



# UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

---

---

## FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES IZTACALA

Aislamiento parcial y secuenciación del receptor acoplado a proteínas G 54  
(GPR54) en el encéfalo de *Chiostoma humboldtianum*.

### T E S I S

PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

BIÓLOGO

Presentan:

ERIKA ALEJANDRA GARCÍA HERNÁNDEZ  
ANEL EDITH LAGUNES GUILLÉN

Director de Tesis: Dr. Rodolfo Cárdenas Reygadas.



TLALNEPANTLA, EDO. DE MÉXICO

2010



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.

## **AGRADECIMIENTOS**

Al Dr. Rodolfo Cárdenas Reygadas, por su apoyo en la realización de este trabajo.

Al Dr. Jorge Campos Contreras por sus comentarios, sugerencias y sobre todo apoyo en el análisis de resultados de este proyecto.

A la M. en C. Beatriz Macedo Garzón (Beta) por la valiosa amistad y por sus consejos brindados durante todo el proceso para la elaboración de este trabajo.

Al Dr. Diego Arenas Aranda, Dr. Sergio Vaca Pacheco y M. en C. Mónica Chaves Maldonado, por su tiempo dedicado en la revisión de este trabajo.

## ÍNDICE

<b>1. Resumen</b>	<b>1</b>
<b>2. Introducción</b>	<b>2</b>
<b>2.1. Antecedentes</b>	<b>5</b>
<b>2.2. Consideraciones del genero <i>Chirostoma</i></b>	<b>14</b>
<b>3. Justificación</b>	<b>16</b>
<b>4. Objetivo</b>	<b>17</b>
<b>5. Materiales y Métodos</b>	<b>18</b>
<b>5.1 Obtención del material biológico</b>	<b>18</b>
<b>5.2 Aislamiento del RNA total</b>	<b>18</b>
<b>5.3 Aislamiento y amplificación</b>	<b>19</b>
<b>5.4 Clonación</b>	<b>19</b>
<b>5.5 Secuenciación y análisis filogenético</b>	<b>20</b>
<b>6. Resultados</b>	<b>21</b>
<b>7. Discusión</b>	<b>23</b>
<b>8. Conclusión</b>	<b>32</b>

<b>9. Glosario</b>	<b>33</b>
<b>10. Referencias</b>	<b>35</b>

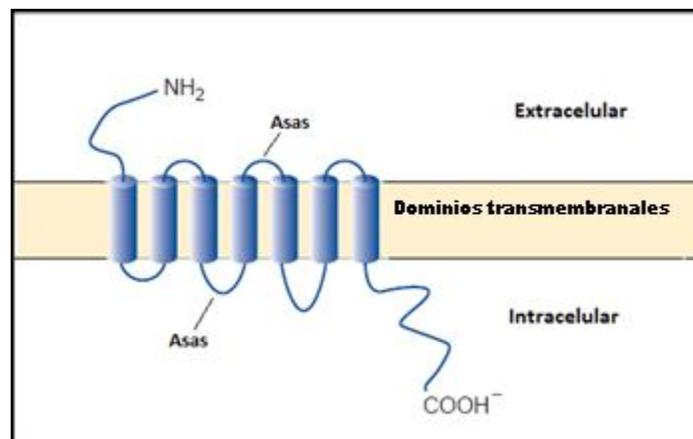
## 1. RESUMEN

La reproducción está bajo el control de señales que regulan dicho fenómeno. Entre estas, se encuentra la liberación de hormonas y factores químicos. Una molécula importante en este proceso es el receptor transmembranal GPR54 que juega un papel esencial en la reproducción. Estudios realizados en peces y otros vertebrados han demostrado que los niveles de mRNA de GPR54 aumentan de manera significativa durante el inicio de la pubertad, lo que sugiere que la vía Kiss1/GPR54 es crucial en el inicio de la pubertad y mantenimiento de la reproducción en estos organismos. El objetivo de este trabajo fue el obtener una secuencia parcial del receptor GPR54 de *Chirostoma humboldtianum* a partir de RNAm. El material biológico fue colectado en la Laguna de Zacapu, Michoacán. Los encéfalos fueron inmediatamente removidos y conservados en RNAlater®. Se generaron cDNAs por RT-PCR del encéfalo de *Ch. humboldtianum* y posteriormente se realizaron una serie de PCRs con oligos específicos, de los cuales se obtuvo un producto de 530 pb que fue clonado y secuenciado. Por último, la secuencia obtenida fue analizada en el programa BLAST y blastx. La comparación nos permitió determinar que el producto obtenido, presenta una similitud con GPR54 del 88%-84% con otras especies de teleósteos, como son: *Haplochromis burtoni*, *Oreochromis niloticus*, *Mugil cephalus*, *Thunnus maccoyii*, *Rachycentron canadum*, *Hippoglossus hippoglossus*, *Solea senegalensis* y *Micropogonias undulatus*.

## 2. INTRODUCCIÓN

La reproducción sexual esta definida por la capacidad de generar gametos viables, a fin de promover la fertilización y el desarrollo temprano. Dicha función es esencial para la perpetuación de la especie y por lo tanto, está bajo el control de señales de regulación (Fink, 2000).

Una molécula importante en este proceso es el receptor transmembranal acoplado a proteínas G 54 (GPR54) que juega un papel esencial en la reproducción. Este receptor esta compuesto aproximadamente por 396 amino ácidos. Pertenece a la familia rodopsina clase A, y se caracteriza por presentar una estructura que contiene un extremo amino terminal extracelular, siete dominios transmembranales, 3 asas extracelulares, 3 asas intracelulares y un extremo carboxilo terminal intracelular (Fig.1) (William, 2004; Roseweir y Millar,2009). Cabe mencionar que se ha caracterizado a las kisspeptinas como el ligando natural del receptor GPR54; las kisspeptinas se identifican por ser miembro de la familia RFamida ( $\text{Arg-Phe-NH}_2$ ). Los miembros de la familia kisspeptina se van a denominar de acuerdo a su número de aminoácidos constituyentes (kisspeptina-10,-13, -14 y 54), todos van a compartir el C-terminal del decapeptido, el cual es necesario para su actividad biológica. Aunque es importante mencionar que kiss-10, es el número mínimo de amino ácidos requerido para la activación del GPR54 (Jayasena *et al.* 2009).



**Figura 1.-** Se muestra la estructura general de un receptor acoplado a proteínas G (GPR) imagen modificada de Colledge, 2004.

La unión de kisspeptina con GPR54 puede activar una gran variedad de señales, las cuáles involucran la cascada de reacciones de los receptores acopladas a proteínas G (Gaq/11), tal como la fosfolipasa C y proteincinasa C (PLC-PKC) y la movilización intracelular de  $Ca^{2+}$ , el cual, se ha demostrado que juega el papel de segundo mensajero, regulando la capacidad de las kisspeptinas para estimular la secreción neuroendocrina de GnRH en el hipotálamo vía GPR54 (Castaño *et al*, 2009). También se ha visto que GPR54, actúa sobre las vías de MAP cinasas ERK1/2 y p38. Sin embargo, la información generada hasta la fecha pone cada vez más de manifiesto que la activación de un sistema específico de señales interconectadas está selectivamente accionado por la vía kisspeptina/GPR54, de manera que regula funciones tan distintas como la liberación de una hormona y la inhibición de la migración de la célula. Por otra parte, la vía de cascadas que es requerida para la activación de GPR54 parece ser múltiple e intrincado (Castaño *et al.*, 2009).

Recientemente, se ha demostrado que el sistema Kiss/GPR54 es esencial para el inicio de la pubertad en los vertebrados, ya que estudios realizados en ratones muestran que las mutaciones en GPR54 tienen como consecuencia, testículos pequeños, pubertad retrasada y comportamiento sexual reducido en el caso de los machos, mientras que en las hembras, los ovarios y el útero son pequeños, además de retraso en la apertura vaginal, ninguna maduración de folículos en el ovario y comportamiento sexual reducido (Roseweir y Millar, 2009). Por lo tanto, este sistema es crucial para el inicio de la pubertad por su participación como mediador para la liberación de GnRH, la cual es encargada de liberar a las gonadotropinas: LH y FSH.

Actualmente, la familia de las GnRHs contiene 28 isoformas, de las cuales 24 son de especies de cordados y 4 para no cordados. Estos péptidos presentan algunas características en común: todos son deca péptidos a excepción de 4 isoformas que presentan 12 aminoácidos (no cordados). Además, el péptido presenta los residuos 1, 4, 9 y 10 perfectamente conservados. En la nomenclatura

tradicional de esta familia de hormonas, a cada isoforma se le antepone la letra inicial del organismo donde fue aislado por primera vez. De todas las isoformas, 8 se tienen reportadas en el cerebro de diferentes especies de teleósteos. (Gorman y Sower, 2003).

Por otro lado, los estudios realizados en peces han demostrado que los niveles de expresión del ARNm de GPR54 aumentan de manera significativa durante el inicio de la pubertad, lo que sugiere que la vía Kiss1/GPR54 desempeña un papel importante en este proceso y en el mantenimiento de la reproducción en los peces como en los mamíferos, llevando un control de la reproducción, que se ha mantenido durante la evolución de los vertebrados (Aerle, *et al.*, 2007).

Recientemente, el receptor GPR54 se ha caracterizado en diferentes especies de peces como: pez cebra (*Danio rerio*; NM\_001110531) (Biran, *et al.*, 2008), pez dorado (*Carassius auratus*; EJ465140) (Shuisheng, *et al.*, 2009), Tilapia (*Oreochromis niloticus*; AB162143) (Parhar, *et al.* 2004), Lisa gris (*Mugil cephalus*; DQ683737) (Nocillado, *et al.*, 2007.), Cobia (*Rachycentron canadum*; DQ790001) (Mohamed, *et al.*, 2007), Carpa (*Pimephales promelas*; EF672266) (Filby, *et al.*, 2008), Tilapia burtoni (*Haplochromis burtoni*; ADD7344.2) (Grone, *et al.*, 2010) Atún rojo (*Thunnus maccoyii*; GQ150542.1), Hipogloso del atlántico (*Hippoglossus hippoglossus*; GQ330487.1) (Mechaly, *et al.*, 2010), Lenguado (*Solea senegalensis*; EU136710.1) (Mechaly, *et al.*, 2009) y Corvina del atlántico (*Micropogonias undulatus*; DQ347412.1).

## 2.1. ANTECEDENTES

Colledge en el 2004, realizó una revisión sobre la pubertad y GPR54 en ratones. En la pubertad la secreción pulsátil de hormonas inicia con la maduración sexual de las gónadas. El receptor acoplado a proteínas G 54 (GPR54) es crucial en el inicio de la pubertad, junto con su ligando natural que son las kisspeptinas. Estudios en ratones que carecen de GPR54 no inician la pubertad, presentan sus órganos reproductores inmaduros, tienen concentraciones bajas de esteroides sexuales y de hormonas gonadotrópicas, aunque presenten concentraciones normales de hormona liberadora de gonadotropinas (GnRH) en el hipotálamo. En humanos, varios casos de hipogonadismo se han atribuido a mutaciones en GPR54 y en menor medida a la producción de kisspeptina. GPR54 esta regulado negativamente por estrógenos y testosterona. Por todo lo anterior, se puede decir que GPR54 es requerido para el funcionamiento normal de eje Hipotalamo-hipofisis-gonadas (HPG), probablemente en la secreción de hormonas gonadotrópicas.

Parhar, *et. al.*, en el 2004 clonaron a GPR54 del encéfalo de tilapia (*O. niloticus*) y determinaron su expresión en machos inmaduros y maduros, encontrando que el cDNA de GPR54 contiene 1131pb que codifica para 377 aminoácidos y muestra un 56% de identidad con el GPR54 de humanos. Los niveles de GnRH-I y GnRH-III fueron significativamente mayores en machos maduros en comparación con inmaduros. En organismos maduros los niveles de GnRH-I fueron inversamente proporcionales a GPR54 ( $P < 0.002$ ). GPR54 fue expresado significativamente en un porcentaje de 40-60% en neuronas de GnRH-I, GnRH-II y GnRH-III en organismos maduros y para organismos inmaduros solo en neuronas de GnRH-III, las cuales han migrado a una región final del cerebro, al contrario solo 50% de neuronas de GnRH-I y GnRH-II en juveniles tenia GPR54 ( $P < 0.001$ ). De este modo ofrecen pruebas de que la estructura de GPR54 de especies no mamíferas está altamente conservada durante la evolución, y que se expresa en neuronas de GnRH-I, GnRH-II y GnRH-III. Además proponen que la expresión de GPR54 es una señal de parada para las GnRHs durante la migración neuronal y que es

primordial para la modulación del crecimiento celular y la secreción de GnRHs, lo cual es importante para el desarrollo sexual normal.

Aerle, *et al.*, en el 2007, realizaron un estudio para identificar los genes de kiss1 y GPR54 en cinco genomas de teleósteos (Fig. 2A), encontrando que en el pez cebra, GPR54 se expresó predominantemente en el cerebro y en el ojo, este último, con un menor nivel de expresión, mientras que kiss1 se expresó en el cerebro, intestino, tejido adiposo y en testículos. En el caso del cerebro, se ha demostrado que GPR54 participa en la liberación de las gonadotropinas, mientras que en el intestino, los ojos, el tejido adiposo y en los testículos aunque el efecto en estos órganos aun no ha sido establecido. Sin embargo, es importante mencionarlos ya que con esto se podría demostrar que Kiss1 se puede expresar no solo de manera endocrina sino también parácrina y autócrina. Por otra parte, el análisis de la región del cromosoma que contiene el sitio del Kiss1 mostró una alta homología en los genomas de vertebrados. En contraste con sus homólogos mamíferos, en teleósteos, se conservó la secuencia de la proteína de Kiss1, con la excepción de la región que representa la kisspeptina-10. Las sucesiones del péptido señal, hendidura probable y sitios del amidación en las sucesiones de kiss1 de teleósteos fueron determinados y se encontró similitud con mamíferos (Fig. 2B).



Mohamed, *et al.*, en el 2007 realizaron un estudio en donde analizaron los cDNAs del receptor GPR54 el cual fue aislado del cerebro de Cobia (*Rachycentron canadum*), encontrando que tiene un 95% de identidad con Tilapia y el 51-56 % del total de la secuencia es idéntica a mamíferos. En cuanto a los resultados de los métodos cuantitativos (qRT-PCR), permitieron la detección de los tres mRNAs de GnRH en el primer día después de la colecta. Además, los niveles de GnRH I aumentaron gradualmente en larvas de 3 y 4 días después de la colecta. Mientras que los mRNAs de GnRH II y GnRH III tuvieron niveles más altos en larvas de 2 y 6 días después de la colecta comparado con días anteriores. Cabe mencionar que el encontrar niveles altos de GnRH I y GnRH II en machos más que en las hembras de 153 días después de la colecta, se puede relacionar con la pubertad temprana observada durante el primer año en cobia. Por lo tanto, este estudio mostró por primera vez la expresión de GPR54 durante el desarrollo larval de Cobia. Observando así, que los patrones de GPR54 y de GnRH durante las etapas larvales, juveniles y la pubertad temprana en Cobia sugiere una relación entre el receptor GPR54 y la GnRH durante los estados de desarrollo, con el papel del receptor en controlar la liberación de GnRH en mamíferos.

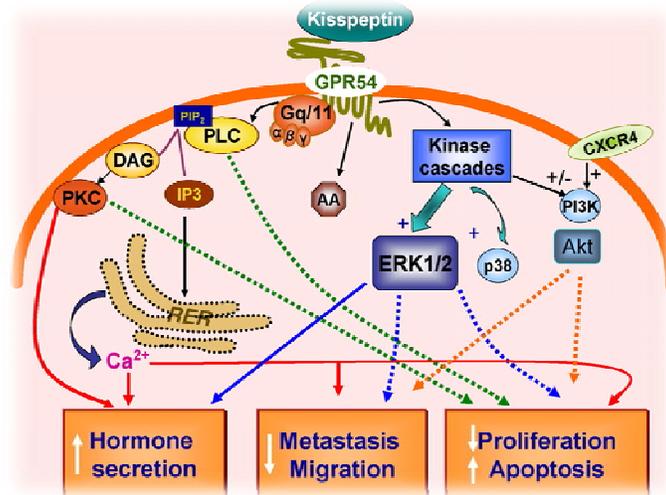
Richard, *et al.*, en el 2008, realizó una revisión de los niveles de Kisspeptina (Kiss-1) y GPR54 en la hipófisis. Dado que el efecto estimulador de las kisspeptinas sobre la secreción de gonadotropinas esta bloqueada por un antagonista de GnRH, se ha sugerido que el efecto de las kisspeptinas se manifiesta exclusivamente en el hipotálamo, sin embargo, las kisspeptinas están presentes en la hipófisis en ovejas, lo que sugiere que la glándula pituitaria puede ser un tejido blanco de las kisspeptinas. En un estudio realizado en ratón donde se usó un doble etiquetado fluorescente con un anticuerpo monoclonal contra LH $\beta$  se demuestra que las gonadotropinas son expresadas por Kiss-1 y GPR54. Por otra parte, estudios *in vitro* de los efectos de que tiene Kiss-1 sobre la secreción de gonadotropinas en la pituitaria, han dado resultados contradictorios, dependiendo del entorno de las células y de la hormona ya que con GnRH los niveles de las gonadotropinas aumentan, esto a diferencia del estradiol el cual disminuye o

mantiene el nivel de gonadotropinas. Las kisspeptinas parecen ser incapaces de inducir un incremento de LH, por lo tanto es probable, que esta hormona tenga un efecto sinérgico con GnRH y el estradiol, tanto en hipotálamo como en la hipófisis. También se revisaron datos sobre el papel potencial que el sistema KISS-1/GPR54 pueden tener sobre el control de otras funciones en la hipófisis como somatotropa o lactotropa y como podrían actuar de manera endocrino, autócrino y parácrino en la modulación de las señales de secreción hormonal en la pituitaria anterior.

Biran, *et al.*, en 2008, llevó a cabo un estudio de la identificación molecular y la caracterización funcional del sistema Kiss1/GPR54 en la Zarigüeya, rana y Pez cebra. El procesamiento del cDNA de la proteína Kiss1 en estos organismos dió como resultado, que el pez cebra contiene una secuencia de 52 aminoácidos, rana presentó una secuencia de 54 aminoácidos y la zarigüeya una secuencia de 53 aminoácidos. El análisis filogenético de todos los péptidos de Kiss1, mostró claramente la agrupación de la secuencia de aminoácidos de acuerdo a la clase de vertebrado. Por otra parte, el gen de Kiss1 de pez cebra consiste de dos exones y un intrón. En el análisis a través de qRT-PCR de los dos GPR54 (GPR54a y GPR54b) clonados del cerebro de pez cebra, se encontró que GPR54a es similar a otras especies de peces y este se expresa en gónadas, mientras que en GPR54b se expresa en otros tejidos diferentes del cerebro. En las hembras los niveles de RNAm de kiss1 aumentó gradualmente durante las primeras semanas de vida, en peces tiene un pico cuando los ovarios contienen ovocitos maduros, mientras que en machos los niveles más altos se alcanzan después de seis semanas pos-fertilización, cuando en los testículos se exhiben los primeros estadios de espermatogenesis y decrecen después de la pubertad. También se encontró que GPR54a y GPR54b se expresan diferencialmente con patrones similares en ambos géneros. Estos resultados indican que el sistema KISS/GPR54 participa en la iniciación de la pubertad en peces.

Elizur, en el 2009, realizó una revisión del sistema Kiss/GPR54 en peces. La codificación para Kiss1 y su receptor GPR54 se ha aislado en varias especies de peces. La expresión de sus genes se caracterizó en un contexto de tiempo y expresión espacial, en respuesta a manipulaciones endocrinas. La secuencia de GPR54 se ha encontrado conservada entre especies de mamíferos y peces, también se ha identificado la secuencia de un segundo receptor (GPR54) en el pez cebra. En cuanto a la secuencia de Kiss1, se ha observado que es muy divergente entre los mamíferos y los peces; sin embargo, a pesar de esto la kisspeptina de humanos es capaz de activar al GPR54 de peces. Al igual que en los mamíferos, el sistema Kiss1/GPR54 en peces parece estar parcialmente regulado por esteroides gonadales. Los datos disponibles hasta la fecha en peces indican que este sistema tiene un papel en el desarrollo puberal y en la reproducción.

Castaño, *et. al.*, en el 2009, llevaron acabo una revisión de las vías de señalización intracelular activadas por las kisspeptinas a través de GPR54. La unión de GPR54 con su ligando (kisspeptina) desencadena una serie de mecanismos típicos acopladas a proteínas G, tales como la activación de la fosfolipasa C (PLC), y subsecuentemente la acumulación de inositol (1-4-5) - trifosfato (IP3), la movilización de  $Ca^{+2}$  intracelular y la activación de la protein cinasa C. Sin embargo, la kisspeptina también activa las vías con actividad mitógena de las protein cinasas (MAPK), especialmente ERK1/2, p38 y del fosfatidilinositol-3-cinasa (PI3K)/Akt. Además, kisspeptina/GPR54 también influyen en la señalización celular con otros receptores, tales como el receptor a la quimosina CXCR4 y el receptor de GnRH (Fig. 3).



**Figura 3.-** Se muestran las vías de señalización intracelular del sistema Kiss1/GPR54 (Castaño, *et al.*, 2009).

Ming, *et al.*, en el 2009, hicieron una revisión de la función reproductiva de Kisspeptina y GPR54 a través del ciclo de vida de ratón y hombre. Mutaciones en este sistema pueden perturbar el sistema reproductivo de un variedad de fenotipos, en ambos. En este sentido, fenotipos reproductivos de casi dos docenas de pacientes con mutaciones en GPR54 han sido reportados, así como fenotipos de cuatro líneas de ratones con mutaciones en GPR54 y dos líneas con mutaciones en Kiss1. Estos fenotipos han ayudado a demostrar que las funciones del sistema KISS/GPR54 son requeridas en todas las fases del ciclo de vida (desarrollo fetal, neonatal, pubertad y adulto), esto cuando la secreción de la hormona liberadora de gonadotropinas (GnRH) es más alta.

Mechaly, *et al.*, en el 2009 realizaron la identificación de dos isoformas del receptor a kisspeptina (Kiss1r) generadas partir de splicing alternativo en el lenguado Senegalés (*Solea senegalensis*). El cDNA de *S. senegalensis* (Ss) contiene 1137 pb, que resultan en una proteína de 378 aminoácidos. La búsqueda en bases de datos permitió la identificación de Kiss1r ortólogos en seis nuevas especies que pertenecen a tres grupos de vertebrados, estableciendo las relaciones evolutivas de todas las secuencias de Kiss1r disponibles hasta la fecha.

El análisis del Kiss1r de *Ss* reveló por primera vez la presencia de caracteres que son particulares del mecanismo de splicing alternativo, esto fue confirmado por la identificación de dos transcritos, *Ss Kiss1r \_v1* y el *Ss Kiss1r \_v2*, este último, derivado de la retención del intron III, conteniendo una inserción de 27 codones en la región transmembranal cuatro con dos codones de paro, esto sugiere que puede llevar a una proteína truncada. El RNAm de las dos variantes tuvieron diferente expresión en los diferentes tejidos. En el cerebro, los niveles de *Ss kiss1r\_v1* fueron más altos que el *Ss kiss1r\_v2*, en gónadas se observó lo opuesto. Ambas isoformas presentaron cambios dependiendo del sexo y del estado de maduración. La presencia de las dos variantes puede ayudar a explicar algunas discrepancias observadas en estudios pasados con respecto a la expresión de KISS1R durante la pubertad. Así la existencia de splicing alternativo del gen de KISS1R puede contribuir a entender muchas funciones fisiológicas mediadas por la señalización de KISSPEPTINA-KISS1R.

Grone *et al.*, en el 2010, realizaron un estudio en donde trataron de entender como se expresa Kiss1r en el cerebro de un cíclido, *Astatotilapia burtoni*, para lo cual se midió el nivel de expresión del RNAm de kiss1r homólogos por hibridación *in situ* y se realizó un qRT-PCR. Encontrando que la expresión del RNAm de Kiss1r en el bulbo olfatorio, en núcleos específicos del telencéfalo, diencéfalo, mesencéfalo y rombencéfalo, así como en neuronas GnRH-II y GnRH-III. Así mismo, se comprobó como influencia el estado en los niveles del RNAm de Kiss1r, ya que se encontraron niveles altos RNAm de Kiss1r en todo el cerebro de machos territoriales y niveles bajos en machos no territoriales. Concluyendo que Kiss1r juega un papel importante en la fisiología reproductiva entre fenotipos territoriales y no territoriales.

Mechaly *et al.*, en el 2010, caracterizó el cDNA genómico que codifica para Kiss1r en hipogloso del atlántico (*Hippoglossus hippoglossus*). Este receptor contiene 1146pb y 381 amino ácidos, presentando una alta homología con Kiss1r-2 de otros teleósteos. El análisis filogenético de la secuencia de kiss1r sugiere que este

receptor en mamíferos surgió por una duplicación del gen anterior de anfibios. Por otra parte, el análisis de la sintenia demuestra la naturaleza altamente conservada de kiss1r-2 en teleósteos. En cuanto al análisis bioinformático se identificaron seis regiones conservadas en la región río arriba de Kiss1r-2. La expresión de kiss1r-2 en el cerebro se incrementa con el inicio de la pubertad, mientras que en las gónadas los niveles de expresión fueron solo detectados en organismos inmaduros.

## 2.2. CONSIDERACIONES DEL GÉNERO *Chirostoma*

Uno de los géneros importantes en nuestro país es el género *Chirostoma*, conocidos como charales y peces blancos, los cuales pertenecen a la familia Atherinopsidae, que se distribuyen en el altiplano y la vertiente centrooccidental del país. Algunas de sus especies han sido ampliamente utilizadas para la alimentación humana desde tiempos anteriores a la conquista, cuando estos peces ya eran utilizados para consumo local por las poblaciones p'urhépechas, nahuatls y otomíes, entre otras. En la actualidad, y al igual que ocurre con muchos de nuestros recursos naturales, algunas de las especies que conforman este género se encuentran en peligro por sobreexplotación, además de que los lagos en donde se encuentran sufren actualmente de un gran deterioro y de una crisis ecológica que incluye la contaminación y la introducción de especies exóticas, destrucción de hábitats, pérdida de agua (profundidad) (Barriaga, 2003).

Cabe mencionar que en términos de investigación existen pocas especies estudiadas y con solo en tres de ellas se han realizado trabajos sistemáticos para lograr su cultivo. Aunque se ha avanzado notoriamente en su conocimiento sobre su biología, ecofisiología, hábitos alimenticios, reproducción y en el desarrollo de sistemas para la optimización de su cultivo. Las especies en donde las técnicas de cultivo se encuentran más avanzadas son *Ch. estor*, *Ch. humboldtianum* y *Ch. promelas*. Sin embargo, dentro del grupo, *Ch. humboldtianum* (Fig.4) es una de las especies con mayor distribución natural, ya que tiene como lugares de origen la laguna Zacapu, el río Lerma, los lagos del valle de México, de Santa María, de San Pedro Lagunillas en Nayarit y el Lago Juanacatlán en Jalisco (Paulo-Maya *et al.*, 2000). Además, de que es una especie de gran importancia cultural y económica, al ser utilizado durante décadas como alimento por las poblaciones localizadas alrededor de los lagos de Pátzcuaro y de Chapala así como embalses del estado de México (Aguilar y Navarrete, 1997). Algunas especies como el pez blanco de Pátzcuaro (*Ch. estor*) o el pez blanco de Chapala (*Ch. chapalichties*) y el pez blanco o pez blanco del altiplano (*Ch. humboldtianum*) han sido

ampliamente utilizados para la alimentación humana desde tiempos prehispánicos (Rojas y Sasso, 2005).

Dentro de las especies nativas que tiene importancia por sostener fuertes pesquerías en los estados de Michoacán y Jalisco están los charales y pescados blancos, los cuales tienen un gran potencial piscícola en México; estos gozan de una gran aceptación en la dieta del pueblo mexicano (Paulo Maya, *et al.*, 2000).



**Figura 4.-** Fotografía de *Chirostoma humboldtianum* tomada en la Laguna de Zacapu, Michoacán.

### 3. JUSTIFICACIÓN

Al ser el GPR54 una molécula reguladora del inicio de la pubertad y posteriormente de la reproducción, es importante establecer la presencia de la secuencia en el encéfalo anterior de *Chirostoma humboldtianum*, para de esta manera empezar a conocer las relaciones anatómico-funcionales que regulan estos procesos tan importantes. Dado que *Ch. humboldtianum* es una de las especies endémicas de México, en donde sus poblaciones están siendo afectadas por una sobreexplotación y una crisis ecológica que incluye la contaminación y la introducción de especies exóticas, es muy conveniente el conocer los factores y sus relaciones para promover un mayor índice reproductivo de dicha especie y otras del mismo género. Con este trabajo se pretende sentar las bases para posteriores estudios de la fisiología reproductiva de dicha especie, que ayuden a la conservación de este grupo de peces.

#### **4. OBJETIVO**

Realizar el aislamiento y la secuenciación de GPR54 a partir de cDNA del encéfalo de *Chirostoma humboldtianum*.

## 5. MATERIALES Y MÉTODOS

### Fase de campo

#### 5.1 Obtención del material biológico

Los ejemplares de *Chirostoma humboldtianum* fueron capturados en la Laguna de Zacapu, Michoacán; por medio de un chinchorro de 40m de longitud y con una apertura de maya de 1.25cm. La pesca fue realizada con la ayuda de pescadores de la cooperativa local.

Se capturaron organismos con tallas de longitud patrón de 75mm o superiores al ser estos los tamaños convenientes.

Los peces se sacrificaron por decapitación, se sexaron y el cerebro anterior fue inmediatamente removido, y colectado en tubos eppendorf de 1.5 ml de capacidad, previamente tratados con dietilpirocarbonato (DEPC) 1:1000. Los tubos contenían 500 µl de RNAlater® para el mantenimiento del RNA del tejido.

### Fase de laboratorio

#### 5.2 Aislamiento de RNA total

De los encéfalos obtenidos se extrajo el RNA total con Trizol® (GIBCO), basado en el método de ácido guanidínico, tiocianato-fenol-cloroformo, de acuerdo a la técnica de Chomczynski y Sacchi, 1987. La integridad de RNA se verificó por la presencia de las bandas de RNA ribosomal de 28S y 18S en geles desnaturizantes de agarosa, teñidos con bromuro de etidio, posteriormente se generó cDNA de doble cadena a partir del RNA total utilizando el Kit Cloned AMV First-strand cDNA® (Invitrogen). La síntesis se realizó con un oligo-dT<sub>17</sub>.

### 5.3 Aislamiento y Amplificación

El aislamiento del cDNA de GPR54 se realizó utilizando los precursores generados a partir de la síntesis descrita anteriormente, con ayuda de los oligonucleótidos específicos (Tabla 1).

Tabla 1.- oligos utilizados para el aislamiento de GPR54.

<b>Oligo</b>	<b>Secuencia de 5' a 3'</b>
PjGPR54Fw2 *	ACT TCA TGT GCA AAT TTG TTG CTT
PjGPR54RV2 *	ACT GGA ACA GGA CAA AGA TCT GAA
GPR54F *	ACT TCA TGT GCA AAA TTG TT

Posteriormente, los PCRs fueron realizados en un termociclador, el cual consistió en una desnaturalización inicial a 94° C por 5 min., seguida de 35 ciclos de 94° C por 30s, TM de 52° C por 1 min., 72° C por 1 min. y una extensión final de 72° C por 7 min. La temperatura de mantenimiento fue de 4° C. Todos los productos de los PCRs fueron verificados en geles de agarosa al 1%. Consecutivamente fueron purificados con el Kit Wizard® SV Gel and PCR Clean-up System.

### 5.4 Clonación

Para la clonación se utilizó el protocolo de pGEM-T and pGEM-Easy Vector Systems®, el cual se llevó a cabo en dos fases: la primera fue la ligación de las células con el buffer de ligación rápida 2X; la segunda fue la transformación de las células competentes de alta eficiencia JM109. De las colonias crecidas se seleccionaron las colonias blancas las cuales fueron inoculadas con medio LB y ampicilina (3 ml por cada tubo), los tubos se incubaron en agitación a 150 rpm durante toda la noche a una temperatura de 37° C.

Consecutivamente se realizó la purificación del plasmido a través del protocolo de Wizard Plus SV Minipreps DNA Purification System®, el cual consta de la

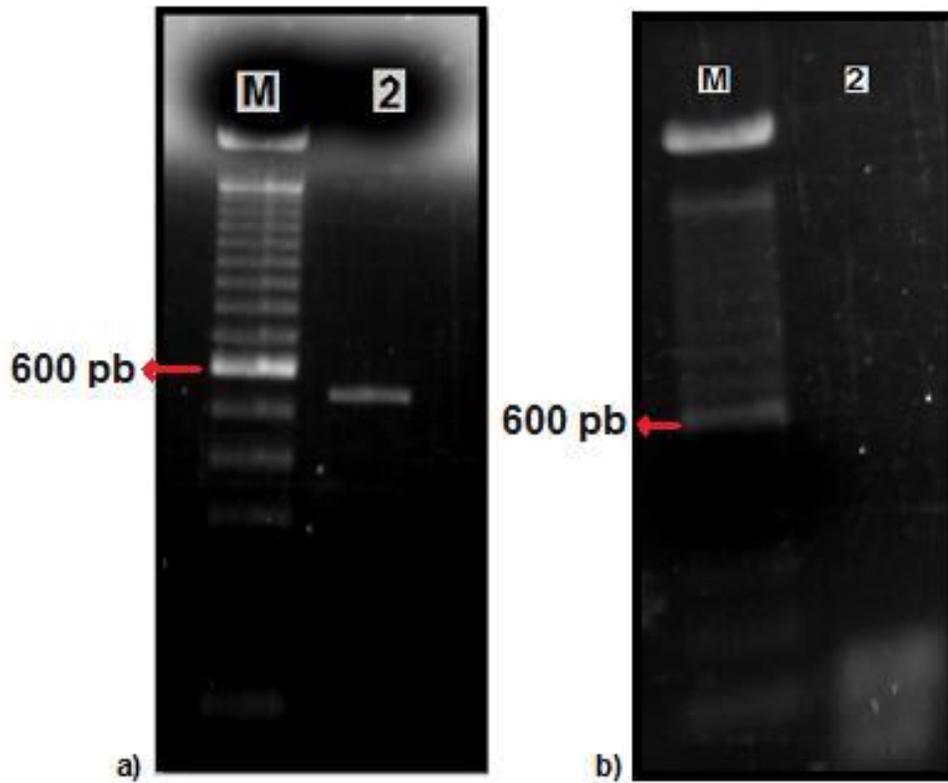
producción de lisado limpio, ligación de plásmido de DNA, lavado y dilución. Finalmente, se realizó un PCR con las condiciones antes mencionadas y este se verificó en un gel de agarosa al 1%

### 5.5 Secuenciación y análisis filogenético

Todos los productos obtenidos se secuenciaron en un secuenciador automatizado ABI 3100, en la Unidad de Biotecnología y Prototipos (UBIPRO). La secuencia de GPR54 fue comparada con las disponibles en la base de datos digital (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>). Las secuencias fueron alineadas con el programa Clustalw y de forma manual para rectificar la alineación con ayuda del programa Chromas 1.45 (32-bit) y Bioedit. Posteriormente, se llevó a cabo la traducción con el marco de lectura dos, así mismo se llevó a cabo la construcción de un árbol filogenético por el método neighbor-joining utilizando la secuencia de nucleótidos. La significancia estadística del árbol obtenido fue analizada por el programa Mrbayes (3.1) utilizando el modelo evolutivo GTR en el cual se realizaron 100 000 repeticiones.

## 6. RESULTADOS

Usando los oligos generados a partir de regiones conservadas de las secuencias para GPR54 de otros teleósteos se obtuvo un producto de 530 pb (Fig. 5a); en la figura 6 se muestra la secuencia obtenida en pares de bases y amino ácidos.



**Figura. 5.-** Gel de agarosa al 1%, teñido con bromuro de etidio. **-a)** Carril 1- Marcador de peso (100 pb) molecular. Carril 2- Expresión del receptor GPR54 en macho. **b)** Carril 1- Marcador de peso (100 pb) molecular. Carril 2 muestra de hembra en la cual no se observa ninguna banda.

2	TTC ATG TGC AAA TTT GTc GCC TTT CcG CAG CAG GTG ACA GTG CAA	46
1	Phe Met Cys Lys Phe Val Ala Phe Leu Gln Gln Val Thr Val Gln	15
47	GCT ACC TGT ATT ACC CTG ACT GCA ATG AGT GGG GAC CGC TGc TAT	91
16	Ala Thr Cys Ile Thr Leu Thr Ala Met Ser Gly Asp Arg Cys Tyr	30
92	GTG ACA GTC TAC CCC CTG AAA TCC CTC CGC CAC CGC ACT CCA AAA	136
31	Val Thr Val Tyr Pro Leu Lys Ser Leu Arg His Arg Thr Pro Lys	45
137	GTA GCC ATG ATA GTC AGC ATC TGC ATT tGG ATC GGC TCC TTC ATC	181
46	Val Ala Met Ile Val Ser Ile Cys Ile Trp Ile Gly Ser Phe Ile	60
182	CTG TCT TCT CCA ATT TTA CTG TAC CAA CGT TTA GAA GAG GGT TAC	226
61	Leu Ser Ser Pro Ile Leu Leu Tyr Gln Arg Leu Glu Glu Gly Tyr	75
227	TGG TAC GGC CCA AGA CAA TAC TGC ATG GAG AGA TTT CCC TCT AAg	271
76	Trp Tyr Gly Pro Arg Gln Tyr Cys Met Glu Arg Phe Pro Ser Lys	90
272	ACA CAT GAG AGA GCC TTC ATT CTC TAC CAG TTT ATT GCT GCT TAC	316
91	Thr His Glu Arg Ala Phe Ile Leu Tyr Gln Phe Ile Ala Ala Tyr	105
317	CTG CTG CCA GTG CTC ACA ATC TCT TTT TGC TAC ACT CTG ATG GTA	361
106	Leu Leu Pro Val Leu Thr Ile Ser Phe Cys Tyr Thr Leu Met Val	120
362	AAA AGG GTT GGC CAG CCC ACC GTT GAA CCT GTG GAC AAC AAT TAT	406
121	Lys Arg Val Gly Gln Pro Thr Val Glu Pro Val Asp Asn Asn Tyr	135
407	CAG GTC AAC CTT CTG TCT GAG AGA ACA ATC AGC ATA AGG AGC AAA	451
136	Gln Val Asn Leu Leu Ser Glu Arg Thr Ile Ser Ile Arg Ser Lys	150
452	GTC TCC AAA ATG GTG GTG GTG ATT GGT CTC CTC TTT GCC ATC TGT	496
151	Val Ser Lys Met Val Val Val Ile Gly Leu Leu Phe Ala Ile Cys	165
497	TGG GGG TCA ATT CAG ATC TTT GTC CTG TTe CAG	529
166	Trp Gly Ser Ile Gln Ile Phe Val Leu Phe Gln	

**Figura 6.-** Nucleótidos y secuencia deducida de amino ácidos de GPR54 en *Chirostoma humboldtianum*.

## 7. DISCUSIÓN

En los últimos años se ha demostrado que el sistema GPR54/Kisspeptina desempeña una función crucial en el inicio de la pubertad y en el control neuroendocrino del eje reproductivo, que consiste en la estimulación de la secreción de gonadotropinas, el cual se ejerce a nivel hipotalámico mediante la activación de las neuronas de GnRH y por consiguiente la liberación de esta.

En el presente trabajo, se aisló por primera vez una parte del receptor acoplado a proteínas G 54 (GPR54) en el pez mexicano, *Chirostoma humboldtianum*. La secuencia aislada comprende del dominio transmembranal tres al dominio transmembranal seis, incluyendo la asa extracelulares 4 y las asas intracelulares 3 y 5 (Fig. 7, mostrada al final de la sección) y consta de 530 pb y 176 aminoácidos (Fig. 6).

Al hacer la comparación de dicha secuencia parcial encontramos que el porcentaje de similitud que se observó entre *Ch. humboldtianum* y otras especies de teleósteos se encuentra entre el 88% y 84% (Tabla 2, mostrada al final de la sección). Posteriormente, se realizó un alineamiento con otras especies de peces a través del programa clustalw (Fig. 7, mostrada al final de la sección); en cuanto al análisis de amino ácidos se encontró que la similitud se incrementa hasta el 97% (Tabla 3). Al realizar el alineamiento se muestra que la molécula se encuentra conservada (Fig. 8) a excepción de 4 amino ácidos: P por A (TM3), S por T (TM4), V por G y S por P (TM6), cabe mencionar que estos cambios no afectan directamente la estructura de la proteína debido a que están clasificados dentro del mismo grupo (no polares), aunque en el caso de los amino ácidos S y P si podrían afectar debido a que la prolina es un imino ácido y hace que la molécula cambie su estructura. Sin embargo, suponemos que estos cambios no afectan la vía de señalización del sistema Kiss/GPR54.

Dentro de la parte del receptor que se logró aislar se encuentra el asa intracelular dos, esta juega un papel importante en la vía de señalización, ya que en ella se lleva a cabo la activación catalítica que induce al ligando a la activación de la subunidad  $G_{\alpha}$  (Tena-Sempere, 2009).

Debido a los pocos estudios que se tienen de este receptor, actualmente no se cuenta con la información necesaria para su descripción en cuanto al sitio de reconocimiento de la Kiss10 y su sitio activo.

El árbol filogenético presentado en este estudio establece las relaciones evolutivas de las secuencias de GPR54 con las que se obtuvo una mayor similitud con representantes del orden perciforme, y algunos otros ordenes como mugiliforme y pleuronectiformes. Entre estos la similitud más alta se tiene con dos representantes de la familia de cíclidos. Al carecer de secuencias para este receptor en el grupo de los aterínidos, no fue posible determinar una similitud para el GPR54. Evidentemente, los porcentajes de similitud reportados en el presente trabajo pueden modificarse al contar con la secuencia total del GPR54 de *Chirostoma*. (Fig. 9 mostrada al final de la sección).

Por otra parte, la mayoría de los estudios de GPR54 en peces se han centrado en el cerebro, en este estudio no se encontró expresión de GPR54 en hembras, una posible explicación es que estos organismos se encuentran al final de la etapa de madurez sexual y presentan una menor expresión del receptor (Fig. 5b), esto concuerda con el estudio realizado en *S. senegalensis* en el cual se encontró que en machos la expresión de GPR54 aumenta en organismos maduros a diferencia de las hembras las cuales en etapa madura disminuyen la expresión (Mechaly, *et al.*, 2009). Cabe mencionar, que los niveles más altos de GPR54 en machos coincide con un incremento en el tamaño testicular y en el número de espermatogonias, mientras que las hembras los niveles de GPR54 se van a incrementar con el desarrollo ovárico (Filby, *et al.* 2008).

Actualmente, este receptor ya ha sido reportado para otras especies de peces como: Tilapia burtoni (*Haplochromis burtoni*), Tilapia (*Oreochromis niloticus*), Lisa gris (*Mugil cephalus*), Atún rojo (*Thunnus maccoyii*), Cobia (*Rachycentron canadum*), Hipogloso del atlántico (*Hippoglossus hippoglossus*), Lenguado (*Solea senegalensis*) y Corvina del atlántico (*Micropogonias undulatus*), en las cuales se ha demostrado que GPR54 juega un papel importante en el inicio de la pubertad y madurez sexual.

La secuencia parcial aislada en este trabajo servirá como base para obtener la secuencia completa, y posteriormente, realizar estudios de distribución anatómica y colocalización con otros componentes del eje reproductivo que ayuden a comprender mejor el funcionamiento de dicho eje en *Ch. humboldtianum*.

**Tabla 2.-** Porcentaje de similitud de la secuencia parcial de nucleótidos de GPR54 de *Chirostoma humboldtianum* con otros teleósteos.

Especie	Porcentaje de homología	Núm. de acceso al GenBank
Tilapia burtoni <b>(<i>Haplochromis burtoni</i>)</b>	88%	GQ860302.1
Tilapia <b>(<i>Oreochromis niloticus</i>)</b>	88%	AB162143.1
Lisa gris <b>(<i>Mugil cephalus</i>)</b>	87%	DQ683737.1
Atún Rojo <b>(<i>Thunnus maccoyii</i>)</b>	86%	GQ150542.1
Cobia <b>(<i>Rachycentron canadum</i>)</b>	85%	DQ790001.1
Hipogloso del atlántico <b>(<i>Hippoglossus hippoglossus</i>)</b>	85%	GQ330487.1
Lenguado <b>(<i>Solea senegalensis</i>)</b>	85%	EU136710.1
Corvina del atlántico <b>(<i>Micropogonias undulatus</i>)</b>	84%	DQ347412.1

**Tabla 3.-** Muestra el porcentaje de similitud de la secuencia parcial de GPR54 en amino ácidos de *Chirostoma humboldtianum* con otros teleósteos.

<b>Especie</b>	<b>Porcentaje de homología</b>	<b>Núm. de acceso al GenBank</b>
Tilapia burtoni <b>(<i>Haplochromis burtoni</i>)</b>	97%	ADD7344.2
Tilapia <b>(<i>Oreochromis niloticus</i>)</b>	96%	QGBD04.1
Lisa gris <b>(<i>Mugil cephalus</i>)</b>	96%	ACT78954.1
Atún Rojo <b>(<i>Thunnus maccoyii</i>)</b>	95%	ABG76790.1
Cobia <b>(<i>Rachycentron canadum</i>)</b>	94%	ABG82165.1
Hipogloso del atlántico <b>(<i>Hippoglossus hippoglossus</i>)</b>	94%	ADC96613.1
Lenguado <b>(<i>Solea senegalensis</i>)</b>	94%	ABW95362.1
Corvina del atlántico <b>(<i>Micropogonias undulatus</i>)</b>	94%	ABC75101.1

Hippoglossus hippoglossus	CTTCATGTGCAAGTTTGTCGCCTTTCTACAGCAGGTGACGGTCCAG	46
Solea senegalensis	CTTCATGTGCAAAATTCGTCGCCTTTCTACAGCAGGTGACTGTCCAA	46
Thunnus maccoyii	CTTCATGTGCAAAATTTGTTGCCTTTCTACAGCAGGTGACAGTTCAA	46
Rachycentron canadum	CTTCATGTGCAAAATTTGTTGCCTTCCTGCAGCAGGTGACGGTGCAA	46
Micropogonias undulatus	CTTCATGTGTAAATTTGTTGCCTTTCTACAGCAGGTGACAGTCCAA	46
Mugil cephalus	CTTCATGTGCAAAATTTGTTGCCTTCCTGCAGCAGGTGACAGTGCAA	46
Haplochromis burtoni	CTTCATGTGCAAAATTTGTCGCCTTTCTGCAACAGGTGACGGTGCAA	46
Oreochromis niloticus	CTTCATGTGCAAAATTTGTCGCCTTTCTGCAGCAGGTGACGGTGCAA	46
Ch.humboldtianum	CTTCATGTGCAAAATTTGT-GCCTTTCTGCAGCAGGTGACAGTGCAA	46

\*\*\*\*\* TM 3 \*\*\*\*\*

Hippoglossus hippoglossus	GCCACTTGTATCACCCTGACTGCCATGAGTGGAGACC	GCTGTTACATCAC	96	
Solea senegalensis	GCTACTTGCATAA	CTGACTGCTATGAGTGGAGACC	GCTGTTATGTGAC	96
Thunnus maccoyii	GCCACATGTATCACTCTGACCGCTATGAGTGGGACC	GCTGTTACGTCAC	96	
Rachycentron canadum	GCCACCTGCATCACCCTGACTGCTATGAGTGGAGACC	GCTGTTACGTCAC	96	
Micropogonias undulatus	GCCACCTGTATCACTCTGACGGCTATGAGCGGTGACC	GCTGTTACGTCAC	96	
Mugil cephalus	GCGACCTGCATCACCCTGACTGCTATGAGTGGGACC	GCTGTTACGTCAC	96	
Haplochromis burtoni	GCCACCTGCATCACCCTGACTGCCATGAGTGGAGACC	GCTGTTACGTCAC	96	
Oreochromis niloticus	GCCACCTGCATCACCCTGACTGCTATGAGTGGAGACC	GCTGTTACGTCAC	96	
Ch.humboldtianum	GCTACTGTATTACCCTGACTGCAATGAGTGGGACC	GCTGTTACGTCAC	96	

\*\* \*\* \*\* TM 4 \*\* \*\* \*

Hippoglossus hippoglossus	CATCTACCCCTCTGAAATCCCTCCGCCACCGCACCCCGAGAGTAGCCATGA	146
Solea senegalensis	AGTGTATCCCTCTGAAATCCCTCCGTCACCGCACCCCGAGAGTAGCCATGA	146
Thunnus maccoyii	AGTCTACCCCTCTGAAATCCCTCCGCCACCGCACCCCGAGAGTAGCCATGA	146
Rachycentron canadum	AGTCTATCCCTCTGAAAGTCCCTCGGCCACCGCACCAAGGGTGGCCATGA	146
Micropogonias undulatus	AGTCTATCCCTCTGAAAGTCCCTCGGCCACCGCACCAAGGGTGGCCATGA	146
Mugil cephalus	GGTCTACCCCTCTGAAATCTCTTCGCCACCGTACCCGAAAGTAGCCATGA	146
Haplochromis burtoni	AGTCTACCCCTCTGAAATCTCTTCGCCACCGAACCCCAAGTAGCCATGA	146
Oreochromis niloticus	AGTCTACCCCTCTGAAATCTCTTCGCCACCGAACCCCAAGTAGCCATGA	146
Ch.humboldtianum	AGTCTACCCCTCTGAAATCCCTCCGCCACCGCACTCCAAAAGTAGCCATGA	146

\* \*\* \*\* TM 5 \* \*\* \*

Hippoglossus hippoglossus	TCGTCAGCATCTGCATTTGGATCGGCTCCTTCATCCTGTCCACCCCGATT	196
Solea senegalensis	TTGTCAGCCTCTGCATTTGGATTGGCTCCTTCATCCTGTCCACCCCGATT	196
Thunnus maccoyii	TTGTCAGCATCTGCATTTGGATCGGCTCCTTCATCCTGTCCACCCCGATT	196
Rachycentron canadum	TCGTCAGCGTCTGCATCTGGATTGGCTCCTTCATCCTGTCCACCGCGATT	196
Micropogonias undulatus	TCGTCACCATCTGCATTTGGATCGGCTCCTTCATCCTGTCCACCCCGATT	196
Mugil cephalus	TCGTCAGCGTCTGCATCTGGATTGGCTCCTTCATCCTGTCCACCGCGATT	196
Haplochromis burtoni	TTGTCAGCATTTGCATTTGGATCGGTTCTTTTCATCCTCTACACCAATT	196
Oreochromis niloticus	TTGTCAGTATTTGCATTTGGATCGGTTCTTTTCGTCCTCTACACCAATT	196
Ch.humboldtianum	TAGTCAGCATCTGCATTTGGATCGGCTCCTTCATCCTGTCTTCTCAATT	196

\* \*\* \*\* TM 5 \* \*\* \*

Hippoglossus hippoglossus	TTGATGTACAGCGCATAGAGGAGGGTACTGGTACGGTCC	CAGACAATA	246
Solea senegalensis	TTAATGTACAGCGTATAGAGGACGGATACTGGTATGGTCCA	AAGACAATA	246
Thunnus maccoyii	TTAATGTACAGCGTATAGAGGAGGGTACTGGTATGGCCCC	AGGCAGTA	246
Rachycentron canadum	TTAATGTACAGCGTATAGAGGAGGGCTACTGGTACGGCCCC	GAGGCAATA	246
Micropogonias undulatus	TTAGTGTACAGCGTATAGAGGATGGTACTGGTACGGCCCC	CGGCAGTA	246
Mugil cephalus	TTAATGTACAGCGCATAGAGGAGGGCTACTGGTATGGGCCA	AAGGCAATA	246
Haplochromis burtoni	TTAATGTACAGCGTATAGAGGAGGGCTACTGGTACGGCCCC	GAGGCAATA	246
Oreochromis niloticus	TTAATGTACAGCGTATAGAGGAGGGCTACTGGTACGGCCCC	GAGGCAATA	246
Ch.humboldtianum	TTACTGTACAAAGTTTGAAGAGGGTACTGGTACGGCCCCA	AAGACAATA	246

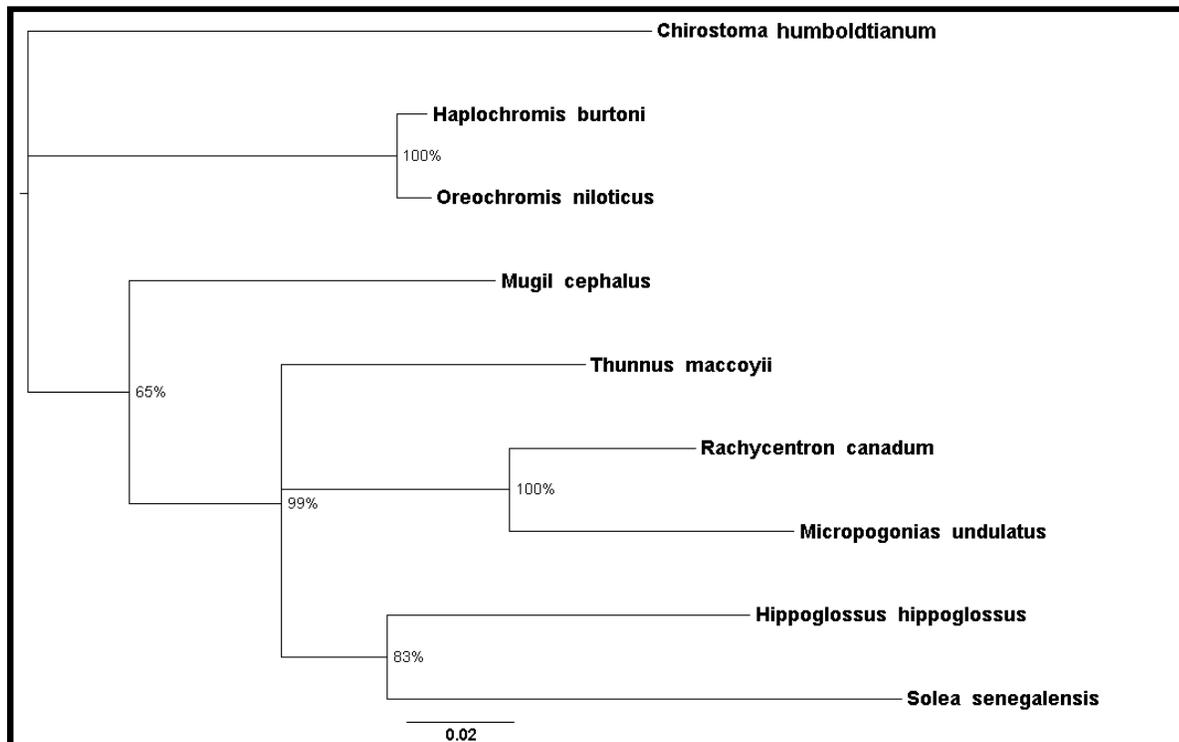
\*\* \*\*\*\*\* \*\* \* \*\* \*\* \*\* \*\*\*\*\* \*\* \*\* \* \*\* \*\*

Hippoglossus hippoglossus	CTGCATGGAGAGATTTCCCTCTAAAAACACACGAGAGGGCTTTCATCCTCT	296
Solea senegalensis	CTGCATGGAGAGATTTCCCTCAAAAACTCATGAGCAGGCCTTTCATCCTCT	296
Thunnus maccoyii	CTGCATGGAGAGATTTCCCTCGAAGACACATGAGAGGGCTTTCATCTTGT	296
Rachycentron canadum	CTGCATGGAGAGATTTCCCTCTAAGACACACGAGAGGGCTTTCATCCTCT	296
Micropogonias undulatus	CTGCATGGAGAGGTTCCCTCTAAGACACACGAGAGGGCTTTCATCCTCT	296
Mugil cephalus	CTGCATGGAGAGGTTCCCTCTAAGACGCATGAGAGGGCTTTCATCCTCT	296
Haplochromis burtoni	CTGCATGGAGAGATTTCCCTCTAAGACGCATGAGAGGGCTTTCATCCTGT	296
Oreochromis niloticus	CTGCATGGAGAGATTTCCCTCTAAGACGCATGAGAGGGCTTTCATCCTGT	296
Ch.humboldtianum	CTGCATGGAGAGATTTCCCTCTAAGACACATGAGAGGCCTTCATTCTCT	296
***** ** ** ** **		
Hippoglossus hippoglossus	ACCAGTTCATTGCTGCCTACCTGCTGCCCGTCCCTACCATCTCCTTCTGC	346
Solea senegalensis	ACCAGTTCATTGCTGCCTACCTGCTGCCCTGTCTACTATCTCCTTCTGC	346
Thunnus maccoyii	ACCAGTTCATCGCCGCTACTTGTGCTGTCTACTATCTCCTTCTGC	346
Rachycentron canadum	ACCAGTTCATTGCTGCCTACCTGCTGCCCTGTCTACTATTTCTTCTGC	346
Micropogonias undulatus	ACCAGTTCATTGCTGCCTACCTGCTGCCCTGTCTACTATTTCTTCTGC	346
Mugil cephalus	ACCAGTTCATTGCTGCCTACCTGCTGCCAGTGTCTACTATTACTTTCTGC	346
Haplochromis burtoni	ACCAGTTCATTGCTGCCTACCTGCTGCCCTGTCTACTATCTCTTCTGC	346
Oreochromis niloticus	ACCAGTTCATTGCTGCCTACCTGCTGCCCTGTCTACTATCTCTTCTGC	346
Ch.humboldtianum	ACCAGTTTATTGCTGCTTACCTGCTGCCAGTGTCTACAATCTCTTTTCTGC	346
***** ** ** ** **		
Hippoglossus hippoglossus	TACACTCTGATGGTGAAGAGGGTGGGTCAGCCCACTGTGGAGCCGGTGGGA	396
Solea senegalensis	TACACCCTGATGGTCAAGAGGGTCCGACAGCCCACTGTGGAACTGTAGA	396
Thunnus maccoyii	TACTACTCTGATGGTGAAGAGGGTGGGCCAGCCCACTGTAGAACCCTGTTGA	396
Rachycentron canadum	TACACTCTGATGGTGAAGAGGGTGGGACAGCCCTACAGTCGAACCTGTAGA	396
Micropogonias undulatus	TACACTCTGATGGTGAAGAGGGTGGGACAGCCCTACAGTCGAACCTGTAGA	396
Mugil cephalus	TACACTCTGATGGTGAAGAGGGTGGGCCAGCCCACTGTAGAACCCTGTAGA	396
Haplochromis burtoni	TACACTCTGATGGTTAAGAGGGTGGGCCAGCCCACTGTAGAACCCTGTAGA	396
Oreochromis niloticus	TACACTCTGATGGTTAAGAGGGTGGGCCAGCCCACTGTAGAACCCTGTAGA	396
Ch.humboldtianum	TACACTCTGATGGTAAAAAGGGTGGGCCAGCCCACTGTGAACCTGTGGA	396
** ** ***** ** ** **		
<b>TM 6</b>		
Hippoglossus hippoglossus	CAACAACCTACCAGGTTAAACCTCCTGTCTGAGAGAACGTTAAGTATCAGGA	446
Solea senegalensis	CAACAACCTATCAGGTTCAACCTTCTTTCTGAGAGAACTATAAGTATCCGAA	446
Thunnus maccoyii	CAACAACCTATCAGGTTCAACCTCCTGTCTGAGAGAACTATCAGCATCAGGA	446
Rachycentron canadum	CAATAATTATCAGGTTGAATCTCCTGTCTGAGAGAACTATCAGCATCCGGA	446
Micropogonias undulatus	CAACAACCTATCAGGTTCAACCTCCTGTCTGAGAGAACTATCAGTATCAGGA	446
Mugil cephalus	CAACAATTACCAGGTTCAACCTTCTGTCCGAGAGAACTATCAGCATCAGGA	446
Haplochromis burtoni	CAATAATTATCAGGTTGAATCTCCTGTCTGAGAGAACTATCAGCATCCGGA	446
Oreochromis niloticus	CAATAATTATCAGGTTGAATCTCCTGTCTGAGAGAACTATCAGCATCCGGA	446
Ch.humboldtianum	CAACAATTATCAGGTTCAACCTTCTGTCTGAGAGAACTATCAGCATCAGGA	446
*** ** ** ** ***** ** ** **		
Hippoglossus hippoglossus	GCAAAGTGTCCAGGATGGTGGTTGTGATTGTCTCTCTTCCATCTGC	496
Solea senegalensis	GCAAAGTCTCCAAGATGGTGGTTGTGATTGTCTCTCTTCCAACTCTGC	496
Thunnus maccoyii	GCAAGGTCTCCAAGATGGTGGTAGTGATCGTCTCTCTTCCCATCTGC	496
Rachycentron canadum	GCAAAGTCTCCAAGATGGTGGTGTGATCGTCTCTCTTCCCGTCTGC	496
Micropogonias undulatus	GCAAAGTCTCCAAGATGGTGGTGTGATCGTCTCTCTTCCCATCTGC	496
Mugil cephalus	GCAAAGTCTCCAAGATGGTGGTGTGATCGTCTCTCTTCCCGTCTGC	496
Haplochromis burtoni	GCAAAGTCTCCAAGATGGTGGTAGTGATTGTCTCTCTTCCATCTGC	496
Oreochromis niloticus	GCAAAGTCTCCAAGATGGTGGTAGTGATTGTCTCTCTTCCCATCTGC	496
Ch.humboldtianum	GCAAAGTCTCCAAGATGGTGGTGGTAGTGATTGTCTCTCTTCCCATCTGT	496
**** ** ** ***** ** ** **		

Hippoglossus hippoglossus	TGGGGACCCATCCAGATCTTCGTCCTCTTCCAGT	530
Solea senegalensis	TGGGGACCCATCCAGATCTTCGTCCTCTTCCAGT	530
Thunnus maccoyii	TGGGGTCCCATCCAGATATTCGTCCTCTTCCAGT	530
Rachycentron canadum	TGGGGTCCCATCCAGATCTTCGCCCTTTTTCAGT	530
Micropogonias undulatus	TGGGGTCCCATCCAGATCTTCGCCCTTTTTCAGT	530
Mugil cephalus	TGGGGTCCCATCCAGATCTTCGTCCTTTTCCAGT	530
Haplochromis burtoni	TGGGGGCCCATCCAGATCTTTGTCCTCTTCCAGT	530
Oreochromis niloticus	TGGGGGCCCATCCAGATCTTTGTCCTCTTCCAGT	530
Ch.humboldtianum	TGGGGGTCAATTCAGATCTTTGTCCTGTTCAGT	530
	***** * ** ***** ** * *** ** *****	

**Figura 7.-** La imagen muestra el alineamiento de la secuencia de GPR54 para *Chirostoma humboldtianum* con el GPR54 de Tilapia burtoni (*Haplochromis burtoni*), Tilapia (*Oreochromis niloticus*), Mugil (*Mugil cephalus*), Atún rojo (*Thunnus maccoyii*), Cobia (*Rachycentron canadum*), Hipogloso del atlántico (*Hippoglossus hippoglossus*), Lenguado (*Solea senegalensis*) y Corvina del atlántico (*Micropogonias undulatus*). Encerrados en un cuadro se indican los dominios transmembranales (TM) del tres al seis.





**Figura 9.-** Árbol filogenético de GPR54 en teleósteos deducido de la secuencia de amino ácidos, usando el método de neighbor-joining mediante el programa Mrbayes (3.1). El porcentaje representa la significancia estadística de la estructura del árbol. En el árbol se encuentran representadas los ordenes: atheriniformes (*Ch. humboldtianum*), perciformes (*H. burtoni*, *O. niloticus*, *T. maccoyii*, *R. canadum*, *M. undulatus*), mugiliforme (*M. cephalus*) y Pleuronectiformes (*H. hippoglossus*, *S. senegalensis*).

## 8. CONCLUSIÓN

Se logró aislar por primera vez una secuencia parcial del receptor acoplado a proteínas G 54 (GPR54) en el encéfalo anterior de *Chirostoma humboldtianum*, así mismo se encontró una alta similitud con otras especies de peces, por lo cual podemos decir que este receptor se encuentra altamente conservado en teleósteos.

## 9. GLOSARIO

**Autócrino:** Secreción química que afecta a la misma célula que secretó la sustancia.

**Endócrino:** Se refiere a la producción de un mensajero que viaja a través de la vía sanguínea y actúa sobre una célula blanco.

**Espermatogénesis:** Es proceso mediante el cual se desarrollan los gametos masculinos.

**FSH:** Hormona folículo estimulante.

**GH:** Hormona de crecimiento.

**GnRH:** Hormona liberadora de gonadotropinas. Las GnRHs están divididas en tres sistemas:

GnRH-I: Nombre de la isoforma localizada en el área hipotalámica.

cGnRH-II: Nombre de la isoforma localizada en el área mesencefálica .

GnRH-III: Nombre de la isoforma localizada en el nervio terminal.

**GPR54 o Kiss1r:** Receptor acoplado a proteínas G 54.

**Kiss:** Kisspeptina

**Lactotropa:** célula encargada de la producción de prolactina.

**Prolactina:** Hormona que interviene en el proceso reproductivo y en la osmorregulación en peces.

**LH:** Hormona luteinizante.

**Neuroendócrino:** células que envían hormonas a la sangre en respuesta a la estimulación del sistema nervioso.

**Parácrino:** Tipo de secreción química que afecta a una célula vecina de la célula emisora.

**PCR:** Reacción en cadena de la polimerasa.

**QPCR:** Reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real.

**qRT-PCR:** Retro transcripción de la reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real.

**RT-PCR:** Retro transcripción de la reacción en cadena de la polimerasa.

**Somatotropa:** Células encargadas de la producción de hormonas como: GH y TSH.

**TSH:** Hormona estimulante de la tiroides.

## 10.REFERENCIAS

- Aerle, R. V., Kille, P., Lange, A. y Tyler, C. R. 2007. Evidence for the existence of a functional Kiss1/Kiss1 receptor pathway in fish. *Peptides*. 29:57-64.
- Barriaga, S.A. 2003. La importancia de los estudios de genética molecular en el género *Chirostoma*. *Contactos*. 47: 5-11.
- Biran, J., Ben-Dor, S. y Levavi-Sivan, B. 2008. Molecular Identification and Functional Characterization of the Kisspeptin/Kisspeptin Receptor System in Lower Vertebrates. *Biol. Reprod.* 79:776–786.
- Castaño, P. J., Martínez-Fuentes, J., Gutiérrez-Pascual, E., Vaudry, H., Tena-Sempere, M. y Malagón, M. 2009. Intracellular signaling pathways activated by kisspeptins through GPR54: Do multiple signals underlie function diversity? *Peptides*. 30:10-15.
- Chan, Y. M., Broder-Fingert, S. y Seminara, S. B. 2009. Reproductive functions of kisspeptin and Gpr54 across the life cycle of mice and men. *Peptides*. 30:42-48
- Chomczynski, P. & Sacchi, N.1987. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal. Biochem.* 162:156–159.
- Colledge, H. W. 2004. GPR54 and puberty. *TEM*. 15:448-453.
- Elizur, A. 2009. The Kiss1/GPR54 system in fish. *Peptides*. 30: 164-170.

- Fink, G. 2000. Neuroendocrine regulation of pituitary function: general principles. In: Conn, P. M. Freeman, M. E. (Eds.), Neuroendocrinology in Physiology and Medicine. Humana Press, Totowa, New Jersey. Pp. 107-134.
- Filby AL, van Aerle R, Duitman JW, Tyler CR. 2008. The kisspeptin/gonadotropin-releasing hormone pathway and molecular signaling of puberty in fish. Biol Reprod; doi:10.1095/biolreprod.107.063420.
- Gorman, A., Sower, S.A. 2003. Evolution of the role of GnRH in animal (Metazoan) Biology. Gen. Comp. Endocrinol. 134:207-213.
- Gottsch ML, Clifton DK, Steiner RA. 2006. Kisspeptin-GPR54 signaling in the neuroendocrine reproductive axis. Mol Cell Endocrinol. 254/255:91–96.
- Grone, P. B., Marusca, P. K., Korzan, J. W., y R. D. Fernald. 2010. Social status regulates kisspeptin receptor mRNA in the brain of *Astatotilapia burtoni*. General and Comparative Endocrinology. 2-10.
- Jayasena, C. N., Dhillon, W. S. and Bloom, S. R. 2009. Kisspeptins and the control of gonadotropin secretion in humans. Peptides. 30:76-82.
- Kauffman AS, Clifton DK, Steiner RA. 2007. Emerging ideas about kisspeptin-GPR54 signaling in the neuroendocrine regulation of reproduction. Trends Neurosci. 30:504–11.
- Martinez-Chavez CC, Minghetti M, Migaud H. 2008. GPR54 and rGnRH I gene expression during the onset of puberty in Nile tilapia. Gen Comp Endocrinol.156:224–33.
- Mechaly, S. A., Viñas, J. y Piferrer, F. 2009. Identification of two isoforms of the kisspeptin-1 receptor (Kiss1r) generated by alternative splicing in a

modern teleost, the Senegalese Sole (*solea senegalensis*). *Biology of reproduction*. 80:60-69.

- Mechaly, S. A., Viñas, J. Murphy, C. Reith, M. y Piferrer, F. 2010. Gene structure of the Kiss1 receptor-2 (Kiss1r-2) in the atlantic Halibut: Insights into the evolution and regulation of Kiss1r genes. *Molecular and Cellular Endocrinology*. 317: 78-89.
- Messenger S, Chatzidaki EE, Ma D, Hendrick AG, Zahn D, Dixon J, Thresher RR, Malinge I, Lomet D, Carlton MBL, Colledge WH, Caraty A, Aparicio SAJR. 2005. Kisspeptin directly stimulates gonadotropin-releasing hormone release via G protein coupled receptor 54. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 102:1761–1766.
- Mingi, C.Y; Broder, F. S. and Seminara, B. S. 2009. Reproductive Functions of Kisspeptin and GPR54 across the life cycle of mice and men. *Peptides*. 30: 42-48
- Mohamed JS, Benninghoff AD, Holt GJ, Khan IA. 2007 Developmental expression of the G protein-coupled receptor 54 and three GnRH mRNAs in the teleost fish cobia.. *J Mol Endocrinol*.38:235–44.
- Navarro VM, Castellano JM, Fernández-Fernández R, Barreiro ML, Roa J, Sanchez-Criado JE, et al. 2004. Developmental and hormonally regulated messenger ribonucleic acid expression of Kiss-1 and its putative receptor, GPR54, in rat hypothalamus and potent luteinizing hormone-releasing activity of Kiss-1 peptide. *Endocrinology*. 145(10):4565–74.
- Nocillado JN, Levavi-Sivan B, Carrick F, Elizur A. 2007. Temporal expression of G-protein-coupled receptor 54 (GPR54), gonadotropin-

releasing hormones (GnRH), and dopamine receptor D2 (drd2) in pubertal female grey mullet, *Mugil cephalus*. *Gen Comp Endocrinol*; 150:278–87.

- Parhar IS, Ogawa S, Sakuma Y. 2004. Laser-captured single digoxigenin-labeled neurons of gonadotropin-releasing hormone types reveal a novel G protein-coupled receptor (GPR54) during maturation in cichlid fish. *Endocrinology*.145:3613–8.
- Paulo M. J., G. Figueroa L. y. Soria B. M. 2000. “Peces dulceacuícolas mexicanos XIX *Chirostoma humboldtianum* (Atheriniformes:Atherinopsidae)”. *ENCB-IPN, Zoología Informa*. 43:59-74.
- Richard, N., Corvaisier, S., Camacho, E. y Kottler, L.M. 2008. KiSS-1 and GPR54 at the pituitary level: Overview and recent insights. *Peptides*. 30:123-129.
- Roseweir A.K. and Millar, R, P. 2009. The role of kisspeptin in the control of gonadotrophin secretion. *Human Reproduction Update*, 15(2): 203-212.
- Roa, J., Aguilar, E., Dieguez, C., Pinilla, L. y Tena-Sempere, M. 2007. New frontiers in kisspeptin/GPR54 physiology as fundamental gatekeepers of reproductive function. *Frontiers in Neuroendocrinology*. 29:48-69.
- Roa, J., Castellano, J.M., Navarro, V.M., Handelsman, D.J., Pinilla, L. y Tena-Sempere, M. 2008. Kisspeptins and the control of gonadotropin secretion in male and female rodents. *Peptides*. 30: 57-66
- Roux N, Genin E, Carel JC, Matsuda F, Chaussain JL, Milgrom E. 2003. Hypogonadotropic hypogonadism due to loss of function of the KiSS1-derived peptide receptor GPR54. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 100: 10972–10976.

- Seminara SB, Messenger S, Chatzidaki EE, Thresher RR, Acierno JS, Shagoury JK, Bo-Abbas Y, Kuohung W, Schwinof KM, Hendrick AG, Zahn D, Dixon J, et al. 2003. The GPR54 gene as a regulator of puberty. *N Engl J Med.* 349:1614–1627.
- Shuisheng, L., Zhang, Y., Liu Y., Huang, X., Huang, W., Danqi, L., Zhu, P., Shi, Y., Cheng, C., Liu, X. and Lin, H. 2009. Structural and functional multiplicity of the kisspeptin/GPR54 system in goldfish. *Journal of Endocrinology.* 201: 407-418.
- Tena-Sempere y Huhtaniemi, 2003 Gonadotropinas y los receptores de gonadotropina. In: BCJM Fauser, Editor, *Medicina Reproductiva - Molecular, Celular y Genética Fundamentos*, Parthenon Publishing, Nueva York, pp. 225-244.
- Tena-Sempere, M. 2006. GPR54 and kisspeptin in reproduction. *Human reproduction update.* 12(5):631-639.
- Tena-Sempere, M. 2009. Kisspeptin signaling in the brain: Recent developments and future challenges. *Molecular and Cellular Endocrinology* . Pp. 1-6.
- Weltzien, F. A., Andersson, E., Andersen, O., Shalchian-Tabrizi, K. y Norberg, B. 2004. The Brain-pituitary-gonad axis in male teleosts, with special emphasis on flatfish (pleuronectiformes). *Comp. Biochem Physiol A Mol Integr Physiol.* 137: 447-77.