

SISTEMA MITOCONDRIAL ANIMAL (SISMIT): UN PROGRAMA DE COMPUTACIÓN APLICADO EN EL ANÁLISIS MOLECULAR DE LOS GENOMAS MITOCONDRIALES DE ANIMALES VERTEBRADOS

SISTEMA MITOCONDRIAL ANIMAL (SISMIT): A COMPUTING SOFTWARE BASED IN THE MOLECULAR ANALYSIS OF MITOCHONDRIAL GENOMES OF VERTEBRATES

C. Scotto¹ y R. Valdivia²

RESUMEN

El presente trabajo reporta el diseño de un programa de computación que analiza a nivel molecular las secuencias del DNA mitocondrial de 37 animales vertebrados domésticos y silvestres de importancia zoológica.

Palabras clave: DNA mitocondrial, Programa de Computación, RFLP, PCR

ABSTRACT

The present article reports the design of a computing program which analyzes at the molecular level the sequences of mitochondrial DNA (mtDNA) of 37 domestic and wild life vertebrates of zoogenetic importance.

Key words: mitochondrial DNA (mtDNA), Computer Program, RFLP, PCR.

INTRODUCCIÓN

Los avances tanto en el campo de la biología molecular como en la informática han permitido el desarrollo de una nueva área de la ciencia denominada *bioinformática*.

En 1979, BROWN *et al.* predijeron que las moléculas de DNA mitocondrial de los vertebrados (mtDNA) llegarían a ser una de las primeras moléculas de DNA en ser totalmente secuenciadas con el tiempo, debido a que son las unidades genómicas eucarióticas

más simples que existen en la naturaleza, pues tienen un tamaño promedio de 16 500 nucleótidos (Rosamond, 1982) y carecen de intrones (Anderson *et al.*, 1981).

Abreviaturas: PCR = Polymerase Chain Reaction; RFLP = Restriction Fragment Length Polymorphisms; bp = base pairs.

Es así que durante los últimos veinte años se han estado reportando las secuencias nucleotídicas completas del DNA mitocondrial de diferentes animales vertebrados disponibles actualmente en el Genbank (1999) de Internet.

Por otro lado, debido a las características que esta molécula posee es muy utilizada en

1 Laboratorio de Bioquímica y Biología Molecular. Universidad Nacional Federico Villarreal. Lima. Perú.
E-mail:scottoc@hotmail.com
2 Instituto Nacional de Recursos Naturales. INRENA. Lima-Perú.

diferentes estudios a nivel molecular para la construcción de mapas de restricción por RFLP (NEI, *et al.*, 1979; Brown, 1980) o para la amplificación de segmentos específicos por PCR (Higuchi *et al.*, 1984). El patrón electroforético de bandas obtenido en un gel por RFLP o PCR, junto con el patrón de bandas de un marcador comercial, en cualquier laboratorio son analizados a simple vista o con la ayuda de lectores ópticos para su detección (Scott *et al.*, 1993).

Hoy, existen programas de computación que son bancos de datos de secuencias nucleotídicas como el Genbank (Altschul *et al.*, 1990) y de secuencias de aminoácidos como el Proteindata Bank (Bernstein *et al.*, 1977). Otros programas de computación trabajan con estas secuencias haciendo predicciones, comparaciones por homología y análisis de sus propiedades intrínsecas como son el Blastp, Seqaid, Oligo, Macaw, etc., (Karlin & Altschul, 1990). Sin embargo, ningún programa integra tanto la información molecular dentro de una base de datos junto con las secuencias nucleotídicas o de aminoácidos y las principales técnicas moleculares utilizados en el análisis de genomas mitocondriales como son el RFLP y el PCR.

En respuesta a este problema, se desarrolló y patentó el programa de computación Sismit

Animal, Versión 1.0 (1999). Este programa constituye el primer programa de biología molecular aplicado en el análisis del mtDNA de animales vertebrados utilizando un sistema visual de análisis de imágenes digitales por computadora.

MATERIALES Y MÉTODOS

El Sismit Animal (1999) fue creado utilizando el programa Pascal, versión 7.0 (Tenenbaum & Augenstein, 1981) y la información del trabajo de Tesis de Scotto (1996).

RESULTADOS

El Sismit Animal fue diseñado de forma versátil para funcionar en computadoras desde el modelo AT-286 con 1 Megabyte de Memoria RAM y en cualquier tipo de pantalla monocromática o a color.

El programa utiliza algoritmos matemáticos apropiados para proyectar una pantalla de Menú Principal (Fig. 1) y varias pantallas para los Submenús que contienen diferentes opciones seleccionables por el usuario (Fig. 2).

Dentro del Menú Principal las opciones **Datos Básicos** y **Diccionario** son bancos de datos con información mitocondrial actualiza-

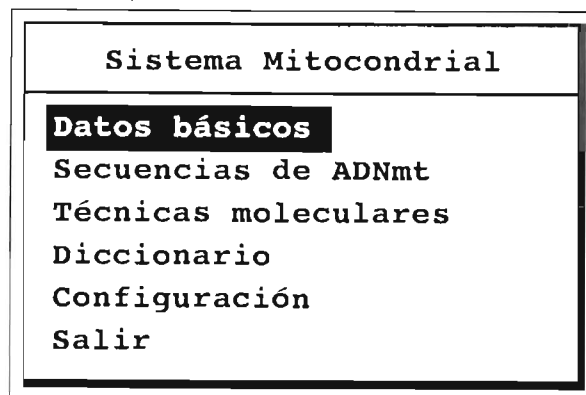


Figura 1. 1) Datos básicos; 2) Secuencias de DNAm; 3) Técnicas moleculares; 4) Diccionario; 5) Configuración; 6) Salir

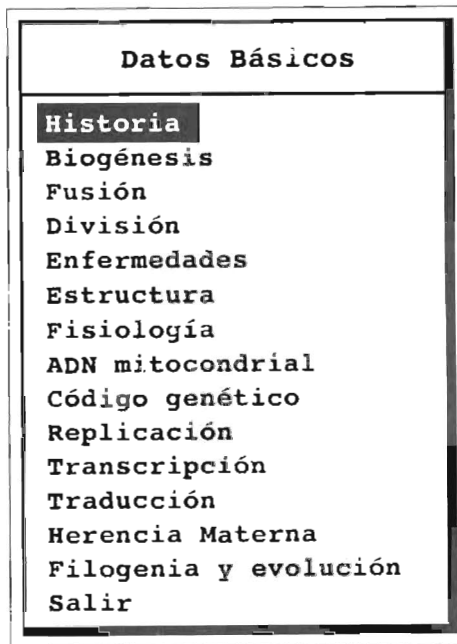


Figura 2. 1) Historia; 2) Biogénesis; 3) Fusión; 4) División; 5) Enfermedades; 6) Estructura; 7) Fisiología; 8) ADN mitocondrial; 9) Código genético; 10) Replicación; 11) Transcripción; 12) Traducción; 13) Herencia Materna; 14) Filogenia y evolución; 15) salir.

da (Fig. 3), los cuales están complementados con la proyección de gráficos descriptivos para cada tema seleccionado (Fig. 4).

La opción **Secuencias del DNA mitocondrial** permite seleccionar el mtDNA de uno de los 37 animales vertebrados dife-

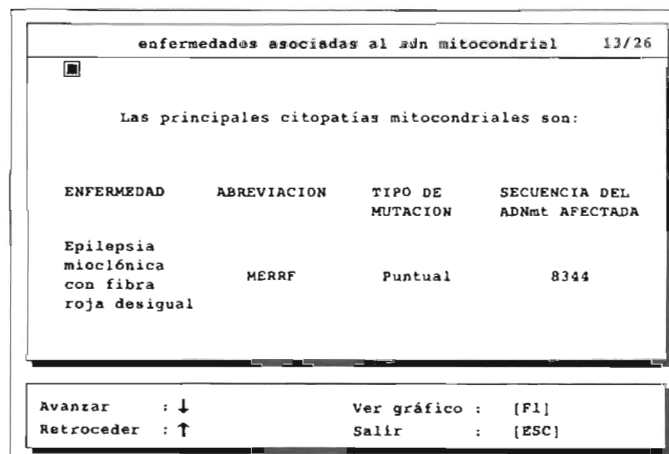


Figura 3. Se describe una citopatía mitocondrial denominada Epilepsia mioclónica con fibra roja desigual. Su abreviación: MERRF. Tipo de mutación: Puntual. Secuencia del mtDNA afectada: 8344

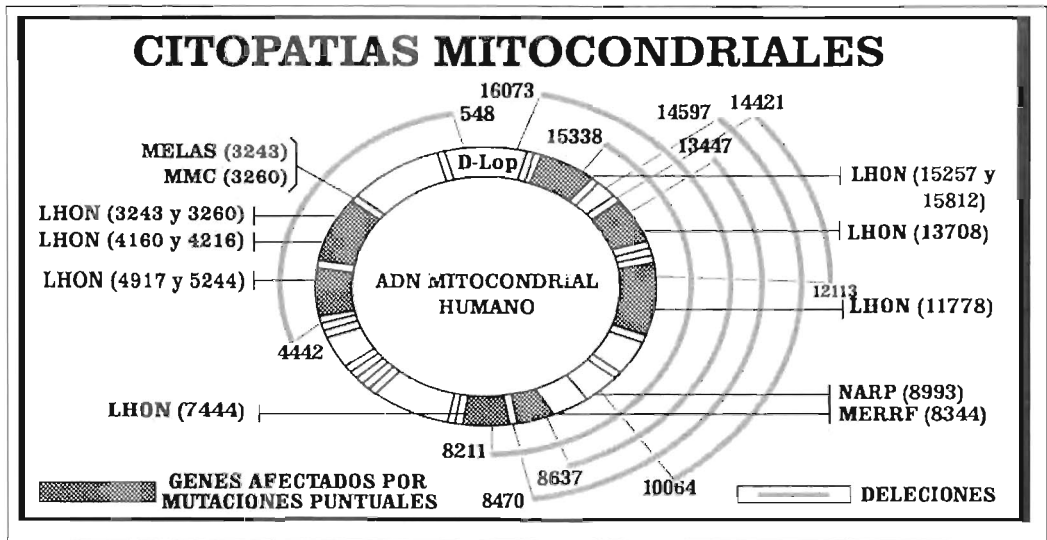


Figura 4. Se describe las regiones en la molécula del mtDNA donde se han identificado las principales mutaciones de tipo puntual (números) o por deleción (semicírculos) que producen enfermedades en humanos con las abreviaciones: LHON, MELAS, MERRF, MMC y NARP.

rentes con que trabaja el programa (Fig. 5). Además, para cada cadena del mtDNA seleccionada (Cadena H o L) puede obtenerse información de cada uno de los 37 genes que poseen las moléculas de mtDNA de los vertebrados: 22 RNA mensajeros, 2 RNA ribosómicos y 13 genes para proteínas (CANN *et al.*, 1987) como son la secuencia del gen

seleccionado, los porcentajes de bases nitrogenadas (adenina, guanina, citosina y timina) y el número de nucleótidos totales del gen seleccionado (Fig. 6).

Dentro de esta opción y al seleccionarse un gen que codifique para una proteína se obtendrá su secuencia de aminoácidos respecti-

Secuencia de ADN mitocondrial			
Asno	(<i>Equus asinus</i>)	Humano 2	(<i>Homo sapiens</i>)
Bacalao	(<i>Gadus morhua</i>)	Humano 3	(<i>Homo sapiens</i>)
Ballena aleta	(<i>Balaenoptera physalis</i>)	Humano 4	(<i>Homo sapiens</i>)
Ballena azul	(<i>Balaenoptera musculus</i>)	Humano 5	(<i>Homo sapiens</i>)
Bovino	(<i>Bos taurus</i>)	Lamprea	(<i>Petromyzon marinus</i>)
Caballo	(<i>Equus caballus</i>)	Orangutan 1	(<i>Pongo pygmaeus pygmaeus</i>)
Canguro	(<i>Macropus robustus</i>)	Orangutan 2	(<i>Pongo pygmaeus abelii</i>)
Carpa	(<i>Cyprinus carpio</i>)	Ornitorrinco	(<i>Ornithorhynchus anatinus</i>)
Celacanto	(<i>Latimeria chalumnae</i>)	Pez africano	(<i>Polypterus ortanipinnia</i>)
Chimpancé 1	(<i>Pan troglodytes</i>)	Pez asiático	(<i>Crossostoma lacustre</i>)
Chimpancé 2	(<i>Pan troglodytes</i>)	Pez pulmonado	(<i>Protopterus dolloi</i>)
Erizo	(<i>Erinaceus europaeus</i>)	Pollo	(<i>Gallus gallus</i>)
Foca 1	(<i>Halichoerus gryphus</i>)	Rana de garras	(<i>Xenopus laevis</i>)
Foca 2	(<i>Phoca vitulina</i>)	Rata	(<i>Rattus norvegicus</i>)
Gato	(<i>Felis catus</i>)	Ratón	(<i>Mus musculus</i>)
Gibón	(<i>Hylabates lar</i>)	Rinoceronte	(<i>Rhinoceros unicornis</i>)
Gorila 1	(<i>Gorilla gorilla</i>)	Trucha	(<i>Oncorhynchus mykiss</i>)
Gorila 2	(<i>Gorilla gorilla</i>)	Zarigüeya	(<i>Didelphis virginiana</i>)
Humano 1	(<i>Homo sapiens</i>)	Comparaciones	
Salir			

Figura 5. La pantalla muestra las 37 especies diferentes de vertebrados cuyo DNA mitocondrial está en la base de datos

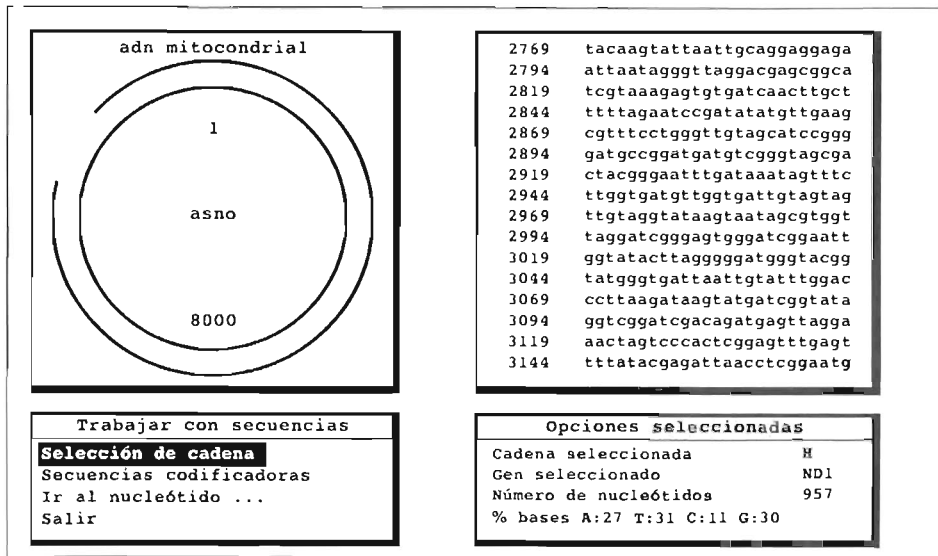


Figura 6. La pantalla muestra la ubicación espacial, la secuencia nucleotídica, la cadena del mt DNA, número de nucleótidos y porcentaje de bases nitrogenadas del gen NAD1 mitocondrial.

va (Fig. 7). También dentro de esta opción se puede realizar comparaciones de dos genes iguales o dos genes diferentes para dos especies diferentes o para la misma especie seleccionada por el usuario (Fig. 8).

La opción **Técnicas Moleculares** permite trabajar con las técnicas moleculares más utilizadas en la biología molecular como son el RFLP y PCR (Maniatis, F. & Sambrook, J., 1989). Dentro de la opción RFLP, se puede

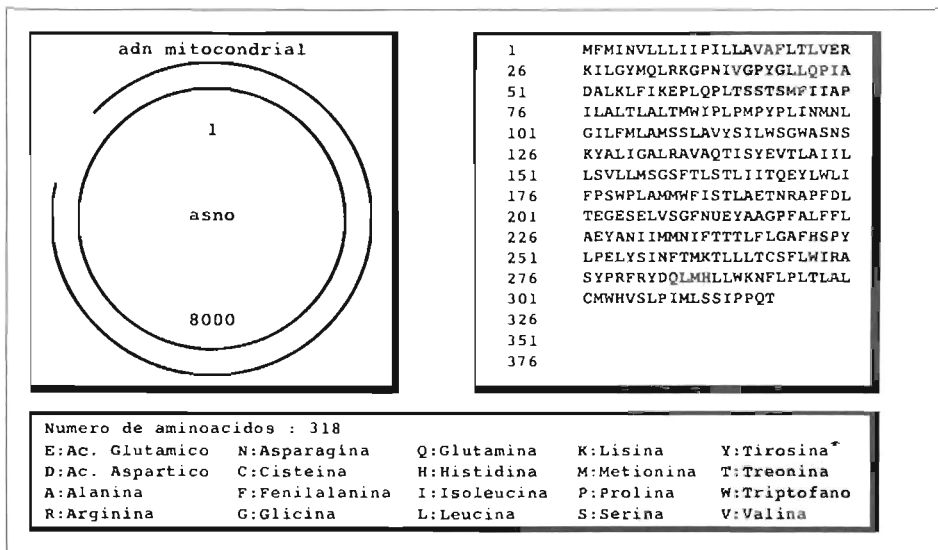


Figura 7. La pantalla muestra la secuencia de los 318 aminoácidos codificados por una sola letra del gen ND1 mitocondrial.

1	g	t	t	a	a	t	g	t	a	a	t	g	a	t	a	t	c	a	a	a	
26	g	c	a	a	g	g	c	a	c	t	g	a	a	a	t	g	c	c	t	a	g
51	a	g	t	a	t	c	c	t	a	c	t	c	c	a	a	a	c	a	c	a	t
76	G	G	T	T	G	G	T	C	C	T	G	G	C	T	T	T	T	A	T	A	G
101	T	T	A	T	A	A	A	A	T	T	A	C	A	C	A	T	G	C	A	A	G
126	T	A	T	C	C	G	A	C	C	C	C	A	G	T	G	A	A	T	G	C	C
151	T	C	T	A	A	T	C	G	C	A	C	T	C	T	A	C	A	A	A	A	A
176	G	G	A	G	C	A	G	G	T	A	C	A	A	G	C	A	C	A	C	A	A
201	A	G	T	A	G	T	C	A	T	A	A	C	A	C	T	T	G	T	A	G	G
226	C	A	C	A	C	C	C	C	C	A	C	G	G	G	A	C	A	G	C	A	G
251	A	T	A	A	A	A	T	A	A	G	C	T	A	G	A	A	C	G	A	A	A
276	T	T	C	G	A	C	T	A	A	G	T	T	A	T	A	A	C	T	A	G	G
301	G	T	T	G	T	A	A	A	T	T	C	G	T	G	C	A	G	C	C	A	C
326	G	C	G	G	T	C	A	T	A	C	G	A	T	A	A	C	C	A	A	A	T
351	A	T	A	A	A	C	C	T	C	C	G	G	C	T	A	A	A	G	C	G	T
376	C	A	A	A	G	C	C	C	A	T	A	A	A	T	A	A	A	G	T	T	

Comparaciones	
Asno	Cambiar cadena
Caballo	Elegir nuevo gen
Salir	

Opciones seleccionadas	
Cadena seleccionada	L
genes	: ARNtat-Fen / ARNtat-Fen
% bases	A:38 T:26 C:19 G:16
% bases	A:40 T:29 C:16 G:15

Figura 8. Las pantallas mostradas comparan la secuencia nucleotídica del tRNA-Fenilalanina mitocondrial de dos equinos (asno y caballo). También se compara los porcentajes de sus bases nitrogenadas.

seleccionar de una lista de 150 enzimas de restricción diferentes, nueve enzimas de restricción y realizar digestiones simples o dobles del mtDNA escogido (Fig. 9). De la misma manera, para la opción PCR, se puede seleccionar dos sondas o *primers* ya probados a nivel mundial para amplificar una secuencia específica para un mtDNA seleccionado (Fig. 10).

Para las opciones RFLP y PCR, el programa proyecta un patrón electroforético digital que permite ver al usuario los fragmentos obtenidos por RFLP o el fragmento amplificado por PCR. Además, se puede seleccionar un marcador molecular utilizado comúnmente en los laboratorios para comparar la distancia de migración de la corrida

Selección de enzimas de restricción				
NaeI	NruI	SacI	SgfI	StuI
NarI	NsiI	SacII	SgrAI	StyI
NciI	PflMI	SaII	SmaI	TagI
NcoI	PleI	Sau3AI	SnaI	ThaI
NdeI	PpuMI	Sau96I	SnaBI	Tth111t
NheI	PstI	ScaI	SpeI	TurboNaeI
NlaIII	PvuI	ScrFI	SphI	Tru9I
NlaIV	PvuII	SduI	SspI	VspI
NotI	RsaI	SfaNI	SstI	XbaI
NspI	RsrII	SfiI	SstII	XhoI
Adelante	Atras	salir		

Figura 9. Banco de datos de las enzimas de restricción utilizadas en RFLP

Selección de Sondas Cadena L				
L516As	L515Ba	L9388Bp	L6461Bm	L15175Bo
L517As	L6125Ba	L940Bp	L9337Bm	L15289Bo
L8912As	L6126Ba	L6464Bp	L15025Bm	L15541Bo
L12030As	L7020Ba	L9340Bp	L15861Bm	L16176Bo
L13773As	L7907Ba	L11221Bp	L16352Bm	L514Ca
L14437As	L8786Ba	L15028Bp	L48Bo	L8916Ca
L14600As	L9029Ba	L15791Bp	L239Bo	L11019Ca
L14846As	L14616Ba	L15864Bp	L14487Bo	L14603Ca
L15457As	L15672Ba	L936Bm	L14765Bo	L14460Ca
L513Ba	L16571Ba	L938Bm	L14929Bo	L14849Ca
Adelante	Atras	Salir		

Figura 10. Banco de datos de las sondas utilizadas en PCR

electroforética. Dentro de esta opción se puede obtener información molecular como son el peso molecular (en pb) y el número de los fragmentos digeridos por RFLP (Fig. 11), o el tamaño del segmento amplificado por PCR (Fig. 12).

DISCUSIÓN

El presente reporte demuestra que con nuestro programa SISMIT Animal es posible integrar la información de la secuencia nucleotídica del DNA mitocondrial disponible en Internet de diferentes especies animales

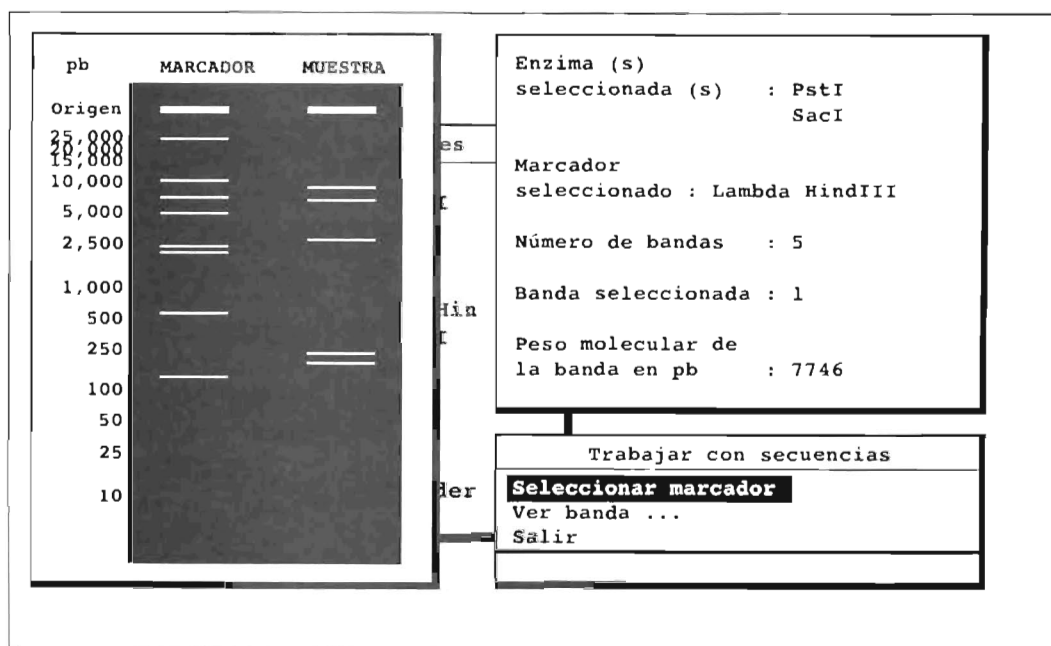


Figura 11. En la pantalla superior derecha se indica las enzimas de restricción y marcador seleccionados, y el número de bandas

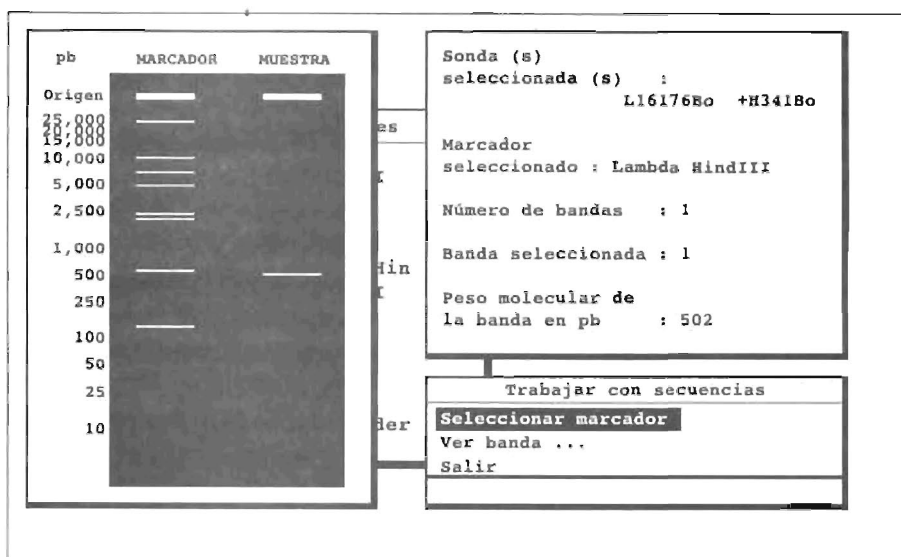


Figura 12. En la pantalla superior derecha se indica las sondas y marcador seleccionados, número de bandas, banda seleccionada y peso molecular en pb

con la información de biología molecular utilizados en los laboratorios que analizan esta molécula. De esta manera, se pudo diseñar un programa de computación que utiliza un lenguaje informático para proyectar un sistema de análisis de imágenes y facilitar el acceso y utilización de esta información de una forma fácil, confiable y útil para los investigadores.

LITERATURA CITADA

- Anderson, S., Bankier, A., Barrell, B., De Bruijn, M., Coulson, A., Drouin, J., Eperon, I., Nierlich, D., Roe, B., Sanger, F., Schreier, P., Smith, A., Staden, R. & Young, I. 1981. Sequence and organization of the human mitochondrial genome. *Nature*. 290:457-465.
- Altschul, S., Gish, W., Miller, W., Myers, E. & Lipman, D. 1990. Basic local alignment search tool. *J. Mol. Biol.* 215:403-410.
- Bernstein, F. Koetzle, T., Williams, G. Meyer, E. Brice, M. Rodgers, J., Kennard, O., Shimanouchi, T. & Tasumi, M. 1977. The ProteinData Bank: A computer-based archival file for macromolecular structures. *J. Mol. Biol.* 112: 535-542.
- Brown, W., George, M. & Wilson, M. 1979. Rapid evolution of animal mitochondrial DNA. *Proc. Natl. Sci. USA.* 76(4): 1967-1971.
- Brown, W. 1980. Polymorphism in mitochondrial DNA of humans as revealed by restriction endonuclease analysis. *Proceeding of the National Academy of Sciences of the USA.* 77: 3605-3609.
- Cann, R., Stoneking, M. & Wilson, A. 1987. Mitochondrial DNA and human evolution. *Nature.* 325(1): 31-36.
- Genbank (INTERNET): <http://ncbi.nlm.nih.gov>
- Higuchi, R., Bowman, M., Freiberger, O. Ryder, O & Wilson, A. 1984. DNA sequence from the quagga member of the horse family. *Nature.* 312: 282-284.
- Karlin, S. & Altschul, S. 1990. Methods for assessing the statistical significance of molecular sequence features by using general scoring schemes. *Proc. Natl. Acad. USA.* 87: 2264-2208.

- Maniatis, F. & Sambrook, J. 1989. Molecular Cloning. A Laboratory Manual. Cold Spring Harbor Laboratory Press. 2nd. ed., New York.
- Nei, M. & Li, W. 1979. Mathematical model for studying genetic variation in terms of restricción endonucleases. Proc. Natl. Acad. USA. 76(10): 5269-5273.
- Rosamond, J. 1982. The molecular of the mitochondrion. Biochemical Journal. 202: 1-8.
- Scott, D., Welt, M. & Leung, F. 1993. A computer to aid in calculating similarity indexes from DNA Fingerprints. Biotechniques. 14(6): 980-983.
- Scotto, C. 1996. Extracción y purificación de ADN mitocondrial en vacunos criollos del Perú. Tesis para optar el título de Biólogo, UNALM, Lima, Perú.
- Sismit Animal. 1999. Copyright. Sistema Mitocondrial Animal, Versión 1.0 Patente N.º 0743. Indecopi. Lima, Perú.
- Tenenbaum, A. & Augenstein, M. 1981. Copyright. Estructura de datos en Pascal. Prentice-Hall Inc. 3.^a ed. México, D.F.