



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES IZTACALA

**Aislamiento y Secuenciación de
Receptores a Estrógeno en Encéfalo
de *Chirostoma humboldtianum*
(Atheriniformes: ATHERINOPSIDAE).**

TESIS

Que para obtener el título de:

Bióloga

PRESENTA:

GABRIELA ALEJANDRA MUÑOZ OSNAYA

Director de tesis: Dr. Rodolfo Cárdenas Reygadas

Investigación financiada por "Proyecto PAPIIT IN217116"

Los Reyes Iztacala, Estado de México 2016





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 proyecto PAPIIT IN217116, por los recursos destinados para la realización de ésta investigación.

Al programa Becas ExxonMobil para la investigación (BEI) por las facilidades para continuar éste proyecto.

A los ejecutivos de ExxonMobil por su programa de mentorías.

Al Institute of International Education (IIE) por su apoyo en los talleres de conversación, seminarios de liderazgo y conferencias.

Al Dr. Rodolfo Cárdenas Reygadas por su guía y apoyo.

Al Dr. Jorge Eduardo Campos Contreras por sus observaciones y recomendaciones.

A la Mtra. Mónica Chávez Maldonado por sus consejos y ayuda.

A la Mtra. Beatriz Macedo Garzón por su interés y saber.

Al Biol. José Luis González Barajas por sus críticas.

Al laboratorio de genética de la Unidad de Morfología y Función (FES-I) por permitirme ocupar sus instalaciones y ayudarme cuando situación lo ameritaba.

Gracias a los maestros y personas que estuvieron inmersas en mi formación, así como aquellas que fueron leales, justas y honestas conmigo; particularmente al profesor Pedro Ruiz Aviña, a Beta, a Mayra, a Aida, a Jimena y a mi familia.

A mis padres

**Rubén Muñoz Ortega y Alejandra Osnaya González,
mi entera gratitud y amor.**

ÍNDICE

RESUMEN.....	1
ABSTRACT	2
INTRODUCCIÓN.....	3
1) HORMONAS ESTEROIDEAS.....	3
1.1 Esteroides sexuales/Hormonas sexuales.....	4
2) RECEPTORES A ESTRÓGENO.....	5
2.1 Estructura de ER.....	6
2.2 Subtipos de ER	7
2.2.1. Mecanismo de acción de los ER.....	8
2.3 ER en peces teleósteos	10
ANTECEDENTES	11
CONSIDERACIONES DE LA ESPECIE DE ESTUDIO	12
PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....	14
OBJETIVOS	15
Objetivo general:.....	15
Objetivos particulares:	15
MATERIALES Y MÉTODO	16
RESULTADOS.....	20
RECEPTOR A ESTRÓGENO SUBTIPO ALFA.....	20
RECEPTOR A ESTRÓGENO SUBTIPO BETA	21
DISCUSIÓN.....	22
CONCLUSIÓN	31
REFERENCIAS	32

RESUMEN

El estrógeno es una hormona esteroidea inmersa en diferentes funciones reproductivas, tales como la ovogénesis, vitelogénesis, comportamiento reproductivo, regulación de gonadotropinas, desarrollo testicular entre otros. Dicha hormona se encuentra regulada por receptores nucleares denominados Receptores a Estrógeno (ER), los cuales presentan una estructura dividida en seis regiones (A-F), donde las regiones C (dominio de unión al ADN) y E (dominio de unión al ligando) son los más conservados filogenéticamente. Existen varios subtipos de éste receptor en vertebrados, en peces se han identificado los subtipos alfa (ER α), beta (ER β) y gama (ER γ), pero la información con respecto a expresión, afinidad y localización en peces es limitada. En este estudio se realizó el aislamiento, secuenciación y clonación de los subtipos de ER presentes en el encéfalo de *Chirostoma humboldtianum*. Las muestras de encéfalos fueron obtenidas de la colecta de organismos provenientes de la laguna de Zacapu, Michoacán; la extracción de ARN se llevó a cabo por medio de Guanidil-tiocianato-fenol-cloroformo, para la síntesis de cDNA se utilizó una reversa transcriptasa (RT-PCR), dicho cDNA se usó en PCR con oligonucleótidos específicos y los productos obtenidos se clonaron. Para ER α se obtuvo una secuencia de 228 pb (76 aa) que presenta mayor identidad a nivel de proteína con *Odontesthes bonariensis* (99%) y *Melanotaenia fluviatilis* (89%), seguido de *Oryzias javanicus* (97%), *Sebastes schlegeli* (96%) y *Dicentrarchus labrax* (96%); para ER β se obtuvo una proteína de 119 aminoácidos (359 pb); presentando una mayor similitud con *O. bonariensis* (93%), *Micropterus salmoides* (92%), seguido por *D. Labrax* (90%) y *Oryzias latipes* con el 89%. Ambas secuencias corresponden al dominio de unión al ligando (LBD), por lo cual, es la primera vez que se aisló, secuenció y clonó secuencias parciales de dos subtipos de receptores a estrógeno (ER α y ER β) en *C. humboldtianum*.

ABSTRACT

Estrogen is a steroid hormone immersed in different reproductive functions such as oogenesis, vitellogenesis, reproductive behavior, regulation of gonadotropins and testicular development among other functions. This hormone is regulated by nuclear receptors called Estrogen Receptors (ER), which contain six distinct regions (A-F) where region C (DNA binding domain) and E (ligand binding domain) are phylogenetically conserved. There are several subtypes of this receptor in vertebrates, for example, three subtypes have been identified in fish: alpha (ER α), beta (ER β) and gamma (ER γ); however, the information regarding expression, localization and affinity is limited in fishes. In this study, we report the isolation, sequencing and cloning of the ER subtypes present in the brain of *Chirostoma humboldtianum*. Brain samples were collected from the lagoon of Zacapu, Michoacan; total RNA from fish brains were extracted by guanidinium-phenol/chloroform method, and reverse transcription was performed using a reverse transcriptase (RT-PCR). The resulting cDNA was subsequently used in PCRs with specific oligonucleotides, and then cloned. The 228 bp product corresponds to ER α , and encodes a 76 amino acid (aa) protein. The highest amino acid identity was found for ER α with *Odontesthes bonariensis* and *Melanotaenia fluviatilis* (99%), followed by *Oryzias javanicus* (97%), *Sebastes schlegeli* (96%), and *Dicentrarchus labrax* (96%). A protein of 119 amino acids (359 bp) corresponding to ER β , was obtained showing the highest identity of *O. bonariensis* (93%), *Micropterus salmoides* (92%), *D. labrax* (90%), and *Oryzias latipes* (89%). Both sequences correspond to the ligand binding domain (LBD; which were not seen before, making this the first time the partial sequence of two estrogen receptor subtypes (ER α and ER β) were isolated, sequenced and cloned in *C. humboldtianum*

INTRODUCCIÓN

1) HORMONAS ESTEROIDEAS

Los glucocorticoides, mineralocorticoides y las hormonas sexuales constituyen las denominadas hormonas esteroideas, las cuales controlan una amplia gama de funciones fisiológicas y metabólicas. Dichas hormonas se sintetizan a partir de un precursor común (el colesterol) que les confiere una estructura tetracíclica similar (Figura 1) por medio de una vía conocida como esteroidogénesis, la cual involucra numerosas enzimas como el citocromo P450 (CYP) y la hidroxisteroide deshidrogenasa (HSD) (Bondesson *et al*, 2015).

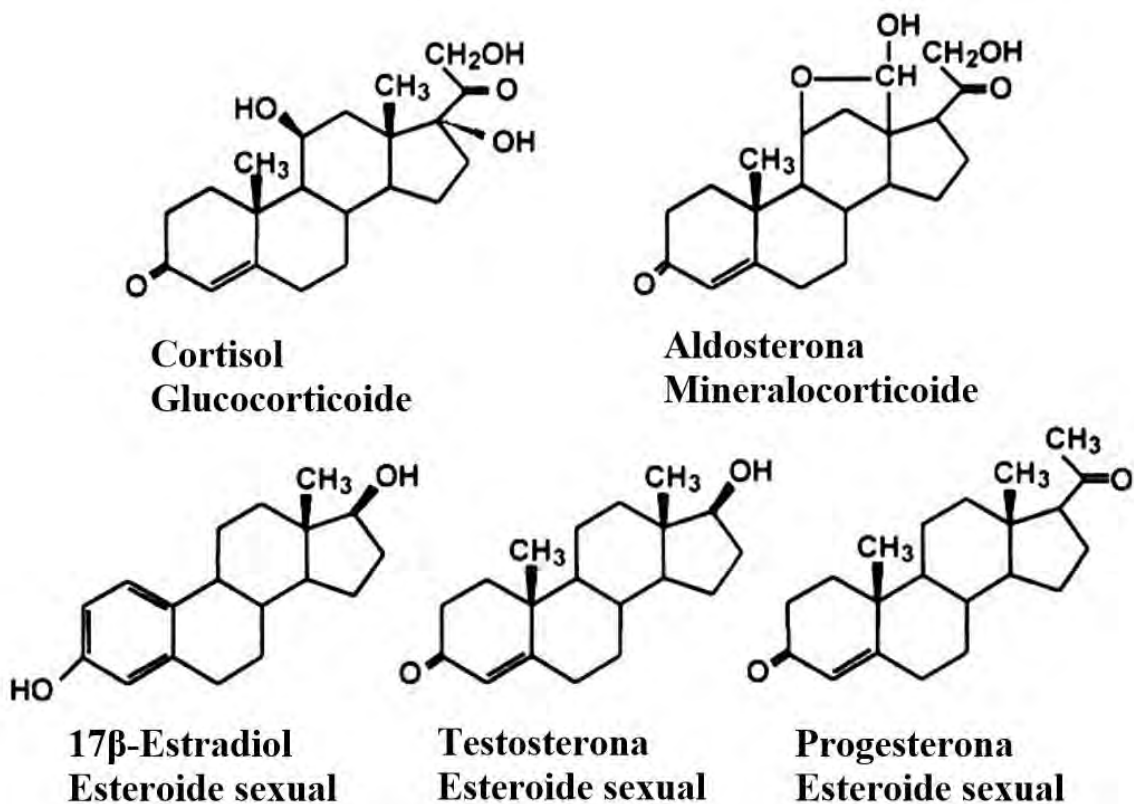


Fig 1. Hormonas esteroideas con su característica estructura tetracíclica

1.1 Esteroides sexuales/Hormonas sexuales

Los esteroides sexuales, es decir, los estrógenos (18 carbonos), los andrógenos (19 carbonos), la progesterona y el cortisol (21 carbonos), son sintetizados *in novo* de un precursor común: el colesterol. Para dar inicio a la síntesis de esteroides la cadena lateral del colesterol es eliminada por medio de la enzima cyp11a1, siendo la única capaz de realizar dicha escisión, además de ser la responsable de la conversión de esteroides de 21 carbonos a esteroides de 19 carbonos. La conversión del colesterol da como resultado pregnenolona, la cual puede seguir dos vías, en la primera se tiene como producto final la progesterona (gracias a la participación de 1 β -hidroxiesteroide deshidrogenasa) y la aldosterona (por medio de la actividad de diversos citocromos p450), la segunda vía se define por la conversión de la pregnenolona a 17 α -hidroxipregnenolona así como el lugar donde está se lleve a cabo. En la zona fasciculada de la corteza suprarrenal continuará su ruta hasta formar cortisol mientras que en las gónadas formará testosterona o estradiol, para éstos últimos se necesitan dehidroepiandrosterona que por actividad de cyp17a1 formará androstenediona, para después formar estrona y por último estradiol. Alternativamente la androstenediona es convertida a testosterona, la cual con ayuda de una aromatasas puede dar lugar a la síntesis de estradiol (Figura 2) (Bondesson *et al*, 2015).

La esteroidogénesis ha presentado una conservación en la parte central de la vía con respecto a peces teleósteos y humanos, pero existen diferencias muy marcadas. Una de ellas se refiere a la síntesis de la aldosterona, en peces la corticosterona es el punto final de la vía, por el contrario, en humanos la corticosterona es un producto intermedio para la síntesis de la aldosterona, pero las mayores diferencias se pueden encontrar en la síntesis de andrógenos, donde el ligando para los receptores a andrógenos en peces es la 11-ketotestosterona, mientras que en seres humanos es la testosterona, por lo tanto, en peces la 11-ketotestosterona se sintetiza a través de 11 β -hidroxitestosterona, molécula que no puede producir los humanos debido a que la vía androgénica humana se centra en reducciones, además de que las enzimas son diferentes. Otra diferencia es la existencia en peces de dos genes que codifican para distintas aromatasas y son responsables de la catalización de dichas reacciones: cyp19a (en gónadas) y CYP19b (en cerebro) para formar E₂ (Bondesson *et al*, 2015 y Tokarz *et al*, 2015).

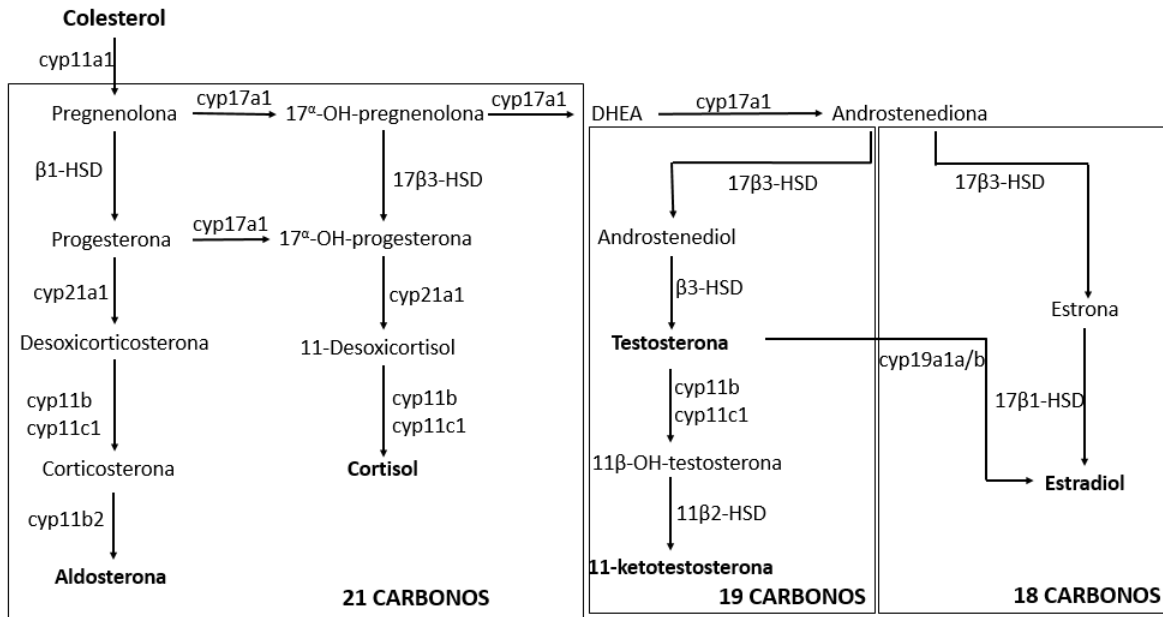


Fig 2. Posible vía de síntesis de esteroides sexuales. Los esteroides se encuentran agrupados por el número de carbonos en su estructura. En las flechas se muestra los nombres de los genes de las enzimas inmersas en el proceso de síntesis, donde cyp:citocromo P450; DHEA:Dehidroepiandrosterona; HSD:hidroxiesteroide deshidrogenasa; OH:hidroxi.

2) RECEPTORES A ESTRÓGENO

Los estrógenos son hormonas esenciales en diferentes funciones reproductivas y no reproductivas, particularmente en la regulación del desarrollo de los ovarios, diferenciación y mantenimiento de la ovogénesis, así como la estimulación hepática para la síntesis de vitelogenina (VTG), que es vital para la ovogénesis en peces, (Tohyama *et al*, 2015). Todas estas funciones se encuentran mediadas por receptores a estrógeno (Mu *et al*, 2013 y Katsu *et al*, 2011).

2.1 Estructura de ER

Los receptores a estrógeno (ER) pertenecen a la superfamilia de receptores nucleares. Una característica de esta familia es que contienen seis distintos dominios nombrados alfabéticamente (A-F). La región N-terminal que contiene a los dominios A y B es de las más variadas entre vertebrados; contiene la primera función activadora (AF1), a la cual, justamente, se le atribuye la activación del receptor independiente del ligando, ya que puede ser fosforilada por medio de una protein-cinasa (MAPK) en los residuos de serina/treonina promoviendo que se active. La región correspondiente al dominio C es responsable de la unión del ADN denominada DBD, siendo altamente conservada entre vertebrados. Contiene dos dedos de zinc, lo que le permite tener una conformación tridimensional, permitiendo que el receptor interactúe con una secuencia específica del ADN, referida como elemento de respuesta a estrógenos (ERE) dicha región ha sido identificada y presenta la siguiente secuencia AGGTCAnnnTGACCT, mientras que una serie de aminoácidos en el segundo dedo de zinc están involucrados en la dimerización del receptor. El dominio D está poco conservado, según se desprende del análisis de la comparación de secuencias entre los diferentes grupos de vertebrados. Esta parte le confiere señales de localización nuclear y posiblemente también permite la formación de dímeros. En la región E se encuentra el dominio de unión al ligando (LBD), donde el ligando induce la segunda función activadora (AF2), responsable de la actividad transcripcional dependiente del ligando, además de interactuar con proteínas de shock y proteínas co-reguladoras. El dominio F es el final del AF2 y continúa hasta el C-terminal del receptor, del cual se desconoce su función atribuyéndosele de la modulación en la actividad transcripcional del complejo ligando-receptor en las células (Figura 3) (Nelson y Habibi, 2013 y Socorro *et al*, 2000).

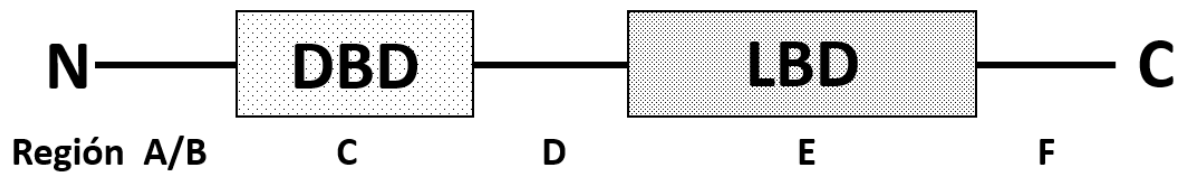


Fig 3. Estructura general de receptores nucleares. DBD: Dominio de unión al ADN, LBD: Dominios de unión al ligando.

2.2 Subtipos de ER

Dos tipos de ER han sido descritos en vertebrados. El primero, conocido como ER α fue clonado en humanos, pollos y truchas arcoíris y casi diez años después el ER β fue descubierto en ratas. En la figura 4 se muestra que ambos subtipos poseen la misma estructura de un receptor nuclear, con variantes en su longitud así como en el porcentaje de similitud entre dominios, siendo los dominios de unión al ADN y de unión al ligando los más conservados (Strobl-Mazzulla et al, 2008 y Kuiper *et al*, 1996).

La expresión de ER α y de ER β en los diferentes tejidos es claramente diferenciada durante el desarrollo temprano, crecimiento y desarrollo gonadal sin importar el organismo, y a nivel genético se observan diferentes afinidades en la unión a los ligandos, así como en la actividad transcripcional (Unal *et al*, 2014; Mu *et al*, 2013).

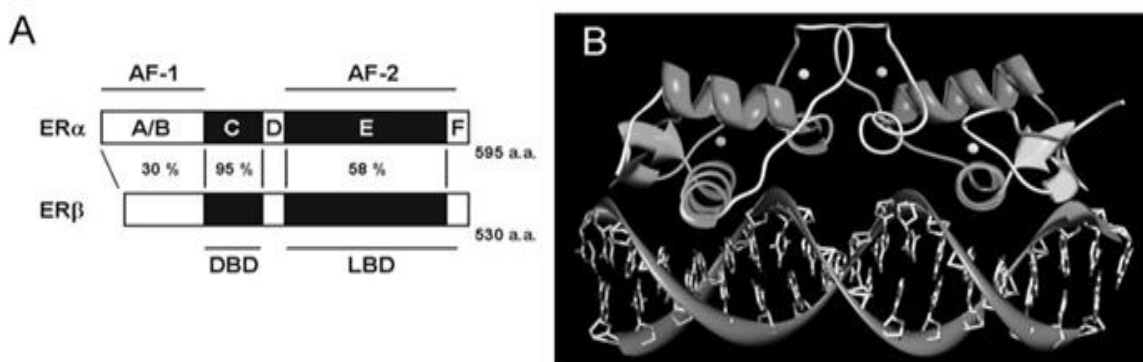


Fig 4. Estructura de los receptores a estrógeno, en la región N-terminal se encuentra el dominio A/B (transactivación, AF-1), el dominio de unión al ADN (DBD, dominio C), dominio D (dimerización), en la región C-terminal se encuentra el dominio de unión al ligando y transactivación (LBD, AF-2, dominio E) y el dominio F que contiene ésta relacionado con la transactivación. Los porcentajes indican la homología entre los subtipos en vertebrados. B) Modelo de la dimerización de los ER (PDB ID: HCQ). Las esferas indican los átomos de zinc (Modificado de Marino *et al*, 2006).

2.2.1. Mecanismo de acción de los ER

Hay distintas vías de señalización en el cual los estrógenos son regulados (Figura 5)

a) Vía Clásica

En ausencia del ligando, los ERs se encuentran en el citoplasma asociados a proteínas de shock térmico. Una vez presente el ligando (siendo el más común el 17 β -estradiol o E2) las proteínas de shock térmico se separan y los receptores forman homodímeros o heterodímeros entre ER α y ER β , relocalizados en el núcleo e interactuando con el elemento de respuesta a estrógenos (ERE) en la región promotora del gen en cuestión. El complejo receptor/ADN actúa como andamio para varias proteínas coreguladoras (más de 300 en mamíferos) conocidas como coactivadores o correpresores, por ejemplo, en mamíferos el corregulador SRC-1 actúa directamente con ER α , incrementando la actividad transcripcional en presencia de estradiol. Es sabido que se pueden obtener diferentes respuestas, en presencia del ligando, según el tejido y subtipo de receptor. (Heldring *et al*, 2007; Nelson y Habibi, 2013 y Strobl-Mazzulla *et al*, 2008).

b) Vía no genómica

Como su nombre lo indica, éste mecanismo es no genómico, de acción rápida y ha sido observado en varios tejidos, sin embargo, aún no se encuentra entendido del todo. En modelos *in vitro* se ha demostrado que el mecanismo de acción para ER α consiste en interactuar directamente con el complejo proteincinasa c-Src. Un ejemplo de ello, es la existencia de una vía en la cual los factores de crecimiento, mediante la activación de cinasas, fosforilan y activan los ERs (Heldring *et al*, 2007). Además, se ha descrito la presencia de un receptor asociado a proteínas G (GPR30) capaz de mediar una rápida acción del estradiol (Nelson y Habibi, 2013).

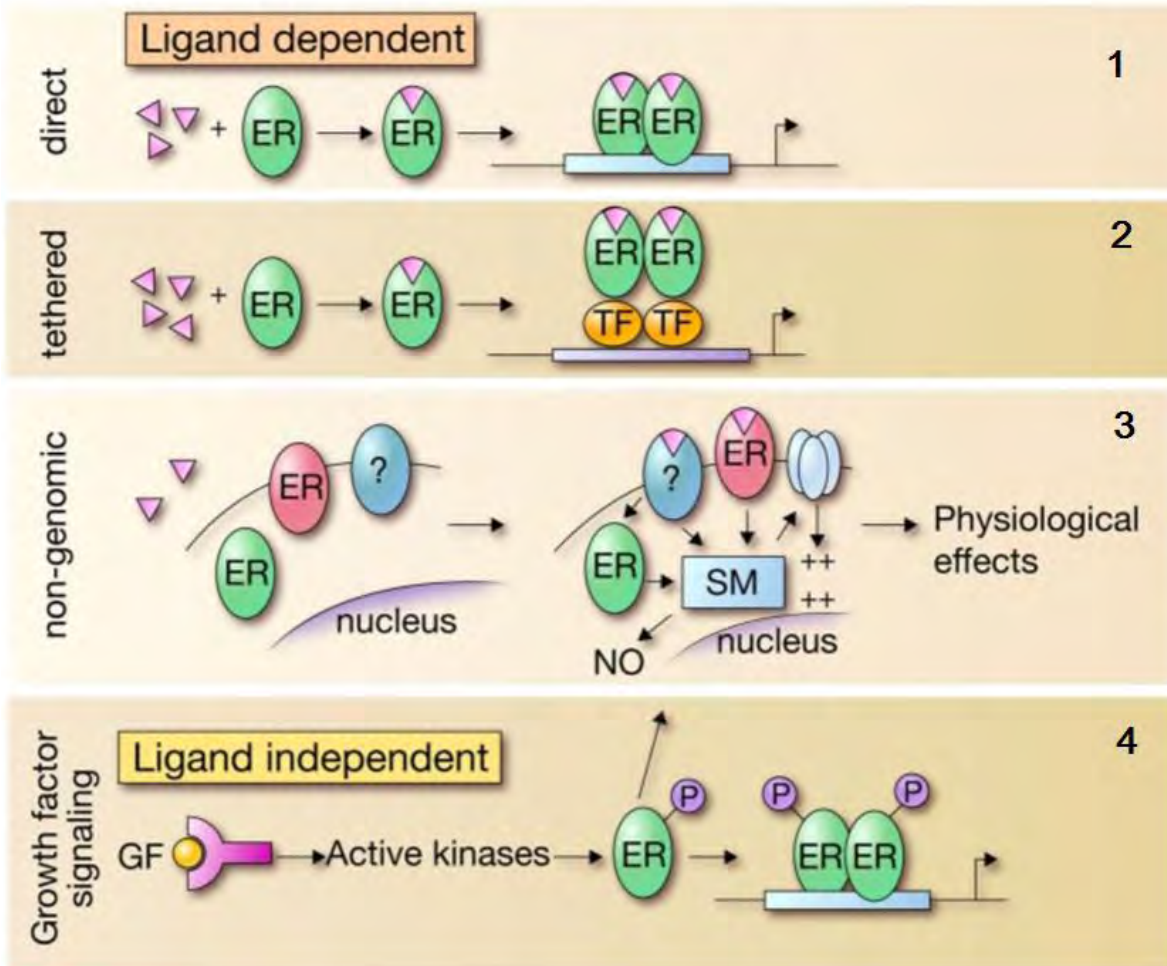


Fig 5. Diferentes vías de señalización para la regulación de receptores a estrógeno (ER). CLÁSICA: 1) Vía clásica (directa), activación del ligando y unión directa al ADN (por medio de ERE). 2) Interacción con factores de transcripción (TF) después de la activación de ER por ligando y su unión indirecta con el ADN. NO GENÓMICA: 3) Ligando activa a un receptor a estrógeno asociado a la membrana para activar segundos mensajeros (SM), afectando los niveles de óxido nítrico (NO) y éste induce a una respuesta fisiológica rápida. 4) Vía independiente de ligando, activa ER por medio de factores de crecimiento, que activan cinasas y fosforilan al ER activándolo y uniéndose al ADN. (Modificado de Heldring *et al*, 2007).

Otro aspecto importante que cabe destacar es que dichos receptores a estrógeno (ER) pueden activarse por sustancias conocidas como disruptores endócrinos (xenoestrógenos), los cuales tienen propiedades y estructuras similares al de los estrógenos. Se han identificado más de 200 químicos con capacidad estrogénica, incluyendo compuestos farmacéuticos, industriales y agrícolas, tales como, bisfenoles y pesticidas. La mayoría de estos disruptores entran a medios acuáticos y como consecuencia, el mayor riesgo de exposición lo tienen los peces. Estos compuestos se unen a los ERs, induciendo la activación de los mismos y su interacción con el ADN, responsable de la activación o represión de genes para regular la transcripción, controlar los promotores y en algunos casos, el empalme alternativo; determinando no sólo la cantidad, sino la naturaleza del producto expresado, y por ende, problemas a nivel fisiológico como son: la reducción del crecimiento gonadal, deformación gonadal, inhibición de la espermatogénesis, reducción de la cuenta espermática, baja producción de huevos y el aumento de la prevalencia de intersexos, por referir solo algunas de las consecuencias a su exposición (Cotter *et al*, 2013 y Tohyama *et al*, 2015).

2.3 ER en peces teleósteos

El primer receptor a estrógeno clonado en peces fue de trucha arcoíris correspondiendo al ER α , el cual es expresado en regiones neuroendócrinas clásicas en el cerebro, tales como: el área preóptica y el área mediobasal y caudal del hipotálamo, mientras que el ER β tiene una amplia distribución a lo largo de los ventrículos del telencéfalo y el diencefalo, esto indica la posibilidad de funciones específicas o redundantes, diferentes mecanismos de regulación o disimilitud en la localización celular. Hay evidencia de que ER α es expresado en neuronas primarias, en especial, en neuronas dopaminérgicas en el área preóptica, neuronas GABA, neuronas GnRHérgicas y neuronas Kiss, ya que la expresión de CYP19b es fuerte y ésta se encuentra regulada por E₂ (mecanismo dependiente de ER) (Coumilleau *et al*, 2015 y Strobl-mazzulla *et al*, 2008), pero esto varía conforme a la especie, por ejemplo *Fundulus heteroclitus* (Cotter *et al*, 2015) muestra una baja expresión del subtipo alfa en cerebro, en contra parte con *Cyprinus carpio* (Katsu *et al*, 2011) donde el receptor predominante en encéfalo es el subtipo alfa. El subtipo beta en encéfalo de *Sparus aurata* (Socorro *et al*, 2000) y *Sebastes schlegeli* (Mu *et al*, 2013) exhiben una alta expresión, mientras que en *Dicentrarchus labrax* dicha expresión difiere entre sexos, ya que en encefalos de machos es mayor que en hembras (Halm *et al*, 2004).

ANTECEDENTES

Menuet y colaboradores en el 2002 realizaron la caracterización molecular de diferentes subtipos del receptor a estrógeno en *Danio rerio* (pez cebra) por medio de PCR, obteniendo secuencias completas de tres subtipos: ER α (569 aa), ER β 1 (592 aa) y ER β 2 (553 aa), compartiendo una similitud de 82.1%-91.7% en la región C, correspondiente al dominio de unión al ADN.

Sabo-Attwood y colaboradores en el 2004 aislaron los subtipos alfa, beta y gama del receptor a estrógeno en *Micropterus salmoides* (lobina negra) por medio de PCR en tiempo real, obteniendo para ER α una secuencia de 1881 pb (627 aa), para el ER β 2010 pb (670 aa) y para ER γ una secuencia de 1668 pb (556aa). Con respecto a su expresión en ovarios, cerebro e hipófisis, los niveles de ER α fueron más bajos en comparación con ER β y ER γ se mantenía con una moderada regulación.

Strobl-mazzulla y colaboradores en el 2008 estudiaron con mayor detalle la distribución de dos receptores a estrógeno en comparación con la aromatasa en el encéfalo de *Odontesthes bonariensis* (pejerrey) por medio de PCR e hibridación *in situ*; obteniendo dos secuencias, una de 2872 pb (603 aa) que codifica a ER α y otra de 2539 pb (558 aa) correspondiente a ER β . Ambas secuencias comprenden los dominios típicos de un receptor nuclear, siendo los más conservados el dominio C y el dominio E (82%-92% de similitud) con respecto a otras especies. Tanto pJER α y pJER β fueron localizados en la parte anterior ventral del área preóptica donde cyp19A2 fue detectada con mayor fuerza.

Woods y colaboradores en el 2010 clonaron y analizaron la expresión en diferentes tejidos de esr1 en *Melanotaenia fluviatilis* (pez arcoíris) por medio de PCR, reportando una secuencia 2569 pb que codifica a una proteína de 611 aminoácidos. Presentando una mayor similitud con *Sparus aurata* (dorada) (86%) y *Fundulus heteroclitus* (killifish) (71%). Su expresión fue más abundante en el hígado, gónadas e intestino de machos y hembras adultos.

Mu y colaboradores en el 2013 realizaron la clonación y análisis de la expresión de los receptores a estrógeno beta durante el desarrollo de *Sebastes schlegeli* (Korean rockfish) mediante qRT-PCR. Confirmando que ambos ER β contienen los seis dominios típicos. En el caso de ER β 1 éste está formado por 2451 pb (561 aa) y ER β 2 por 2338 pb (659 aa). La región codificante para el dominio C mantiene la mayor identidad, siendo del 58% con

respecto a un comparativo con múltiples especies de peces ER β 1 se expresó en hipófisis, cerebro, gónadas y riñones mientras que ER β 2 se expresó solamente en el intestino.

CONSIDERACIONES DE LA ESPECIE DE ESTUDIO

La posición geográfica y la compleja historia geológica de México han favorecido su riqueza faunística. Los levantamientos de la parte central del país, desde el Eje Volcánico Transversal hasta la región del Río Grande han auspiciado un elevado grado de endemismo. Un notable ejemplo de este endemismo puede ser encontrado en los peces del género *Chirostoma*, con sus 18 especies y seis subespecies (Barbour, 1973), probables productos del activo vulcanismo que se dio en el altiplano mexicano, que originó la segmentación de hábitats acuáticos teniendo como consecuencia aislamiento genético en las poblaciones de peces, provocando eventos de especiación (Uribe-Alcocer y Díaz-Jaimes, 2003).

Se ha propuesto que los ancestros del género *Chirostoma* eran similares a la especie actual *Menidia berylina* y que llegaron a los sistema fluvial Lerma-Santiago-Chapala (localizados en los estados de Michoacán y parte de Jalisco) por medio de sistemas marinos que en la actualidad han emergido, ya que la familia Atherinopsidaese presentan tanto en ambientes marinos como salobres y desde entonces, han contribuido en un alto grado al endemismo de la ictiofauna de la región. (Espinosa-Pérez *et al*, 1993).

El pescado blanco es un recurso de importancia por su valor económico, ecológico y cultural en la región del altiplano mexicano y su explotación se remota a tiempos anteriores a la conquista, cuando estos peces ya eran utilizados por poblaciones purépechas para consumo local.

Chirostoma humboldtianum el de más amplia distribución, actualmente se reporta su presencia en el estado de México (cuatro cuerpos de agua) y en el estado de Michoacán en la laguna de Zacapu, en el lago de Pátzcuaro y en el embalse Cointzio, pero en los últimos tiempos sus poblaciones se han visto disminuidas como recurso por diversas actividades antropogénicas y la eutrofización de su hábitat, así como la obtención de una mayor ganancia en un menor tiempo lo que lleva a una sobrepesca de dichos organismos, y por ende, una creciente mortalidad de juveniles por métodos de extracción no selectivos, por lo que, si se conocen los mecanismos en lo que respecta a crecimiento y desarrollo, ésta información puede ser interpretada en beneficios tanto económicos como biológicos para su adecuado manejo y producción pesquera (SAGARPA, 2003).

A pesar de su importancia biológica, histórica y económica que representa se han realizado pocos estudios sobre esta especie; en los aspectos fisiológicos que regulan tanto la reproducción y el crecimiento de *C. humboldtianum* se tienen reportadas secuencias de hormonas concernientes al crecimiento, como son el precursor a la hormona del crecimiento (GH) en hipófisis (Juárez-Robles, 2014) y al eje reproductivo, con la secuencia para GnRHR2a, el precursor de GnRH, el receptor de la hormona liberadora de gonadotropinas (RHR1B) y el receptor a kiss1 (Cárdenas *et al*, artículos no publicados y Macedo-Garzón, 2012).

En los años setenta se iniciaron experiencias en el cultivo de pez blanco de Patzcuaro (*C. estor*) en los estanques del Centro Piscícola de Pátzcuaro (Rosas *et al*, 1970) y desde entonces se ha logrado reunir información para el cultivo y la reproducción controlada de *C. humboldtianum* en condiciones de cautiverio, donde destaca la incubación del huevo a 22° C por 288 horas (desarrollo embrionario dividido en 20 fases), eclosión en un medio salino (2.55 g/L de sal de mar) sin efectos negativos, sobrevivencia de los reproductores por un periodo de 2-4 años en estanques circulares sin recambio de agua y con aireación (Martínez *et al*, 2003); con respecto a la alimentación dicha especie es carnívora y zooplanctónica, es decir, tiende a consumir alimento vivo, pero Suárez (1997) planteó los aspectos nutricionales básicos para esta especie.

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

La caracterización de receptores a estrógeno en peces no parece mostrar una relevancia científica de gran impacto o utilidad; pero esto se ve frenado al verse inmersos en dos grandes problemas que aquejan a la sociedad; uno de ellos es la contaminación por agentes hormonales en los cuerpos de agua, los cuales poseen una estructura molecular similar a los estrógenos, capaces de unirse a los receptores de dicha hormona (ER), activando factores transcripcionales que interactúan con el ADN y que son responsables de la activación o represión de genes, afectando mecanismos y procesos regulatorios de gonadotropinas, oogenesis, vitelogenesis, desarrollo testicular entre otros, teniendo como consecuencia problemas de índole reproductivo, de crecimiento y de número de individuos así como posibles consecuencias en los eslabones más altos de la cadena alimenticia, esto debido a la ingesta de una concentración anormal de sustancias tóxicas con efecto endócrino y la disminución en la cantidad y calidad del alimento. El segundo punto a tratar se refiere al cultivo de peces de interés comercial, como es el caso de *Chirostoma humboldtianum*; con la finalidad de aumentar la producción por medio del manejo eficiente de suplementos hormonales en la reproducción, así como el mantenimiento de dichos organismos, la caracterización de los receptores a estrógeno se vuelve uno de los factores relevantes para este fin, ya que como se mencionó anteriormente median este tipo de procesos, siendo necesaria la investigación básica para obtener dicha información y acercarnos a la posibilidad de obtener una mayor ganancia en un menor tiempo sin orillar a una especie endémica a la extinción.

OBJETIVOS

Objetivo general:

Aislar, secuenciar y clonar los subtipos de Receptores a Estrógeno (ER) presentes en el encéfalo de *Chirostoma humboldtianum*

Objetivos particulares:

-Aislar los subtipos de Receptores a Estrógeno (ER) en encéfalo de *Chirostoma humboldtianum*.

-Determinar la secuencia de los subtipos de Receptores a Estrógeno (ER) en encéfalo de *Chirostoma humboldtianum*.

-Clonar las secuencias obtenidas de los subtipos de Receptores a Estrógeno (ER) de *Chirostoma humboldtianum*.

MATERIALES Y MÉTODO

A) Fase de campo.

Las muestras de encéfalos fueron obtenidas de la colecta de organismos en su mayoría sexualmente maduros, provenientes de la laguna de Zacapu, Michoacán (19.816667-101.790833) en el mes de Mayo (Figura 6), se colectaron por medio de la técnica de chinchorreo llevada a cabo por los pescadores de la cooperativa de dicha localidad (Figura 7).

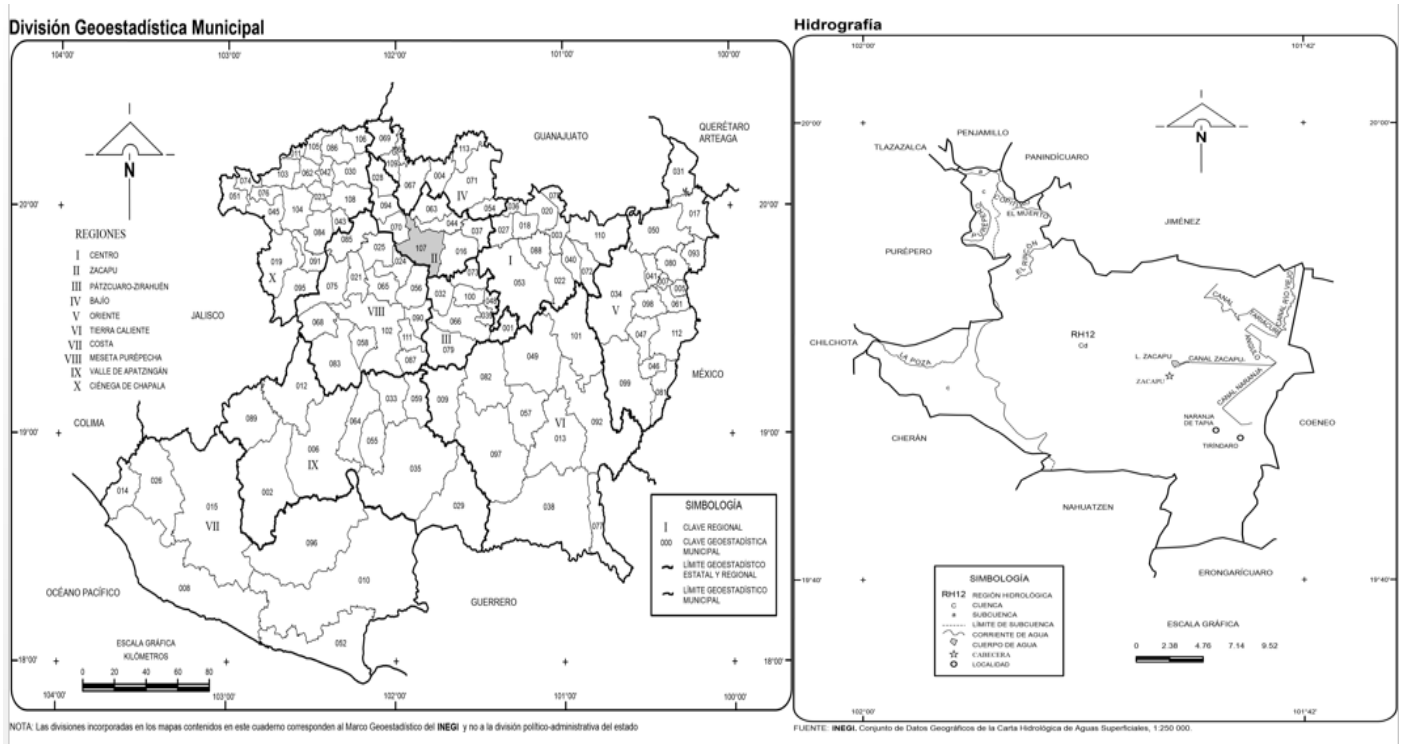


Fig 6. Ubicación del municipio de Zacapu (en gris) así como de la hidrografía de la Laguna de Zacapu (Michoacán). Tomado de INEGI (2016)

Los organismos fueron anestesiados con MS222 (Sigma-Aldrich®) y en base a las características externas de la gónada ser sexados, posteriormente se procedió a la extracción de encéfalos mediante disección, los cuales fueron puestos en tubos eppendorf (tratados previamente con dietil-pirocarbonato) y transportados en hielo seco hasta el Laboratorio de Endocrinología de Peces de la FES-Iztacala.



Fig. 7. Ejemplares de *C. humboldtianum* pertenecientes a la colecta.

B) Fase de laboratorio.

I. Extracción de ARN

La extracción de ARN total fue realizada de acuerdo al protocolo establecido por Chomczynski y Sacchi en 1987 (Guanidil-tiocianato-fenol-cloroformo), verificando su integridad en un gel de Agarosa al 1% teñido con Midori Green® (Figura 8) para después realizar RT-PCR de acuerdo al protocolo del kit Super Script III RT (invitrogen®).

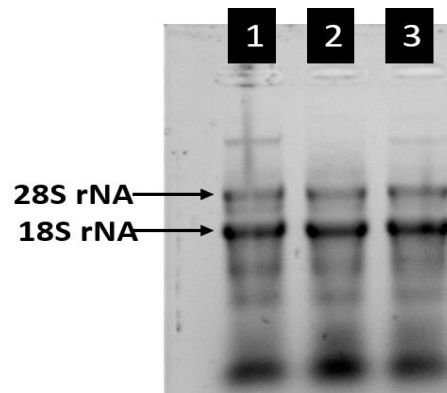


Fig 8. Verificación de integridad de rNA en gel de Agarosa 1% con Midori Green®. Carriles 1-3: Muestras de encéfalo (Mayo).

II. Aislamiento de Receptores a Estrógeno

Para el aislamiento de los receptores a estrógeno de *C. humboldtianum* se realizaron PCRs con diferentes juegos de oligonucleótidos (Tabla 1) los cuales fueron diseñados con el programa Oligo 7 (Versión 7.58) y las secuencia de varios peces propuestas por Strobl-Mazzulla y colaboradores (2008) para éstos receptores.

OBTENCIÓN DE LAS SECUENCIAS PARA EL ER α

Para el aislamiento y amplificación de la secuencia se realizaron PCRs con los oligonucleótidos denominados ER α F/ ER α R (Tabla 1) bajo las siguientes condiciones: 94° C (5min), 94° C (30 seg), Tm 63°C (1 min), 72° C (1 min), 35 ciclos, 72° C (7 min).

OBTENCIÓN DE LA SECUENCIA PARA EL ER β

Se realizaron PCRs para el aislamiento y amplificación de la secuencia usando los oligonucleótidos denominados ER β F/ ER β R (Tabla 1) bajo las siguientes condiciones:

95° C (5 min), 95° C (40 seg), Tm 49.6°C (1 min), 72° C (1 min), 40 ciclos, 72° C (7 min).

Tabla 1. Oligonucleótidos usados para la obtención de Receptores a Estrógeno

Oligonucleótido	Secuencia 5'-3'	Posición del nucleótido
Receptor a Estrógeno subtipo alfa		
ERαF	AGCAGCTGAGCCGACCCTACAC	1040–1061
ERαR	CATGCCCTCAACACAGTCTCCTTC	1342–1319
Receptor a Estrógeno subtipo beta		
ERβF	TGCTGCTGGCTGGAGGTGTTGAT	1621–1643
ERβR	AGGTGGGCGAGGCGGGTGTA	1981-2000

I. Secuenciación de productos

Los productos obtenidos fueron verificados por electroforesis en geles de agarosa al 1% con Midori Green®; purificados en columnas por medio del kit Wizard purification Promega SV® gel y secuenciados (Secuenciador Automático ABI 3100 Perkim Elmer) en la Unidad de Biotecnología y Prototipos de la FES-Iztacala (UNAM).

Las secuencias obtenidas fueron analizadas mediante Blast y blastx (versión 2.0, National Center for Biotechnology Information) y comparadas con la base de datos de Genbank, para su posterior manejo en los programas BioEdit Sequence Alignment Editor (versión 7.2.5), GeneDoc (versión 2.7.000) y Geneious R9 (versión 9.1.3).

II. Clonación de productos

Los productos obtenidos fueron clonados en base al protocolo del kit pGEM-Easy Vector system® (Promega), las clonas seleccionadas fueron purificadas siguiendo el protocolo del kit Wizard Plus SV Minipreps DNA Purification System® (Promega), siendo verificados los resultados con los PCRs respectivos a cada subtipo y un gel de agarosa al 1% teñido con Midori Green® (Figura 9).

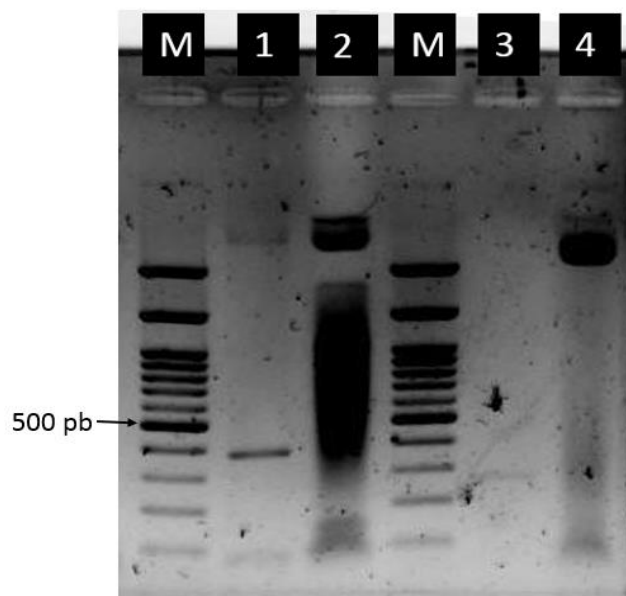


Fig 9. Gel de Agarosa al 1% teñido con Midori Green®. Se muestran los plásmidos de cada uno de los subtipos y su respectivo PCR. M: marcador, Carril 1: ERβ purificado, Carril 2: Plásmido de ERβ, Carril 3: ERα purificado, Carril 4: Plásmido de ERα

RESULTADOS

Se reportaron por primera vez secuencias parciales de los Receptores a Estrógeno subtipo alfa y subtipo beta para *C. humboldtianum* por medio de PCR.

RECEPTOR A ESTRÓGENO SUBTIPO ALFA

Se obtuvo un producto de 228 pb (Figura 10) usando los oligonucleótidos ER α F/ ER α R (Tabla 1) correspondiendo al dominio de unión al ligando (LBD) de ER α

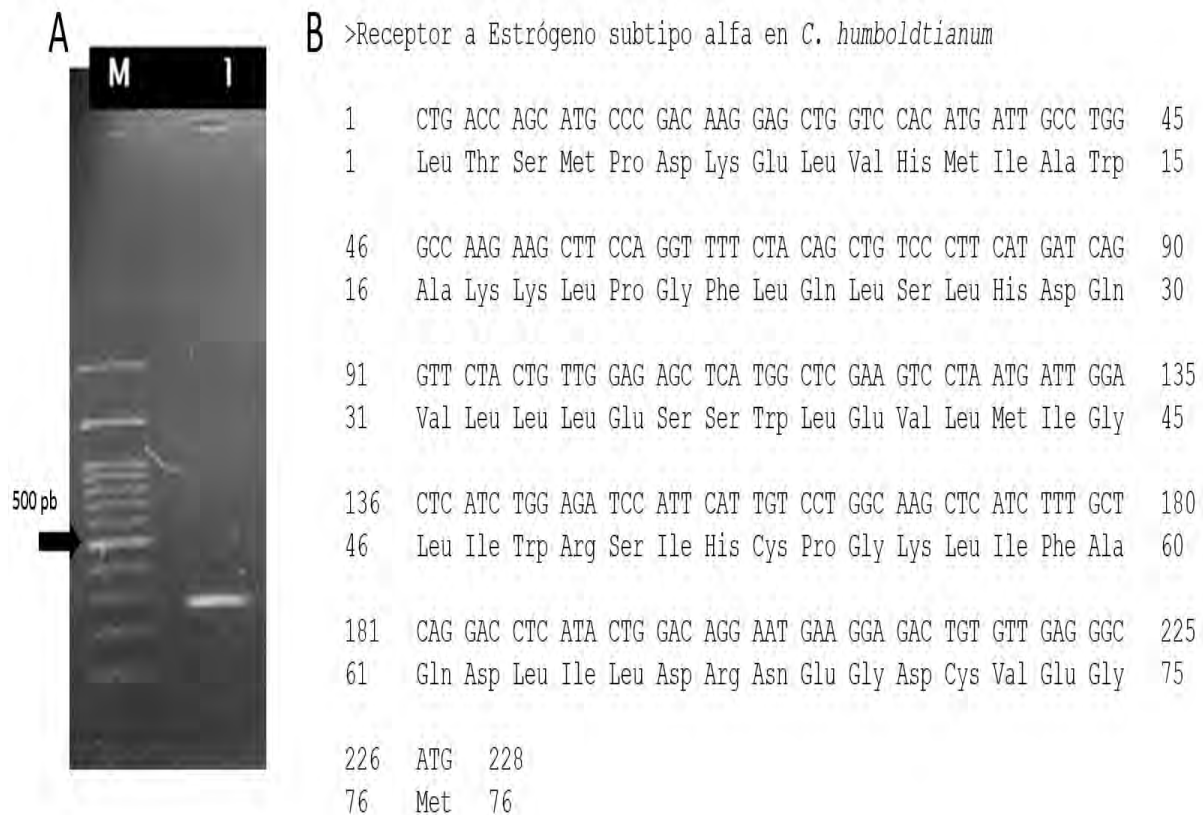


Fig 10. A) Producto de aproximadamente 200pb verificado en un gel de Agarosa al 1% teñido con Midori Green®. M= Marcador de peso molecular 1=Producto de PCR.
B) Secuencia parcial en nucleótidos y aminoácidos de ER α para *C. humboldtianum*

RECEPTOR A ESTRÓGENO SUBTIPO BETA

Se obtuvo un producto 359 pb (Figura 11) con los oligonucleótidos ERβF/ ERβR (Tabla 1) correspondiente al dominio de unión al ligando (LBD) del ERβ

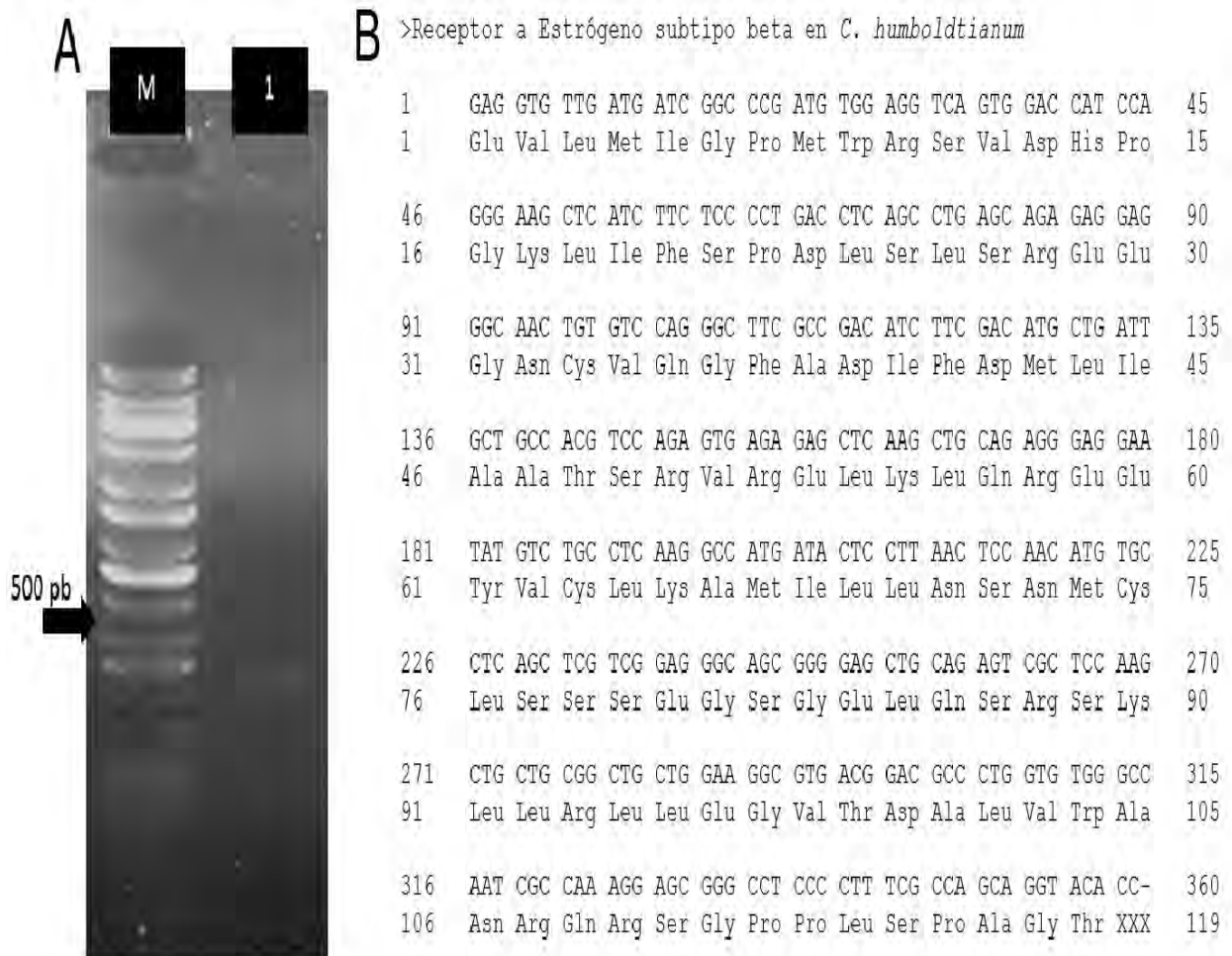


Fig 11. A) Producto de aproximadamente 400 pb verificado en un gel de Agarosa al 1% teñido con Midori Green®. M= Marcador de peso molecular 1=Producto de PCR. B) Secuencia parcial en nucleótidos y aminoácidos de ERβ para *C. humboldtianum*

DISCUSIÓN

Como es sabido, el estrógeno cuenta con una participación importante en varios procesos como son: la regulación de la ovogénesis, vitelogénesis, regulación de gonadotropinas, desarrollo testicular y otros aspectos de la reproducción (Nelson & Habibi, 2013). El efecto del estradiol (E_2) es mediado por vía de ERs que controlan el encendido y apagado de genes en varios tejidos endócrinos (Sabo-Attwood *et al*, 2004).

Onchorhynchus mykiss fue la primera especie perteneciente a peces teleósteos en la que se reportó la secuencia completa para éste receptor nuclear. Desde entonces, la información sobre receptores a estrógeno y sus subtipos ha ido en aumento (Katsu *et al*, 2011).

En este estudio se identificaron por primera vez secuencias para dos subtipos de receptores a estrógeno (α y β) en *C. humboldtianum*

El receptor a estrógeno subtipo α (con número de acceso KP868629.1) consta de una secuencia parcial de 228 pb que codifican a una proteína de 76 aminoácidos; para el subtipo β se obtuvo una secuencia parcial de 359 pb, codificando una proteína de 119 aminoácidos. Ambas secuencias corresponden al dominio de unión al ligando (LBD), región altamente conservada entre especies. Esto se puede observar al realizar las comparaciones entre las secuencias obtenidas y las de otros peces. Para ER α la mayor identidad se encuentra con *O. bonariensis*, seguida de *M. fluviatilis* y *C. labrosus* (ambos con el mismo porcentaje) y por último con *S. schlegeli* (Tabla 2), mientras que para ER β , *M. fluviatilis* presenta la mayor identidad, seguido por *O. bonariensis*, *S. schlegeli* y *M. salmoides* (Tabla 3).

Tabla 2. Porcentajes de identidad en nucleótidos de ER α con otras especies de peces

Especie (ER alfa)	Identidad (%)	Número de acceso
<i>Odontesthes bonariensis</i>	91	EU284021.1
<i>Melanotaenia fluviatilis</i>	87	GU319956.1
<i>Chelon labrosus</i>	87	DQ011293.1
<i>Sebastes schlegeli</i>	86	FJ594994.2

Tabla 3. Porcentajes de identidad en nucleótidos de ER α con otras especies de peces

Especie (ER beta)	Identidad (%)	Número de acceso
<i>Melanotaenia fluviatilis</i>	91	GU319957.1
<i>Odontesthes bonariensis</i>	90	EU284022.2
<i>Sebastes schlegeli</i>	89	FJ646610.3
<i>Micropterus salmoides</i>	89	AY211022.1

Al realizar la comparación de la proteína de ER α para *C. humboldtianum* (AJW28723.1), las especies con mayor identidad fueron *O. bonariensis* y *M. fluviatilis*, seguido por *Oryzias javanicus* y *S. schlegeli*, y por último *Dicentrarchus labrax*; mismo caso para la proteína de ER β cuyo porcentaje de identidad es con *O. bonariensis*, seguido de *M. salmoides*, *D. labrax*, *Oryzias latipes* y *Cyprinus carpio*. Al realizarse una comparación entre las identidades y especies tanto en nucleótidos como en aminoácidos, observamos que existen cambios, los cuales pueden deberse a que se obtuvieron secuencias parciales, las cuales codifican a proteínas de 76 aa (ER α) y 119 aa (ER β), correspondiendo a menos del 50% del total del dominio con respecto al de especies comparadas, produciendo un sesgo en los porcentajes (Tablas 4 y 5), pero también nos permite sugerir que dicho parecido con otras especies reflejarían una relación filogenética entre taxas (Cotter *et al*, 2013), tal y como sucede entre *O. bonariensis* y *C. humboldtianum*, pertenecientes a la misma familia (Atherinopsidae).

Tabla 4. Identidad en aminoácidos de ER α en *C. humboldtianum* con otras especies de peces

Especie	Similitud (%)	Localización de LBD (aa)	Receptor completo (aa)
<i>O. bonariensis</i> (ABY19510.1)	99	312-549	602
<i>M. fluviatilis</i> (ADF87494.1)	99	310-547	610
<i>O. javanicus</i> (AAX13999.1)	97	319-355	642
<i>S. schlegeli</i> (ACN39246.2)	96	317-554	624
<i>D. labrax</i> (CAD43599.1)	96	325-562	639

Tabla 5. Tabla 4. Identidad en aminoácidos de ER β en *C. humboldtianum* con otras especies de peces

Especie	Similitud (%)	Localización de LBD (aa)	Receptor completo (aa)
<i>O. bonariensis</i> (ABY19511.2)	93	272-509	558
<i>M. salmoides</i> (AAO39211.1)	92	274-511	556
<i>D. labrax</i> (CAD33851.1)	90	230-467	517
<i>O. latipes</i> (NP_001098172.1)	89	573-510	562
<i>C. carpio</i> (BAF99814.1)	87	281-518	544

En la región carboxilo terminal del receptor, se encuentra el dominio E, el cual, es altamente conservado y es conocido por contener el sitio de transactivación dependiente de ligando (AF2); está compuesto por doce alfa hélices (H1-H12) unidas por un beta-plegamiento entre H5 y H6 (Nelson y Habibi, 2013). Ésta estructura se pliega permitiendo que las hélices H3, H6, H8 creen una cavidad hidrofóbica donde se unen los estrógenos y sucede el cambio conformacional induciendo la activación de AF2 y su asociación con la hélice H12 para activar al receptor. Ésta función de transactivación es similar para ER α y ER β , así como la cavidad hidrofóbica y explica porque ambos subtipos unen el estrógeno con aproximadamente la misma afinidad (mamíferos KD= 0.2-0.5 nM y en peces: 0.5–0.7 nM). (Hawkins, M.B y Thomas, P., 2004 y Mu *et al*, 2013). Esta particular estructura terciaria aparentemente está presente en el dominio E de *C. humboldtianum*, ya que para ER α se han identificado a H3 y H6 así como parte de la cavidad hidrofóbica (L417-L425 y V433-L443) (Figura 12) mientras que para ER β se tienen identificadas H6 y H8 y segmentos correspondientes a la cavidad hidrofóbica (L378-L386 y V394-F397) (Figura 13), cabe destacar que dichas hélices se encuentran constituidas en su mayoría por aminoácidos de tipo no polar, debido a que interactúan con un ligando derivado del colesterol y de naturaleza lipídica. En pez cebra se ha identificado que un residuo en C-terminal del dominio ER alfa (L349) está implicado en la estabilidad de la unión al ligando a diferentes temperaturas, dicho aminoácido se conserva en las especies con las que se comparó el ER α de *C. humboldtianum* (Menuet *et al*, 2002).

La longitud del dominio E en los ERs ha sido altamente conservados en peces (ER alfa: 620 aa y ER beta: 547 aa en promedio respectivamente), que se constata en las comparaciones con las especies elegidas en este estudio (Socorro *et al*, 2000).

Al realizar la comparación entre ambos subtipos de *C. humboldtianum* a nivel de proteína (Figura 14), podemos observar que comparten 24 aa idénticos, es decir, el 65% de identidad, los cuales se encuentran ubicados mayoritariamente en la Hélice 6 (W38-R49) del LBD, un resultado similar se ha presentado en los receptores alfa y beta de *S. aurata* compartiendo 86 aa idénticos (61%-65%) en el LBD (Socorro *et al*, 2000) y para *O. bonariensis* (secuencias completas), que comparten 260 aa (45%) del total de los subtipos de ER (Strobl-mazzulla *et al*, 2008). Las similitudes entre receptores pueden deberse a duplicaciones del genoma después del evento de divergencia entre los peces con aletas lobuladas (Sarcopterygii) y los peces con aletas radiadas (Actinopterygii), siendo estos

últimos mayoritariamente peces teleósteos que muestran una considerable diversidad (Mu *et al*, 2013).

Los eventos de duplicación genómica resultan en genes parálogos que subsecuentemente inducen a una neo-funcionalización, sub-funcionalización o inactivación/pérdida de genes (Tohyama *et al*, 2015), como es el caso del receptor a estrógeno subtipo gamma (ER γ) en *M. salmoides*, que muestra una similitud del 82% a nivel de nucleótidos con el ER β en *C. humboldtianum*, observaciones similares se han reportado en *Micropogonias undulatus*, donde un análisis filogenético reveló que los subtipo beta y gamma están estrechamente relacionados; la secuencia de ER γ a nivel de aminoácidos de *M. salmoides* comparte una mayor identidad (75%) con ER β en el dominio de unión al ligando, en comparación con ER α (60%) (Sabo-Attwood *et al*, 2004), basados en estos resultados Hawkins y colaboradores (2000) sugiere que el ER γ resultó de una duplicación del ER β del genoma de un ancestro teleósteo.

Tohyama *et al* (2015) proponen que los ER contribuyeron a la radiación adaptativa de los teleósteos, debido a que el estrógeno modula el aspecto reproductivo y la determinación sexual y que la alta conservación de los dominios C (DBD) y E (LBD) y sus respuestas similares al E2 sugieren que los ER podrían someterse a neo/sub-funcionalización cambiando su patrón de expresión.

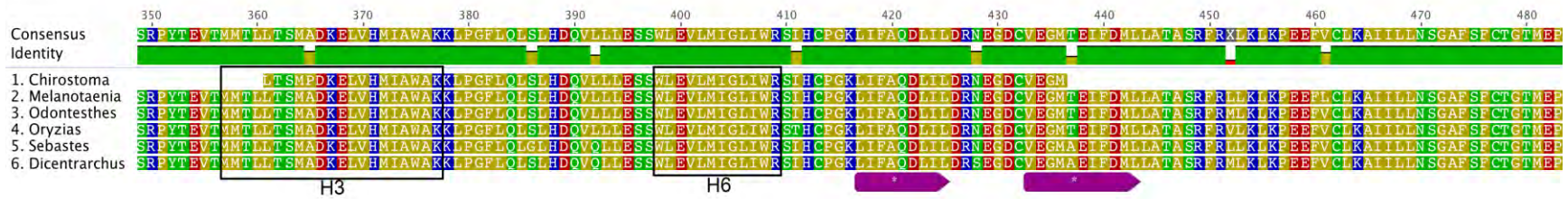


Fig 12. Domino de unión al ligando (LBD) de ER α en *C. humboldtianum*, alineándose a nivel de proteína con *O. bonariensis*, *M. fluviatilis*, *O. javanicus*, *S. schlegeli*, y *D. labrax*. Estructuralmente se indican las hélices 3 y 6, así como parte de la cavidad hidrofóbica (donde se asocia el ligando) con un asterisco. Los colores indican la polaridad de los aminoácidos, Amarillo: No polar. Verde: Polar, no cargado. Rojo: Polar, ácido. Azul: Polar, básico.

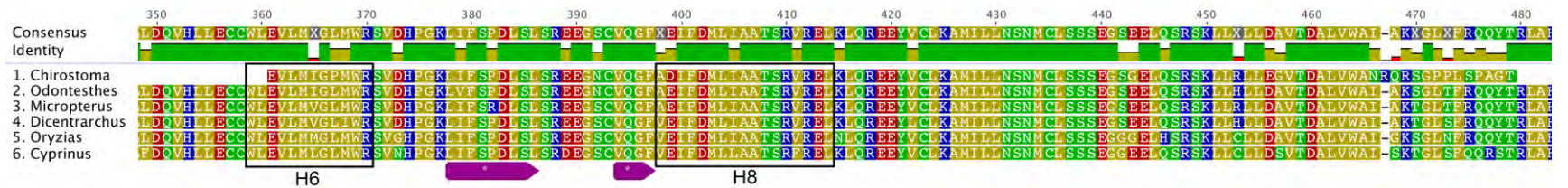


Fig 13. Domino de unión al ligando (LBD) de ER β en *C. humboldtianum*, alineándose a nivel de proteína con *O. bonariensis*, *M. salmoides*, *D. labrax*, *O. latipes* y *C. carpio*. Estructuralmente se indican las hélices 6 y 8, así como parte de la cavidad hidrofóbica (donde se asocia el ligando) con un asterisco. Los colores indican la polaridad de los aminoácidos, Amarillo: No polar. Verde: Polar, no cargado. Rojo: Polar, ácido. Azul: Polar, básico.

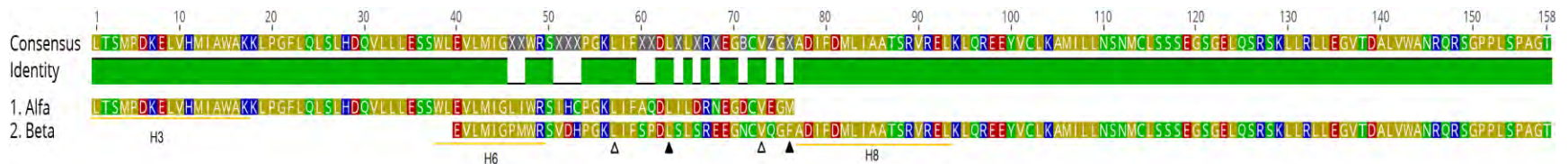


Fig 14. Comparación a nivel de aminoácidos entre los dominios de unión al ligando de ER α Y ER β en *C. humboldtianum*. Subrayado se muestran las hélices que los componen (H3-H8), con un triángulo blanco el inicio de las cavidades hidrofóbicas y con uno negro su final. Los colores indican la polaridad de los aminoácidos, Amarillo: No polar. Verde: Polar, no cargado. Rojo: Polar, ácido. Azul: Polar, básico. En la posiciones 46, 47, 51 y 76 hay un cambio de aminoácidos pero se mantiene la polaridad, sugiriendo un cambio de estructura pero no de función.

Los genes de ER se expresan en varios tejidos que se ven afectados por la acción de los estrógenos, pero aunque las estructuras de los ERs sean similares, cada subtipo tiene un patrón de expresión diferente (Mu *et al*, 2013) Este estudio no se enfocó en la distribución de los ERs pero si se puede afirmar que se encuentran ambos subtipos en el encéfalo de *C. humboldtianum*.

Las regiones específicas de distribución en el encéfalo de cada uno de los subtipos son variables; ER α es expresado en regiones neuroendócrinas, tales como, el área preóptica, hipotálamo, hipófisis, telencéfalo ventral, mientras que ER β está particularmente distribuido en los ventrículos del telencéfalo y diencefalo; dichas regiones están inmersas en funciones reproductivas (Coumilleau *et al*, 2015 y Strobl-Mazzulla *et al*, 2008). Ésta particular distribución puede variar de acuerdo a la especie; *Chalcalburnus tarichi* reporta una expresión sin aparente diferencia significativa entre ambos receptores en el hipotálamo (Unal *et al*, 2014), en *O. bonariensis* ER β se distribuye en la superficie del ventrículo del telencéfalo, área preóptica e hipotálamo (Strobl-Mazzulla *et al*, 2008) y en *S. schlegeli*, ER β es expresado en el área preóptica e hipotálamo (Mu *et al*, 2013).

La aromatasa es expresada en regiones inmersas en funciones reproductivas, por lo cual, existe una relación entre los esteroides sexuales y el cambio de actividad de la aromatasa. Los peces teleosteos son los únicos que poseen dos genes para aromatasa, uno de esos genes, *cyp19a1*, codifica para la aromatasa A, la cual se expresa en gónadas y la aromatasa B (*cyp19a1b*) es expresada en el cerebro y fuertemente regulada por el estradiol y los mecanismos de ER (Bondesson *et al*, 2014; Coumilleau *et al*, 2014; Pellegrini *et al*, 2005). Dicha relación se estableció ya hace tiempo, pero en el 2005, Pellegrini y colaboradores demostraron la existencia de un elemento de respuesta a estrógeno (ERE) localizado río arriba del sitio de inicio de la transcripción de *cyp19a1b*, necesario para la máxima regulación de la expresión de aromatasa mediada por estrógenos.

En *Danio rerio* (pez cebra) y en la mayoría de los peces, la actividad y la expresión de la aromatasa baja en el periodo embrionario y aumenta en el periodo de madurez sexual, correspondiendo a altos niveles de esteroides sexuales circundantes, como son el estradiol y la testosterona (Coumilleau *et al*, 2014), en las especies con determinación del sexo dependiente de la temperatura, la aromatasa se expresa mayormente en temperaturas que produzcan descendencia femenina (Bondesson *et al*, 2014).

Debido al papel que tiene el estradiol en la regulación del eje reproductivo, los ERs se expresan en otros tejidos, mostrando una distribución específica según la especie, por ejemplo, ER α es expresado en mayor medida en ovario e hígado para las especies *F. heteroclitus* y *C. carpio* (Cotter *et al*, 2015 y Katsu *et al*, 2011) mientras que para ER β , *S. aurata* muestra una expresión significativamente más alta en testículos y una moderada expresión en hígado (Socorro *et al*, 2000), al inicio del desarrollo del ovario de *S. Schlegeli* la expresión de ER β y ER γ aumentaron, así como el nivel de E₂ en plasma, señalando una acción conjunta para la maduración final del ovocito (Mu *et al*, 2013).

Debido a que el subtipo alfa es el predominante en el hígado, se cree que es el principal implicado en la vitelogénesis.

La reproducción exitosa en los vertebrados ovíparos necesita una serie de acontecimientos vitales que incluyen el suministro de nutrientes a los embriones en crecimiento. Este proceso implica la producción de vitelogenina (Vtg), sintetizada en el hígado en respuesta al estradiol y mediado por ER, dicho precursor de la yema es liberado al torrente salguíneo y subsecuentemente ingresado a los ovocitos (Dominguez *et al*, 2014). Dicha síntesis es en respuesta al estradiol y mediado por ER, pero se desconoce si uno de los subtipos de ER es el principal responsable de la regulación transcripcional (Sabo-Attwood *et al*, 2004).

En el hígado de *M. salmoides* se expresan tanto ER α como ER β , pero el único que cambia significativamente el nivel de expresión es el subtipo alfa. De Enero a Febrero se alcanzaron los niveles más altos de ER α mRNA (1.5x10⁶ copias), éste aumento se produjo en paralelo con Vtg 1 mRNA y niveles de E₂ en plasma (1.8x10⁸ copias y 2.000 pg/ml respectivamente), pero los niveles de ER β mRNA en hígado no aumentaron en proporción de E₂ y Vtg mRNA, observándose un leve aumento en otoño (Octubre) (Sabo-Attwood *et al*, 2004). A mediados de Septiembre los niveles de E₂ en hembras de *C. auratus* aumentan, activando los ER β , que actúan como reguladores de ER α para el aumento paulatino de vitelogenina. Dicha regulación de ER α subsecuentemente sensibiliza al hígado al estradiol y aumenta dramáticamente la vitelogénesis. Si la expresión de ER α se incrementa artificialmente por un tratamiento de estradiol, la vitelogénesis inducida por un segundo tratamiento de estradiol se ve bloqueada por un antagonista de ER α (Cotter *et al*, 2015). De acuerdo a lo anterior, los niveles de ER α a lo largo de la recrudescencia fluctuarán; siendo mayores en la mitad, correspondiendo al periodo de aumento de estradiol en la sangre y posiblemente ER β actúe como un sensor al estradiol, por lo tanto, los niveles de expresión

de ER α en hígado puede ser una señal para identificar la etapa en la que se encuentra el pez.

En *O. latipes* los niveles de inducción de Vtg por varios disruptores endócrinos (EDC) están correlacionados positivamente con la expresión de ER pero con diferencias en la respuesta, ER α y ER β respondieron tanto para bisfenol A (BPA), NP, o,p'-DDT, pero la sensibilidad (EC₅₀) de ER β fue menor en comparación con ER α , mientras que ER γ exhibió la respuesta más débil. También se ha encontrado diferencia entre especies; en carpas se puede inferir que su sensibilidad ante éstos compuestos es menor debido a su tolerancia en ambientes contaminados (Tohyama *et al*, 2015), pero la exposición a xenoestrógenos dio como resultado organismos intersexuales y un incremento de Vtg en plasma en machos de *M. Salmoides* (Dominguez *et al*, 2014)

Por medio de modelos de interacción y un métodos computacionales para estructuras en 3D, se reveló una fuerte relación entre la estructura de los EDC y el LBD de ER en *O. latipes*. Dos grupos hidroxilo del BPA forman un enlace de hidrógeno con ER α , mientras que NP tiene uno y o,p'-DDT posee ninguno, teniendo como consecuencia diferencias en la energía de interacción, siendo para ER α BPA < NP < o,p'-DDT. Los dos grupos fenoles del BPA posiblemente forman puentes de hidrógeno con E377/L290 con ER β y E355/G523 con ER γ . En las secuencias obtenidas de *C. humboldtianum*, para el subtipo alfa no se identificaron ninguno de los aminoácidos, pero para el subtipo beta se identificaron los aminoácidos E377/L290, cuya variable es la posición (E383/L398) (debido al alineamiento con otras especies); dicha relación nos permite inferir los efectos de los EDC en *C. humboldtianum*, donde, la energía de interacción entre BPA y ER β será mucho más baja que el subtipo alfa pero con consecuencias a nivel Vtg, neurogénesis y reproducción (Tohyama *et al*, 2015).

CONCLUSIÓN

Se aislaron, secuenciaron y clonaron por vez primera secuencias parciales de receptores a estrógeno subtipo alfa y beta en *C. humboldtianum*.

Se aisló una secuencia parcial (228 pb) del receptor a estrógeno subtipo alfa en encéfalo de *C. humboldtianum*, correspondiendo al dominio de unión al ligando (LBD).

Se aisló una secuencia parcial (359 pb) del receptor a estrógeno subtipo beta en encéfalo de *C. humboldtianum*, correspondiendo al dominio de unión al ligando (LBD).

REFERENCIAS

Barbour, C. (1973). A Biogeographical History of *Chirostoma* (Pisces: Atherinidae): A Species Flock from the Mexican Plateau. *Copeia*, 1973(3), p.533.

Bondesson, M., Hao, R., Lin, C., Williams, C. and Gustafsson, J. (2015). Estrogen receptor signaling during vertebrate development. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Gene Regulatory Mechanisms*, 1849(2), pp.142-151.

Chomczynski, P. and Sacchi, N. (1987). Single-step method of RNA isolation by acidguanidiniumthiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Analytical Biochemistry*, 162(1), pp.156-159.

Cotter, K., Yershov, A., Novillo, A. and Callard, G. (2013). Multiple structurally distinct ER α mRNA variants in zebrafish are differentially expressed by tissue type, stage of development and estrogen exposure. *General and Comparative Endocrinology*, 194, pp.217-229.

Cotter, K., Nacci, D., Champlin, D., Chuprin, J. and Callard, G. (2015). Cloning of multiple ER α mRNA variants in killifish (*Fundulus heteroclitus*), and differential expression by tissue type, stage of reproduction, and estrogen exposure in fish from polluted and unpolluted environments. *Aquatic Toxicology*, 159, pp.184-197.

Coumailleau, P., Pellegrini, E., Adrio, F., Diotel, N., Cano-Nicolau, J., Nasri, A., Vaillant, C. and Kah, O. (2015). Aromatase, estrogen receptors and brain development in fish and amphibians. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Gene Regulatory Mechanisms*, 1849(2), pp.152-162.

Dominguez, G. A., Bisesi, J., Kevin, J., Denslow, N. D., Sabo-Attwood, T. (2014). Control of Transcriptional Repression of the Vitellogenin Receptor Gene in Largemouth Bass (*Micropterus Salmoides*) by Select Estrogen Receptors Isotypes. *Toxicological Sciences* 141(2), pp. 423–431

Espinosa-Pérez, H, P., Fuentes-Mata, M. T, Gaspar-Dillanes, V. Arenas. (1993). Notes on Mexican Ichthyofauna. In: Ramammorthy, T., Lot, A., Bye R. Fa, J. (Eds). *Biology Diversity of Mexico: Origins and Distribution*. N. York. Oxford University Press. Pp. 229-251.

Halm, S., Martínez-Rodríguez, G., Rodríguez, L., Prat, F., Mylonas, C. C., Carrillo, M., Zanuy, S. (2004). Cloning, characterisation, and expression of three oestrogen receptors (ER α , ER β 1 Y ER β 2) in the European sea bass, *Dicentrarchus labrax*. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 223, pp. 63–75

Hawkins, M.B., Thomas, P. (2004). The unusual binding properties of the third distinct teleost estrogen receptor subtype ER α are accompanied by highly conserved amino acid changes in the ligand binding domain. *Endocrinology* 145, pp. 2968–2977.

Heldring, N., Pike, A., Andersson, S., Matthews, J., Cheng, G., Hart, J., Tujague, M., Ström, A., Treuter, E., Warner, M., Gustafsson, J. (2007). Estrogen Receptors: How do they signal and what are their targest. *Physiological Revivs*, 87, pp. 905-931.

Juárez-Robles, M. V. (2014). Distribución de la hormona del crecimiento (GH) en hipófisis de *Chirostoma humboldtianum*. TELEÓSTEOS. ATHERINOPSIDO. Tesis de Licenciatura para obtener el grado de biólogo. Universidad Nacional Autónoma de México. Facultad de Estudios Superiores Iztacala.

Macedo-Garzón, B. (2012). Aislamiento, secuenciación y clonación de pjGnRH en el charal (*Chirostoma humboldtianum*). Tesis de maestría para obtener el grado de maestra en ciencias biológicas. Universidad Nacional Autónoma de México, Facultad de Estudios Superiores Iztacala.

Marino, M., Galluzzo, P., Ascenzi, P. (2006). Estrogen signaling multiple pathways to impact gene transcription. *Current Genomics*, 7, pp.497-508.

Martínez Palacios, C., Ríos Durán, M., Campos Mendoza, A., Toledo Cuevas, E. and G. Ross, L. (2003). Desarrollo tecnológico alcanzado en el cultivo del pez blanco de Pátzcuaro. In: *Historia y avances del cultivo de pescado blanco.*, 1st ed. México: Instituto Nacional de Pesca, pp.169-184.

Menuet, A., Pellegrini, E., Anglade, I., Blaise, O., Laudet, V., Kah, O., Pakdel, F. (2002). Molecular Characterization of Three Estrogen Receptor Forms in Zebrafish: Binding Characteristics, Transactivation Properties, and Tissue Distributions. *Biology of Reproduction*, 66(6), pp.1881-1892.

Mu, W., Wen, H., Shi, D. and Yang, Y. (2013). Molecular cloning and expression analysis of estrogen receptor betas (ER β 1 and ER β 2) during gonad development in the Korean rockfish, *Sebastes schlegeli*. *Gene*, 523(1), pp.39-49.

Nelson, E. and Habibi, H. (2013). Estrogen receptor function and regulation in fish and other vertebrates. *General and Comparative Endocrinology*, 192, pp.15-24.

Pellegrini, E., Menuet, A., Lethimonier, C., Adrio, F., Gueguen, M., Tascon, C., Anglade, I., Pakde, F., Kah, O. (2005). Relationships between aromatase and estrogen receptors in the brain of teleost fish. *General and Comparative Endocrinology*, 142, pp. 60-66.

Rosas, M., M. (1970). Pescado blanco (*Chirostoma estor*). Su fomento y su cultivo en México. Serie divulgación. Inst. Nal. De Inv. Biol. Pesq. Secretaría de Industria y Comercio. México (2):79 pp

Sabo-Attwood, T., Kroll, K. and Denslow, N. (2004). Differential expression of largemouth bass (*Micropterus salmoides*) estrogen receptor isotypes alpha, beta, and gamma by estradiol. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 218(1-2), pp.107-118.

SAGARPA: Historia y avances del cultivo de pescado blanco. (2003). México: Instituto Nacional de la Pesca (SAGARPA), Dirección General de Investigación en Acuicultura.

Socorro, S., Power D. M., Olsson, P. E., Canario, V. M. (2000). Two estrogen receptors expressed in the teleost fish, *Sparus aurata*: cDNA cloning, characterization and tissue distribution. *Journal of Endocrinology*, 166(2), pp.293-306.

Strobl-Mazzulla, P., Lethimonier, C., Gueguen, M., Karube, M., Fernandino, J., Yoshizaki, G., Patiño, R., Strüssmann, C., Kah, O. and Somoza, G. (2008). Brain aromatase (Cyp19A2) and estrogen receptors, in larvae and adult pejerrey fish *Odontesthes bonariensis*: Neuroanatomical and functional relations. *General and Comparative Endocrinology*, 158(2), pp.191-201.

Suárez, N., V. (1997), Contribución al conocimiento de los hábitos alimentarios y nutricionales del *Chirostoma humboldtianum*, para la formulación de balanceados en su alimentación artificial. Tesis de Licenciatura, FES-Zaragoza, UNAM. México, 92 pp

Tohyama, S., Miyagawa, S., Lange, A., Ogino, Y., Mizutani, T., Tatarazako, N., Katsu, Y., Ihara, M., Tanaka, H., Ishibashi, H., Kobayashi, T., Tyler, C., Iguchi, T. (2015). Understanding the Molecular Basis for Differences in Responses of Fish Estrogen Receptor Subtypes to Environmental Estrogens. *Environmental Science Technology* (49), pp.7439–7447.

Tokarz, J., Möller, G., Hrabec de Angelis, M., Adamski, J. (2015). Steroids in teleost fishes: A functional point of view. *Steroids* 103, pp123-144.

Uribe Alcocer, M. and Díaz Jaimes, P. (2003). Análisis cariotípico de un pescado blanco y dos charales del género *Chirostoma* (Pisces: Atherinopsidae): evolución cariotípica en el orden Atheriniforme. In: *Historia y avances del cultivo de pescado blanco*, 1st ed. Mexico: Instituto Nacional de la Pesca, pp.79-88.

Unal, G., Marquez, E., Feld, M., Stavropoulos, P. and Callard, I. (2014). Isolation of estrogen receptor subtypes and vitellogenin genes: Expression in female *Chalcalburnus tarichi*. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology*, 172-173, pp.67-73.

Katsu, Y., Lange, A., Miyagawa, S., Urushitani, H., Tatarazako, N., Kawashima, Y., Tyler, C. and Iguchi, T. (2011). Cloning, expression and functional characterization of carp, *Cyprinus carpio*, estrogen receptors and their differential activations by estrogens. *J. Appl. Toxicol.*, 33(1), pp.41-49.

Kuiper, G; Enmark, E; Peltö-Huikko, M; Nilsson, S; Gustafsson, J. (1996). Cloning of a novel receptor expressed in rat prostate and ovary. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93, 5925-5930.

Woods, M., Kumar, A. and Barton, M. (2010). Nucleotide sequence, tissue expression patterns and phylogenetical analysis of estrogen receptor onemRNA in the Murray rainbowfish (*Melanotaenia fluviatilis*) (Atheriniformes, Actinopterygii). *General and Comparative Endocrinology*, 166(3), pp.529-536.