



# UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES  
IZTACALA

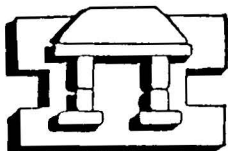
"AISLAMIENTO Y CARACTERIZACION DE UNA SECUENCIA PARCIAL DEL GEN ASOCIADO A LA PRODUCCION DE GONADOTROFINA (Gn-RH) DEL CHARAL Chirostoma humboldtianum"

## T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE  
B I O L O G O  
P R E S E N T A N :

JUAN CASTRO IBARRA  
MIGUEL ANGEL LOPEZ GARCIA

DIRECTOR DE TESIS: DR. DIEGO JULIO ARENAS ARANDA



IZTACALA

Los Reyes Iztacala a 27 de Febrero del 2002. Tlalnepantla, Edo, de México

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



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

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

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

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

## **“A MIS ABUELOS, PADRES Y HERMANOS”**

Por su apoyo incondicional en todo momento, por el cariño y amor invaluable, por sus consejos sabios y regaños oportunos, por darme fe y esperanza en los momentos más difíciles y en las cosas que anhelo, y sobre todo por aceptarme tal y como soy.

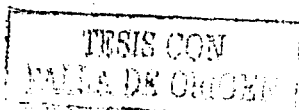
**JOSE INES IBARRA LARA  
MARIA LUISA MATA RAMÍREZ**

**JUAN CASTRO CLARA  
ELVIRA IBARRA MATA**

**IVONNE CASTRO IBARRA  
LIZET CASTRO IBARRA**

**A MIS SOBRINOS “KARLITA Y MICHEL”**

**JUAN CASTRO IBARRA**



## **“A MIS PADRES Y HERMANOS”**

Por su apoyo incondicional en todo momento, por el cariño y amor invaluable, por sus consejos sabios y regaños oportunos, por darme fe y esperanza en los momentos más difíciles y en las cosas que anhelo, y sobre todo por aceptarme tal y como soy.

**JUAN LOPEZ LUNA  
BERTHA GARCIA LOPEZ**

**VICTOR MANUEL GARCIA LOPEZ  
MARIA DEL SOCORRO LOPEZ GARCIA  
CARLOS LOPEZ GARCIA  
GUADALUPE LOPEZ GARCIA  
PATRICIA LOPEZ GARCIA  
(A TODOS MIS SOBRINOS)**

**MIGUEL ANGEL LOPEZ GARCIA.**

**TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN**

## AGRADECIMIENTOS

A nuestro director de tesis, **Dr. DIEGO JULIO ARENAS ARANDA** por su asesoría en este trabajo y su nobleza como ser humano.

A todos los compañeros del laboratorio de genética molecular de la Unidad de Investigación Médica en Genética Humana del Hospital de Pediatría del Centro Médico Nacional Siglo XXI, que de alguna manera colaboraron en la realización de este trabajo.

A los profesores de la FES Iztacala por su apoyo y solidaridad a lo largo de nuestra formación profesional.

A los revisores de este trabajo, por su tiempo y dedicación a la revisión metódica de este trabajo.

A nuestros amigos a lo largo de nuestra vida y estancia en la FES Iztacala, por compartir su amistad con nosotros.

A mi amigo en toda la extensión de la palabra "**JUAN CASTRO IBARRA**" por el enorme cariño que le tengo y todo lo que hemos compartido juntos en esta aventura llamada "vida".

A mi amigo "**MIGUEL ANGEL LOPEZ GARCIA**" por su sinceridad, tolerancia, estímulo y permitirme verle tal y como es.

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

A mis compañeros del LABORATORIO del "HOSPITAL GENRAL ISSEMYM  
ECATEPEC POR SU APOYO Y COMPRESION".

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

# INDICE

Resumen	1
Introducción	2
Antecedentes	6
Objetivos	9
Metodología	10
Resultados	17
Discusión	30
Apéndice	33
Bibliografía	36

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

## RESUMEN

El presente trabajo tuvo como objetivo aislar y secuenciar un fragmento del gen asociado a la producción de Gonadotropina (GnRH) involucrada en la reproducción de los vertebrados, del charal *Chirostoma humboldtianum*.

Las GnRH's son moléculas pertenecientes a una superfamilia de genes que tienen en común una región que codifica para un decapeptido. Actualmente se han descrito 9 moléculas de esta familia, de las cuales siete corresponden a vertebrados y dos a procordados. En *C. humboldtianum* no se ha descrito esta hormona, por lo que en este trabajo empleando la técnica de amplificación rápida de extremos de cDNA ("RACE"), aislamos y secuenciamos un fragmento de DNA que tuvo una homología, en la región del decapeptido, del 90% con otras secuencias conocidas.

Consideramos que este trabajo es relevante ya que sentará las primeras bases del conocimiento de la fisiología reproductiva de una especie endémica, con fines de que en el futuro se logre su cultivo, con todos los beneficios que de ello deriven.

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN



# INTRODUCCION

Los sistemas acuáticos tienen un papel importante, en el desarrollo de las culturas pues, representan una fuente primaria de recursos. La pesca es una alternativa que ofrece en principio, alimento, además de ingresos económicos. Sin embargo, la sobreexplotación de estos recursos, así como su deterioro derivado de la actividad antropogénica, ocasionan una disminución considerable en la productividad de diversos ecosistemas acuáticos en México.

La acuicultura es una alternativa que permite elevar la producción, así como ayudar a recuperar las poblaciones naturales de organismos, de la misma manera, impulsa la transición de la actividad exclusivamente extractiva a una actividad productiva económicamente rentable, que permita el uso racional y sustentable de los recursos (Ruiz-Dura, 1993).

No obstante la actividad pesquera en aguas interiores tiene como base la explotación y cultivo de especies introducidas, por lo que es de fundamental importancia dirigir esfuerzos de investigación hacia el desarrollo de tecnologías y métodos adecuados de cultivo, sobre la base del control reproductivo de diversas especies de peces (Aguilar, 1993).

El género *Chirostoma* es un grupo de peces que incluye al pescado blanco y los charales. Se encuentran distribuidos en el sistema Chapala- Lerma - Santiago y en los Valles de México y el Mezquital.

Una de estas especies es el charal (*Chirostoma humboldtianum*), que forma parte de la ictiofauna exclusiva en México, por lo que se considera una especie endémica y su importancia es significativa, desde el punto de vista ecológico, económico, evolutivo y de conservación (Barbour, 1973).

Sin embargo, se conoce poco de su Biología, dinámica poblacional y potencial reproductivo. Las experiencias de captura, muestreo, transporte y confinamiento realizadas por Alvarado y Ruiz (1996), sugieren que la capacidad de adaptación y resistencia al manejo de *C. humboldtianum*, es mayor que la de las especies más cercanas y de talla más grande, por lo que los ensayos experimentales, tendientes hacia el cultivo de esta especie, son de gran importancia (Maldonado, 1996).

Entre los trabajos realizados en esta especie se tienen la determinación del espectro trófico durante un ciclo anual en la presa las tazas, Estado de México, donde se determinaron que ésta estuvo compuesta por nueve grupos alimenticios: cladóceros, anfipodos, copépodos, calanoides y ciclopoideos, dípteros, coleópteros, hemípteros, peces y rotíferos, correspondiendo la preferencia de éstos al orden en el que se mencionan (Fuentes, 1997).

La reproducción de los telósteos, está influenciada por factores ambientales que promueven su madurez sexual (Peter, et al, 1993). El proceso reproductivo esta controlado por el eje hipotálamo-pituitaria-gonada (Sherwood, et al, 1997). Este sistema esta modulado por hormonas de naturaleza peptídica y esteroidea. Los moduladores más importantes son las hormonas liberadoras de gonadotropinas (GnRH's), producidas principalmente en el hipotálamo. Esta bien descrito que las GnRH's juegan un papel principal en la regulación de la secreción de las gonadotropinas (GtH's) de la pituitaria, en las hembras un incremento de la GtH en suero ocasiona la maduración de los ovocitos, incrementa la síntesis de esteroides y la ovulación espontánea, entre otras cosas, en los machos se incrementa la espermatogénesis y la producción de testosterona. En ambos sexos se han observado cambios en la conducta reproductiva cuando los niveles de GtH's se incrementan.

El gen que codifica la GnRH pertenece a una superfamilia de genes que producen un decapeptido con una similitud muy alta entre los vertebrados y los precordados (Sower, 1997).

La Biología Molecular contemporánea se ocupa principalmente de la comprensión de los mecanismos responsables de la transmisión y expresión de la información genética que en el último término determinan la estructura y función celulares. Los avances iniciales de Biología Molecular se lograron aprovechando el rápido crecimiento y la facilidad de manipulación del genoma de bacterias sencillas como *E. coli* y sus virus (Cooper 2002).

Recientemente se han aplicado con éxito en eucariotas no sólo los principios fundamentales sino también muchos de los abordajes experimentales desarrollados inicialmente en procariotas (Cooper 2002).

El desarrollo de las técnicas de ADN recombinante ha tenido un tremendo impacto en la Biología Molecular, permitiendo el aislamiento y caracterización en detalle de genes eucariotas individuales (Cooper 2002).

La técnica de amplificación por PCR (de sus siglas en inglés Polymerase Chain Reaction) fue desarrollada a mediados de los años 80's por Mullis. El PCR puede usarse para reproducir o amplificar una secuencia de DNA *in vitro* sin el uso de células durante el proceso. Sin embargo, el procedimiento solo puede ser usado si las secuencias de nucleótidos flanqueantes de la región de interés es conocida, ya que el PCR involucra el uso de oligonucleótidos sintéticos complementarios a dichas secuencias conocidas donde se alinean (hibridan) a la región de interés para sintetizarla por una amplificación enzimática; este alineamiento dependerá de la complementariedad del oligonucleótido a la región blanco, de la concentración de bases y la temperatura a la cual ocurre la hibridación.

El PCR involucra tres pasos, cada uno repetido muchas veces para producir los ciclos de amplificación. Fase 1 : La desnaturalización del DNA genómico generalmente a 94°C. Fase 2 : El DNA desnaturalizado, se alinea a un exceso de oligonucleótidos a una temperatura que varía de los 37°C a los 60°C. Fase 3 : Una DNA polimerasa termoestable es usada para replicar el segmento de DNA hacia los extremos 3' de los oligonucleótidos, los cuales proveen el extremo 3'OH libre requerido para la extensión. El producto del primer ciclo de replicación es nuevamente desnaturalizado, alineado a los oligonucleótidos y replicado nuevamente por la DNA polimerasa. El ciclo es repetido muchas veces hasta que se alcanza el nivel de amplificación requerido. El procedimiento de amplificación tiene varias ventajas como un rendimiento exponencial ya que para el fin del primer ciclo el sedimento de DNA se ha duplicado, al fin del segundo ciclo al cuadruplicado, etc, de tal modo que para el décimo tendremos aproximadamente 1024 copias a partir de cada templado original.

Inicialmente la elongación de las cadenas en el PCR se llevaba a cabo con el fragmento Klenow de la DNA pol I de *E. coli*, lo que presentaba la desventaja de que en cada ciclo de desnaturalización del DNA la polimerasa también se desnaturalizaba, lo que obligaba a la adición de nueva enzima al final de cada paso de desnaturalización. El mayor avance en el PCR vino con el descubrimiento de una polimerasa termoestable aislada a partir de una bacteria termófila *Thermophilus aquaticus*. Esta polimerasa fue llamada *Taq* polimerasa. Esta enzima tiene una temperatura óptima de polimerización de 72°C, temperatura a la cual las cadenas del templado permanecen separadas, por lo que el paso de elongación de las cadenas se lleva a cabo esta temperatura. Pero la ventaja más grande que ofrece es que solamente tiene que ser adicionada al inicio de la reacción, ya que no pierde su actividad aún durante el paso de desnaturalización (Gardner 1994).

Cada vez son más las aplicaciones del principio de amplificación por PCR en la Biología Molecular donde se han desarrollado variantes de esta técnica como RT-PCR y RACE.

RT-PCR (Amplificación en cadena de la polimerasa acoplada a la síntesis de cDNA): Esta técnica nos permite obtener una secuencia en particular de cDNA a partir de RNA; para lograr esto, es necesario incubar RNA con transcriptasa reversa (RT) en presencia de un oligonucleotido de timinas (oligo dT) u oligonucleotidos al azar, que servirán de cebadores para que la enzima sintetice la primera cadena de cDNA. Posteriormente, el híbrido es desnaturalizado y se añade dos oligonucleotidos específicos y la taq polimerasa, para así iniciar PCR típico (Life Technologies 1996).

La amplificación rápida de extremos de cDNA (RACE), es un procedimiento para la amplificación de RNA mensajero entre un sitio interior definido y cualquiera del extremo 3' ó 5' de éste. Esta metodología de amplificación con especificidad de un solo lado ha sido descrita como un PCR unidireccional ó PCR de anclaje y requiere de transcriptasa reversa. Los productos obtenidos se amplifican por un PCR típico.

La técnica del RACE ha sido usada para amplificación y clonación de RNA's mensajeros no descritos y pueden ser empleados para crear bibliotecas de cDNA. Adicionalmente el producto del RACE puede ser directamente secuenciado sin ninguna fase intermediaria de clonación. También los productos pueden ser utilizados para preparar sondas. Los productos generados por el procedimiento de RACE 3' y 5' pueden ser combinados para generar cDNA's completos. (Life Technologies, 1996).

Con lo que respecta a C. humboldtianum cabe mencionar que no existen trabajos de Biología Molecular. Bajo este contexto, el presente trabajo se orienta a contribuir al conocimiento de aspectos reproductivos de C. humboldtianum, desde una perspectiva genética mediante técnicas de Biología Molecular (RT-PCR, PCR, RACE), con la finalidad de aislar una secuencia parcial del gen asociado a la producción de gonadotropina (Gn-RH), involucrada en el ciclo reproductivo.

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

## ANTECEDENTES

Los aspectos reproductivos de los peces, no sólo han sido estudiados como parte de la historia natural, sino también asociados con estudios de dinámica poblacional, características genéticas, producción y problemas de repoblación (Nikolsky, 1963).

Los estudios reproductivos de los peces forman parte básica de su Biología, especialmente de aquellos que soportan una presión pesquera importante. El conocimiento del estado de madurez de los individuos de una población y la estimación de la fecundidad, son importantes en los estudios del ciclo reproductivo (Caillet, 1986).

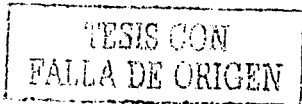
Al igual que los mamíferos, la reproducción en peces óseos es controlada por factores medio ambientales que promueven junto con la adquisición de cierta talla del pez y la madurez sexual (Peter, 1997).

La reproducción en los teleósteos es similar al patrón general de los vertebrados en sus aspectos fundamentales, pero presenta características que son únicas de la clase y un gran desarrollo de variaciones inter específicas en estructuras de las gónadas y en las hormonas que éstos producen (Lance, 1978; en Peralta, 1991).

El control de desarrollo gonadal implica cuatro procesos: medioambiental, nutricional, de conducta y hormonal. Los sistemas nervioso y endocrino de los vertebrados actúan concertadamente para coordinar los eventos reproductivos. Los eventos neurales predominan en las primeras etapas, mientras que las etapas posteriores son de naturaleza hormonal (Harvey y Hoar, 1980).

La percepción de estímulos ambientales, como la percepción del día (fotoperíodo), la temperatura y la época de lluvias, está regida por el sistema nervioso e incluye el paso de la información de los receptores sensoriales hasta el cerebro.

En general la reproducción se encuentra regida por el eje hipotálamo - hipófisis - gónada y en ella participan hormonas de naturaleza peptídica y esteroidea. Entre las peptídicas destacan las hormonas liberadoras de gonadotropinas (GnRH) controladas por el hipotálamo y las gonadotropinas (GtHs) producidas por la hipófisis, mientras que las esteroideas son producidas fundamentalmente por la gónada.



La información neural al llegar al hipotálamo determina la actividad de la hipófisis por medio de mensajeros químicos denominados factores liberadores de gonadotropinas (GnRH), éstos a su vez estimulan la hipófisis para liberar a la circulación general unas hormonas llamadas gonadotropinas (GtH-I y GtH-II), cuyo destino es la gónada; su efecto es estimular la producción de esteroides sexuales en la gónada, esteroides que posteriormente son responsables de la maduración de los gametos (Harvey y Hoar, 1980).

La GnRH son moléculas pertenecientes a una súper familia de genes que dan como resultado la formación de un decapeptido activo con un alto grado de similitud entre los vertebrados y de algunos cordados inferiores (Sherwood,1997).

Actualmente se tienen descritas nueve moléculas de esta familia de las cuales siete corresponden a vertebrados y dos a procordados (Sower,1997).

La primera forma de GnRH descrita para peces fue la encontrada en el salmón *Oncorhynchus keta* y fue determinada como (Trp 7, Leu 8)-GnrH, u hormona liberadora de gonadotropinas de salmón (sGnRH) (Sherwood;1994), pues varía en los aminoácidos que posee en las posiciones 7 y 8 con respecto a la GnRH del mamífero (mGnRH)(Matsuo et al; 1971;Burgus, et al; 1972), que fue la primera en describirse para cualquier tipo de organismo y cuya secuencia es pGlu-His-Trp-Ser-Tyr-Gly-Leu-Arg-Pro-Gly-NH<sub>2</sub>. Otras formas moleculares identificadas en el cerebro de teleosteos son (His5,Trp7,Tyr8)-GnRH denominada como GnRH de pollo II (cGnRH II) (Miyamoto et al;1984), la misma GnRH, la (His5,Leu7,Asn8)-GnRH descrita para el bagre (cfGnRH), y la (Ser8)-GnRH descubierta originalmente en el género Sparus (sbGnRH) (King;1995), otras secuencias reportadas para peces son pez gato GnRH (His5,Asn8)( GnRH,cf GnRH)(Bogerd et al; 1992; Ngamubongchon et al; 1992), pez perro GnRH(His5,Trp7,Leu8)GnRHdf, (Lovejoy et al; 1992), y para la lamprea GnRH-III(His5,Asp6,Trp7,Lys8) GnRH-L,(Sower et al; 1993).

Estas GnRH's han sido identificadas en extractos cerebrales de vertebrados y constituyen una familia de decapeptidos estructuralmente asociados. Durante los 500 millones de años de evolución de los vertebrados la estructura primaria de GnRH ha sido conservada.

La existencia de múltiples formas moleculares de GnRH ha sido bien documentada en teleósteos y en especies como *Clarias gariepinus*, *Clarias macrocephalus*, *Haplocromis burtoni*, *Sparus sparus*, *Morone saxatilis*, *Carassius auratus* y para varias especies de salmónidos del genero *Oncorhynchus*. Su secuencia ha sido confirmada por técnicas de Biología Molecular y para *C. garapines*, *C. Macrocephalus*, *H. Burtoni*, se han reportado tres formas diferentes de GnRH en el encéfalo de estas especies, mientras que en bagres y pez dorado se reporta la presencia de dos formas distintas de GnRHs en sus cerebros. Esta coexistencia de más de una forma de GnRH en el cerebro de teleósteos, ha conducido a estudios sobre bioactividad, distribución y regulación de las mismas, pues en varias de las especies descritas anteriormente, las diferentes formas de GnRH pueden estimular la secreción de GtH (Yu, 1997).

Esta bien establecido que la secreción de GtH es estimulada por GnRH y las gonadotropinas inducen directamente fenómenos gonádicos como son : la vitelogénesis, la maduración del ovocito, aumento de la esteroidogénesis y la evolución espontánea en el caso de las hembras y la estimulación de la espermatogénesis y la producción de testosterona en machos, así como el comportamiento reproductivo en ambos. (Peter, 1997).

Al ser las GtHs moléculas grandes, de tipo dimérico, no resulta muy factible él poder utilizarlas en la inducción de la reproducción en peces, pues su costo es muy elevado por lo que es más accesible el uso del gen GnRH en auxilio de la sincronización de la reproducción entre ambos y el fomento de la calidad y cantidad de gametos por parte de los reproductores. (Peter, 1997).

El gen de GnRH costa de cuatro exónes y codifica para los péptido señal, GnRH y un péptido asociado (GAP). El exón 1 tiene el UTR 5', el exón 2 codifica para el péptido señal, GnRH y un trozo de GAP, el exón 3 codifica la parte media del GAP y el exón 4 codifica la parte final de GAP y contiene el UTR 3'. En el extremo 5' del gen se han identificado 2 regiones promotoras y 4 motivos para unión de estrógenos (ERE). (Yu, 1997).

La similitud de nucleótidos entre los diferentes cDNA's que codifican para las diferentes formas de GnRH en teleósteos son entre el 23.6 y el 33%. Un porcentaje de similitud parecido existe al comparar las secuencias de nucleótidos entre las GnRH's de peces y la de mamíferos o pollo. (Peter, 1997).

A la fecha se han realizado estudios sobre la biología reproductiva e histología de las gónadas del *Chirostoma humboldtianum*, sin embargo no se han reportado estudios sobre la fisiología reproductiva de la especie desde una perspectiva genética mediante técnicas de Biología molecular.

## OBJETIVOS

Objetivo general:

Aislar y caracterizar una secuencia parcial de cDNA que codifica para la hormona de reproducción (Gn-RH) del charal *Chirostoma humboldtianum*.

Objetivos particulares:

Obtener una colección de RNA total de diferentes organismos del pez *C. humboldtianum*.

Diseñar y sintetizar oligonucleotidos a partir de secuencias conocidas del gen que codifica para la hormona de reproducción (GnRH) de diferentes organismos mediante el programa Oligo.

Aislar una secuencia del Gen asociado a la producción de la gonadotropina (Gn-RH) mediante la técnica de obtención rápida de extremos de cDNA (RACE), a partir del RNA total de *C. humboldtianum*.

Caracterizar mediante secuenciación automática la secuencia del Gen que codifica para la hormona asociada a la producción de gonadotropina (Gn-RH).



## METODOLOGIA

Los peces se capturaron en la presa "Las Tazas" que pertenece al municipio de Ixtlahuaca, se encuentra geográficamente entre los  $99^{\circ} 42' 44''$  y  $99^{\circ} 42' 15''$  de longitud oeste y a los  $19^{\circ} 41' 16''$  de latitud norte a una altitud de 2534m snm.

Se incluye en la región hidrológica Lerma-Chapala-Santiago, que pertenece a la provincia del eje neovolcánico y a la subprovincia de lagos y volcanes de Anáhuac.

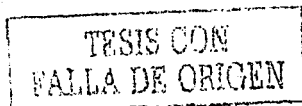
El clima según Köppen y modificado por García en 1964 pertenece al Ci(w1) (w) b (i) g, siendo el más seco entre los templados con lluvias en verano

Las temperaturas medias mensuales máximas se presentan en los meses de abril, mayo y junio, teniendo junio la máxima de  $17.4^{\circ}\text{C}$ . De marzo a septiembre la temperatura media mensual es superior a  $14.2^{\circ}\text{C}$ . Las temperaturas máximas promedio se presentan en los mismos meses anteriormente mencionados. La temperatura máxima promedio se presenta en el mes de mayo siendo de  $28.7^{\circ}\text{C}$  y en los meses de marzo a octubre oscilan de  $27.5^{\circ}\text{C}$  a  $30.3^{\circ}\text{C}$ . Las temperaturas mínimas promedio oscilan de  $1.5^{\circ}\text{C}$  en los meses de marzo a julio, en los meses de agosto a octubre son superiores a  $1.7^{\circ}\text{C}$ .

De acuerdo a las temperaturas, los meses más cálidos se presentan durante la primera parte del año antes de los meses de lluvia que se inician a mediados del año y se continúan hasta octubre.

La precipitación total anual de acuerdo a los datos es de 760 mm. presentándose el máximo en el mes de julio con 175.8 mm.

La parte correspondiente a la zona forestal en la región corresponde a la provincia templada en la cual se encuentra Encino, Palo Blanco, Madroño entre otras (Cetena, 1970).



## **MUESTRA BIOLÓGICA:**

Se realizaron colectas periódicas cada 30 días. Cabe resaltar que en el presente trabajo únicamente se utilizaron organismos de la estación de primavera debido a que en este periodo del año los peces alcanzan la mayor talla y peso.

El muestreo se llevó a cabo considerando abarcar diversas zonas ubicadas a la orilla de la presa, utilizando un chinchorro playero de tipo charalero de 28 metros de longitud aproximadamente con una caída de 1.5 metros y una abertura de malla de 0.8cm.

Una vez obtenidos los peces, fueron anestesiados con MS 222 al 0.5%, hasta que el movimiento opercular se detuvo. Fueron decapitados y el cerebro completo recolectado en tubos "Eppendorf" de 1.5 ml esterilizados y puestos en hielo seco para su traslado al laboratorio, y posteriormente almacenado en un ultra congelador a  $-70^{\circ}\text{C}$ , hasta su utilización.

## **OBTENCION DE RNA total DE TEJIDO:**

El RNA total se obtuvo mediante la técnica del Trizol ( GIBCO/BRL Gaitherburg, MD) basado en el método de extracción de isotiosanato de guanidina – fenol – cloroformo (Chomczynski and Sachi, 1987). El tejido se congeló inmediatamente después de su aislamiento, posteriormente se homogenizó de 50 a 100 mg del tejido con una jeringa de 3 ml y con una aguja de 20 G y se resuspendió en la solución de isotiosanato de guanidina, incubándose la muestra 5 min. a temperatura ambiente. Se adicionó 0.2 ml de cloroformo y el producto se centrifugó a 15 Krpm durante 15 min. a  $4^{\circ}\text{C}$ . Se transfirió la fase acuosa a otro tubo y el RNA se precipitó con isopropanol. La pastilla de RNA se lavó dos veces con etanol al 70% y se resuspendió en 20-50  $\mu\text{l}$  de agua tratada con dietilpírcarbono, por último se incubó a  $55^{\circ}\text{C}$  para que la pastilla se resuspenda completamente y se almacenó a  $-70^{\circ}\text{C}$ .

## **Electroforesis en geles de agarosa**

En un carro de cámara electroforética previamente cerrado con cinta adhesiva se colocó un peine y se agregó agarosa al 1.0 % en TBE 1X, con bromuro de etidio, previamente fundida, hasta alcanzar un grosor de 1 cm.

Una vez solidificada la agarosa, se quitó cuidadosamente el peine y la cinta adhesiva. Se colocó el carro en la cámara electroforética y se cubrió con la solución de corrida TBE 1X.

En un trozo de parafilm se mezclaron 2 $\mu$ l de colorante de corrida y 10 $\mu$ l de la muestra de RNA o cDNA. Se tomó la muestra con una micro pipeta y se depositó en el pozo del gel.

Se sometió la cámara electroforética a corriente eléctrica durante 60 min., utilizando un voltaje de 100 a 120 volts. Una vez terminada la electroforesis se observó el gel en un transiluminador de luz ultra violeta (U.V) de onda corta y se tomó una fotografía con una cámara Polaroid modelo MP-4+.

## **Concentración e integridad del RNA**

La concentración y pureza del RNA se determinó mediante espectrofotometría de luz ultravioleta (UV). El RNA es capaz de absorber luz ultravioleta, a una longitud de onda de 260 y 280 nanómetros, mediante esta propiedad fue posible calcular la concentración y pureza de las muestras.

### **Concentración.**

Esta se obtuvo tomando como base la siguiente relación: 1 DO a 260nm=50mg/ $\mu$ l.

La integridad del RNA se determinó en geles de agarosa al 0.8% teñidos con bromuro de etidio, con un voltaje de 60v. durante 120 minutos, en una cámara de electroforesis previamente lavada con hidróxido de sodio (NaOH) 10 N, durante 180 minutos.

## Diseño de oligonucleotidos

En base a la secuencia reportada en la literatura del gen que codifica para la hormona de reproducción (GnRh) del salmón (Xin -Wei, 1995) se eligieron tres regiones, procurando que por lo menos una ellas se hallase más conservada filogenéticamente y en base a esto, se diseñaron mediante el programa oligo, tres oligonucleotidos para flanquear la región deseada.

Oligo "RACE 1" Dirección 5' CAG CAC TGG TCA TAC GGT TGG C 3'

Oligo "RACE 2" Dirección 3' CGC TCA CAT TTA ATA TTT ATT TTA G 5'

Oligo "RACE 3" Dirección 3' TGA TGG ATT CTG GTT ATG 5'

## Amplificación rápida de extremos de cDNA (RACE)

Esta técnica se desarrolla bajo el siguiente protocolo:

### Síntesis de la primera cadena de cDNA a partir de RNA total.

El RNA se amplificó utilizando la técnica de RACE. Básicamente ésta consistió en generar cDNA de doble cadena, a partir de RNA total. En un tubo de 0.2 ml. se pusieron 2.5  $\mu$ l equivalentes a 2.5  $\mu$ g de RNA, se adicionaron 2  $\mu$ l del oligo "RACE 1", a una concentración de 100 picomoles y se adicionaron 11  $\mu$ l de agua tratada con DEPC. La mezcla se incubó en un termociclador "GeneAmp PCR System 9700 de la marca Applied Biosystems" a 70°C por 10 minutos inmediatamente después se colocó el tubo en hielo por lo menos 1 minuto, posteriormente se adicionó al tubo la siguiente mezcla:

Componente	Volumen por reacción.
"Buffer10x "	2 $\mu$ l.
Cloruro de magnesio (MgCl <sub>2</sub> )	2 $\mu$ l.
Mezcla de dNTP 's	1 $\mu$ l.
DTT 0.1M.	2 $\mu$ l.

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

La mezcla se concentró en el tubo, por centrifugación y se incubó 5 min. a 42°C. Se agregó 1 µl de la enzima SuperScript II RT (trascriptasa reversa) , se incubó a 42°C por 50 minutos, 15 minutos 70°C . A continuación se adicionó 1 µl de inhibidor de RNA'asa y se incubó 20 minutos a 37°C. El volumen final de 25 µl se almacenó a -20°C hasta su uso.

## Síntesis de la segunda cadena de cDNA.

La síntesis de la segunda cadena se realizó por PCR utilizando únicamente el 10% del volumen final de reacción de la primera cadena.

En un tubo eppendorf de 0.2 µl se preparó la siguiente mezcla:

Componente	Volumen por reacción
Agua bidestilada	39 µl.
"Buffer 10x"	10µl.
Cloruro de magnesio (MgCl <sub>2</sub> )	6µl.
dNTP's (mezcla)	40µl.
Oligo 1	1µl.
Oligo 2	1µl.
cDNA	2.5µl.
Taq. Polimerasa	0.5µl.
Volumen de reacción final	100µl.

Se incubó en un termociclador "GeneAmp PCR System 9700 de la marca Applied Biosystems" con las siguientes condiciones:

Desnaturalización inicial: 94°C, 7 minutos ( 1 ciclo).

Desnaturalización 94°C, 1 minuto, alineamiento 50°C, 1 minuto, polimerización 73°C, 1.5 minutos (35 ciclos.).

Extensión 73°C, 7 minutos ( 1 ciclo).

## Obtención e integridad de la banda de cDNA.

Alicuotas de los productos de amplificación obtenidos mediante el "RACE" fueron sometidas a electroforesis en gels de agarosa al 1%, utilizando como marcador de peso molecular escalera de 123 pares de bases (GIBCO-BRL).

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

## Extracción y purificación de la banda de cDNA.

Para extraer la banda de interés del gel de agarosa se utilizó el "kit QIAquick Gel extraction" (Quiagen). Este protocolo fue diseñado para la extracción y purificación de cDNA de 70pb a 10kb de geles de agarosa. La banda de interés se aisló del gel con una navaja de bisturí esterilizada, procurando minimizar el tamaño removiendo el exceso de agarosa. Se pesó y se colocó en un tubo eppendorff. Se adicionaron tres volúmenes de "buffer" QG por un volumen de gel, en base a la relación, por cada 100 mg se adicionaron 300  $\mu$ l. La mezcla se incubó a 50°C por 10 minutos agitando con vortex cada 2-3 minutos durante la incubación. Una vez que la agarosa se disolvió (la mezcla debió mantener un color similar al "buffer" QG), se adicionó un volumen de isopropanol proporcional al peso del fragmento del gel y se mezclaron. A continuación la mezcla se transfirió a una columna (incluida en el kit) y se puso sobre un tubo colector, centrifugándose a 6000 rpm por 1 minuto. Se eliminó el volumen eluido del tubo colector y se colocó nuevamente la columna dentro de este tubo. Se adicionó 0.75 ml de "buffer" PE y se centrifugó 1 minuto a 6000 rpm. Se descartó el volumen eluido y se volvió a centrifugar a 13000 rpm durante 1 minuto. Se colocó la columna dentro de un tubo eppendorff de 1.5 mililitros y se le adicionaron 50  $\mu$ l del "buffer" EB y se centrifugó a máxima velocidad durante 1 minuto para eluir el DNA. Para obtener una mayor concentración se realizó un lavado adicional agregando 30  $\mu$ l de "buffer" EB, centrifugando a máxima velocidad durante 1 minuto.

## Cuantificación y concentración de cDNA

Como se ha mencionado antes, el DNA es capaz de absorber luz ultravioleta a una longitud de onda de 260 nm. Mediante esta propiedad del DNA es posible calcular la concentración y pureza de las muestras, con ayuda de un espectrofotometro.

### Concentración

Esta se obtiene tomando como base la siguiente relación:

1 D.O a 260nm = 40mg/ $\mu$ l.

### Pureza.

Esta se obtiene haciendo la división del valor de la absorbancia a 260nm sobre la absorbancia a 280nm, que es la longitud de onda a la cual absorben las proteínas. La pureza adecuada equivale a una relación 260/ 280nm. igual a 1.8.

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

## Secuenciación automática

La secuenciación automática de los fragmentos, se llevó a cabo utilizando el kit BigDye (Applied Biosystems) los productos fueron leídos en un secuenciador automático ABI Prism 377 (Applied Biosystems).

Esta técnica se basa en el principio de la reacción de "Sanger". Existen nucleótidos marcados con fluorescencia los cuales son incorporados dentro de los productos de que se están polimerizando a partir de un oligonucleótidos cebador.

En un tubo "ependorf" esterilizado de 0.2 ml se realizó la siguiente mezcla:

Componente	Volumen por reacción
Oligo "RACE" 1	3.2µl.
Oligonucleótidos fluorocromados	2.0µl.
CDNA (10-40 ng/µl)	2.0µl.
Agua bidestilada	14.8µl.

La reacción se sometió a un ciclo de 94°C durante 1 minuto, 35 ciclos a: 94°C, 1 minuto, 50°C, 1 minuto, 73°C, 1.5 minutos y un ciclo final de 73°C durante 1 minuto, en un termociclador "GeneAmp PCR System 9700" ("Applied Biosystems").

Una vez teniendo la secuenciación del fragmento de cDNA se procedió a realizar un análisis vía "internet" mediante el programa "Blast" (<http://www.ncbi.nih.gov/BLAST/>).

## RESULTADOS

El objetivo de este trabajo radicó en la amplificación y secuenciación de un fragmento del gen para la hormona de reproducción (GnRH) en el pez *Chirostoma humboldtianum*

En el presente trabajo se utilizaron organismos de la temporada de primavera, debido a que en este periodo se obtuvieron los ejemplares de mayor talla y peso.

El RNA se extrajo a partir de cerebros conservados en un ultracongelador, utilizando trizol, como se describe en métodos. Su concentración se determinó por espectrofotometría a 260 y 280 nm como se comenta en métodos. En la tabla 1 se muestran las concentraciones de RNA total obtenidas de 7 muestras analizadas. Las concentraciones obtenidas oscilaron de 1600-5500 ng y. La integridad de cada una de las muestras fue verificada mediante electroforesis en geles de agarosa. En la figura 1 se muestra el resultado de la electroforesis de 2 muestras con las concentraciones más altas de RNA obtenidas.

MUESTRA.	260 nm.	280 nm.	RAT.	CONCENTRACIÓN (ng/μl)
A	2.816.	1.574.	1.817.	5632 ng
B	1.613.	0.814.	1.846.	3226 ng
C	2.894.	1.572.	1.841.	5788 ng
D	1.859.	0.938.	1.982.	3718 ng
E	1.312.	0.651.	2.015.	2624 ng
F	0.843.	0.429.	1.965.	1686 ng
G	0.140.	0.071.	1.972.	280 ng

TABLA 1: Muestra la lectura de las concentraciones en  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$  de RNA por espectrofotometría de luz ultra violeta a 260 y 280nm.



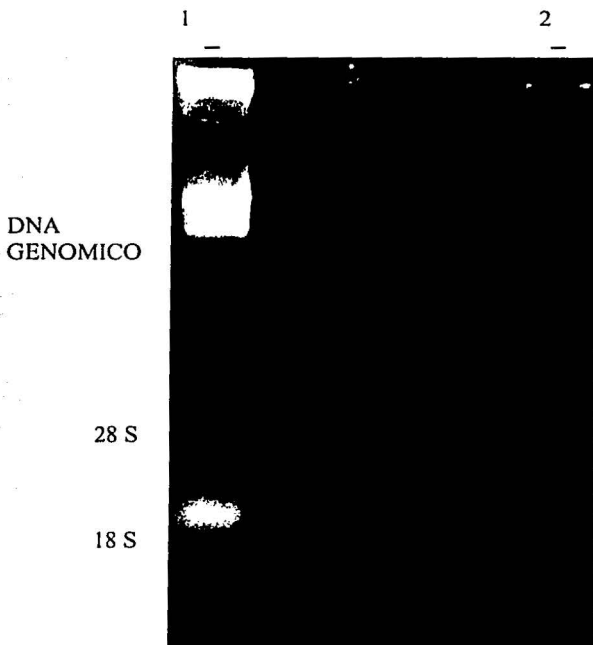


Figura 1. Electroforesis de RNA total de *Chiostoma humboldtianum*. Alicuotas de RNA total se sometieron a electroforesis en geles de agarosa al 0.8% teñidos con bromuro de etidio como se describe en metodología. Al margen se indican los tamaños de las bandas ribosomales.

Con la finalidad de verificar la integridad de los oligonucleotidos, éstos fueron sometidos a electroforesis en gel de agarosa al 1%. En la figura 2 se observa una banda para cada oligonucleotido, lo cual indica que cada uno de éstos tiene un solo producto. Por otro lado las concentraciones de los 3 oligonucleotidos son similares.

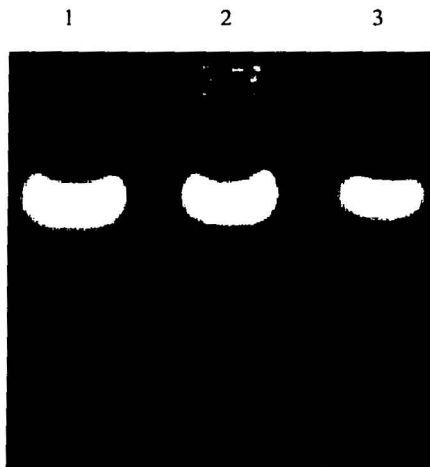


Figura 2. Electroforesis de oligonucleotidos, alícuotas de 2 $\mu$ l. Los oligonucleotidos se sometieron a electroforesis en geles de agarosa al 0.8% teñidos con bromuro de etidio como se describe en metodología. Carril 1 oligonucleotido RACE 3, carril 2 oligonucleotido RACE 1 y carril 3 oligonucleotido RACE 2.

En la figura 3 se muestran los productos de cDNA obtenidos mediante la técnica de amplificación rápida de extremos de cDNA ("RACE"). Como se puede observar se obtuvieron bandas de aproximadamente 369 pb.

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

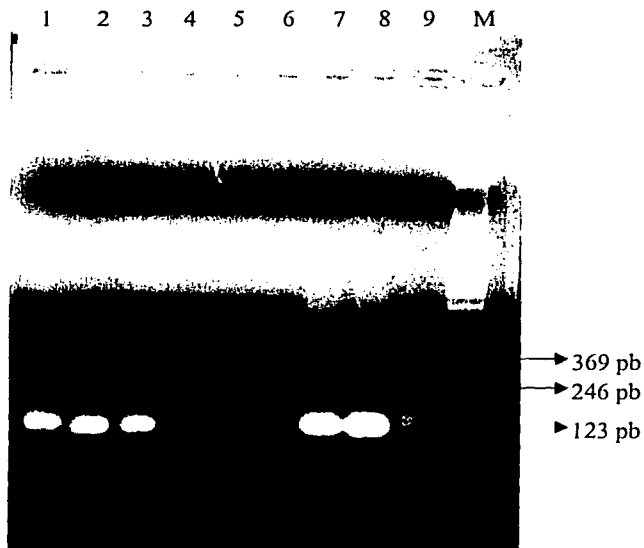


Figura 3. cDNA de *Chirostoma humboldtianum*. El cDNA del candidato a ser el gen asociado a la producción de GnRH de este organismo se obtuvo como se describe en metodología. Alícuotas de los productos fueron sometidos a electroforesis en gel de agarosa al 1%. Carril 1, 2 y 3 oligonucleótidos RACE 1, 2 y 3 respectivamente. Carril 4, 5 y 6 controles negativos. Carril 7 y 8 cDNA de *C. humboldtianum*. M marcador peso molecular, escalera de 123 pb (Gibco-BRL).

Con la finalidad de tener una mayor cantidad del producto amplificado para su posterior purificación, se diseñó una variación en los pozos, de tal manera que el 90% restante del producto obtenido por RACE, se depositará en su totalidad. En la figura 4 se muestra el resultado obtenido.

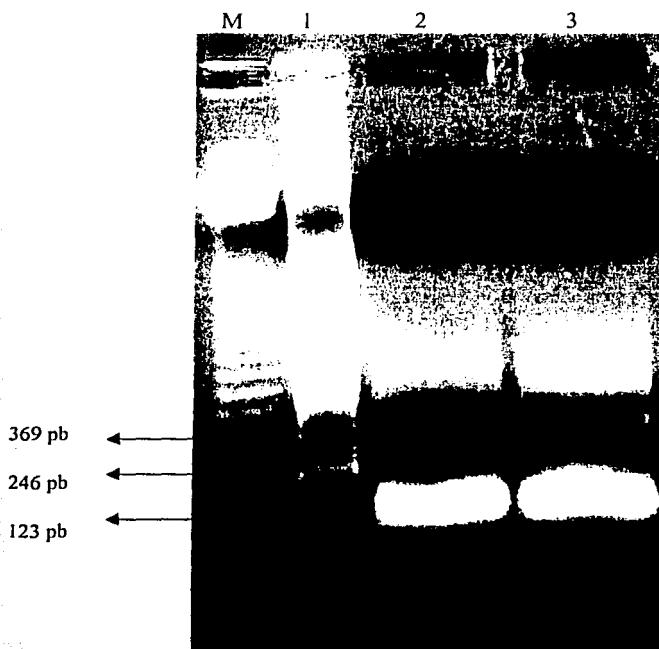


Figura 4. Electroforesis de los productos totales del cDNA de *C. humboldtianum*. Los productos totales de 2 reacciones de síntesis de cDNA se separaron por electroforesis en gel de agarosa al 1%, como se describe en metodología. Carril 2 y 3 cDNA's de *C. humboldtianum*. M marcador peso molecular, escalera de 123 pb (Gibco-BRL) y el carril 1 muestra una alicuota degradada.

Los productos amplificados fueron purificados del gel como se describe en metodología. Posteriormente, para la secuenciación automática de los productos de cDNA, se cuantificaron por espectrofotometría 7 productos de la purificación de cDNA del gel de agarosa. Los valores obtenidos se muestran en la tabla 2.

MUESTRA.	260. Nm	280. Nm	RAT	CONCENTRACIÓN (ng/ $\mu$ l)
A	0.002.	0.001.	2.000.	5.0.
B	0.010.	0.009.	1.111.	25.0.
C	0.007.	0.006.	1.167.	17.5.
D	0.005.	0.003.	1.660.	12.5.
E	0.012.	0.010.	1.200.	30.0.
F	0.019.	0.018.	1.056.	47.5.
G	0.009.	0.006.	1.500.	22.5.

Tabla 2 : Concentraciones de cDNA's de diversas muestra de *C. humboldtianum*.

Una vez obtenido el fragmento de nucleótidos de aproximadamente 369 pb, por medio de secuenciación automática, se secuenció un producto de 240 pb, que se describe en la figura 5.

5'-TTAAAACCCCTTTGGACGGCCACGACGGTTTCTGATAGTCTTGGAACTCGGACTTTCGTTCTTGATTAATGAAAACATCTTGGCAAATGCTTTGGCGTTTCGTCCGTATTGCGCCGATCCAAGAATTTACAGTCTAGCGGCCAACTACTAATGCCCCCGGCCATCTTAACTCAAGGCTTCATTTTACAGCACATCCTACGGATGGCTACCAGGTACTTTCATTCTTATCCCAACC 3'

Figura 5. Secuencia parcial del gen asociado a la producción de GnRH de C. humboldtianum. Los nucleótidos subrayados y en letra cursiva corresponden a la región conservada de la hormona.

La región secuenciada (240 pb) fue consultada en la base de datos "Blast", obteniendo como resultado una poca homología con otras secuencias ya reportadas. Sin embargo al comparar únicamente la secuencia que codifica a la hormona, ésta resultó tener un alto porcentaje de similitud del 90%, con otros peces (fig 6).

CAG CAC TGG TCA TAC GGT TGG CTT CCG GGT gln his trp ser tyr gly trp leu pro gly	<u><i>Oncorhynchus keta</i></u> (Salmón)
CAG CAC TGG TCC TAC GGA TGG CTA CCA GGT gln his trp ser tyr gly trp leu pro gly	<u><i>Pagrus major</i></u> (Pez rojo)
CAG CAC TGG TCC TAC GGG TGG CTA CCA GGC gln his trp ser tyr gly trp leu pro gly	<u><i>Porichthys notatus</i></u> (Aleta Clara)
CAG CAC ACA TCC TAC GGA TGG CTA CCA GGT gln his thr ser tyr gly trp leu pro gly	<u><i>C. humboldtianum</i></u> (Charal)

Figura 6. Comparación de la región conservada de la secuencia de cDNA de la hormona GnRH de diferentes organismos.

Otro análisis comparativo fue realizado con "Fasta". Inicialmente se comparó exclusivamente la región del decapeptido (30 pb) obteniendo una similitud del 90 % con la hormona GnRH de peces. Sparus aurata, salmon-type g, Pagrus major, Sparus aurata, Haplochromis burtoni, Oryzias latipes, Dicentrarchus labrax, Oryzias latipes, Porichthys notatus y Verasper moseri, por mencionar algunos.

Al hacer la comparación de los nucleótidos localizados hacia el extremo 3' del decapeptido, que en el caso de la hormona corresponde a la región GAP, no se encontró homología con ninguna secuencia. Con lo que respecta con los nucleótidos (189 pb) localizados hacia la región 5' del decapeptido, que corresponde al péptido señal en la hormona GnRH, se obtuvo un 82 % de homología con la región 18S rRNA para diversos peces.

La homología de la secuencia completa aislada en este trabajo fue del 82.4 al 84.6 % con respecto a la secuencia 18S rRNA de los peces Oreochromis esculentus, Chrysophrys major, Salmo salar, Cyprinus carpio, Oncorhynchus mykiss, entre otros.

TESIS CON  
SELLA DE ORIGEN

Resultats de FASTA.txt

>> Sparus aurata salmon (1972 nt)  
90.000% identidad 90.000%.

```

                                10      20      3
0
query                          CAGCACACATCCTACGGATGGCTACCAGG
T
                                :.....:
:
gb|U30 TTGGCGTTGGTGGTTCAGGTCACCCGTGCCAGCACTGGTCTACGGATGGCTACCAGG
T
                                1590      1600      1610      1620      1630      164
0
gb|U30 GGGAAAGAGAAGCGTGGGAGAGCTGGAGGCAACCATCAGAATGATGGGTACAGGAGGAGT
G
                                1650      1660      1670      1680      1690      170
0
```

>> Pagrus major (442 nt)  
90.000% identidad 90.000%

```

                                10      20      3
0
Query                          CAGCACACATCCTACGGATGGCTACCAGG
T
                                :.....:
:
gb|D26 TTGGCGTTGGTGGTTCAGGTCACCCGTGCCAGCACTGGTCTACGGATGGCTACCAGG
T
                                50      60      70      80      90      100
0
gb|D26 GGGAAAGAGAAGTGTGGGAGAGCTGGAGGCAACCATCAGAATGATGGGTACAGGAGGAGT
G
                                110      120      130      140      150      160
```

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN



Resultats de FASTA.txt

>> Sparus aurata (264 nt)  
90.000% identidad 90.000%

```

                                10      20      3
0
Query                          CAGCACACATCCTACGGATGGCTACCAGG
T
                                ::::::  ::::::::::::::::::::
:
gb|AF0 TTGGCGTTGGTGGTTCAGGTCACCCTGTCCCAGCACTGGTCTACGGATGGCTACCAGG
T
      40      50      60      70      80      90

gb|AF0 GGAAGAGAAGCGTGGGAGAGCTGGAGGCAACCATCAGAATGATGGGTACAGGAGGAGT
G
      100     110     120     130     140     150
```

>> Haplochromis burtoni (2545 nt)  
86.667% identidad 86.667%

```

                                10      20      3
0
Query                          CAGCACACATCCTACGGATGGCTACCAGG
T
                                ::::::  ::::::  ::::::::::::::::::::
:
gb|AF0 CTGGCGTTGGTGGTTCAGGTCACCCTGTCCCAGCACTGGTCTATGGATGGCTACCAGG
T
      800     810     820     830     840     85

0

gb|AF0 GGAAAGAGAAGTGTGGGAGAGCTTGAGGCAACCATTAGGGTGGTAATTATTATATGTG
G
      860     870     880     890     900     91

0
```

TESTE CON  
FALLA DE ORIGEN 26

Resultats de FASTA.txt

>> Oryzias latipes  
86.667% identidad 86.667%

```

                                10      20      3
0
Query                          CAGCACACATCCTACGGATGGCTACCAGG
T
                                : : : : :
:
gb|AB0 TTGGCGTTGGTGGTTCAGGTCACCCTGTGCCAGCACTGGTCCTATGGATGGCTACCAGG
T
    60      70      80      90      100     110

gb|AB0 GGAAAAAGAAGTGTGGGAGAGCTCGAGGCAACCATCAGGATGATGGGCACAGGAAGAGT
G
    120     130     140     150     160     170
```

>> Dicentrarchus labrax (575 nt)  
86.667% identidad 86.667%

```

                                10      20      3
0
Query                          CAGCACACATCCTACGGATGGCTACCAGG
T
                                : : : : :
:
gb|AF2 TTGGCGTTGGTGGTTCAGGTCACCCTGTCCCAGCACTGGTCCTATGGATGGCTACCAGG
T
    150     160     170     180     190     200

gb|AF2 GGAAGAGAAGTGTGGGAGAGCTAGAGGCAACCATCAGGATGATGGGTACAGGAGAAGT
G
    210     220     230     240     250     260
```

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

Resultats de FASTA.txt

>Oryzias latipes (418 nt)  
86.667% identidat 86.667%

```

                                10      20      3
0
Query                          CAGCACACATCCTACGGATGGCTACCAGG
T
                                : : : : : : : : : : : : : : : : : :
:
gb|AB0 TTGGCGTTGGTGGTTCAGGTCACCCCTGTGCCAGCACTGGTCTATGGATGGCTACCAGG
T
      60      70      80      90      100      110

gb|AB0 GAAAAAGAAGTGTGGGAGAGCTCGAGGCAACCATCAGGATGATGGGCACAGGAAGAGT
G
      120     130     140     150     160     170
```

>> Porichthys notatus salmon (460 nt)  
86.207% identidat 86.207%

```

                                10      20      3
0
Query                          CAGCACACATCCTACGGATGGCTACCAGG
T
                                : : : : : : : : : : : : : : : : : :
:
gb|U41 TTGCATTGGTGCTTCACGCCGTCCTGTCCCAGCACTGGTCTACGGGTGGCTACCAGG
C
      90      100     110     120     130     140

gb|U41 GGGAAAGAGAAGCGTGGGAGAGCTGGAGGCCACCATCAGGATGATGGGTACAGGCCGGTGT
G
      150     160     170     180     190     200
```

TESIS CON  
SALLA DE ORIGEN

Resultats de FASTA.txt

>> gonadotropina. (460 nt)  
86.207% identidad 86.207%

```

                                10      20      3
0
Query                          CAGCACACATCCTACGGATGGCTACCAGG
T                               ::::::  ::::::  ::::::
gb|S79 TTGGCATTGGTGCTTCAGCCGTCCTGTCCCAGCACTGGTCCTACGGGTGGCTACCAGG
C
      90      100      110      120      130      140

gb|S79 GGAAGAGAAGCGTGGGAGAGCTGGAGGCCACCATCAGGATGATGGGTACAGGCGGTGT
G
      150      160      170      180      190      200

```

>> Verasper moseri (447 nt)  
83.333% identidad 83.333%

```

                                10      20      3
0
Query                          CAGCACACATCCTACGGATGGCTACCAGG
T                               ::::::  ::::::  ::::::
:
gb|AB0 TTGATGTTGGTGGTTCAGGTCGCCCTGTCCCAGCACTGGTCCTATGGATGGCTCCAGG
T
      80      90      100      110      120      13

0

gb|AB0 GGAAGAGGAGTGTGGGGAGCTGGAGGCGACCATCAGGATGATGGGCACAGGCGGAGT
G
      140      150      160      170      180      19

0

```

SERIE 009  
FALLA DE INGRESO

## DISCUSION

La base experimental de este trabajo radica en el aislamiento y amplificación de un fragmento del gen asociado a la hormona de reproducción GnRH en el pez C. *humboldtianum*.

Como se menciona en metodología, se realizaron colectas periódicas en el área de estudio, cabe resaltar que en el presente trabajo se emplearon organismos del periodo de primavera debido a que en esta temporada el C. *humboldtianum* alcanzó su mayor talla y peso, y por tanto un índice gonadosomático considerable, indicativo de la época reproductiva (Rodríguez 1992).

Es importante señalar que en la época de primavera se da un aumento en el porcentaje de zooplanton (recurso alimenticio de especies ícticas) (Navarrete y Chazaro, 1992), recurso que al ser aprovechado al máximo se traduce en una eficiente conversión fisiológica del alimento (Palohemio de Dickie, 1966) para un mayor y rápido crecimiento del charal.

Originalmente se trato de aislar y caracterizar una secuencia del gen que codifica para la hormona (GnRH) por medio de la técnica de amplificación rápida de extremos de cDNA (RACE) utilizando un oligonucleotido adaptador en el extremo 3' poly A y un oligonucleotido degenerado para un sitio interno de la secuencia, diseñado en base al gen asociado a la producción de la GnRH del salmón.

Se realizaron múltiples ensayos con esta técnica obteniendo una diversidad de bandas. Algunas fueron purificadas y secuenciadas. Ninguna de ellas tuvo homología con la secuencia de la hormona.

Posteriormente se decidió utilizar una estrategia diferente para el 3' "RACE" la cual consistió en diseñar otros dos oligonucleotidos, que a nuestro criterio resultarían ser más específicos, un oligo "RACE1" para un sitio interno que resulta ser la región conservada, que en este caso resulto ser la secuencia de la hormona (GnRH), no solo en el salmón sino en otras especies de peces ya reportados. El segundo oligonucleotido "RACE 2" fue diseñado para flanquear la región del extremo 3' poly "A".

El cDNA obtenido a partir de RNA mensajero por "RACE" consistió en un fragmento de aproximadamente 360 pb. Este producto fue secuenciado y se obtuvo una lectura de 240 pb que se sugiere pertenece a la súper familia de decapéptidos. Esta secuencia también tiene un patrón de repetidos de timinas (figura 5) reportada en el gen GnRH de otros peces como el salmón.

En esta secuencia se puede notar que la homología de nucleótidos con otros teleosteos es baja, sin embargo, para la región conservada (hormona GnRH) encontramos una homología de hasta el 90% con las secuencias reportadas para otras especies de peces, el 10 % restante difiere a consecuencia de una mutación con sentido equivocado, dándose ésta en el tercer triplete (TGG por ACA) de C. humboldtianum, esto confirma que la diversidad genotípica entre los organismos está establecida por el proceso evolutivo.

Con esta metodología se pudo obtener la región de la secuencia de la hormona GnRH tal como se puede ver en resultados, si bien es cierto que la técnica de "RACE" es relativamente rápida para tener amplificaciones de DNA, la dificultad radica en obtener una región de cDNA específica, esto sucede comúnmente cuando se desconoce el tamaño de esta, debido a la utilización de oligos degenerados que resultan no ser específicos y por ello hibridar en diversos sitios. Esto pudo haber ocurrido con el fragmento que nosotros deseábamos aislar, ya que se encuentra una alta homología con una región que tiene una similitud con el gen GnRH, por este motivo se sugiere complementar este trabajo con diversas alternativas como son, el diseño de oligos que amplifiquen una región mas extensa con respecto al decapéptido, con la finalidad de encontrar las regiones asociadas al decapéptido, ya que no se descarta la posibilidad de que estas regiones se encuentren en otro sitio.

Otra alternativa sería el uso de sondas genómicas o de cDNA correspondientes a secuencias relacionadas con la hormona GnRH de otros organismos, para usarlas en ensayos de hibridación Northern o Southern.

Los estudios de Biología Molecular en peces no solo permiten contribuir al mejor aprovechamiento de especies para alimento humano, sino que además ofrece otras posibilidades como modelos sobre el conocimiento de enfermedades genéticas y desarrollos aplicables a otros vertebrados incluido el hombre. Quizás una de las aplicaciones menos explotada, es la utilización de los animales acuacultivados para la producción de sustancias de elevado valor económico por ejemplo la producción de insulina y colágena humana a partir de tilapia genéticamente modificada. Otro ejemplo destacable es el salmón del Atlántico genéticamente modificado en el gen relacionado con la hormona de crecimiento, que ocasionó un incremento en su peso corporal hasta casi un 1000 % (Hackett 2000).

Este trabajo es una de las primeras contribuciones al conocimiento Molecular de Chirostoma h., que permitirá iniciar una caracterización más precisa de la Biología de esta

especie, lo que podrá redituarse en un mejor conocimiento de la Fisiología reproductiva de esta especie, con fines de que en el futuro se cuente con bases suficientes para su cultivo, con todos los beneficios económicos y sociales que ello confiera, además los conocimientos adquiridos por esta investigación se podrán aplicar a especies cercanas en un mejor aprovechamiento de esta especie.

# APENDICE

## Reactivos:

Agua "DEPC" (diethylpicrocarbonato).

## Colorante de carga para geles de agarosa :

Azul de bromofenol (0.25 %)

Xilencianol (0.25 %)

Glicerol (30.0 %)

## Anestesia :

Ms222 al 0.5 %

## Reactivos para extracción de RNA :

Trizol

Cloroformo

Isopropanol

Etol 75 %

## "Buffer" TBE 5X (amortiguador de boratos)

Tris base 54.0 gr

Acido borico 27.5 gr

EDTA 4.65 gr

Agua destilada 1000 ml.



### **“Buffer” TBE 1X (buffer de boratos)**

Agua destilada	400 ml.
Buffer 5 X	100 ml.
Total	500 ml.

### **Lavado de camara electroforetica para eliminaci3n de RNA'sas**

Hidroxido de sodio (NaOH) 10N

### **Geles de agarosa para corrimiento electroforetico al 1%**

Agarosa	0.6gr
Buffer TBE 1X	30 ml
Bromuro de etidio	1.0µl

### **Kit para la primera cadena de cDNA**

Oligo “RACE 1”	100 picomoles.
Agua DEPC	
“Buffer”	10 X
Cloruro de magnesio (MgCl <sub>2</sub> )	25mM
Mezcla de dNTP's	10mM
DTT	0.1M
Transcriptasa reversa. (superScript II RT)	200 U.
Inhibidor de RNA'sas.	

### **Kit para la segunda cadena de cDNA**

Agua bidestilada	
"Buffer"	10 X
Cloruro de magnesio (MgCl)	50 mM
Mezcla de dNTP's	2 mM
Oligo "RACE 2"	100 pm
Oligo "RACE 1"	100 pm
cDNA	100 pm
Taq polimerasa.	

### **Kit para extracció de agarosa**

"Buffer" QG.	
Isopropanol	
"Buffer" PE	
"Buffer" EB	10 mM.

### **Kit para purificaci3n de cDNA**

Columna de microfiltrado. ("Dye Ex")  
Tubo colector.

### **Kit para secuenciaci3n automatica.**

Oligo "RACE" 1	100 pm.
Oligonucleótidos fluorocromados	
cDNA	
Agua bidestilada	

## BIBLIOGRAFIA

- Aguilar, P. J. F. y N. Navarrete, (1997.) Crecimiento, condición y mortalidad del charal *Chirostoma humboldtianum* en México. Rev. de Biol. Trop. 44 (3) : 757-771 pp.
- Aguilar, P. J. F. (1993.) Crecimiento y supervivencia del charal *Chirostoma humboldtianum*, en el embalse San Felipe Tiacaque, Edo. de México. Tesis profesional. F.E.S-IZTACALA. UNAM.México. 37 pp.
- Alvarado, O. y Ruiz, A. (1996.) Uso de los anestésicos MS-222, Xilocaína y Xilocaína potenciada con bicarbonato de sodio en el manejo y transporte de pescado blanco *Chirostoma humboldtianum*, Valencianess, 1835. (Pisces:Atherinidae) de la laguna de Zacapu, michoacán. Tesis profesional. Escuela de Biología. U.A.G., F.E.S. Zaragoza. U.N.A.M. 158 pp.
- Arnheim, N., (1990.) The Application of PCR organismal and population Biology Bioscience 12 (4) : 25-30 pp.
- Barbour, C., (1973.) The systematics and evolution of the genus *Chirostoma tulane* Stud. Zool. Bot. 18 (3) : 97-141 pp.
- Bogerd, J., Li, K. W., Janssen-Dommerholt, C., and Goos, H. (1992.) Two gonadotrophin-releasing hormones from africa catfish (*Clarias gariepinus*). Biochem. Biophys. Res. Commun. 187, 127-134 pp.
- Bogerd, J., Zandbergen, T., Andersson, E., and Goos, H. (1994.) Isolation, characterization and expression of cDNA's encoding the catfish-type and chicken-II-type gonadotropin-releasing hormone precursors in the African catfish. Eur. J. Biochem., 222, 541-549 pp.
- Burgus, R., Butcher, M., Amoss, M., Ling, N., Monahan, M., River, J., Fellows, R., Blackwell, R., Vale, W., and Guillermin, R. (1972.) Primary structure of the ovine hypothalamic luteinizing hormone-releasing factor (LRF). Proc. Natl. Acad. Sci. USA 69, 278-282 pp.
- Caillet, G. M., (1986.) Fishes. A field and laboratory manual on their structure, identification and natural history. Wadsworth Publishing Company. Belmont, Ca. 56-65 pp.



- CETENAL, (1970.) Carta topográfica, geológica, uso del suelo y climática. SSP escala 1: 50000 E-14-A-27.
- Chomczynski, p., and Sacchi, N. (1987.) Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. Anal. Biochem. 162, 156-159 pp.
- Cooper, M (2002.) La célula. Harvard Medical School segunda edición, España 3-89 pp.
- Fuentes, L., Figueroa – Lucero, G. Y Soto – Galera, E. (1997.) Espectro trófico de *Chirostoma humboldtianum* (Valensiennes) durante un ciclo anual en la presa Las Tazas, Jocotitlan, Edo. de México. XIV congreso nacional de zología. Noviembre de 1997. Guanajuato Guanajuato.
- Garibay, R. (1988.) Estudio histológico de las gónadas del charal *Chirostoma humboldtianum*, del embalse Huapango Estado de México. I Congreso Nacional de Ictiología. La Paz B.C.S. del 8 al 11 de noviembre de 1988. 29-35 pp.
- Hackett. (2000.) The molecular genetics of transgenic fish. Recient advances in marine biotechnology ed. Fingerma, Acuaculture part B Fishes, 77-145 pp.
- Harvey, B. (1980.) Teoría y práctica de la reproducción inducida en los peces. Centro internacional de investigación para el desarrollo. Ottawa, Ont, 48 pp.
- King, J., and Millar, R. P. (1982.) Structure of chicken hypothalamic luteinizing hormone-releasing hormone.2. Isolation and characterization. J. Biol. Chem. 257, 10729-10732 pp.
- Lovejoy, D., Fischer, W., Ngamvongchon, S., Craig, A., Nahorniak, C., Peter, R., Rivier, J., and Sherwood, N. (1992.) Distinct sequence of gonadotropin-releasing hormone (GnRH) in dogfish brain provides insight into GnRH. Proc. Natl. Acad. Sci. Usa 89, 6373-6377 pp.
- Maldonado, V. R. (1996.) Algunos aspectos reproductivos de *Chirostoma humboldtianum* durante el periodo otoño-invierno en la laguna de Zacapu, Michoacán. México. Memorias del XIII Congreso Nacional de Zoología. Morelia Michoacán. Noviembre de 1995, 49pp.
- Matsuo, H., Baba, Y., Nair, R., Arimura, A., and Schally. (1971.) Structure of the porcine L.H- and FSH-releasing hormone. I. The proposed amino acid Sequence. Biochem. Biophys. Res. Commun. 43, 1334-1339 pp.

- Miyamoto, K., Hasegawa, Y., Mineshi, T., Nomura, M., Takahashi, Y., Igarachi, M., Kangagua, K., Almatsuo, H. (1982.) Isolation and characteritacion of chicken hypothalamyc luteinising hormone-releasing hormone. Biochem. Biophys. Res. Commun. 107, 820-827 pp.
- Navarrete, S. y Cházaro, O. S. (1992.) Espectro trófico del charal C. humboldtianum. (Valenciannes) Pisces Atherinidae del embalse San Felipe Tiacaque, Edo de México. Rev. Zool. F.E.S. Iztacala. 3, 23-29 pp.
- Ngamvongchon, S., Lovejoy, D., Fischer, W., Craig, A., Nahorniak, C., Peter, R., Rivier, J., and Sherwood, N., (1992.) primary structur of two forms of gonadotrophin-releasing hormone, one distin and one conserve from catfish brain. Mol. Cell. Neurosci. 3, 17-22 pp.
- Nikolsky, G. (1963.) The ecology of fishes. Academic Press. London, 352 pp.
- Paloheimo, J., and Dickie, L. (1966.) Food and growth of fish. Relation among food, body, size and growth efficiency. J. Fish. Res. Board. Cand. 23, 1209-1248 pp.
- Peralta, C. (1991.) Ciclo gonádico a nivel histológico en hembras de Chirostoma Estor copandaro. (pescado blanco) en el lago de Pátzcuaro, Mchoacán. Mex. tesis profesional Facultad de Ciencias. U.N.A.M., México D.F. 116 pp.
- Peter R., Yu, K., (1997.) Neuroendocrine regulation of ovulation in fishes: Basic and applied aspects. Rev Fish Biol. 7, 137-197 pp.
- Rodriguez, D. (1987.) Algunos aspectos ecológicos del zooplancton del embalse San Felipe Tiacaque, Edo de Mex. Memorias del XI Simposium de Biologías de campo. F.E.S. Iztacala UNAM. 35 pp.
- Ruíz-Durá, M. F. (1993.) Recursos Pesqueros de México. Su conservación y manejo socio-ecónomico. 3ra. Ed. Limusa. México, D.F. 283 pp.
- Sherwood, N., Eiden, L., Brawnstein, M., Spiess, J., Rivier, J., and Vale, W. (1983.) Characterization of a teleost gonadotropin- releasing hormone. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 80, 2794-2798 pp.
- Sherwood, N., Von, S., Lescheid, D., (1997.) Origen and evolution of GnRH in Vertebrates and invertebrates. In GnRH neurons. Gene to behavior. Parhar and Sukuma editores 3-26 pp.

- Sherwood, N., Parker, D., McRory, J., (1994.) Molecular evolution of Growth hormone-releasing hormone and gonadotrophin releasing hormone in Sherwood NW y Hew CL, editores. Fish physiology, vol. XIII, New York, Academic Press 3-66 pp.
- Sower, S. (1997.) Evolution of gen GnRH in fish and ancients origins. in GnRH neurons. Gene to behavior. Parhar y sukuma editore 27-50 pp.
- Sower, S., Chiang, Y., Lovas, S., and Conlon, J. (1993.) Primary structure and biological activity of a third gonadotrophin-realesing hormone from lamprei brain. Endocrinology 132, 1125-1131 pp.
- Suzuki, M., Hyodo, S., Cobayashy, M., Aida, K., and Urano, A. (1992.) Characterization and localization of mRNA in coding the salmon-type gonadotrophin-releasing hormone precursor of the massu salmon. J. Mol. Endocrinol. 9, 73-82 pp.
- Yu, K., Lin, X., Cumba, B., and Peter, R. (1997.) Neural regulation of GnRH in teleost fishes. In GnRH neurons. Gene to behavior. Parhar y Sakuma editors. 277-312 pp.
- Xin-Wei L., and Peter, R. (1995.) Expression of Salmon Gonadotrophin-Releasing Hormone (GnRH) and Chicken GnRH-II Precursor Messenger Ribonucleic Acids in the Brain and Ovary of Goldfish., GCE. 101, 282-296 pp.

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN