuencia nucleotídica. En la actualidad este concepto ha reemplazado al de epigénesis, es decir, la interpretación de cómo el genotipo dirige la expresión del fenotipo en el desarrollo de los organismos (Jaenisch y Bird, 2003). El estudio de éstas alteraciones se considera un factor crítico para comprender los mecanismos por los cuales la información se regula y hereda de una generación a otra (Jenuwein y Allis, 2001). Los mecanismos epigenéticos son esenciales para el desarrollo y la diferenciación celular, pero también están involucrados en los cambios producidos por el medio ambiente en organismos maduros. A su vez están involucrados en la defensa contra virus, que de otra manera, utilizarían la maquinaria celular para sus propios fines (Jahner y Jaenisch, 1985).

Los mecanismos epigenéticos involucran un cambio físico del ADN, sin involucrar una alteración de la secuencia nucleotídica. La modificación ocurre por

adición de grupos metilo a bases citosina y/o por el empaquetamiento del ADN a estados altamente condensados (Li, 2002). Los cambios de la estructura cromatínica ocurren por modificaciones covalentes de las proteínas asociadas al ADN: las histonas. Las modificaciones pueden ser por ejemplo por acetilación, metilación y fosforilación de éstas proteínas (Li, 2002). Estas modificaciones interfieren en las interacciones ADN-proteínas necesarias para el inicio del proceso de transcripción (Rakyan et al., 2001).

En la mayoría de los loci autosómicos en mamíferos, ambas copias del gen se expresan por igual. Para otros genes, sin embargo, una copia está silenciada en algunos tejidos durante el desarrollo, produciéndose expresión monoalélica del gen (Spencer et al., 2000). El fenómeno epigenético que provoca este resultado es la impronta genómica, es decir, la metilación selectiva de un alelo, que impide o dificulta la unión del complejo de inicio de la transcripción. En mamíferos la metilación del ADN se encuentra predominantemente en citosinas del dinucleótido CpG. De todos los dinucleótidos CpG presentes en el genoma de los mamíferos aproximadamente el 70% se encuentra metilado. La mayoría de los sitios no metilados se encuentran agrupados en pequeños clusters conocidos como "islas CpG". Éstas se encuentran frecuentemente incluidas o cercanas a los promotores o primeros exones de genes reguladores (Rakyan et al., 2001). La reacción de metilación de las bases citosinas es catalizada por las ADN metiltransferasas. Para el caso de los mamíferos, han sido identificadas cuatro de éstas enzimas (Bestor et al., 1988; Yoder et al., 1997; Okano et al., 1998).

Los genes con impronta están involucrados en el desarrollo embrionario, formación de la placenta, diferenciación de ciertos linajes celulares,

funcionamiento del sistema nervioso y establecimiento de la conducta postnatal (Ferguson-Smith y Surani, 2001; Reik, 2002). La expresión monoalélica del gen puede ocurrir desde el alelo materno o paterno (Li, 2002). Se han identificado al menos 60 genes con impronta, y se estima, que el número total en el genoma de ratón será cercano a 200. Hasta ahora, estos genes han mostrado un alto grado de conservación entre ratón y humano (Engel, 2000). Además tienden a agruparse en “clusters” (Gong et al., 2005). Los homólogos materno y paterno presentan asincronía replicacional, durante la fase S del ciclo celular (Paldi, 2003). Los genes con impronta están formados por unidades transcripcionales compactas, con intrones pequeños. Se encuentran asociados a patrones de metilación específicos según la forma de expresión del alelo (Lefebvre et al., 1997). Se sugiere que las secuencias que poseen esos patrones diferenciales de metilación son importantes en la señalización inicial y expresión posterior de los genes con impronta (Bartolomei y Tilghman, 1997). El gen *Peg 1* presenta impronta genómica (Kobayashi et al., 1997). Se encuentra en el extremo proximal del cromosoma 6 en *Mus musculus* y el cromosoma 7q32 en humano. *Peg 1* o *MEST (Mesoderm Specific Transcript)* es de copia única en mamíferos y codifica para una enzima de las α/β hidrolasas en mamíferos. (Engel, 2000). Tiene 12 exones, con un tamaño promedio de 212 pb y un cADN de 2543 nt. Además se ha identificado una región isla CpG en el exon 1 de *Peg1*, demostrándose que esta región está diferencialmente metilada (Lefebvre et al., 1997).

En humanos *Peg1* es transcrito desde dos promotores adyacentes. Sólo uno de estos promotores posee impronta, expresándose exclusivamente desde el

alelo paterno. El otro promotor se encuentra activo en ambos alelos. (Li, 2002; Engel, 2000)

El descubrimiento de tetraploidía en *Tympanoctomys barrerae* ($2n=102$) (Gallardo et al., 1999) y la descripción de que *Pipanacoctomys aureus* ($2n=92$), taxón hermano de *T. barrerae*, también es tetraploide, presenta una oportunidad excelente, para indagar cómo los genomas duplicados evolucionaron para silenciar el material genético redundante (Gallardo et al., 2004). En efecto, la duplicación de genes de copia única y el silenciamiento de alelos para lograr la diploidización funcional necesaria, requieren de un fuerte control epigenético (Scheid, 1996; Matzke, 1999; Wendel, 2000; Comai, 2000; Eckardt, 2001; Pikaard, 2001).

Una primera aproximación, acerca de cómo se comportan los genes con impronta en *T. barrerae* involucraron estudios del gen Peg1/MEST en esta especie. Estas investigaciones demostraron la existencia de al menos tres secuencias distintas para Peg1, de las cuales una sola se expresa en embriones, comprobando la impronta genómica en *T. barrerae* (Bacquet, 2003).

Para tener información relevante respecto de la impronta genómica, se hace necesario conocer las regiones promotoras del gen en cuestión (Lefebvre et al. 1997). Estudios recientes demuestran que la regulación génica no se produce sólo a nivel de secuencias nucleotídicas (Jenuwein y Allis, 2001). También compromete complejos mecanismos, que involucran modificaciones post transcripcionales (Orphanides y Reinberg, 2002). Las modificaciones post transcripcionales implican edición del ARN, interacciones con zonas intrónicas y un dinámico remodelamiento de la cromatina, reafirmando que la generación de

complejidad genética en los organismos no es un fenómeno aislado (Ast, 2005). Las investigaciones actuales en genómica comparada y funcional pretenden explicar la regulación de esta complejidad (Orphanides y Reinberg, 2002; Ast, 2005).

Finalmente, la impronta genómica parece ser un puzzle evolutivo. Al respecto, pasa por alto una de las propiedades recurrentes que se atribuyen a la diploidía: la protección contra los efectos de las mutaciones deletéreas y recesivas (Spencer et al., 1998). La impronta expone un alelo inmediatamente, sin heterocigosis funcional, sino con monoplodía (Spencer et al., 1998). Distintas hipótesis tratan de resolver esta interrogante, ya que es necesario invocar alguna ventaja evolutiva de la impronta genómica para justificar su existencia. (Wilkins y Haig, 2003)

La impronta genómica ha sido descrita en mamíferos euterios, marsupiales y angiospermas. Sin embargo, en monotremas, (y en todos los demás vertebrados e invertebrados no euterios) los análisis de embriones uniparentales o de genes que presentan impronta en otros organismos, indican que éste mecanismo de regulación no se encuentra presente (Reik y Walter, 2001).

En esta tesis se propuso caracterizar el gen Peg1/MEST en *T. barrerae*, *P. aureus*, *O. mimax* y *O. gliroides* para su utilización como marcador nuclear y de impronta genómica en octodóntidos. En caso de ser útil como marcador nuclear, el árbol de genes obtenido será consistente con otros construídos utilizando marcadores nucleares y mitocondriales. A su vez la distribución de las secuencias génicas en el árbol entrega información de su evolución molecular.

Para lograr esos objetivos se aisló y purificó el gen Peg1/MEST desde la biblioteca genómica de *T. barrerae* para estudios de regulación génica. Se amplificó, subclonó y secuenció la región exon 9 – intrón – exón 10 del gen Peg1 en *P. aureus*, *O. mimax* y *O. gliroides* para su comparación y análisis filogenéticos.

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 MATERIALES

3.1.1 Material biológico

Los especímenes de *T. barrerae* (#1708 MHG, #1710 MHG), *P. aureus* (#1680 MHG), *O. mimax* (#1536 MHG) y *O. gliroides* (#1639 MHG) fueron colectados en su hábitat natural (Gallardo and Kirsch, 2001), sacrificados y procesados para análisis posteriores. En la captura y tratamiento de los animales se disminuyó al máximo el sufrimiento de éstos, de acuerdo a las normas de bioética de la Universidad Austral de Chile. Los especímenes se encuentran registrados en la colección de mamíferos del Instituto de Ecología y Evolución de la Universidad Austral de Chile.

3.1.2 Bacterias y biblioteca genómica.

Invitrogen Cepas de *E. coli* "DH-5 α Subcloning efficiency"

Stratagene XL1-Blue MRA(P2)

3.1.3 Enzimas

Invitrogen *Taq* DNA Polimerasa, *EcoRI*, *SacI*, *XbaI*, RNAsa A,

Promega DNAsa, Proteinasa K

Stratagene Biblioteca genómica de *T. barrerae* en vector Lambda FIX II

3.1.4 Reactivos y otros

Genset SA	Oligonucleótidos partidores (PCR)
GibcoBRL	DNA λ /HindIII ladder, 1kb DNA ladder, extracto de levadura, peptona.
Invitrogen	Topo Cloning Kit, Tris base, agarosa, SDS, tampón 10x PCR.
Merck	Etanol absoluto, isopropanol, cloroformo, ácido clorhídrico 37%.
Qiagen	QiaPrep Miniprep Kit, Lambda DNA Maxi Kit
Winkler	Acetato de amonio, cloruro de sodio, fenol equilibrado saturado básico, agar-agar, alcohol isoamílico.
Sigma	Ampicilina, bromuro de etidio, EDTA.
Promega	Prime-a-gene labeling system kit.

3.2 MÉTODOS

3.2.1 Preparación de ADN genómico.

Soluciones: Tampón de extracción: Tris/HCl 10 mM [pH 8.0], EDTA 0.1 M [pH 8.0], SDS 0.5% y RNasa pancreática 20 µg/ml.

Tampón TE pH 8.0 : Tris/HCl 10 mM [pH 8.0], EDTA 1 mM [pH 8.0]

El ADN genómico de *T. barrerae*, *O. mimax*, *O. gliroides* y *P. aureus* se purificó según el método de extracción por fenol / cloroformo (Sambrook et al., 2003). Se pulverizó aproximadamente 0.5 g de tejido fresco previamente sumergido en nitrógeno líquido. Una vez evaporado el nitrógeno, el tejido pulverizado se traspasó a un tubo Falcon de 15 ml que contenía 10 volúmenes de tampón de extracción. Se incubó por 1 hora a 37°C con agitación ocasional. Se agregó proteinasa K hasta obtener una concentración final de 100 µg/ml, incubando en baño María a 50°C por toda la noche. Después de la incubación, una vez que la suspensión llegó a temperatura ambiente, se agregó un volumen de fenol equilibrado con 0.5 M Tris/HCl [pH 8.0], mezclando suavemente las dos fases por inversión. Las fases se separaron por centrifugación a 5.000 rpm por 15 min a temperatura ambiente. La fase acuosa se transfirió con una pipeta de punta ancha a un tubo Falcon de 15 ml limpio. El proceso de extracción se repitió dos veces. En la última extracción se utilizó un volumen equivalente de fenol/cloroformo/AIA (25/24/1), separando las fases por centrifugación a 5.000 x g por 15 min a temperatura ambiente. A la última fase acuosa, se le adicionó 0.2 volúmenes de acetato de amonio 10 M y dos volúmenes de etanol absoluto a -20°C para precipitar el ADN genómico. El ovillo de ácido nucleico se extrajo enrollándolo con una pipeta Pasteur con su punta doblada. Se lavó con etanol

70% frío y se dejó secar al aire. Posteriormente, el ADN se resuspendió en 1000 μ l de tampón TE pH 8.0 y se incubó a 37°C durante toda la noche. El ADN genómico fue almacenado a 4°C.

3.2.2 Cuantificación del ADN.

La concentración del ADN se estimó midiendo su absorbancia a 260 nm, en un espectrofotómetro UV-1203 Shimadzu. Para calcular la concentración se consideró que una unidad de absorbancia a 260 nm (1 OD) corresponde a 50 μ g/ml de ADN de doble hebra (Sambrook et al., 2003).

La calidad del ADN se estimó directamente por fraccionamiento en un gel de agarosa al 1% teñido con bromuro de etidio, bajo luz UV. La pureza del ADN se evaluó a través de la razón A_{260}/A_{280} , que para un ADN puro fluctúa entre 1,7 y 1,85.

3.2.3 Amplificación de secuencias nucleotídicas por PCR

En un tubo de polipropileno estéril de 0.2 ml se agregó 100 ng de ADN genómico (50 ng/ μ l), 2 μ l de solución 10 μ M de cada partidor específico para la amplificación (TyPeg1s : 5'-AATGATGGGRACTTGGTCATAGAC-3'; TyPeg1r: 5'-ACTGGGAACAGTGACAGAGGCAAGCGC-3'), 2 μ l de tampón 10xPCR, 1.2 μ l de $MgCl_2$ 25 mM, 0.4 μ l de solución mezcla de dNTP 10 mM, 0.2 μ l de Taq polimerasa 5U/ μ l y agua destilada desionizada estéril, hasta completar un volumen total de 20 μ l. Como control negativo se mezcló en un tubo todos los componentes de la reacción de amplificación, excepto el ADN templado, para descartar cualquier tipo de contaminación por ADN exógeno en el ensayo. La reacción se

llevó a cabo en un termociclador Perkin Elmer modelo GeneAmp PCR System 2400. El protocolo de amplificación consistió en un paso de denaturación inicial a 95°C por 5 min. A continuación se realizó 35 ciclos consistentes en: un paso de denaturación a 94°C por 30 s, un paso de apareamiento de los oligonucleótidos con el templado a 60°C por 1 min y un paso de extensión a 72°C por 1 min. La extensión final se realizó a 72°C por 10 min. El resultado de la amplificación se estimó por electroforesis de una quinta parte del volumen final de la reacción en gel de agarosa al 1.5%, con tinción de bromuro de etidio. Los tubos con el resto de la reacción se almacenaron a -20°C.

3.2.4 Fraccionamiento de ácidos nucleicos en geles de agarosa

Soluciones: TAE 1x Tris-acetato 20 mM, pH 8.0, EDTA 1 mM y acetato de sodio 10 mM.

Tampón de carga 6x: 0.25% azul de bromofenol, 40% sacarosa en agua.

Los productos de amplificación y el ADN digerido se analizaron por electroforesis en gel de agarosa. La concentración de agarosa fluctuó entre 0.8 y 1.5%, dependiendo del tamaño de las moléculas a visualizar. Como tampón de corrida se utilizó TAE 1x. Las muestras de ADN se aplicaron al gel mezclado con tampón de carga. Para estimar el tamaño de los fragmentos de ADN visualizados en el gel, se fraccionaron las muestras junto con un estándar de tamaño molecular conocido. La electroforesis se llevó a cabo entre 50 – 100 mA y el gel se tiñó con bromuro de etidio a una concentración final de 0.5 µg/ml. Las bandas de ADN se visualizaron en un transluminador UV y se fotografiaron con cámara digital DC290 Kodak, utilizando filtro fluorescente.

3.2.5 Clonamiento de productos de amplificación en el vector

pCR4-Topo

Soluciones: SALT solution: 1.2M NaCl, 0.06M MgCl₂

Medio SOC: Triptona 2% p/v, extracto de levadura 0.5% p/v, NaCl 10 mM, KCl 2.5 mM, Mg²⁺ 20 mM, glucosa 20 mM.

Medio LB: 10g NaCl, 5g extracto de levadura, 5g peptona se disolvió en 800 ml con agua destilada, y se ajustó a pH 7.4, se aforó a un litro y se autoclavó inmediatamente.

Medio LBA: 1.8% agar agar en LB

Medio LB amp: LBA + 100 mg/ml ampicilina.

Los fragmentos amplificados por PCR fueron clonados utilizando “Topo TA Cloning Kit” (Invitrogen) en el vector pCR4-Topo. Este vector consta de 3579 pb, está linearizado y tiene integrado un sistema de ligación basado en la actividad de la ADN topoisomerasa I. En un tubo eppendorf de 1.5 ml se mezcló 2 µl del producto de amplificación, 0.5 µl de “SALT solution” y 0.5 µl de vector [50 ng/µl]. La mezcla se incubó 30 min a temperatura ambiente y se agregó 50 µl de células de *E.coli* DH5α “Subcloning efficiency competent cells” (Invitrogen), incubando por 30 min en hielo. Luego se realizó golpe térmico a 37°C por 2 min, para inducir la incorporación del plásmido en las células competentes. Se agregó 250 µl de medio SOC provisto por el kit. Se incubó con agitación a 37°C por una hora, para favorecer el crecimiento de los recombinantes. Posteriormente, se centrifugó la suspensión bacteriana a 7.000 x g por 5 min a temperatura ambiente. El sedimento fue sembrado en medio sólido LBamp e incubado toda la noche a 37°C.

3.2.6 Purificación de ADN plasmidial a pequeña escala

La extracción de ADN plasmidial se realizó utilizando el kit comercial “QiaPrep Miniprep Kit” (Qiagen), basado en el método de lisis alcalina y purificación del ADN plasmidial en minicolumnas. Se tomó una colonia simple y se suspendió en 5 ml de medio líquido LBamp, incubando toda la noche a 37°C con agitación. Se centrifugó 3 ml del cultivo a 7.000 x g por 3 min a temperatura ambiente. El sedimento de células fue resuspendido en 250 µl de solución “Buffer P1” que contiene RNAsa. Para lisar las células se agregó 250 µl de solución “P2” (tampón de lisis), invirtiendo suavemente el tubo 2-3 veces e incubando a temperatura ambiente por 5 min. Posteriormente se agregó 350 µl de solución “N3” para precipitar las proteínas bacterianas y se invirtió el tubo 2 a 3 veces. Se eliminó el precipitado a 13.000 x g por 10 min. El sobrenadante que contiene el ADN plasmidial se transfirió a un minicolumna (provista por el kit) ubicada en un tubo de polipropileno y se centrifugó a 13.000 x g por 1 min, descartando el líquido colectado en el tubo. En seguida se agregó 750 µl de solución “PE” (solución de lavado), centrifugando nuevamente a 13.000 x g por un minuto a temperatura ambiente y descartando la solución de lavado colectada en el tubo. Luego se repitió la centrifugación para eliminar toda traza de etanol. En seguida, se colocó la minicolumna en un tubo Eppendorf de 1.5 ml y se eluyó el ADN agregando 50 µl de tampón TE pH 8.0 a 50 °C en el centro de la columna. Se dejó reposar por 1 min y se centrifugó a 13.000 x g por 1 min a temperatura ambiente. El ADN purificado se almacenó a 4°C.

3.2.7 Digestión con enzimas de restricción

Para liberar el fragmento clonado y determinar el tamaño del inserto se digirió el ADN plasmidial recombinante. En general, en un tubo Eppendorf se mezcló 1-6 µg del ADN plasmidial (2 µl del ADN obtenido de la purificación de ADN plasmidial), 0.5 µl de *EcoRI* 10U/µl, 1 µl de tampón 10x de la enzima (Invitrogen) y agua destilada, desionizada y estéril, hasta completar un volumen total de reacción de 10 µl. La mezcla se incubó a 37°C por 2 horas.

3.2.8 Marcaje de ADN con ³²P

El marcaje del fragmento de ADN de Peg1 amplificado en *T. barrerae* se realizó utilizando el kit "Prime-a-gene labeling system" de Promega. El método se basa en lo descrito por Feinberg y Vogelstein (1983), en el cual, una mezcla de hexadesoxirribonucleótidos al azar se utiliza para la síntesis *in vitro* de ADN, a partir de ADN doble hebra como templado. En la reacción de síntesis se incorpora un desoxirribonucleótido marcado radioactivamente con ³²P en la posición α fosfato con [α-³²P]dCTP.

Se marcaron 25 ng de ADN en un volumen final de 50 µl. Se descongelaron todos los componentes del sistema en hielo, excepto el fragmento Klenow. El ADN se diluyó en agua desionizada hasta una concentración de 10µg/ml, y se desnaturalizó calentándolo en un tubo eppendorf de 1,5 ml a 95-100°C por 2 min. Inmediatamente se puso el tubo en hielo y se mezclaron los componentes de la reacción en un tubo de microcentrífuga: 10 µl de tampón de marcaje 5x, 2 µl de mezcla 20 µM de dNTPs no marcados, 2 µl de BSA libre de nucleasa [400 µg/ml], 5µl de [α-³²P]dCTP, 50 µCi, 3.000 Ci/mmol a una concentración de 333 nM, 5U de

ADN polimerasa I (fragmento Klenow) y se completó a un volumen final de 50 μ l con agua libre de nucleasa, desionizada y estéril. Después de mezclar cuidadosamente se incubó por una hora a temperatura ambiente. La reacción se detuvo llevando la mezcla a 95-100°C por dos min. y se enfrió inmediatamente en hielo. Se agregó EDTA hasta una concentración final de 20 mM y se usó directamente en la reacción de hibridación o se guardó a -20 °C para usar posteriormente.

3.2.8.1 Determinación de la eficiencia del marcaje

Una décima parte del volumen de la mezcla que contiene al ADN marcado radiactivamente se diluyó a una razón de 1:100 con EDTA 0.2M pH 8.0. Se pipetearon 3 μ l de la solución diluida sobre un filtro de nitrocelulosa para la determinación de cpm total en la muestra y se dejó secar al aire. Se transfirieron 3 μ l de la misma solución a un tubo que contenía 100 μ l de BSA 0.1 mg/ml y EDTA 20 mM y se mezcló vigorosamente. Se agregó a la mezcla 1.3 ml de una solución de TCA 10% frío con 1% pirofosfato de sodio. Se dejó precipitar en hielo por 20 min. Se colectó el precipitado en un filtro de nitrocelulosa y se lavó tres veces con 5 ml de TCA 10% frío. Se enjuagó el filtro en etanol 95% y se dejó secar al aire. El filtro fue empapado con solución de centelleo y en un contador de centelleo se determinó cpm para la muestra precipitada.

3.2.9 Preparación de las células para infección por fago λ

Se tomó una alícuota del stock de glicerol de las células XL 1 Blue MRA P2 y se sembró en placa LBA. Se incubó a 37°C toda la noche. Después de la incubación, se tomó una colonia y se sembró en 20 ml de LB complementado con 0.2% maltosa y 10 mM MgSO₄. Se dejó en agitación a 37°C hasta obtener una densidad óptica (O.D.) a 600 nm de 0.2 – 0.6. Una vez alcanzada esta OD las células fueron sedimentadas a 2.500 x g por 5 min, se descartó el sobrenadante y se resuspendió en MgSO₄ 10 mM hasta obtener una OD teórica de 0.4. Se almacenó la suspensión de células a 4°C.

3.2.10 Rastreo del gen Peg1 en la biblioteca genómica de *T. barrerae*

La biblioteca genómica de *T. barrerae*, se encuentra contenida en 6 sub-bibliotecas construídas en el vector de reemplazo λ Fix II derivado del bacteriófago lambda. Cada una de las subbibliotecas tenía un título de 10⁹ pfu/ml. Para determinar en cual sub-biblioteca se encontraban secuencias específicas para Peg1, se amplificó por PCR utilizando como templado una alícuota de 1 μ l de cada sub-biblioteca con los partidores que amplifican Peg1 en *T. barrerae*, utilizando las condiciones descritas en el acápite 3.2.3 y se rastreó entonces en ésta subbiblioteca.

3.2.10.1 Titulación de stock de fagos y propagación.

Soluciones: Tampón SM: 5.8 g de NaCl, 2 g MgSO₄ x 7 H₂O, 50 ml 1M Tris/HCl pH 7.5, 5ml gelatina 2%, se aforó a un litro, autoclavó y almacenó a 4°C.

LBTA: 0.8% agar agar en LB

En un tubo de vidrio de 13x100 mm estéril se mezcló 100 μ l de las células preparadas en el acápite 3.2.10 con 100 μ l de una dilución del stock de fago. Para determinar cuál era la dilución óptima para el rastreo de la biblioteca genómica, esto es, que volumen del stock de fago se debe utilizar para obtener placas de lisis casi confluentes, se prepararon diluciones en serie desde 10^{-2} a 10^{-5} en tampón SM. La mezcla de bacterias con fagos se incubó a 37°C por 15 min para facilitar la adsorción del fago a la célula. Después de la incubación, a la mezcla se le agregó 3 ml de LBTA equilibrado a 50°C y se vertió inmediatamente a la superficie de placas LBA equilibradas a 37°C, procurando distribuir de manera uniforme. Se dejó solidificar el LBTA y las placas se incubaron invertidas a 37°C toda la noche. Después de la incubación se determinó el número de placas de lisis y se calculó el título de la solución stock de fagos.

Para el rastreo se utilizaron placas de LBA con placas de lisis casi confluentes con alrededor de 50.000 pfu en una placa de 137 mm de diámetro. Para esto, se sembró una dilución 10^{-3} del stock de fagos. Las diluciones se hicieron con tampón SM, trabajando siempre en hielo.

3.2.10.2 Rastreo en biblioteca genómica.

Soluciones: Solución de desnaturalización: 1.5 M NaCl; 0.5 M NaOH

Solución de neutralización: 0.5 M Tris-HCl (pH 7.4), 1.5 M NaCl

Solución de pre-hibridación: 50% formamida, 6x SSC, 0.5 % SDS, ADN de bloqueo "salmon sperm" 100 μ g/ml.

Solución de hibridación: Solución de pre-hibridación con sonda marcada con ^{32}P denaturada.

20 x SSC: Para la preparación de 1 litro de solución se mezclaron en 800 ml de agua: 175.3 g de NaCl, 88.2 g de citrato de sodio. Se ajustó el pH a 7.0 con gotas de HCl 12N. Se aforó a 1 L, se autoclavó y almacenó a 4°C.

Solución de lavado 1: 2x SSC, 0.1% (p/v) SDS.

Solución de lavado 2: 1x SSC, 0.1% (p/v) SDS.

Solución de lavado 3: 0.1 SSC, 0.1% (p/v) SDS.

Las placas de lisis se incubaron a 4°C por 1 hora para endurecer el agar y facilitar la transferencia a filtros de nitrocelulosa. Se confeccionaron dos filtros de nitrocelulosa del tamaño de las placas de LBA por cada una de éstas (duplicado). Los filtros se numeraron con lápiz grafito. Se tomó un filtro y cuidadosamente se puso en contacto directo con las placas de lisis, utilizando guantes para la manipulación. Una vez que el filtro cubrió completamente la placa, se marcaron tres coordenadas asimétricas con carbón activado utilizando un alfiler. El filtro se dejó en contacto por 1 min con las placas de lisis y fue retirado utilizando pinzas estériles. Se repitió el procedimiento con el segundo filtro (duplicado). El filtro y su duplicado se sumergieron en la solución de desnaturalización por 2 min, con la zona de contacto hacia arriba. Luego, los filtros se traspasaron a la solución de neutralización por 5 min y se sumergió en 2XSSC con movimiento suave, para eliminar los restos de agar. El ADN fue fijado en los filtros a 80°C por 2 horas en una cámara de vacío. Luego los filtros se secaron al aire y se empaparon en

2XSSC, luego fueron incubados en 2 ml de la solución de pre-hibridación por 2 horas a 42°C con agitación suave. La sonda de Peg1 marcada como se describe en el acápite 3.2.9 fue desnaturalizada a 100°C por 15 min e inmediatamente se dejó en hielo. Se añadió la sonda a 2 ml de solución de pre-hibridación nueva y se incubó los filtros en esta solución a 42°C por 12 horas en una bolsa de plástico pequeña. Se eliminaron todas las burbujas y la bolsa fue sellada para evitar la evaporación. Una vez terminada la hibridación se recuperó la solución de hibridación y los filtros, éstos se sumergieron completamente en la solución de lavado 1 a 37°C por 15 min, cada lavado se realizó 2 veces. Se repitió éste procedimiento con las soluciones de lavado 2 y 3. Los filtros se dejaron secar al aire a temperatura ambiente sobre hojas de papel secante. Los filtros se cubrieron con alusa transparente para ser expuestos en un fosfoimager. La exposición tuvo una duración de 3 horas. Una vez que se obtuvo el resultado de la exposición, se alineó la foto del filtro ya expuesto con la placa original de LBA utilizando las coordenadas anteriormente marcadas. Sólo los clones de fago que presentaban hibridación positiva en el filtro original y el duplicado fueron considerados para seguir las rondas de rastreo posteriores. Los clones que presentaban hibridación positiva se tomaron desde la placa de LBA con una micropipeta P1000 con su punta cortada para aumentar el grosor y almacenados en 1 ml. de tampón SM y 20µl de cloroformo a 4°C. Para las siguientes rondas de rastreo, estos recombinantes aislados se propagaron y cada fago se purificó hasta en cuatro rondas de rastreo hasta obtener que todas las placas de lisis en una placa de LBA fueran positivas. El recombinante purificado (“plaque purified”) se agitó

vigorosamente por 2 horas para promover la difusión de los fagos en SM y se guardó como solución stock a 4°C. Los recombinantes aislados se denominaron λ TyPeg1-1 y λ TyPeg1-2.

3.2.10.3 Preparación de stock de fago lambda.

Para obtener una solución stock del fago λ recombinante se sembró el clon en una concentración tal que resultó en una placa de LBA con placas de lisis confluentes. Se cubrió con solución SM y se incubó con agitación suave por 2 horas a 4°C. El eluido se recolectó se agregó cloroformo hasta una concentración final de 0.2%. Se agitó fuertemente por 10min, luego se centrifugó a >10.000g para eliminar detritus celulares. El sobrenadante (“cleared lysate”) se tituló y se guardó como solución stock a 4°C. Una alícuota se llevó a 7% DMSO y se guardó como solución stock a -70°C para almacenamiento por largos períodos de tiempo. El mismo procedimiento descrito anteriormente, pero ahora utilizando un volumen mayor de eluido, se utilizó para preparar ADN recombinante.

3.2.11 Extracción de ADN de fago λ Fix II.

Soluciones: tampón L1: 10 mM EDTA; 0.2 mg/ml BSA; 20 mg/ml RNasa A; 6mg/ml

DNasa I

Tampón L2: 30% polietilenglicol (PEG 6000); 3 M NaCl

Tampón L3: 25 mM EDTA

Tampón L4: 4% SDS

Tampón L5: 3 M acetato de potasio, pH 5.5

Tampón QBT (tampón de equilibrio): 750 mM NaCl; 50 mM MOPS, pH 7.0; 15 % isopropanol; 0.15 % Triton® X-100

Tampón QC (tampón de lavado): 1.0 M NaCl, 50 mM MOPS, pH 7.0; 15% isopropanol

Tampón QF (tampón de elusión): 1.25 M NaCl, 50 mM Tris-Cl, pH 8.5; 15% isopropanol

La extracción del ADN del clon de fago λ positivo para Peg1, se realizó utilizando "QIAGEN Lambda Maxi Kit", basado en la precipitación de las partículas virales por PEG seguido de una cromatografía de intercambio aniónico. Para ello, a las placas de 137 mm de diámetro con placas confluentes de lisis (3.2.10.3) se les agregó 10 ml de tampón SM y se eluyó con agitación suave a 4°C por 4 horas. El eluido se transfirió a un tubo estéril. Se agregó 200 μ l de tampón L1. El tampón L1 contiene DNAsa y RNAsa, por lo que se digirió el ARN y ADN cromosómico de las bacterias. Luego se incubó a 37°C por 30 min. Después de la incubación se agregó 25 ml de tampón L2 frío. Se incubó en hielo por 60 min. para precipitar las partículas virales. Luego de la incubación se centrifugó a >10.000g por 10 min y se descartó el sobrenadante. El sedimento, que contiene las partículas virales se resuspendió en 3 ml de tampón L3 utilizando una pipeta para perturbar el sedimento. Una vez resuspendido, se agregó 3 ml de tampón L4 al sedimento y se mezcló suavemente para liberar el ADN recombinante y precipitar las proteínas bacterianas. Se incubó a 70°C por 20 min y luego se enfrió en hielo. Se agregó 3 ml de tampón L5, y se mezcló inmediatamente invirtiendo el tubo 4-6 veces. Se centrifugó la mezcla a >15.000 g y 4°C por 30 min. El sobrenadante se transfirió a

un tubo estéril y se repitió el paso anterior por 10 min. Se equilibró la columna (proporcionada por el kit) y se agregó el sobrenadante obtenido en los pasos previos, quedando el ADN retenido en la columna. Se hizo pasar por gravedad por la columna una solución de lavado (tampón QC) y se eluyó el ADN de la columna con el tampón QF a un tubo limpio. El ADN se precipitó agregando 1 volumen de isopropanol a temperatura ambiente. Se centrifugó a 15.000g por 30 min a 4°C. Cuidadosamente se decantó el sobrenadante. Se lavó el ADN con etanol 70% y se centrifugó a 15.000g por 10 min. Cuidadosamente se decantó el sobrenadante. El ADN se dejó secar al aire por 10 min y se resuspendió el ADN en 50 µl de tampón TE pH 8.0.

3.2.12 Análisis *in silico* de las secuencias nucleotídicas.

Las secuencias del exón 9 – intrón – exón 10 de Peg1 para las cuatro especies de roedores se alinearon utilizando el programa Clustal X (Thompson et al. 1997) y revisadas por inspección visual. Se construyó una matriz de distancia utilizando el programa MEGA3.1 (Kumar et al., 2004). El tiempo de divergencia entre las secuencias fue calculado utilizando el programa Timer (Glazko y Nei, 2003). Calibrado frente al caviomorfo más ancestral, cuyo fósil data de 37.5 Ma, se utilizó como tasa de mutación 0.75% Ma. (Gallardo, 2001).

Todas las reconstrucciones filogenéticas se realizaron utilizando el programa PAUP* 4.0b2 (Swofford, 1999). Como grupo externo se utilizó la secuencia de *Mus musculus* para Peg1 en la región estudiada (Número de acceso Genebank: AF 017994). En todos los análisis los “gaps” se consideraron como datos faltantes. Para el análisis de distancia se utilizó el algoritmo de unión al

vecino (*“Neighbour Joining”*; Saitou & Nei, 1987). Para la estimación de la distancia genética se utilizó el modelo de Kimura dos parámetros (Kimura, 1980). El soporte de los nodos individuales se estimó a través de 1.000 iteraciones bootstrap (Felsenstein, 1985). Para el análisis de máxima parsimonia (MP) se utilizó la opción de búsqueda heurística. El soporte de los nodos individuales se estimó a través de 1.000 iteraciones bootstrap. Para el análisis de máxima verosimilitud (ML) se determinó el modelo de sustitución más adecuado para el conjunto de datos utilizando el programa Modeltest 3.6 (Posada y Crandall, 1998). El análisis de máxima verosimilitud se realizó utilizando todos los parámetros del modelo obtenido (HKY+G). El soporte de los nodos individuales se estimó a través de 100 iteraciones bootstrap.

4. RESULTADOS

4.1 Secuencias Peg1 específicas de octodóntidos

Para obtener secuencias Peg1 específicas se preparó ADN genómico desde tejido de las especies *T. barrerae*, *P. aureus*, *O. mimax* y *O. gliroides*. La concentración de ADN fluctuó entre 1.0 mg/ml y 1.2 mg/ml. La razón A_{260}/A_{280} fue en general mayor a 1.5, que sugiere ADN libre de contaminación por proteínas. La integridad y pureza de una alícuota de ADN genómico de *T. barrerae* se aprecia por el alto peso molecular sin muestras de degradación o contaminación en el gel de agarosa (Fig. 1). Con este resultado se aseguró un templado intacto para la siguiente amplificación de secuencias del gen Peg1 de las distintas especies.

Secuencias parciales de Peg1 se obtuvieron por PCR con los oligonucleótidos TyPeg1s y TyPeg1r (ver 3.2.3) a partir de ADN genómico de las distintas especies de octodóntidos, En *T. barrerae*, *P. aureus* y *O. mimax* se obtuvo un fragmento de 1100 pb., en *O. gliroides* se observa un fragmento con un tamaño molecular 100 pb superior aproximadamente (Figura 2). Así también, se observa la ausencia de cualquier tipo de amplificación inespecífica, lo que sugiere que éste fragmento corresponde a la secuencia Peg1 específica. La total ausencia de señal en el control negativo, esto es, sin ADN templado, permite descartar la presencia de ADN genómico contaminante (Fig. 2B, carril 3).

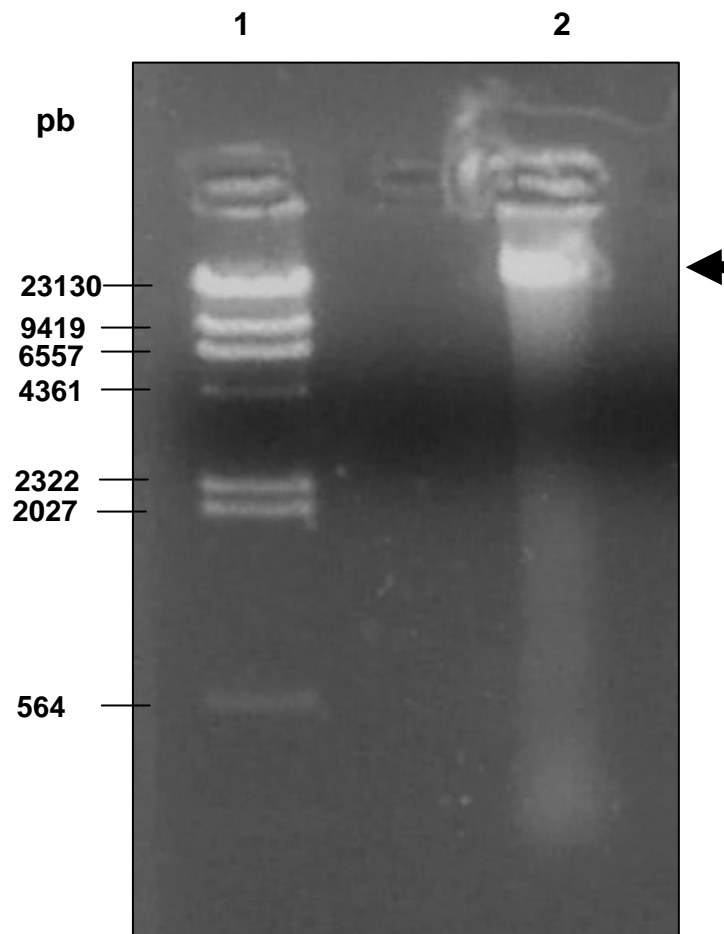


Figura 1:

ADN genómico de *T. barrerae* fraccionado en gel de agarosa al 1%.

Carril 1: estándar de tamaño molecular λ /*Hind*III (250 ng); carril 2: DNA genómico de *T. barrerae* (1 μ g). La flecha indica el ADN genómico de alto peso molecular.

Los productos de amplificación por PCR se clonaron para su posterior secuenciación y se tomaron en general 20 clones positivos y se secuenciaron los que presentaban el inserto de tamaño esperado (1100 pb).

Se preparó al ADN plasmidial recombinante de pTyPeg1-1 de *T. barrerae*, pPaPeg1-1, pPaPeg1-2, pPaPeg1-3, pPaPeg1-4, pPaPeg1-5, pPaPeg1-6, pPaPeg1-7, pPaPeg1-8, de *P. aureus*, pOmPeg1-1, pOmPeg1-2, pOmPeg1-3, pOmPeg1-4 de *O. mimax*, pOgPeg1-1 y pOgPeg1-2 de *O. gliroides*. Como ejemplo se muestra pTyPeg1-1 y pOmPeg1-1 digerido con *EcoRI* (Fig 3). Se obtuvo la secuencia con el siguiente análisis de alineamiento de dos recombinantes para *T. barrerae*, cinco para *P. aureus*, cuatro de *O. mimax* y dos de *O. gliroides*. Cabe señalar que éstas secuencias corresponden a las que presentaban un bajo número de "N" en su secuencia nucleotídica y que el número de nucleótidos secuenciados correspondía al tamaño observado en los geles de agarosa.

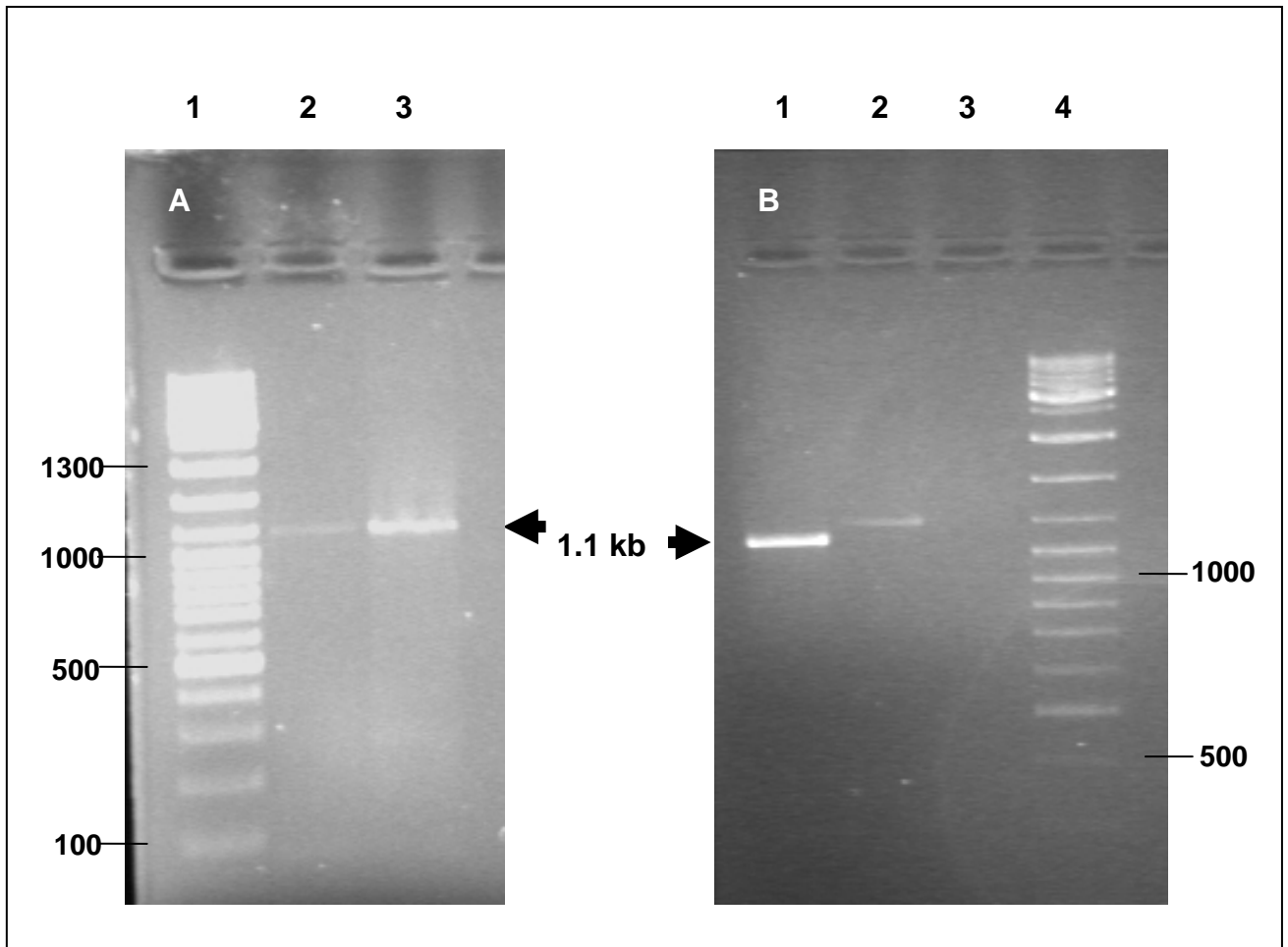


Figura 2:

Productos de PCR Peg1 específicos utilizando DNA genómico como templado fraccionados en gel de agarosa 1.5% teñido con EtBr.

A) Carril 1: estándar de tamaño molecular 100 pb. (250 ng); carril 2: *O. mimax*; carril 3: *P. aureus*. B) Carril 1 : *T. barrerae*; carril 2: *O. gliroides*, carril 3: control negativo; carril 4: estándar de tamaño molecular 100 pb (250 ng).

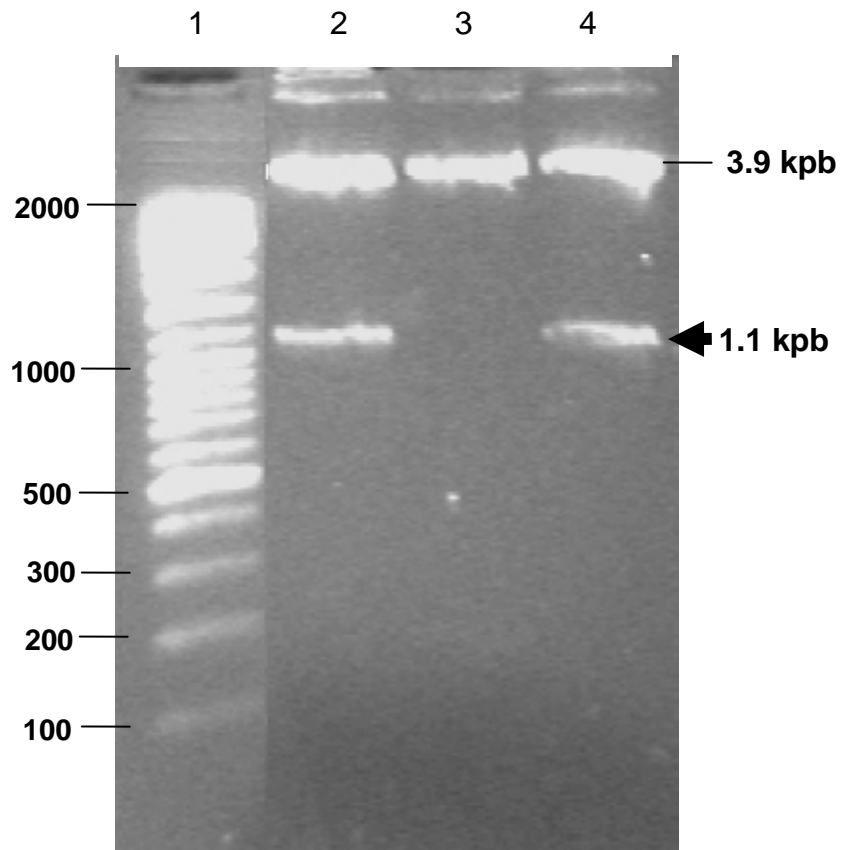


Figura 3:

Caracterización del DNA pTyPeg1-1 por digestión y fraccionamiento en gel de agarosa. Carril 1: estándar de tamaño molecular 100pb (250 ng); carril 2: pTyPeg1-1/ *EcoRI* ; carril 3: pTyPeg1-1; carril 4: pOmPeg1-1/*EcoRI*. La flecha indica el inserto liberado se 1.1 kpb de secuencia Peg1 específica.

4.2 Región génica que contiene Peg1 aislada desde biblioteca genómica de *T. barrerae*.

Para obtener secuencias de Peg1, gen de copia única, se rastrearon 150.000 pfu de de la subbiblioteca número 3 de *T. barrerae* y se eligieron dos clones positivos al rastreo. λ TyPeg1-1 y λ TyPeg1-2. Se eligió el primero para ser caracterizado. Para comprobar que el fago aislado contiene secuencias Peg1 específicas se realizó una reacción de PCR con partidores Peg1 específicos. El producto de tamaño esperado indica que hay secuencias génicas de la región alrededor del exón9 y 10 en éste recombinante λ TyPeg1-1. (Fig. 4).

Una vez completamente purificado λ TyPeg1-1, esto es, después de cuatro rondas de rastreo (“plaque purified”), se preparó ADN λ TyPeg1-1 a partir de 50 ml de lisado obteniéndose 130 μ g del ADN (Fig 5).

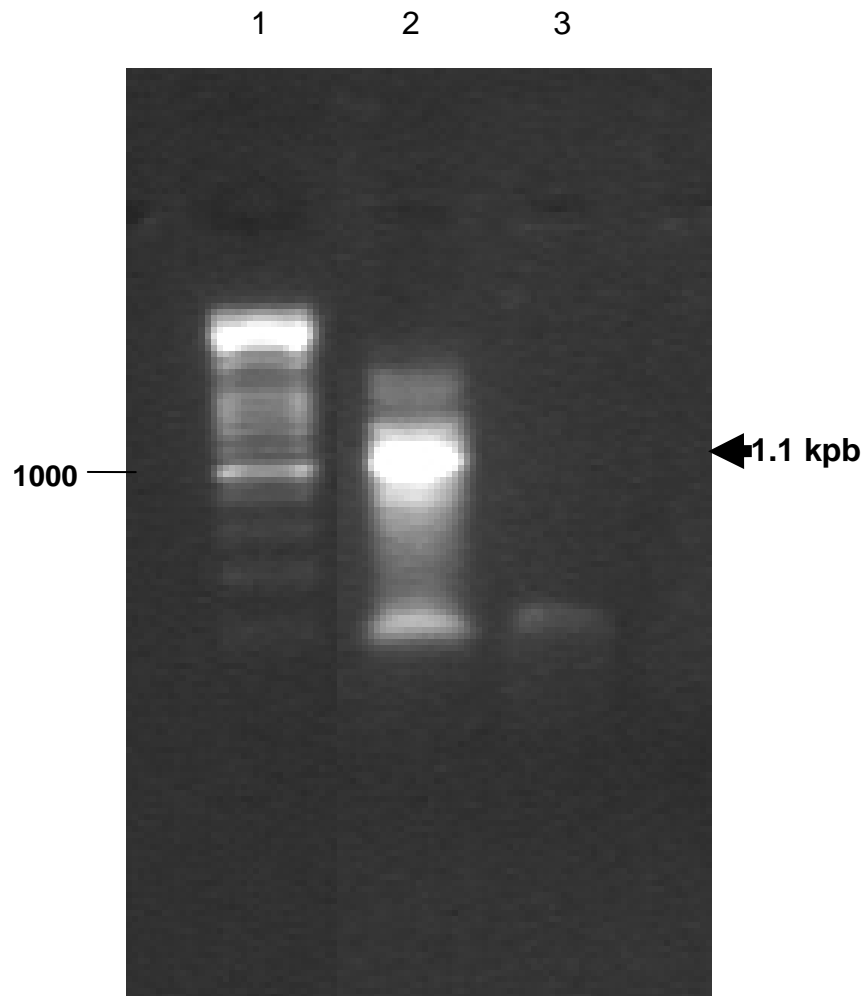


Figura 4:

Fragmento de ADN Peg1 específico amplificado a partir de solución de stock de λ TyPeg1-1 en gel de agarosa al 1,5 % teñido con EtBr.

Carril 1: estándar de tamaño molecular "GeneRuler DNA Ladder mix" (250ng); carril 2: Producto de amplificación con partidores Peg1 específicos con ADN templado λ TyPeg1-1; carril 3: control negativo sin templado. La flecha indica el tamaño esperado del producto amplificado.

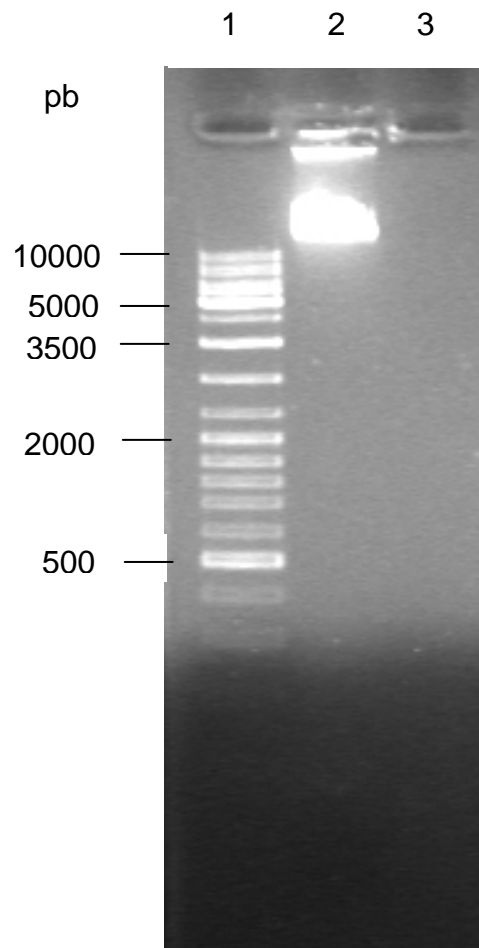


Figura 5:

ADN λ TyPeg1-1 en gel de agarosa al 1,0 % teñido con EtBr.

Carril 1: estándar de tamaño molecular "GeneRuler 1 Kb DNA Ladder mix" (250 ng); carril 2: ADN de λ TyPeg1-1 purificado (2.6 μ g).

4.3 Análisis comparativo de las secuencias nucleotídicas parciales del gen Peg1 de *T. barrerae*, *P. aureus*, *O. mimax* y *O. gliroides*.

Las secuencias de pTyPeg1-1, pPaPeg1-1 a pPaPeg1-8, pOmPeg1-1 a pOmPeg1-4, pOgPeg1-1 y pOgPeg1-2 se alinearon con el programa ClustalX. En los 1179 nucleótidos se identificaron 48 sitios variables en los sitios número 53, 60, 107, 155, 157, 260, 290, 302, 312, 313, 315, 317, 319, 354, 357, 358, 365, 366, 373, 376, 391, 413, 419, 451, 469, 480, 490, 497, 501, 514, 530, 533, 547, 560, 616, 657, 687, 692, 707, 743, 763, 827, 847, 850, 988, 1035, 1063, 1099, de los cuales 44 fueron parsimoniosamente informativos, esto es excluyendo los sitios 157, 501, 657 y 988. Considerando los resultados, la mayor parte de los sitios variables se encuentra en la zona intrónica entre los exones 9 y 10 (Fig. 6) como se observa en el alineamiento presentado en el Anexo 1. La numeración de las secuencias utilizadas corresponde al número del clon secuenciado. Para el caso de la secuencia Peg1 de *O. gliroides* el tamaño mayor observado en los geles de agarosa se confirma a nivel de secuencia por una inserción de 113 nucleótidos ubicada entre los sitios 936 a 1049 inclusive. La secuencia de 113 nucleótidos es reconocida por la base de datos BLAST como zona cromosómica de distintos cromosomas de *Mus musculus*, sin presentar un marco de lectura abierto. Con las secuencias parciales de ésta región del gen Peg1 de las distintas especies se construyó la matriz de distancia con el programa MEGA3.1 (Fig. 7). Algunos de los sitios que permiten agrupar a las especies por su nivel de ploidía (i) se muestran en la figura 8. Además se destaca la región ubicada entre los sitios 1118 a 1123 inclusive, que presenta una repetición corta en tándem del tipo TATATA que podría ser utilizada en estudios poblacionales (Fig 8).

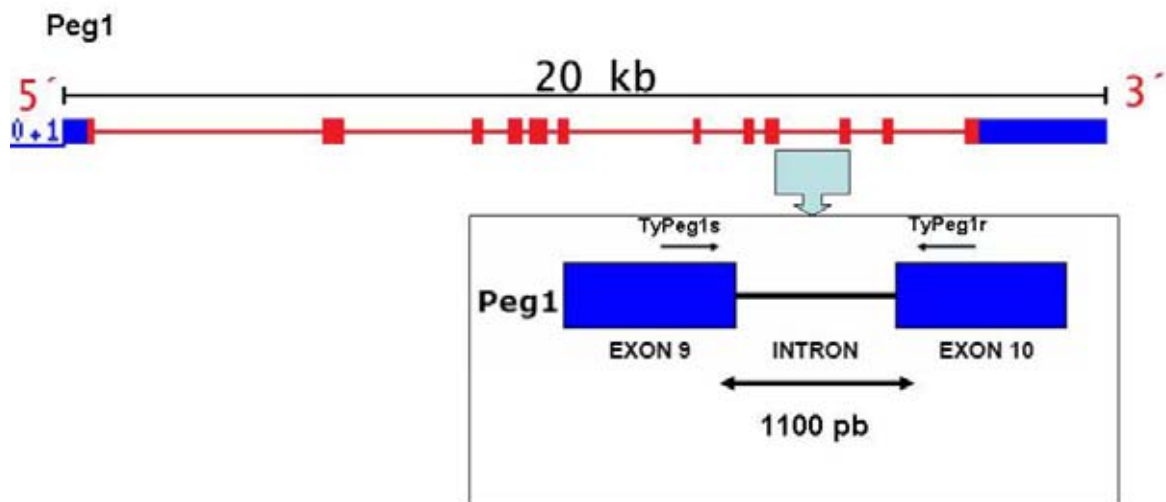


Figura 6:

Esquema de la región de Peg1 secuenciada y ubicación de los partidores utilizados. TyPeg1s 5'-aatgatgggracttggcatagac-3' ;

TyPeg1r 5'-actgggaacagtgacagaggcaagcgc-3'.

Secuencia	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
1.Peg1Tym00												
2.Peg1Tym01	0.000											
3.Peg1Pipa02	0.009	0.009										
4.Peg1Pipa04	0.009	0.009	0.000									
5.Peg1Pipa05	0.009	0.009	0.000	0.000								
6.Peg1Pipa06	0.007	0.007	0.001	0.001	0.001							
7.Peg1Pipa08	0.009	0.009	0.000	0.000	0.001							
8.Peg1Og01	0.017	0.017	0.042	0.042	0.043	0.042						
9.Peg1Og02	0.021	0.021	0.049	0.049	0.050	0.049	0.001					
10.Peg1Om01	0.035	0.035	0.019	0.019	0.015	0.019	0.091	0.105				
11.Peg1Om02	0.035	0.035	0.019	0.019	0.015	0.019	0.091	0.105	0.000			
12.Peg1Om03	0.026	0.026	0.013	0.013	0.013	0.009	0.013	0.079	0.091	0.001	0.001	
13.Peg1Om04	0.035	0.035	0.019	0.019	0.019	0.015	0.019	0.091	0.105	0.000	0.001	0.001

Figura 7:

Matriz de distancia Kimura 2 parámetros (K2P) construída en MEGA

3.1 a partir del análisis de las secuencias de Peg1. Los valores de distancia representan la similitud entre las especies en estudio y fluctúan entre 0 y 1, donde 0 corresponde a identidad total y 1 al 100% de diferencia entre las secuencias. Tym: *Tympanoctomys barrerae*, Pipa: *Pipanoctomys aureus*, Og: *Octodontomys gliroides*, Om: *Octomys mimax*.

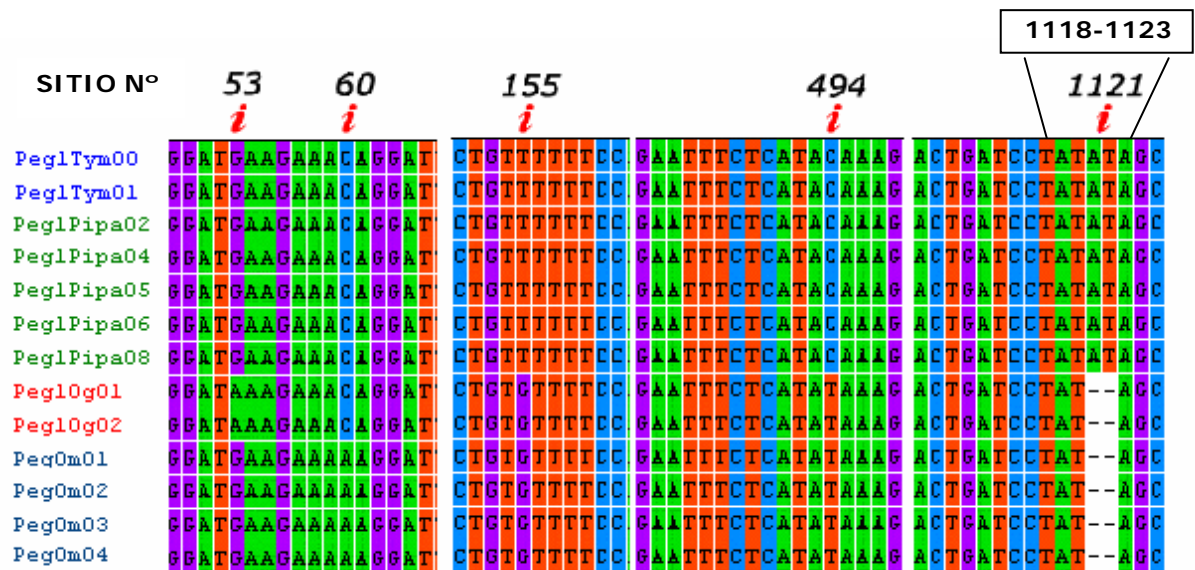


Figura 8:

Alineamiento de secuencias Peg1. Se indican algunos de los sitios informativos (*i*), que permiten diferenciar las secuencias por nivel de ploidía en octodóntidos. Tym: *Tympanoctomys barrerae*, Pipa: *Pipanaoctomys aureus*, Og: *Octodontomys gliroides*, Om: *Octomys mimax*. Los números corresponden a la posición en la secuencia de referencia Peg1Tym00. Número de acceso: AY839646.

4.4 Análisis filogenético de las secuencias Peg1 de octodóntidos

El análisis filogenético de las secuencias *Peg1* parciales de octodóntidos se realizó como se describió en el acápite 3.2.13. Todos los análisis se hicieron utilizando el programa PAUP 4.0b2. Como grupo externo se utilizó a *O. gliroides*. El árbol filogenético construido utilizando el análisis de distancia de las secuencias Peg1 (Fig. 9) muestra que las especies tetraploides *T. barrerae* y *P. aureus* se ubican en clados hermanos con un valor de bootstrap de 100%. Para el intercambio de las ramas se utilizó la opción de búsqueda heurística utilizando el algoritmo de unión al vecino. El soporte de los nodos individuales se evaluó por 1000 iteraciones bootstrap y sus valores se representan sobre las ramas del árbol (Fig. 9).

También se realizó un análisis de máxima parsimonia (MP) utilizando la opción de búsqueda heurística (Fig. 10). El soporte de los nodos individuales se estimó a través de 1000 iteraciones bootstrap. Se definió como grupo externo a *O. gliroides*. La topología es similar a la obtenida en el árbol elaborado utilizando el criterio de distancia. Las especies tetraploides *T. barrerae* y *P. aureus* se ubican en clados hermanos con un valor de bootstrap de 100% (Fig. 10).

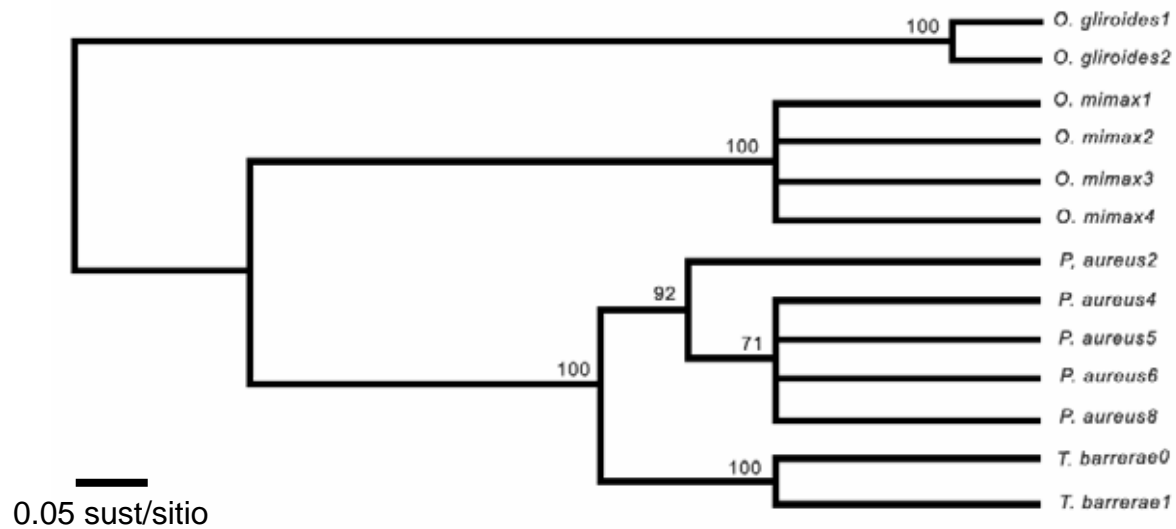


Figura 9:

Dendrograma de distancia de *Peg1* usando el modelo de Kimura dos parámetros (K2P). La barra indica la relación de sustituciones por sitio representadas como largo de las ramas. El soporte de los nodos individuales se evaluó por 1000 iteraciones bootstrap y sus valores se representan sobre las ramas del árbol

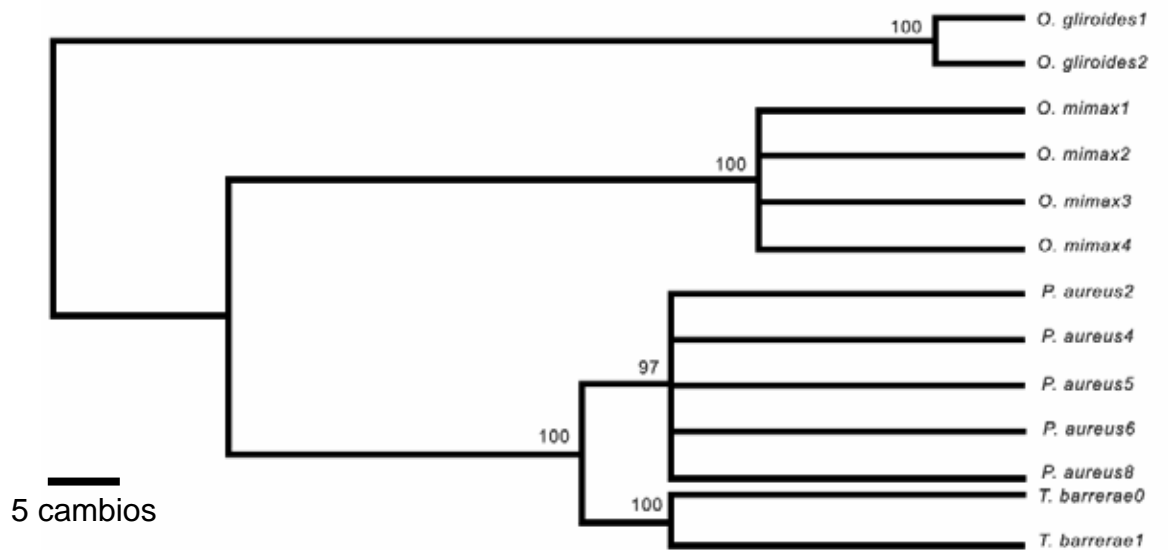


Figura 10:

Árbol filogenético basado en secuencias Peg1 analizadas por máxima parsimonia (MP). Se definió como grupo externo a *O. gliroides*. El árbol tiene 51 pasos, un índice de consistencia (CI) de 1.0, un índice de homoplasia (HI) de 0 y un índice de retención de 1.0. El soporte de los nodos individuales se evaluó por 1000 iteraciones bootstrap y sus valores se representan sobre las ramas del árbol. La barra indica el número de cambios nucleotídicos.

La consistencia de los análisis se evaluó definiendo un nuevo grupo externo, que en este caso fue *Mus musculus* (Fig. 11). Para el nodo de las especies tetraploides, se observa un valor bootstrap más bajo (75%; Fig. 11) que el valor obtenido para el árbol de MP construido utilizando *O. gliroides* como grupo externo (100%; Fig. 10). Sin embargo, la topología del árbol se mantiene invariante con respecto al método de distancia usado como criterio de optimización.

Para el análisis de máxima verosimilitud (ML) también se utilizó la opción de búsqueda heurística. El modelo evolutivo de sustitución más adecuado para el conjunto de datos definido por el programa Modeltest 3.6 fue HKY+G (modelo de Hasegahua-Kishino-Yano), el cual asume valores de frecuencia nucleotídica de A=0.26060 C=0.21680 G=0.22080 T=0.30180 y una tasa de transición/transversión = 1.5079. El análisis de máxima verosimilitud se realizó utilizando todos los parámetros del modelo. El soporte de los nodos individuales se estimó a través de 100 iteraciones bootstrap. La topología del árbol es similar a la obtenida en los análisis de distancia y MP, es decir, se segregan las especies tetraploides de las diploides y corroboran los análisis anteriores (Fig. 12)

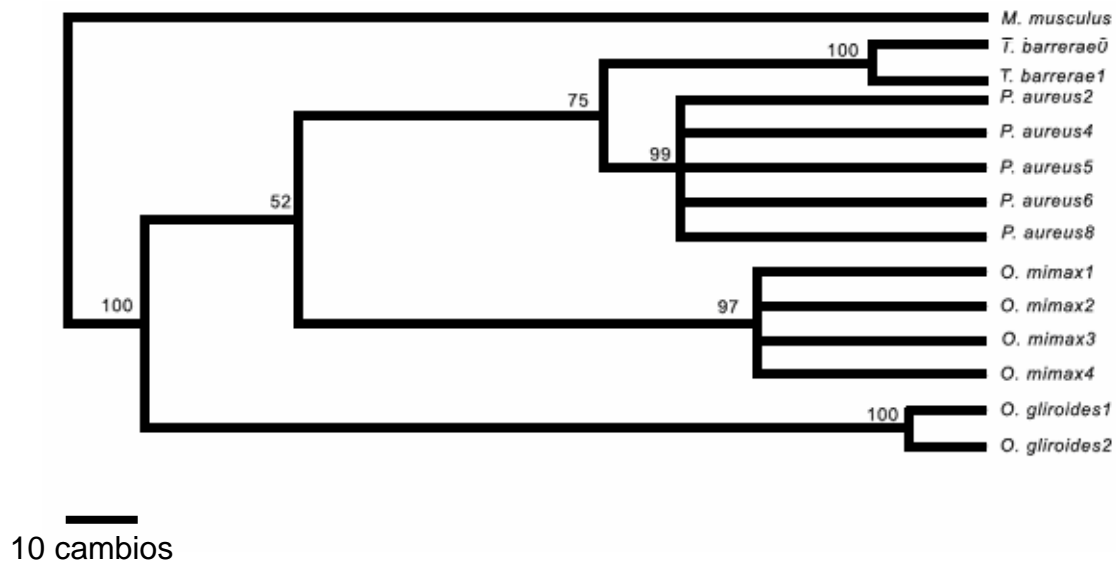


Figura 11:

Árbol filogenético basado en secuencias Peg1 analizadas por máxima parsimonia (MP) con búsqueda heurística. Se definió como grupo externo a *M. musculus*. El árbol tiene 707 pasos, un índice de consistencia (CI) de 0.98, un índice de homoplasia (HI) de 0.02 y un índice de retención de 0.93. El soporte de los nodos individuales se evaluó por 1000 iteraciones bootstrap y sus valores se representan sobre las ramas del árbol. La barra indica el número de cambios nucleotídicos representados como largo de las ramas.

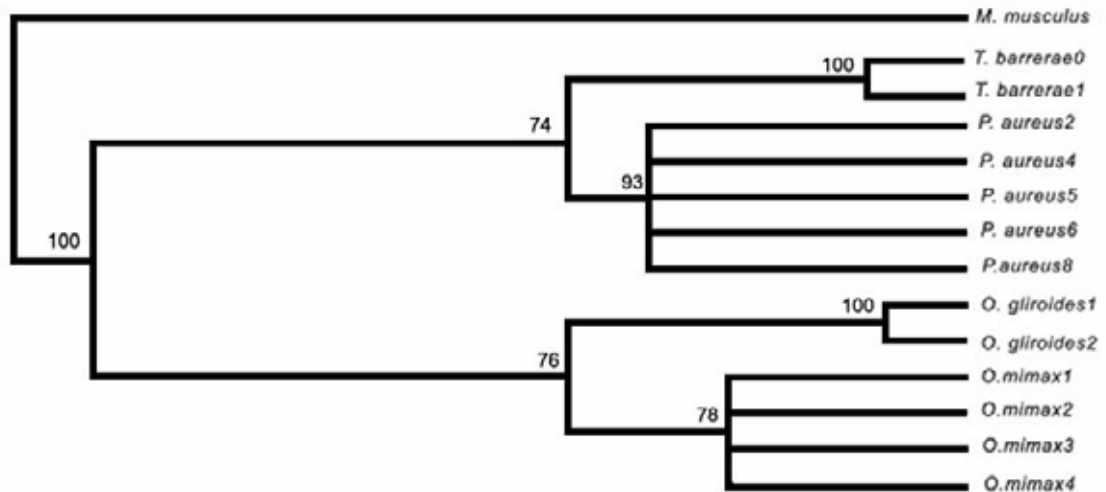


Figura 12:

Árbol filogenético basado en el análisis de secuencias Peg1 de octodóntidos por análisis de máxima verosimilitud (MI) de Peg1 utilizando como grupo externo a *Mus musculus* y el modelo de HKY+G definido según Modeltest 3.6. El soporte de los nodos individuales se evaluó por 100 iteraciones bootstrap y sus valores se representan sobre las ramas del árbol.

5. DISCUSION

El estudio de secuencias del gen Peg1 en las especies tetraploides *T. barrerae*, *P.aureus* y en las especies diploides cercanas *O. mimax* y *O. gliroides* permitió determinar su utilización eficaz como marcador filogenético. A su vez el rastreo del gen Peg1 en la biblioteca genómica de *T. barrerae* permitirá avanzar en la obtención de secuencias regulatorias para realizar estudios relacionados con la detección de regiones diferencialmente metiladas (DMR) en la zona promotora del gen. El tamaño del inserto en el vector de reemplazo varía de 9 a 22 Kb, estudios preliminares indican que el inserto de λ TyPeg1-1 es de 18 Kb aproximadamente (datos no mostrados). La exitosa obtención de secuencias Peg1 de mayor tamaño va a depender de la ubicación y orientación de la secuencia identificada por PCR. En ratón, la secuencia del gen completo tiene 20.11 kb con 12 exones. La zona promotora con secuencias DMR está 2 kb río arriba del inicio del sitio de inicio de la transcripción e incluye a los exones 1 y 2. (Li, 2002). Por lo tanto el clon λ TyPeg1-1 podría contener estas secuencias. Así también se podría utilizar como ADN sonda Peg1 específica para identificar la ubicación del gen en el complemento tetraploide de *T. barrerae* por FISH como ya se ha realizado con el gen Hox C8 (Cebrian, 2004).

La hipótesis propuesta sostiene que si el fragmento de Peg1 amplificado presentaba utilidad como marcador filogenético nuclear, los árboles de genes deben ser consistentes con las filogenias obtenidas utilizando otros marcadores nucleares y mitocondriales. Con ello me refiero específicamente el exón 10 del

receptor de la hormona del crecimiento, como marcador nuclear y el gen 12S como marcador mitocondrial (Honeycutt, 2002; Gallardo et al., 2004).

Los análisis filogenéticos utilizando el gen mitocondrial 12S ubican a *P. aureus* como grupo hermano a *T. barrerae* (Gallardo et al., 2004). Estas especies, junto a *O. mimax*, con el cual comparten un ancestro común, ocupan una posición basal entre los octodóntidos y forman un grupo hermano con el resto de los géneros de la familia (Honeycutt et al. 2003; Gallardo et al., 2004). A su vez, filogenias construidas utilizando secuencias del receptor de la hormona del crecimiento (GHR), otro marcador de origen nuclear, muestran la misma topología para estas especies. (Honeycutt, 2002; Gallardo et al., 2004). *O. gliroides* se ubica por fuera del grupo formado por *O. mimax*, *P. aureus* y *T. barrerae* (Fig 13, Honeycutt, 2002; Gallardo et al. 2004).

El análisis de los resultados comprueba la utilidad del marcador molecular Peg1 para estudios filogenéticos. En todos los árboles de genes construidos con secuencias génicas de Peg1 se observa una buena resolución del grupo estudiado y además son consistentes con los árboles de genes utilizados como comparación. Incluso la sola observación del alineamiento de las secuencias estudiadas permite agrupar a las especies tetraploides entre sí.

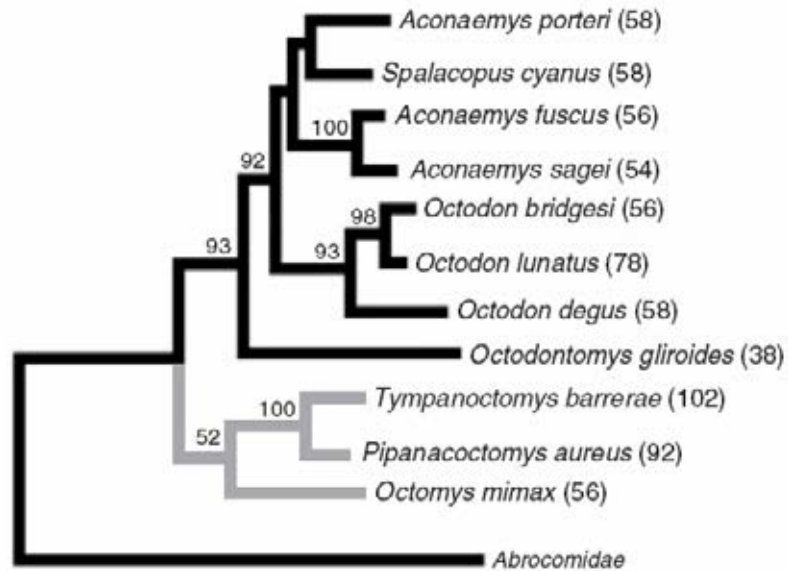


Figura 13. Relaciones filogenéticas utilizando secuencias del gen mitocondrial 12S. Las líneas grises corresponden a los especialistas de desierto. Adaptado de “*Whole-genome duplications in South American desert rodents (Octodontidae)*”. Gallardo et al., 2004. Los números entre paréntesis indican el número cromosómico, los números sobre las ramas de árbol, indican los valores de bootstrap.

Los análisis filogenéticos muestran que *Peg1* se encuentra conservado en el grupo de especies estudiadas, incluso en la secuencia intrónica observada, así entre las secuencias de *T. barrerae* y *P. aureus* la diferencia fue de un 0.5% y entre *T. barrerae* y *O. mimax* fue de 1.5%. Sin embargo las diferencias nucleotídicas, evaluadas a través de distancia genética, permiten discriminar adecuadamente a las especies estudiadas.

Tanto los análisis filogenéticos, como la determinación del tiempo de divergencia entre las especies son datos relevantes para la historia evolutiva de éstas (Opazo, 2005). Al respecto, utilizando una matriz de hibridación de ADN se determinó que el tiempo de divergencia entre *O. mimax* y *T. barrerae* es de 6.5 Ma, con una tasa de mutación de 0.75% / millón de años (Gallardo y Kirsch, 2001). Utilizando los genes 12S y GHR se determinó el tiempo de divergencia de 4.28 Ma entre *O. mimax* y el grupo compuesto por *T. barrerae* y *P. aureus* (Opazo, 2005). Asimismo, el tiempo de divergencia entre *P. aureus* y *T. barrerae* es 1.74 Ma (Opazo, 2005). Otro estudio utilizando el gen 12S, estimó el tiempo de divergencia para *O. mimax* y *T. barrerae* en 10.8 Ma y para el gen GHR la estimación fue de 5.0 Ma (Honeycutt, 2003). El tiempo de divergencia entre *P. aureus* y *T. barrerae* utilizando *Peg1* (acápite 3.2.13) fue de 1.3 Ma. De igual modo, la estimación fue de 4.06 Ma para la segregación entre *O. mimax* y los dos taxa tetraploídes. Por lo tanto el tiempo de divergencia para las especies utilizando *Peg1* es similar al obtenido por Opazo (2005). Sin embargo, distintos estudios no son directamente comparables, ya que la metodología utilizada difiere considerablemente (Tabla 1).

Tiempo de divergencia entre:	Gallardo & Kirsch (2001)	Honeycutt et al. (2002)	Opazo (2005)	Este estudio
<i>O. mimax</i> – taxa tetraploides	6.5 Ma	10.8 Ma (12S) 5.0 Ma (GHR)	4.28 Ma (GHR)	4.06 Ma (Peg1)
<i>P. aureus</i> – <i>T. barrerae</i>			1.74 Ma (GHR)	1.3 Ma (Peg1)
Metodología utilizada	Matriz de hibridización de ADN	Distancia genética K2P.	Análisis bayesiano a partir de filogenia de ML	Distancia genética. K2P

Tabla 1: Comparación de los resultados respecto a los tiempos de divergencia y datos publicados anteriormente. Entre paréntesis se indican las secuencias génicas analizadas.

Otra consideración que se debe tener en cuenta son las características del gen en cuestión (Kumar, 2002). Al respecto, la región de Peg1 estudiada presenta un 80% de secuencias intrónicas, por lo que se espera una tasa mayor de mutación que la calculada para regiones codificantes (Kumar, 2002). Las presunciones respecto de las tasas de mutación de regiones codificantes y no codificantes deben ser revisadas, ya que algunas regiones intrónicas presentan mayor nivel de conservación al ser comparadas con regiones codificantes (Ast, 2005).

La consistencia con las filogenias construidas con genes mitocondriales y nucleares (Honeycutt, 2002) y los altos valores de significancia estadística alcanzados permiten utilizar a la región estudiada de Peg1 como un marcador nuclear confiable en la construcción de árboles de genes en este grupo de

octodóntidos. Al respecto, las características que debe tener un buen marcador molecular están bien definidas de acuerdo a la problemática que se quiera abordar (Awise, 2004). Se considera que el marcador molecular debe tener una región conservada que permita diseñar partidores en las especies a estudiar y que a la vez presente una zona variable que permita diferenciar a las especies en cuestión (Arnason, 2002). La región de Peg1 estudiada cumple con estas características básicas como marcador nuclear. Sin embargo se hace necesario obtener secuencias de géneros más cercanos al grupo de especies estudiado para así poder definir un grupo externo que sea más adecuado para los estudios futuros. Se propone utilizar la secuencia del género *Abrocoma* por su ubicación basal respecto de las especies estudiadas.

La significancia biológica de la impronta no es clara (Murphy y Jirtle, 2003). La impronta genómica se ha detectado en angiospermas, marsupiales y mamíferos euterios (Reik, 2001). Se sostiene que la emergencia evolutiva de la impronta ocurrió en un ancestro común de los mamíferos vivíparos después de haber divergido de los monotremas (Murphy y Jirtle, 2003). La aparición y radiación de los vertebrados fue acompañada por la evolución de mecanismos de regulación génica a través de represión transcripcional como la impronta genómica (Bird, 2002). Estos eventos requieren de un incremento de la metilación, implicando un aumento de la actividad de las metiltransferasas (DNMTs) y de las proteínas de unión a dinucleótidos CpG (Bestor, 1990; Bird, 1995, 2002). La ausencia de metiltransferasas causa alteraciones en la expresión génica, al afectar el control del ciclo celular y la movilización de retroelementos (Jackson-Grusby et al., 2001).

La haploidía funcional provocada por la impronta genómica implica perder ventajas de la diploidía, que disminuyen el efecto deletéreo de las mutaciones recesivas (Spencer, 2000). El costo de la expresión monoalélica es alto, y para superar la presión selectiva, sus ventajas deben ser mayores que las desventajas que implica (Spencer, 2000; Wilkins and Haigs, 2003). Una explicación satisfactoria de la haploidía por impronta debe abarcar la heterogeneidad estructural de los genes que la presentan y sus efectos fenotípicos teniendo en consideración que la mayoría de los loci no presentan impronta (Wilkins y Haigs, 2003). Se han observado notables diferencias en la expresión de los genes con impronta dependiendo de su origen parental y del tejido en cuestión (Reik, 2001). En efecto la expresión de genes con impronta puede variar desde exclusivamente monoalélica a estrictamente bialélica en diferentes tejidos y etapas del desarrollo. Todos los genes con impronta se expresan bialélicamente al menos en un tejido, y en al menos una etapa del desarrollo (Paldi, 2003). Es factible que los alelos paternos de un gen con impronta difieran de los maternos en la probabilidad de inicio del proceso de transcripción debido a alteraciones cromatínicas (Pardo-Manuel de Villena et al., 2000; Ast 2005). De este modo, la impronta no sería un mecanismo de regulación génica, y la selección natural operaría sobre diferencias en la estructura de la cromatina según su origen parental (Pardo-Manuel de Villena et al., 2000). Con ello se facilitaría el apareamiento durante la meiosis, se mantendría la diferencia entre homólogos durante la reparación del DNA y se aseguraría la adecuada recombinación mitótica y meiótica. (Paldi, 2003). Respecto de la ventaja evolutiva de la impronta, la hipótesis de parentesco es la que tiene mayor apoyo y estudios (Wilkins and Haigs, 2003). En ella se identifican factores

que favorecen la expresión de los alelos dependiendo de su origen parental (Reik, 2001; Wilkins, 2005). La regulación en la expresión génica relacionada con el sexo del organismo sugiere que la impronta es una forma de adaptación tanto al medio ambiente paterno como materno (Wilkins, 2005). Consecuentemente se considera que la impronta es una forma especial de plasticidad genética. Considerando que es razonable que la selección actúe sobre los genes de acuerdo con el sexo del organismo (tal como lo hace en presencia de otros tipos de ambiente), estaríamos en presencia de un fenómeno de co-evolución antagónica en las estrategias de expresión en un locus específico (Wilkins, 2005). Sin embargo la tasa de evolución de las proteínas codificadas por genes con impronta no presentan valores por sobre lo normal (Reik, 2001). Por lo tanto la regulación de los genes con impronta habría evolucionado más rápido que las proteínas para las que codifican. Este fenómeno, que modifica patrones de expresión de genes con impronta ligados al desarrollo embrionario en distintas especies de mamíferos, habría contribuido a los mecanismos de especiación en éstos (Vrana, 1998).

La evolución por poliploidía asume que los vertebrados evolucionaron a través de mecanismos de duplicación genómica que habrían jugado un rol fundamental en la generación de diversidad genética y complejidad orgánica (Ohno, 1970; Wendel, 2000). La poliploidía ha jugado un rol significativo en la historia evolutiva de plantas, vertebrados y otros eucariotas, ya que favorece la rápida adaptación de los organismos a nuevos ambientes (Wendel, 2000; Comai, 2005). La poliploidización se ha propuesto como un proceso altamente dinámico, que constituye una de las principales fuerzas evolutivas en angiospermas, siendo

la forma más drástica y eficiente para expandir el tamaño del genoma ya que se supone que el 50% de ellas tienen su genoma duplicado (Otto y Whitton, 2000).

Desde un punto de vista molecular, se considera que los humanos y otros vertebrados serían antiguos poliploides, ya que más de cincuenta familias de genes, (desde las aldolasas hasta los factores de transcripción con dedos de zinc) se encuentran presentes en copia simple en invertebrados, mientras su equivalente en vertebrados se encuentra en cuatro copias, ubicadas en distintos cromosomas (Spring, 1997). Dentro de los vertebrados, se han encontrado poliploides en varias especies de peces, anfibios y reptiles. La mayoría de los ejemplos corresponden a especies que muestran un modo de herencia partenogénico, carecen de cromosomas sexuales heteromórficos, o tienen un sistema laxo de determinación del sexo (Otto y Whitton, 2000). Elegantes estudios de genómica comparada han demostrado, recientemente, la duplicación genómica total de los teleósteos después de la divergencia con los mamíferos, determinando además que el número diploide ancestral de los vertebrados es 12 (Jaillon, 2004). A su vez, se ha determinado un alto nivel de sintenia entre los genes de *Zebrafish* y otros vertebrados incluyendo el humano (Postlethwait, 2000).

Investigaciones sobre evolución génica en poliploides relacionan fuertemente a los procesos epigenéticos con la adquisición de nuevas funciones en los genes duplicados (Rodin y Riggs, 2003). La duplicación genómica contribuye a la diversificación de las especies a través de la pérdida o silenciamiento de copias extra de genes en mayor medida que a través de la generación de nuevas funciones (Lynch y Conery, 2000).

La evolución de los genes duplicados puede tener tres destinos: 1) una copia puede ser silenciada a través de mutaciones degenerativas o fenómenos epigenéticos, 2) una copia puede adquirir una nueva función y ser perpetuada por selección natural, mientras la otra continúa cumpliendo con su función original y 3) ambas copias pueden presentar mutaciones que reducen su expresión (Prince y Pickett, 2002; Rodin y Riggs, 2003).

Para obtener una ventaja adaptativa por alopoliplidía se deben sobrepasar las barreras relacionadas con la fertilidad (Comai, 2005). Se ha observado disrupción de la impronta genómica en roedores híbridos interespecíficos del género *Peromyscus*, lo que vincula este mecanismo epigenético con aislamiento reproductivo (Vrana, 1998). Al respecto se ha propuesto que la base molecular de la esterilidad de los híbridos estaría dada por las diferencias en la impronta de los genes que se expresan en las células germinales (Comai, 2005). En alopoliploides los cambios en la metilación de los sitios CpG no sólo se encuentran asociados con una alteración de la expresión génica, sino también con la aparición de regiones metiladas en secuencias no codificantes y/o anónimas (Ma, 2005). En la mayoría de los casos, un aumento en la cantidad de sitios CpG metilados se asocia con la alopoliploidía, sin embargo también puede ocurrir desmetilación (Ma, 2005). Sin embargo estudios en algodón alopoliploide no mostraron ninguna diferencia respecto de los patrones de metilación, lo que ratifica que los patrones de metilación en la impronta genómica son especie-específicos (Ma, 2005).

En mamíferos ancestrales el mecanismo de compensación de dosis habría estado regulado por la impronta, para luego evolucionar al mecanismo de

inactivación al azar del cromosoma X en células somáticas por la presión selectiva ejercida en la obtención de nutrientes en el desarrollo embrionario (Reik, 2005). La teoría predice que bajo el sistema de determinación de sexo XY que poseen los mamíferos, la mayoría de la progenie de individuos tetraploides sería estéril o inviable, como consecuencia de la alteración del mecanismo regulatorio sensible al cambio en la compensación de dosis (Wendel, 2000). Estudios recientes muestran la existencia de una estrecha relación evolutiva entre la impronta genómica y la inactivación del cromosoma X (Reik, 2005). En la mayoría de los mamíferos el cromosoma Y es pequeño y contiene pocos genes, en contraste con el cromosoma X que contiene una cantidad mucho mayor de genes. En hembras de mamíferos los dos cromosomas X son similares en morfología, sin embargo sólo uno de ellos es activo transcripcionalmente en células somáticas, fenómeno conocido como inactivación del cromosoma X (Lyon, 1999). Los cromosomas sexuales evolucionarían a partir de un par de autosomas, uno de los cuales adquiere un gen determinante del sexo (Marin, 2000), en este punto los niveles transcripcionales de los cromosomas sexuales comienzan a diferir entre machos y hembras, por lo tanto, se debe compensar los niveles transcripcionales de ambos sexos (Reik, 2005). A pesar de que el fenómeno de inactivación del X pareciera ser universal, ha sido demostrado sólo en mamíferos placentados y marsupiales (Reik, 2005). Justamente, el mecanismo de regulación transcripcional por impronta es específico de los mamíferos placentados (Reik, 2005).

El descubrimiento de tetraploidía en roedores ha revolucionado todas las ideas previas acerca de las limitaciones impuestas por el sistema genético de los mamíferos (Gallardo et al., 1999). Un proceso tan relevante como la impronta

genómica es importante en relación a la regulación genómica del material genético redundante en *T. barrerae* (Bacquet, 2004). y la relación entre impronta con la fertilidad de los alotetraploides. El hecho de que *T. barrerae* y *P. aureus* presenten tetraploidía (Gallardo, 1999; 2004) y que su duplicación genómica hubiese ocurrido por hibridización interespecífica abre nuevas interrogantes respecto de la regulación del material genético redundante en mamíferos (González, 2005). Estudios anteriores del gen Peg1 en *T. barrerae* demostraron que el mecanismo de control epigenético mediante impronta genómica, está presente en esta especie (Bacquet, 2004). En estos estudios se detectó que sólo una de las tres copias encontradas de Peg1 en *T. barrerae* se expresa en embriones (Bacquet, 2004). Al respecto, el aislamiento del gen Peg1 desde la biblioteca genómica de *T. barrerae* permitirá realizar estudios más detallados respecto de las zonas diferencialmente metiladas, la impronta y el papel que desempeña ésta en la regulación del material genético redundante en las especies tetraploides. Se propone determinar los niveles de actividad de las enzimas DNMTs, que metilan los dinucleotidos CpG, en las especies poliploides estudiadas y sus especies diploides cercanas, para inferir de manera indirecta si existe alguna diferencia en los patrones de metilación relacionados al nivel de ploidía.

6. CONCLUSION

Los partidores utilizados permiten amplificar con éxito la región exón9 – intrón – exón 10 de Peg1/MEST en cuatro especies distintas de octodóntidos. El fragmento tiene un tamaño de 1063 nucleótidos, excepto para *O. gliroides* cuyo tamaño es de 1176 nucleótidos.

El rastreo en la biblioteca genómica de *T. barrerae* del secuencias génicas del gen Peg1 permitirá obtener su secuencia completa y luego secuencias regulatorias para estudios mas detallados del fenómeno epigenético en esta especie.

La matriz de distancia muestra la potencial utilidad de secuencias de Peg1 como marcador nuclear para la identificación de especies, ya que la diferencia encontrada entre los octodóntidos permite diferenciar una especie de otra.

Al comparar las secuencias obtenidas, se puede agruparlas por nivel de ploidia, es decir, la simple observación permite diferenciar las secuencias de *T. barrerae* y *P. aureus* del resto de las especies.

Los árboles filogenéticos obtenidos obtenidos mediante los tres criterios utilizados muestra la potencial utilidad de secuencias del gen Peg1 como marcador nuclear para estudios filogenéticos, ya que presenta consistencia con filogenias realizadas mediante marcadores mitocondriales y nucleares en el grupo de los octodóntidos (12S, GHR, cyt b). Los altos niveles de bootstrap en todos los análisis permiten concluir que los árboles filogenéticos construidos son confiables a nivel estadístico.

Finalmente el estudio más detallado de este gen en las especies tetraploides (*T. barrerae* y *P. aureus*) podría entregar información sobre la regulación epigenética de sus genomas duplicados.

7. BIBLIOGRAFIA

- Arnason et al. (2002) Mammalian mitogenomic relationships and the root of the eutherian tree. *PNAS*. 99, 8151-8156.
- Ast, G. (2005). The Alternative Genome. *Sci. Amer.* 58-65.
- Avise, John C. (2004) Molecular Markers, Natural History, and Evolution. *Sinauer Associates; 2nd edition*
- Bacquet, C. (2003). Impronta genómica del gen *peg1* en el roedor tetraploide *Tympanoctomys barrerae* (Rodentia, Octodontidae). *Tesis para optar al grado de Lic. Bioquímica.. Universidad Austral de Chile (UACH). Valdivia, Chile.*
- Bartolomei, M. (1997). Genomic imprinting in mammals. *Annu. Rev. Genet.* 31, 493-525.
- Bestor T., Laudano A., Mattaliano R., Ingram V. (1988). Cloning and sequencing of a cDNA encoding DNA methyltransferase of mouse cells. The carboxyl-terminal domain of the mammalian enzymes is related to bacterial restriction methyltransferases. *J. Mol. Biol.* 203, 971-983.
- Bestor, TH (1990). DNA methylation: Evolution of a bacterial immune function into a regulator to gene expression and genome structure in higher eukaryotes. *Phil Trans R Soc Lond B* 326, 179-187
- Bird, A. (1985). Gene number, noise reduction and biological complexity. *Trends Genet.* 11, 94-100
- Bird, A. (2002). DNA methylation patterns and epigenetic memory. *Genes Develo.* 16, 6-21.

- Cebrian, I. (2004) Aislamiento y caracterización molecular y citogenética del enhancer temprano del gen Hoxc8, en el roedor tetraploide *Tympanoctomys barrerae* (Rodentia, Octodontidae). *Tesina de graduación. Universidad Nacional de Misiones. Facultad de Ciencias Exactas, Química y Naturales.*
- Comai, L. (2000). Genetic and epigenetic interactions in allopolyploid plants. *Plant. Mol. Biol.*, 43, 387-399.
- Comai, L. (2005). The advantages and disadvantages of being polyploid. *Nat. Rev. Gen.*, 6, 836-846.
- Eckardt, N.A. (2001). A sense of self: The role of DNA sequence elimination in allopolyploidization. *Plant Cell*, 13, 1699-1704.
- Engel, E. (2000). Genomic Imprinting and Uniparental Disomy in Medicine: Clinical and Molecular Aspects. *Wiley Publishers.*
- Felsenstein, J. (1985). Confidence limits on phylogenies: An approach using the bootstrap. *Evolution*, 39, 783-791.
- Ferguson-Smith, A. and Surani, M. (2001). Imprinting and the epigenetic asymmetry between parental genomes. *Science*, 293, 1086-1089.
- Gallardo, M. H., Bickham, J.W., Honeycutt, R.L., Ojeda, R.A. and Köhler, N. (1999). Discovery of tetraploidy in a mammal. *Nature*, 401, 341.
- Gallardo, M. H. and J.A.W. Kirsch. (2001) .Molecular relationships among Octodontidae (Mammalia: Rodentia: Caviomorpha). *J. of Mamm. Evol.* 8. 73-89.

- Gallardo, M.H. (2004). Whole genome duplications in South American desert rodents (Octodontidae). *Biol. J. Linnean Soc.*, 82, 443–451.
- Glazko, G. V. and M. Nei (2003) Estimation of divergence times for major lineages of primate species. *Mol. Biol. Evol.* 20:424-434.
- Gong, Y., Gu, S, Woodruff, R.C. (2005) The influence of premeiotic clusters of mutation on indirect estimations of Mutation rate. *Hum. Heredity.* 60, 150-155.
- Gonzalez, C.A. (2005) Control epigenético de los loci NORs en *Tympanoctomys barrerae* (rodentia: octodontidae). Tesis para optar al grado de Magíster Cs. Universidad Austral de Chile. Valdivia, Chile.
- Honeycutt, R. (2002). Molecular systematics of the South American caviomorph rodents: relationships among species and genera in the family Octodontidae. *Mol. Phyl. and Evol.* 26, 476–489
- Jackson-Grusby, L., Beard, C., Possemat, R., Tudor, M., Fambrough, D., Csankovszki, G., Dausman, J., Lee, P., Wilson, C., Lander, E. et al. (2001). Loss of genomic methylation causes p53-dependent apoptosis and epigenetic deregulation. *Nat. Genet.* 27, 31-39.
- Jaenisch, R. and Bird, A. (2003). Epigenetic regulation of gene expression: how the genome integrates intrinsic and enviromental signals. *Nat. Genet.*, 33, 245-254.
- Jahner, D and Jaenisch, R (1985) Retrovirus-induced *de novo* methylation of flanking host sequences correlates with gene inactivity. *Nature* 315, 594-597.

- Jaillon, O. (2004). Genome duplication in the teleost fish *Tetraodon nigroviridis* reveals the early vertebrate proto-karyotype. *Nature*. 431, 946-957
- Jenuwein, T. and Allis, D. (2001). Translating the histone code. *Science* 293, 1074-1079.
- Kimura, M. (1980) A simple method for estimating evolutionary rates of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. *J. Mol. Evol.* 16, 111-120.
- Kiyoshi, N. (2004). A Medaka Gen Map: The Trace os Ancestral Vertebrate Proto Chromosomes Revealed by Comparative Gen Mapping. *Genome Res.* 14, 820-828.
- Kobayashi, S. (1997). Human PEG1/MEST, an imprinted gene on chromosome 7. *Human Mol. Gen.* Vol. 6, No. 5, 781-786.
- Kumar, S., (2002). Mutation rates in mammalian genomes. *PNAS*. 99, 2, 803-808.
- Kumar, S., Tamura K & Nei M (2004) MEGA3: Integrated Software for Molecular Evolutionary Genetics Analysis and Sequence Alignment. *Briefings in Bioinformatics* 5:150-163.
- Lefebvre, L., Viville, S., Barton, S., Ishino, F. and Surani, M. (1997). Genomic structure and parent-of-origin-specific methylation of *Peg1*. *Hum. Mol. Genet.* 6,11, 1907-1915.
- Li, E. (2002). Chromatin modification and epigenetic reprogramming in mammalian development. *Nat. Rev. Gen.* 3, 662-673.
- Li, T. (2002). An imprinted *PEG1/MEST* antisense expressed predominantly in human testis and in mature spermatozoa. *J. of Biochem.* 277, 16, 13518-13527.

- Lynch and Conery (2000). The Evolutionary Fate and Consequences of Duplicate Genes. *Science*. 10 , 1151-1155.
- Lyon, M. F. (1999). X chromosome inactivation. *Curr. Biol.* R235-7.
- Marin I, Siegal ML, Baker BS (2000) The evolution of dosage-compensation mechanisms. *Bioessays*. 22: 1106–1114.
- Matzke, M.A. (1999). Rapid structural and epigenetic changes in ploid and aneuploid genomes. *BioEssays*, 21, 761-767.
- Murphy, S. and Jirtle, R. (2003). Imprinting evolution and the price of silence. *BioEssays*, 25, 577-588.
- Ohno, S. (1970). Evolution by gene duplication. *Springer-Verlag*, NY
- Okano M, Xie S, Li E. (1998). Dnmt2 is not required for de novo and maintenance methylation of viral DNA in embryonic stem cells. *Nucleic Acids Res.* 26. 2536 -2540.
- Opazo, Juan C. (2005). A molecular timescale for caviomorph rodents (Mammalia, Hystricognathi). *Mol. Phyl. and Evol.* 37, 932-937.
- Orphanides G. and D. Reinberg (2002). A unified theory of gene expression. *Cell*. 108. 439-451.
- Otto, S. P. and Whitton, J. (2000). Polyploid incidence and evolution. *Annu. Rev. Genet.* 34, 401-437.
- Paldi, A. (2003). Genomic imprinting: could the chromatin structure be the driving force? *Curr. Top. Dev. Biol.* 53, 115-138.

- Pardo-Manuel de Villena, F., de la Casa-Esperón, E. and Sapienza, C. (2000). Natural selection and the function of genome imprinting: beyond the silenced minority. *Trends Genet.* 16, 12, 573-579.
- Pikaard, C. S., (2001). Genomic change and gene silencing in polyploids. *Trends Genet.*, 17, 675-677.
- Posada D. and Crandall KA. (1998). Modeltest: testing the model of DNA substitution. *Bioinformatics* 14 (9): 817-818.
- Postlethwait, J.H. (2000). Zebrafish comparative genomics and the origins of vertebrate chromosomes. *Genome Res.* 10, 1890-1902.
- Rakyan, V.K., Preis, J., Morgan, H.D., Whitelaw, E. (2001). The marks, mechanisms and memory of epigenetic states in mammals. *Biochem. J.* 356, 1-10.
- Reik, W. and Walter, J. (2001). Evolution of imprinting mechanisms: the battle of the sexes begins in the zygote. *Nat. Gen.*, 27, 255-256.
- Reik, W. (2001). Genomic imprinting: Parental influence on the genome. *Nature Gen.* 2, 21-32.
- Reik, W. (2001). DNA methylation and mammalian epigenetics. *Electrophoresis*, 22, 2838-2843.
- Reik, W. (2001). Epigenetic reprogramming in mammalian development. *Science.* 293. 1089-1093.
- Reik, W. (2002). Mammalian epigenomics: reprogramming the genome for development and therapy. *Theriogenology*, 59, 21-32.
- Reik, W. (2005). Co-evolution of X-chromosome inactivation and imprinting in mammals. *Nature Gen.* 6, 875-880

- Rodin, S., Riggs, A. (2003). Epigenetic silencing may aid evolution by gene duplication. *Journ. Mol. Evol.*, 56, 718-729.
- Saitou N. and Nei M. (1987). The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol. Biol. Evol.* 4, 406-425.
- Sambrook, J., Fritsch, E. F. and Maniatis, T. (2003). Molecular cloning. A laboratory manual. Second Edition. *Cold Spring Harbor Laboratory Press.* 9.17-9.19.
- Scheid, M. O. (1996). A change in ploidy can modify epigenetic silencing. *PNAS*, 93, 7114-7119.
- Spencer, H. (1998). Genetic Conflicts, Multiple Paternity and the Evolution of Genomic Imprinting. *Genetics.* 148, 893-904.
- Spencer, H.G., Feldman, M.W., Clark, A.G. (2000). Population genetics and evolution of genomic imprinting. *Annu. Rev. Genet.* 34, 457-477.
- Spring, J. (1997). Vertebrate evolution by interspecific hybridization: Are we polyploid? *FEBS Lett.* 400, 2-8.
- Swofford, D.L. (1999). PAUP Phylogenetic analysis using parsimony (and other methods), version 4.0b. *Sinauer Associates.*
- Thompson, J., Gibson, T., Plewniak, F., Jeanmougin, F. and Higgins, D. (1997). The CLUSTAL_X window interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. *Nucleic Acids Res.* 25, 4876-4882.
- Vrana, P. (1998). Genomic imprinting is disrupted in interspecific *Peromyscus* hybrids. *Nature. Genet.* 20, 362-365.

- Wendel, J. F. (2000). Genome evolution in polyploids. *Plant Mol. Biol.*, 42, 225-249.
- Wilkins, F. and Haigs, D. (2003). What good is genomic imprinting: the function of parent-specific gene expression. *Nat. Rev. Gen.* 4. 1-10.
- Wilkins, J.F. (2005) Genomic imprinting and methylation: epigenetic canalization and conflict. *Trends in genetics.* 21, 6, 356-365
- Yoder, J.A., Walsh C.P. & Bestor T.H. (1997). Cytosine methylation and the ecology of intragenomic parasites. *Trends in Gen.* 13, 335–340

PegOm01	TTT	TTT	T--	-..	[351]
PegOm02	TTT	T--	---	-..	[351]
PegOm03	TTT	TTT	---	-..	[351]
PegOm04	TTT	TT-	---	-..	[351]
PegTym01	TCA	GGC	CCT	TAA	GTA	CTT	ATC	CCA	CTG	GGC	TAT	CTC	CCC	[390]
PegPipa02	---	--T	A..	[390]
PegPipa04	---	--T	A..	[390]
PegPipa05	---	--T	A..	[390]
PegPipa06	---	--T	A..	[390]
PegPipa08	---	--T	A..	[390]
PegOg01	..GCG	T..	[390]
PegOg02	..GCG	T..	[390]
PegOm01CG	T..	[390]
PegOm02CG	T..	[390]
PegOm03CG	T..	[390]
PegOm04CG	T..	[390]
PegTym01	GGC	CCC	CC-	TAA	AAT	GTT	CAA	TCT	CAA	TGG	TGA	AAG	GAA	[429]
PegPipa02-	[429]
PegPipa04-	[429]
PegPipa05-	[429]
PegPipa06-	[429]
PegPipa08-	[429]
PegOg01	A..CTT	[429]
PegOg02	A..CTT	[429]
PegOm01-	[429]
PegOm02-	[429]
PegOm03-	[429]
PegOm04-	[429]
PegTym01	TCT	AAA	TGT	GGC	CCT	TAA	GTA	TGA	GGC	TCT	TCG	TTT	TGC	[468]
PegPipa02	[468]
PegPipa04	[468]
PegPipa05	[468]
PegPipa06	[468]
PegPipa08	[468]
PegOg01	C..	[468]
PegOg02	C..	[468]
PegOm01	[468]
PegOm02	[468]
PegOm03	[468]
PegOm04	[468]
PegTym01	AT-	ATC	TTT	TTC	GTA	GCA	ATA	GGG	AAT	GGG	ACA	GAA	TTT	[507]
PegPipa02	..T	[507]
PegPipa04	..T	[507]
PegPipa05	..T	[507]
PegPipa06	..TG	[507]
PegPipa08	..T	[507]
PegOg01	G.-T	A..A	[507]
PegOg02	G.-T	A..A	[507]
PegOm01	..-A	[507]
PegOm02	..-A	[507]
PegOm03	..-A	[507]
PegOm04	..-A	[507]

PegPipa08	[702]
PegOg01TG.	[702]
PegOg02TG.	[702]
PegOm01TG.	[702]
PegOm02TG.	[702]
PegOm03TG.	[702]
PegOm04TG.	[702]
PegTym01	ACC	CCC	CAT	GAA	GTC	CTC	CAA	GAT	TCA	TTT	TAC	TAT	AAA	[741]
PegPipa02	[741]
PegPipa04	[741]
PegPipa05	[741]
PegPipa06	[741]
PegPipa08	[741]
PegOg01T.	[741]
PegOg02T.	[741]
PegOm01	[741]
PegOm02	[741]
PegOm03	[741]
PegOm04	[741]
PegTym01	ACC	TGA	AAA	ACA	GCA	CTC	TTA	AAA	TCC	TCT	TAT	GAA	AAG	[780]
PegPipa02	[780]
PegPipa04	[780]
PegPipa05	[780]
PegPipa06	[780]
PegPipa08	[780]
PegOg01	.A.	[780]
PegOg02	.A.	[780]
PegOm01	C..	[780]
PegOm02	C..	[780]
PegOm03	C..	[780]
PegOm04	C..	[780]
PegTym01	ATT	CAT	TTC	TTG	CTT	ACT	GGA	TGC	ACA	GAG	CCC	ATT	AAG	[819]
PegPipa02	[819]
PegPipa04	[819]
PegPipa05	[819]
PegPipa06	[819]
PegPipa08	[819]
PegOg01-	...	[819]
PegOg02-	...	[819]
PegOm01	[819]
PegOm02	[819]
PegOm03	[819]
PegOm04	[819]
PegTym01	GCT	CAC	GTG	GAT	AGT	AGG	TAG	AAC	CAC	GGC	TGT	AGT	CAC	[858]
PegPipa02	A..	[858]
PegPipa04	A..	[858]
PegPipa05	A..	[858]
PegPipa06	A..	[858]
PegPipa08	A..	[858]
PegOg01G.	T..	C..	[858]
PegOg02G.	T..	C..	[858]
PegOm01	T..	[858]
PegOm02	T..	[858]

PegOg02	[1179]
PegOm01	[1179]
PegOm02	[1179]
PegOm03	[1179]
PegOm04	[1179]