

Universidad de la República  
Facultad de Ciencias

**Tesina de Grado de Licenciatura en Bioquímica**

***GENES CORIÓNICOS EN AUSTROLEBIAS CHARRUA:  
IDENTIFICACIÓN Y ANÁLISIS DEL PATRÓN DE  
EXPRESIÓN***

***Nicolás G. Papa***

***Tutor: Mag. María José Arezo. Sección Biología Celular***

***Revisor: Dra. Cora Chalar. Sección Bioquímica***

Montevideo, Uruguay  
2011

# ÍNDICE

## INTRODUCCIÓN

Envoltura coriónica en peces teleósteos.....	1
Proteínas coriónicas.....	2
Dominio ZP.....	3
Genes coriónicos.....	4
Modelo biológico.....	5

OBJETIVOS.....	7
----------------	---

## MATERIALES Y MÉTODOS

Colecta y mantenimiento de los ejemplares adultos.....	8
Obtención y cultivo de embriones.....	8
Análisis moleculares	
1) Extracción de ARN.....	9
2) Estimación de la calidad y concentración del ARN obtenido...	9
3) Retrotranscripción. Síntesis de ADNc.....	11
4) Evaluación de la síntesis de ADNc.....	11
5) Amplificación <i>in vitro</i> de los genes de interés.....	12
6) Purificación de los productos obtenidos.....	13
7) Secuenciación y análisis preliminar.....	13
8) Clonado de los productos obtenidos	
a- Reacción de ligación.....	14
b- Competencia y transformación de las bacterias.....	15
c- Preservación de transformantes y purificación del plásmido.	16
d- Secuenciación y análisis de las secuencias.....	16

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

1) Valoración del ARN total.....	17
2) Evaluación del ADNc sintetizado.....	19
3) Amplificación <i>in vitro</i> de los genes de interés.....	20
4) Secuenciación directa de producto de amplificación.....	22
5) Análisis preliminar de la secuencia.....	22

6) Análisis comparativo entre las secuencias obtenidas	
6.1 Análisis de la secuencia nucleotídica.....	25
6.2 Análisis de la secuencia de proteína prospectiva.....	27
7) Análisis del patrón de expresión de la coriogenina L.....	28
Perspectivas.....	30
Referencias bibliográficas.....	31

## RESUMEN

La envoltura vitelina del ovocito de teleósteos, única cubierta ovular que interacciona con los espermatozoides, es una estructura compuesta por glicoproteínas, (coriogeninas, ZPs), cuya complejidad estructural y macromolecular varía con las especies. La comparación de las proteínas coriónicas con sus homólogas en otros vertebrados, ha mostrado semejanzas que sugieren la pertenencia a una familia proteica cuya función estructural se encuentra conservada. En lo que respecta al origen de estas glicoproteínas y los genes involucrados en su organización, se ha establecido que existen dos clases de genes originados por duplicación, los cuales se distinguen por su expresión en el ovario, en el hígado (regulada por estrógenos), o en ambos, dependiendo de las especies. Los genes coriónicos adquieren relevancia a nivel aplicado ya que existe información que señala al corion como un biomonitor muy sensible a la acción de contaminantes como los xenoestrógenos. En el marco de un proyecto cuyo objetivo es el análisis comparado de los genes coriónicos en teleósteos, nos encontramos caracterizando la expresión de estos genes en peces anuales del género *Austrolebias*. Los peces anuales (Cyprinodontiformes) representan un modelo especial por características únicas que los alejan de los modelos tradicionales. Habitando masas de aguas temporales, la supervivencia de las especies reside en los embriones, resistentes a la desecación, con un patrón atípico de desarrollo temprano y la capacidad de experimentar diapausas. En el presente trabajo se ha identificado, mediante RT-PCR, la expresión del gen coriogenina L en diferentes tejidos y estadios del desarrollo de *Austrolebias charrua*. Consiguiendo aislar el ADNc *achzp L*, siendo el hígado el órgano de expresión. El análisis comparativo del conjunto de secuencias presentes en el GenBank presentó la mayor identidad con el ARNm de Coriogenina L de *Kriptolebias marmoratus* (84%). A su vez presentó un 80 % de identidad con la zona radiata-3 de *Cyprinodon variegatus*, así como un 79% de identidad con la coriogenina L de *Fundulus heteroclitus*. Estas especies junto a *Austrolebias* pertenecen a un mismo orden, *Cyprinodontiformes*. Nos planteamos explorar si la expresión del gen identificado es regulado por estrógenos, en cuyo caso se estudiará su valor como biomonitor de contaminación.

## **INTRODUCCION**

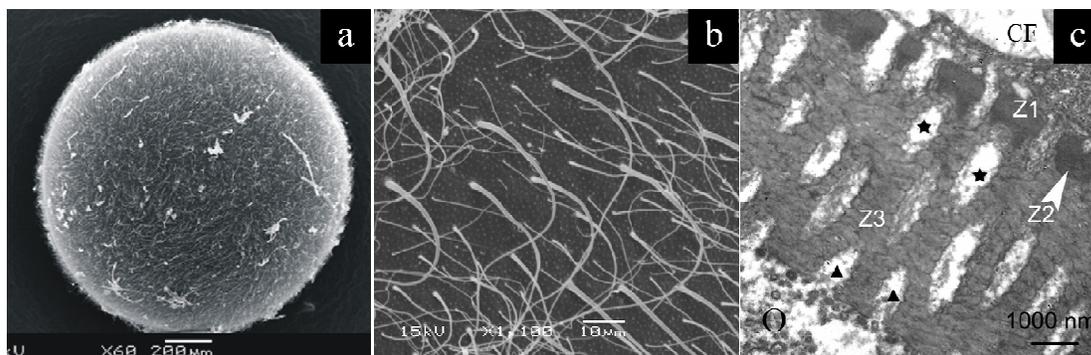
### **Envoltura coriónica en peces teleósteos**

Durante el proceso de formación de los gametos femeninos de vertebrados, se organiza en el ovocito una cubierta externa acelular denominada envoltura vitelina, corion o zona pelúcida, dependiendo del grupo zoológico. En los peces teleósteos ésta cubierta, está involucrada en varios roles durante la fecundación y el desarrollo temprano. Durante la fecundación podría participar en el reconocimiento especie-específico entre los ovocitos y los espermatozoides y la orientación de estos últimos al micrópilo. Su rol en el bloqueo de la poliespermia consistiría en reordenamientos estructurales de la cubierta coriónica luego de la liberación de los gránulos corticales (Dumont y Brummet, 1980; Kudo, 1980; Shibata y col. 2000). Durante el desarrollo embrionario protege al embrión y permite la difusión de gases y productos metabólicos de desecho (Iconomidou y col 2000). En algunos peces teleósteos se ha demostrado que el corion también tiene propiedades bactericidas y funguicidas (Kudo e Inoue, 1989; Kudo, 2000)

La formación de la envoltura vitelina en este grupo ocurre durante la ovogénesis en paralelo con la vitelogénesis. La ovogénesis se ha dividido en cinco etapas reconocibles principalmente por las características de los ovocitos: pre-vitelogénesis, vitelogénesis lipídica, vitelogénesis proteica, ovocito vitelogénico total y ovocito maduro (Selman y Wallace 1983; Berois y col, 2004). La deposición de la cubierta comienza durante la etapa de vitelogénesis lipídica, donde van depositándose en forma sucesiva y desde la superficie ovocitaria las diferentes capas en multímeros filamentosos hasta la etapa de ovocito vitelogénico total. Este proceso se ha seguido mediante microscopía electrónica de transmisión y de barrido documentando desde las etapas tempranas hasta que la cubierta coriónica adquiere una organización trilaminar. Estos arreglos son denominados zona radial externa, intermedia e interna, o Z1, Z2 y Z3 respectivamente (Fig. 1c). (Guraya, 1986, Arezo y col. 2007, Berois y col. 2007). A través de estas capas la membrana celular ovocitaria proyecta microvellosidades que se disponen en forma paralela con las microvellosidades originadas en las células foliculares (Fig. 1c) (Tesoriero, 1977; Wallace y Selman, 1981; Berois y col. 2007).

Las características ultraestructurales de la superficie coriónica de los ovocitos una vez ovulados pueden correlacionarse con su carácter de huevo pelágico o demersal (Isaac-

Nahum, 1988; Berois y col 2007, 2011). A su vez, se ha propuesto que estas características podrían ser útiles para inferir las relaciones filogenéticas entre teleósteos (Li, Wu y Yang, 2000; García y col. 2009) (Fig. 1 a y b)

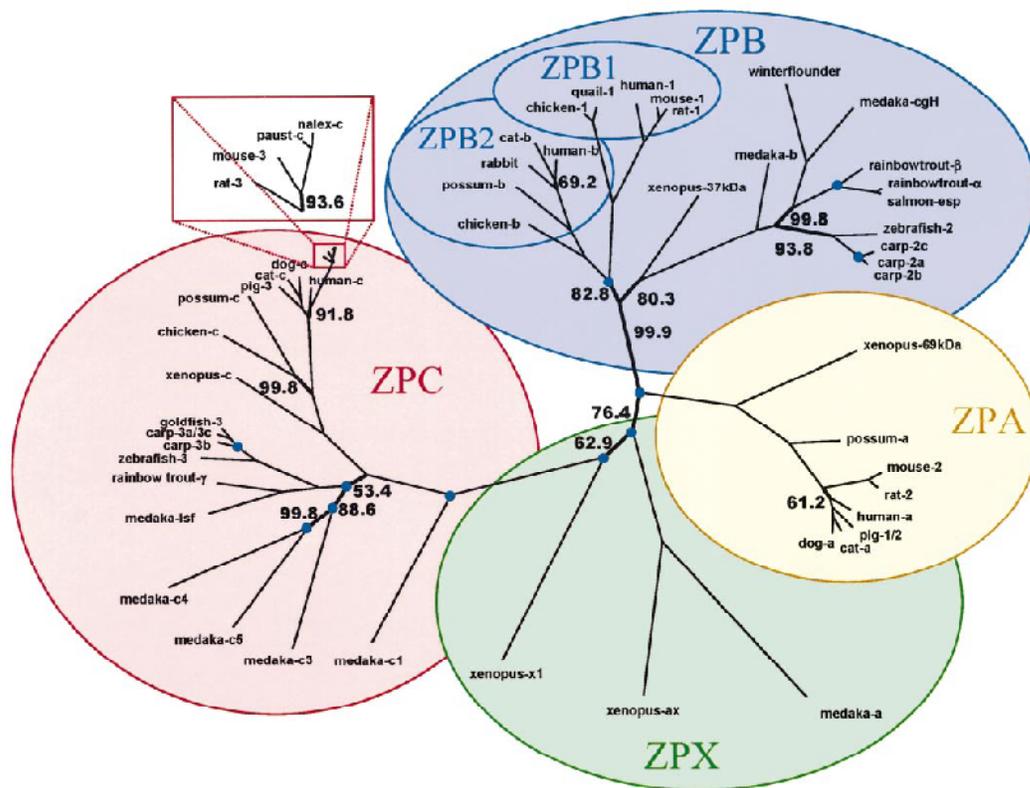


**Figura 1.** a. b. Superficie coriónica de un ovocito de *A. charrua* observada mediante microscopía electrónica de barrido. c. Microscopía electrónica de transmisión de envoltura coriónica de *A. charrua* mostrando sus tres capas: zona radiata externa (Z1), una zona intermedia (Z2) más electrondensa que la anterior, y una zona radiata interna heterogénea (Z3). Se observan también una célula folicular (CF), ovocito (O) microvelocidades ovocitarias (triángulos) y microvelocidades foliculares (estrellas)(adaptado de Arezo y col. 2004).

## Proteínas coriónicas

Diferentes estudios han comparado el perfil bioquímico de la cubierta coriónica de varias especies de teleósteos mostrando que la mayoría comparten un patrón similar de bandas de proteínas y glicoproteínas, con una complejidad estructural y macromolecular que varía con las especies (Spargo y Hope, 2003). Los componentes principales oscilan entre 40 y 130 kDa en sus pesos moleculares (Oppen-Berntsen y col. 1990; Hyllner y col. 1991; Scapigliati y col. 1994; Bonsignorio y col. 1996; Berois y col. 2007).

La comparación de las proteínas coriónicas con sus homólogos en otros vertebrados ha mostrado semejanzas que sugieren la pertenencia a una familia proteica cuya función estructural se encuentra altamente conservada. Su nomenclatura permanece ambigua: coriogeninas, ChP, proteínas zona pelúcida, ZP, proteínas de zona radiata, ZRP, o proteínas de envoltura vitelina VEP. Asimismo, es posible identificar cuatro grupos en vertebrados, todos ellos caracterizados por el dominio ZP: ZPA, ZPB, ZPC y ZPX. Las proteínas ZPB y ZPC se encuentran en todos los vertebrados, ZPX en *Xenopus* (anfibios), pollo y peces, en tanto que ZPA no se ha encontrado hasta ahora en peces (Fig. 2) (Hyllner y col. 2001; Listcher y Wassarman 2007; Spargo y Hope, 2003; Smith y col. 2005).



**Figura 2.** Árbol filogenético de la familia de genes ZP con subfamilias denominadas ZPA, ZPB, ZPC, y ZPX, identificando también los grupos ZPB1 y ZPB2 (Spargo y Hope 2003)

## Dominio ZP

El dominio ZP, presente en las proteínas de la envoltura vitelina en vertebrados, consiste en una secuencia de aproximadamente 260 aminoácidos que contiene 10 a 12 residuos conservados de cisteína, con la capacidad de formar puentes disulfuro intramoleculares (Darie y col. 2004).

El dominio ZP no se limita a proteínas de la envoltura coriónica sino que se ha identificado en cientos de proteínas extracelulares con funciones diversas en una amplia variedad de tejidos de mamíferos, anfibios, aves, peces, moscas, gusanos, moluscos y tunicados (Jovine y col. 2002, 2005). La mayoría de las proteínas que poseen un dominio ZP son proteínas modulares, con función de receptores y/o funciones mecánicas. El dominio ZP juega un papel importante en la polimerización de las glicoproteínas extracelulares ya que funciona como un "módulo de polimerización" (Jovine y col. 2002). Esto ocurre principalmente a través de su sub-dominio N-terminal, mientras que el sub-

dominio C- terminal sería responsable de regular dicha actividad determinando la formación de filamentos de homo o heteropolímeros (Jovine y col. 2005, 2006).

### **Genes coriónicos**

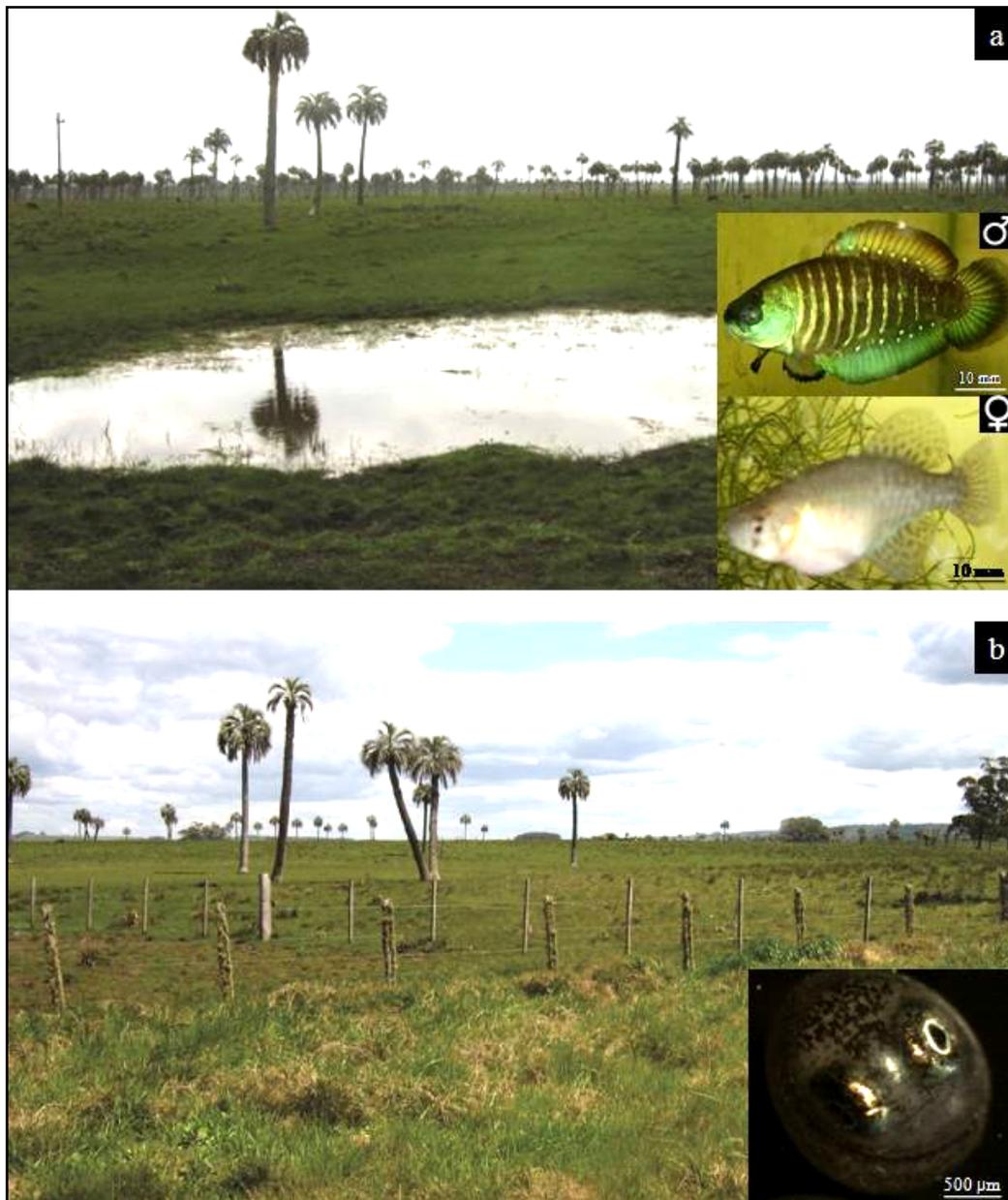
Con respecto al lugar de expresión de los genes coriónicos, a partir de datos ultraestructurales en el pez medaka (*Oryzias latipes*), se generalizó la idea que la cubierta era secretada por el ovocito (Tesoriero 1977, 1978). Posteriormente se demostró en la trucha arco iris (*Oncorhynchus mykiss*) que los genes correspondientes a estas proteínas se transcribían en el hígado bajo la acción de un estrógeno. Luego de otros trabajos se llegó entonces a otra generalización: que las proteínas coriónicas de los teleósteos, en especial las de la zona 3 (Z3)(Fig. 1c), que es la más compleja y la última en depositarse, eran sintetizadas en el hepatocito bajo la regulación del estradiol-17 $\beta$  y luego transportada por el torrente sanguíneo hasta el ovario (Oppen-Berntsen y col. 1992 a, b, Hyllner y Haux, 1992, Hyllner y col. 2001). Sin embargo, los análisis en otras especies: pipefish (*Syngnathus scovelli*), (Begovac y Wallace, 1989), carpa (*Cyprinus carpio*) (Chang y col. 1997) y pez cebra (*Danio rerio*)(Wang y Gong, 1999) demostraban que la síntesis de las coriogeninas tenía lugar en el ovario, por lo que no parecía haber solo un tipo celular responsable de la síntesis de estas proteínas reproductivas presente en los diferentes órdenes de teleósteos.

A partir de datos comparativos entre vertebrados actualmente se acepta que los genes involucrados en la organización de la cubierta vitelina tienen como condición ancestral la expresión en el ovario (Conner y Hughes, 2003). En los teleósteos existen dos clases de genes posiblemente originados por duplicación, los cuales se distinguen por su ulterior expresión en el ovario, en el hígado (regulada por estrógenos), o en ambos, dependiendo de las especies. Esta diferencia estaría relacionada con el patrón de evolución en las diferentes ramas de peces teleósteos (Conner y Hughes, 2003).

## Modelo biológico

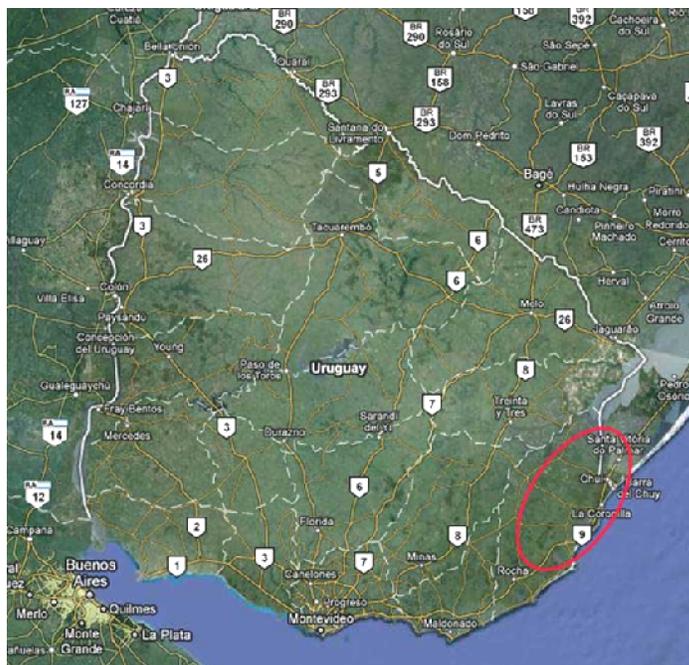
Los peces anuales (Serie *Atherinomorpha*, Orden *Cyprinodontiformes*), presentes en América del Sur y África, tienen un corto ciclo de vida. Los ejemplares juveniles y adultos habitan masas de aguas temporales que se secan totalmente en el verano con la consiguiente muerte de los ejemplares adultos. En el otoño siguiente, cuando las lluvias vuelven a llenar los charcos, los embriones resistentes a la desecación, eclosionan y comienza un nuevo ciclo (Fig. 3). La capacidad de supervivencia de las especies reside pues en los embriones los cuales tienen un patrón atípico de desarrollo temprano, caracterizado por presentar una fase de dispersión de blastómeras y posterior reagregación de éstas entre las etapas de blástula y gástrula. Además, poseen la capacidad de experimentar diapausas (detenciones reversibles en el desarrollo) en tres etapas diferentes: diapausa I (fase dispersa), diapausa II (embrión somático antes o después de la formación del tubo endocárdico) y diapausa III (embrión pre-eclosión) (Fig. 3b) (Wourms, 1964). Estas características, junto a otras derivadas de su ciclo de vida, imponen a los peces anuales como un modelo especial que los distinguen de los modelos tradicionales.

Dentro de los peces anuales de América del Sur se encuentra *Austrolebias charrua* (Costa & Cheffe 2001), de la familia *Rivulidae*. Es una especie endémica del Este de Uruguay y Sur de Brasil asociada a los "Baños del Este" (Fig. 4) que presenta una estrategia reproductiva que corresponde al gonocorismo diferenciado con un marcado dimorfismo sexual (caracteres sexuales secundarios tales como forma del cuerpo, coloración, patrón de bandas, diseño) (Vaz Ferreira y Sierra, 1973, Arezo y col. 2007) (Fig. 3a).



**Figura 3.** Ciclo del charco temporal, hábitat característico de peces anuales, Rocha, Uruguay. a) Charco inundado desde el otoño hasta el final de la primavera donde se reproducen los adultos. Se presentan macho y hembra de *Austrolebias charrua*.

b) Charco seco durante el verano, los embriones permanecen en el sustrato. Se presenta embrión de la misma especie en el estadio pre-eclosión.



**Figura 4.** Mapa de Uruguay destacando la zona de colecta de *Austrolebias charrua* (modificado de Google Earth 6).

## OBJETIVOS

La presente Tesina de grado de Licenciatura en Bioquímica se realizó dentro del grupo Biología del Desarrollo y Reproducción en peces, el cual aborda diferentes temas en el modelo peces anuales en el marco de un grupo multidisciplinario que agrupa investigadores de Genética, Zoología, Etología y Biología Celular. Las investigaciones realizadas han permitido conocer: 1) la biogeografía de las especies, 2) establecer el mantenimiento y reproducción de las mismas en condiciones de laboratorio (Apéndice II), 3) el cultivo estandarizado de embriones, 4) los estadios del desarrollo, 5) la estrategia reproductiva y el proceso de diferenciación sexual para especies del género (Arezo y col. 2005, 2007).

En este marco y contando con datos previos, desde la literatura, en una especie cercana a *Austrolebias charrua* (*O. latipes*), en la cual la cubierta coriónica consta de 3 proteínas: Coriogenina L (ZPC), Coriogenina H (ZPB), y Coriogenina H menor (ZPB) (Yu y col. 2006), que se expresan en el hígado en respuesta a los estrógenos (Murata y col. 1997); se plantea abordar la identificación de los genes que codifican para las proteínas coriónicas en el pez anual *Austrolebias charrua* y su patrón de expresión.

## **MATERIALES Y MÉTODOS**

### **Colecta y mantenimiento de los ejemplares adultos**

Peces adultos de *Austrolebias charrua* fueron colectados en charcos temporales del departamento de Rocha, Uruguay, entre los meses de mayo y agosto de 2009 (Fig. 3a y 4). Luego del transporte y adaptación a las condiciones de mantenimiento estandarizadas en el Acuario de Facultad de Ciencias (Apéndice II), se mantuvieron en peceras de 30 litros con agua de clorinada (pH 6.5-7), temperatura ambiente controlada a 19°C y fotoperíodo natural. Los peces se alimentaron diariamente con alimento vivo (*Tubifex sp.* y *Gammarus sp.*).

### **Obtención y cultivo de embriones**

La obtención de embriones se logró colocando a los adultos en parejas o tríos (1 macho y 2 hembras), en acuarios que contenían recipientes con turba Xaxim en el fondo mimetizando el ambiente natural en el cual estas especies, luego de un elaborado cortejo (García y col. 2004) se entierran en el sustrato para depositar sus huevos.

Los embriones de cada cruzamiento fueron colectados del recipiente utilizando una pipeta y se limpiaron por rodamiento sobre papel de filtro húmedo con agua de clorinada. Luego, fueron colocados en medio de cultivo (NaCl 7,5 g KCl 0,2 g; CaCl<sub>2</sub> 2H<sub>2</sub>O 0,3 g; pH 7,3 en 1L; Yamamoto 1967) en cámaras especialmente diseñadas (1,7 mm de profundidad fabricadas en portaobjetos con cinta aisladora) para su observación mediante un microscopio fotónico Olympus Vanox. Utilizando un cubreobjetos, apoyado sobre la superficie del corion (transparente) se realiza la rotación de los huevos para optimizar el análisis del estadio del desarrollo de los mismos. Los embriones seleccionados se clasificaron según Arezo y col. (2005) y se cultivaron en placas de *Petri*, en Yamamoto a 25 °C.

## **Análisis moleculares**

### **1) Extracción de ARN**

Se procedió a la eutanasia por inmersión en 2-fenoxietanol 5 ppm de dos ejemplares hembra de *Austrolebias charrua* adultos (protocolo habilitado por certificación de la Comisión Honoraria de Experimentación Animal, CHEA). Inmediatamente después de corroborar la muerte de los ejemplares se efectuó disección en condiciones libres de Ribonucleasas (ARNasas). Se retiró el hígado a cada ejemplar, así como los ovarios, para ser colocados inmediatamente en el reactivo comercial TRIZOL (Invitrogen) en una relación: 5 volúmenes de trizol / 1 volumen de tejido. La eutanasia de los alevines se realizó también por inmersión con el mismo anestésico pero usando 2 ppm, para luego ser sumergidos íntegros en TRIZOL, en la relación antes mencionada. Luego de seleccionar los estadíos de interés (Tabla. 1), se colocaron 8 embriones por tubo, utilizando 500 µL de TRIZOL. En todos los casos una vez homogeneizados, se incubaron 20 minutos a temperatura ambiente y almacenaron a -20°C hasta su utilización.

La extracción de ARN total de los tejidos, se realizó según las recomendaciones del fabricante. El material se descongeló a temperatura ambiente, se centrifugó a 10.000g y se homogeneizó nuevamente. Se agregó cloroformo (0,2ml por 1ml de TRIZOL) y se agitó durante 15 segundos. Se centrifugó a 12.000g, 15 minutos a 4°C para la separación de las fases. Se extrajo cuidadosamente la fase acuosa que contenía el ARN, a ésta se le agregó isopropanol (0,5ml por 1ml TRIZOL), 1 µL de Dextrano Sigma 20 µg/mL, (para optimizar la visualización del pellet) y se centrifugó a 12.000g, 10 minutos a 4°C. El pellet obtenido fue lavado con 1ml de etanol 75%, centrifugando a 12.000g, 5 minutos a 4°C y secado bajo lámpara incandescente. Finalmente el ARN fue resuspendido en agua Amresco libre de nucleasas a 55-60°C durante 10 minutos en bloque térmico.

### **2) Estimación de la calidad y concentración del ARN obtenido**

La integridad del ARN fue analizada mediante electroforesis en gel de agarosa al 1% y 1X del intercalante no mutagénico GelRed™ (Biotum/Nº de catálogo 41003), en solución tampón Tris-Acetato\_EDTA (TAE) 1X. Se cargaron 4 µl de muestra y 3 µl de tampón de carga específico para ARN, (Formamida 70%, Azul Bromofenol 0,1%). La corrida electroforética se realizó en TAE 1X a 90 V durante 20 minutos. Para la visualización de las muestras en el gel se utilizó transiluminador ultravioleta.

Las muestras procesadas fueron:

Muestras	TRIZOL ( $\mu\text{L}$ )	Cloroformo ( $\mu\text{L}$ )	Isopropanol ( $\mu\text{L}$ )	Vol. Final ( $\mu\text{L}$ )
Hígado de Hembra	800	160	400	30
Ovario	800	160	400	30
Alevín Hembra	800	160	400	30
Embriones Pre-eclosión	500	100	250	15
Embriones 1 mes Post-fecundación	500	100	250	15

**Tabla 1.** Muestras analizadas y volúmenes de sustancias utilizadas en la fijación y extracción de ARN

### Tratamiento con Desoxirribonucleasa

El ARN extraído de tejidos adultos y alevines enteros fue sometido a un tratamiento con la enzima Desoxirribonucleasa I (ADNasa I, Invitrogen /N° de catálogo 18068-015) para digerir posibles trazas de ADN genómico contaminante. Para ello se utilizaron entre 10 y 15  $\mu\text{L}$  de las muestras provenientes de la extracción de ARN previamente descrita, a los que se le agregó 2  $\mu\text{L}$  de la solución tampón 10X (200mM Tris-HCl pH8,4, 20mM  $\text{MgCl}_2$ , 500mM KCl), 1 $\mu\text{L}$  RNaseOUT (inhibidor de ARNasas Invitrogen/ N° de catálogo 10777-019), 2  $\mu\text{L}$  de enzima ADNasa I y agua Amresco libre de ARNasas hasta completar los 20  $\mu\text{L}$ . La mezcla de reacción se agitó suavemente y se incubó por 30 minutos a 37°C. Culminado este tiempo, para la precipitación del ARN se agregaron, 2  $\mu\text{L}$  de Cloruro de Litio 4M, 1  $\mu\text{L}$  de Dextrano Sigma 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$  y 44  $\mu\text{L}$  de etanol absoluto, para luego sumergir por 2 segundos el tubo Eppendorf en nitrógeno líquido, para acelerar la precipitación (adaptado de Ausubel y col, 1992). Luego se centrifugó a 4°C, 10.000g, por 30 minutos, se descartó el sobrenadante y lavó el pellet con 500  $\mu\text{L}$  de etanol 70%. Finalmente se centrifugó nuevamente 4°C y 10.000g, por 5 minutos, se descartó el sobrenadante, el pellet se secó bajo lámpara incandescente y se resuspendió como en el paso anterior (pag. 9). Luego de lo cual se evaluó la integridad del ARN nuevamente por electroforesis en las mismas condiciones detalladas previamente. La concentración de ARN se estimó según la correlación de absorción/emisión del ARN frente al marcador de pares de bases de ADN (Mass Ruler DNA ladder SM0403 Fermentas). Esta correlación se calculó previamente a partir de un índice obtenido comparando la absorción/emisión de las bandas de ARN ribosomales de cuatro muestras de ARN, de concentraciones conocidas y calculando la correspondencia con el valor de emisión de la banda de 500 pb del marcador

de pares de bases de ADN (Mass Ruler DNA ladder SM0403 Fermentas). El programa utilizado para esto fue ImageJ (Java Image, Abramoff, 2004; Rasband, 1997-2009). La foto empleada en estas mediciones corresponde a una electroforesis realizada en las mismas condiciones descritas.

Inicialmente el ARN se mantuvo a -20°C por un máximo cuatro días, para luego almacenarlo a -80°C que permite conservar al ARN por períodos prolongados.

### **3) Retrotranscripción. Síntesis de ADNc.**

Para la retrotranscripción se utilizó la enzima Superscript III Reverse transcriptase (Invitrogen/ N° catalogo 18080-044) siguiendo el protocolo recomendado por el fabricante. Se incubó durante 5 minutos a 65°C la mezcla de: ARN total (10pg a 5µg) con 1µl de oligo (dT)<sub>20</sub> 50 µM (Invitrogen/ N° catalogo 18418-020), 1µl de dNTPs 10 mM y agua Amresco libre de ARNasas hasta completar 13µl. Se colocó la mezcla 1 minuto en hielo, luego se adicionaron: 4µl de solución tampón 5X, 1µl DTT 0.1M, 1µl RNaseOUT (inhibidor de ARNasas Invitrogen/ N° de catálogo 10777-019), 1µl de enzima retrotranscriptasa. Por último la reacción se produjo en el termociclador a 50°C durante 1 hora y finalizó inactivando la enzima a 70°C durante 15 minutos. Para el proceso se utilizó un termociclador Multigene II, de Labnet International, Inc.

### **4) Evaluación de la síntesis de ADNc**

Se comprobó la síntesis del ADNc mediante la amplificación de un gen de expresión constitutiva, en este caso se realizó utilizando una pareja de oligonucleótidos específicos diseñados para el pez *Danio rerio* que amplifican una región codificante del gen de la β Actina, (número de acceso del GenBank AF057040, Barralo y col. 1999).

β-actina-RSA-1: 5' GCCGGTTTTGCTGGAGATGAT 3' Tm: 70 °C

β-actina-RSA-2: 5' ATGGCAGGGGTGTTGAAGGTC 3' Tm: 70 °C

Las reacciones se llevaron a cabo en Termociclador Multigene II (Labnet), bajo las condiciones de amplificación que se detallan a continuación: 3 minutos de desnaturalización inicial a 94°C, seguido de 32 ciclos de: 30 segundos de desnaturalización a 94°C, 30 segundos de hibridación a 55°C y 1 minuto de extensión a 72°C. Luego una

extensión final de 7 minutos a 72°C. La mezcla de reacción se realizó agregando a cada tubo 9,9 µl de agua Amresco, 1,5 µl de tampón 10X, 0,6 µl de Cloruro de Magnesio (50 mM) , 0,3 µl de dNTPs (10 mM), 0,5 µl de cada oligonucleótido (10 µM) y 0,2 µl de enzima Taq DNA polimerase 5U/ µl (Invitrogen/Nº de catalogo11615010). Al final se agregó 1,5 µl de cada ADN copia a evaluar. Se preparó un control negativo de la reacción para descartar posibles contaminantes en los reactivos utilizados que contenía la mezcla de reacción y 1,5 µl de agua Amresco sustituyendo el ADNc. El volumen final de reacción fue de 15 µl.

Los productos de las reacciones de amplificación se analizaron en geles de agarosa Biotools al 1%, en TAE 1X, a 80 V durante 30 minutos. La visualización se realizó mediante el agente intercalante GelRed™ 1X (Biotum/Nº de catálogo 41003) en transiluminador ultravioleta, tomándose registro fotográfico.

Para la confirmación de que los productos obtenidos a partir de las reacciones de amplificación corresponden a la actina beta de *A. charrua* se realizó el recorte de las bandas del gel de agarosa con pipetas Pasteur estériles usadas como sacabocado. Luego se purificaron mediante el kit GFX PCR DNA Gel Band purification kit (G. Electric) según las especificaciones del fabricante. Los productos purificados fueron secuenciados en el Servicio de Secuenciación del Instituto Pasteur de Montevideo (secuenciador automático ABI3130 Applied Biosystems). Las secuencias obtenidas fueron analizadas mediante el programa BLAST 2.2.22 (Altschul y col.1990)

## 5) Amplificación *in vitro* de los genes de interés

El ensayo de amplificación de los genes de coriogeninas se realizó mediante el uso de oligonucleótidos degenerados diseñados por Yu y col. (2006) para *Oryzias latipes*:

*ChgI-F*: 5'GCT CAC CTG GAA RTA YCC 3' Tm: 52,9 °C

*ChgI-R*: 5'AGC ACY TGA GCM RCA GGR TCY TC 3' Tm: 62,1 °C

Las equivalencias para degeneramiento son  $M=AC$ ,  $R=AG$  e  $Y=CT$

Las reacciones se llevaron a cabo en Termociclador Multigene II, bajo condiciones de amplificación similares a las del punto previo, en que la mezcla de reacción también se realizó agregando a cada tubo 9,9 µl de agua Amresco, 1,5 µl de tampón 10X, 0,6 µl de Cloruro de Magnesio (50 mM) , 0,3 µl de dNTPs (10 mM), 0,5 µl de cada oligonucleótido (10 µM) y 0,2 µl de enzima Taq DNA polimerasa 5U/ µl (Invitrogen/Nº de

catalogo11615010), incorporando al final 1,5 µl de cada ADN copia a evaluar. Asimismo se preparó un control negativo de la reacción para descartar posibles contaminantes en los reactivos utilizados, conteniendo la mezcla de reacción y 1,5 µl de agua Amresco sustituyendo el ADNc. El volumen final de reacción fue de 15 µl. El programa en que se realizó la amplificación fue de 3 minutos de desnaturalización inicial a 94°C, seguido de 32 ciclos de 30 segundos de desnaturalización a 94°C, 45 segundos de hibridación a 52°C y 1 minuto de extensión a 72°C. Finalizando con una extensión de 10 minutos a 72°C.

Para el caso de la amplificación de los ADNc de hígado de hembra adulta y de ovario adulto se realizaron duplicados con tejidos de la otra hembra, que al coincidir con los presentados, no se muestran.

Los productos de las reacciones de amplificación se analizaron en geles de Agarosa Biotools al 1,5%, en TAE 1X, a 80 V durante 30 minutos. La visualización se realizó mediante el agente intercalante GelRed™ 1X (Biotum/Nº de catálogo 41003) en transiluminador ultravioleta, tomándose registro fotográfico.

## **6) Purificación de los productos obtenidos**

Se realizó la amplificación por triplicado de aquellas muestras en las que se obtuvieron las bandas de interés y se sometieron a electroforesis en las condiciones antes mencionadas. Se recortaron con pipetas Pasteur estériles usadas como sacabocado, para luego ser purificadas usando el kit de purificación GFX PCR DNA Gel Band purification kit (G. Electric) según las especificaciones del fabricante.

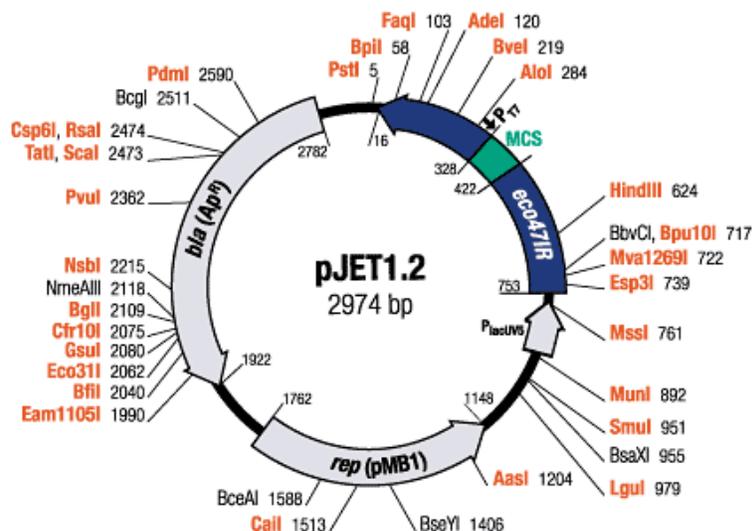
## **7) Secuenciación y análisis preliminar**

Los productos de amplificación purificados se enviaron a secuenciar utilizando ambos oligonucleótidos, ChgL-F y ChgL-R, al Servicio de Secuenciación del Instituto Pasteur de Montevideo (secuenciador automático ABI3130 Applied Biosystems). Las secuencias obtenidas fueron editadas manualmente según el cromatograma, utilizando el programa FinchTV (<http://www.geospiza.com/Products/finchtv.shtml>). Para la búsqueda de homologías se rastrearon las bases de datos disponibles en <http://www.ncbi.nih.gov/guide/sequence-analysis/> mediante el programa BLAST 2.2.22 (Altschul y col.1990). Posteriormente se realizó un análisis comparativo del conjunto de secuencias usando el método de múltiples alineamientos CLUSTALW del programa MEGA 4.0 (Tamura y col. 2007)

## 8) Clonado de los productos obtenidos

### a- Reacción de ligación

Para la ligación se utilizó el kit de clonación pJET 1.2 de Fermentas (<http://www.fermentas.com/en/support/technical-reference/phage-plasmid-dna/pjet12>) según las instrucciones del fabricante en productos de amplificación con extremos pegajosos, para eliminar el poliA agregado por la Taq polimerasa. En este paso se agregó en un tubo Eppendorf estéril: 2 µl de agua destilada, 10 µl de Tampón 2X, 5 µl del producto purificado y 1 µl de enzima DNA Blunting (Fermentas), se mezcló por vortex y luego de una centrifugación de 10 segundos se incubó por 5 minutos a 70°C. Concluido este tiempo se colocó en hielo durante 1 minuto y se agregó 1 µl de vector de clonación pJET 1.2 (Fig. 5) y 1 µl de la enzima T4 DNA Ligase (Promega). Nuevamente se mezcló por vortex y se centrifugó, 10 segundos y se incubó 90 minutos a temperatura ambiente de 24°C. Antes del siguiente paso se incubó 15 minutos a 70°C con el objetivo de inactivar la Ligasa para optimizar el porcentaje de transformación (Michelsen ,1995).



**Figura 5.** Mapa del plásmido pJET 1.2 (Fermentas). El tamaño del plásmido es 2974 pares de bases (pb) indicado en el centro de la figura. El mapa de restricción muestra la ubicación de la secuencia de replicación (*rep*), del gen de resistencia a ampicilina (*bla*), promotor de la ARN polimerasa T7 y los sitios de reconocimiento para endonucleasas de restricción. Posee a su vez el gen que codifica para la endonucleasa de restricción Eco47I que en ausencia de metilaciones específicas, la endonucleasa es letal para las células huésped *E. coli*, este sistema de selección positiva se inactiva al lograr la inserción del fragmento de ADN de interés en el sitio MCS. (<http://www.fermentas.com/en/support/technical-reference/phage-plasmid-dna/pjet12>)

## **b- Competencia y transformación de las bacterias**

Bacterias de la cepa JM107 (Promega) de *E. coli* congeladas a  $-80^{\circ}\text{C}$  en LB líquido con 20% de glicerol, se descongelaron paulatinamente durante 15 o 20 minutos en hielo. Luego, en condiciones de esterilidad, se realizó una estría con un ansa en una placa de LB-Agar (Apéndice I) previamente seca y rotulada. Se dejó en crecimiento, al menos 12 horas, en una estufa a  $37^{\circ}\text{C}$  con el medio hacia arriba.

Las bacterias de la cepa JM107 se hicieron competentes químicamente utilizando el kit TransformAid de Fermentas, (adaptado de las recomendaciones del fabricante). Mediante un ansa previamente flambeada se inocularon dichas bacterias en 1,5 ml de Medio C estéril (TransformAid Fermentas), y se incubaron en un baño orbital a  $37^{\circ}\text{C}$  durante 3 horas. Posteriormente en la zona estéril se transfirió 1,5 mL del medio de cultivo a un tubo Eppendorf y se centrifugó a  $10.000g$  durante 1 minuto a temperatura ambiente. Se descartó el sobrenadante y se resuspendió suavemente el pellet de bacterias en  $300\ \mu\text{l}$  de solución T recién preparada ( $250\ \mu\text{l}$  de solución T A y  $250\ \mu\text{l}$  de solución T B) y se incubó en hielo 5 minutos. Se centrifugó nuevamente 1 minuto en las mismas condiciones, se descartó el sobrenadante y resuspendió el pellet suavemente en  $120\ \mu\text{l}$  de Solución T, se colocó en hielo inmediatamente y se mantuvo durante 5 minutos, adquiriendo la competencia (capacidad de incorporar un plásmido).

La transformación se llevó a cabo transfiriendo  $5\ \mu\text{l}$  del producto de ligación a un tubo Eppendorf de 1,5 ml que permaneció en hielo por lo menos 2 minutos antes de agregarle  $50\ \mu\text{l}$  de las bacterias competentes, e incubando 5 minutos en hielo.

Para la selección de transformantes se sembraron 2 placas de LB-Agar con ampicilina (Apéndice I), secas y precalentadas, colocando  $27,5\ \mu\text{l}$  de la mezcla de transformación distribuida uniformemente con rastrillo de vidrio previamente flambeado y enfriado. Las placas se incubaron 16hs a  $37^{\circ}\text{C}$ .

Se seleccionaron en total ocho colonias entre ambas placas de transformación de las cuales se hicieron estrías mediante un ansa fina de platino en 2 placas LB-agar/ampicilina. Las colonias se denominaron secuencialmente de L1 a L8. Las placas se incubaron a  $37^{\circ}\text{C}$  durante 11hs. De cada estría se seleccionó una colonia aislada la cual se inoculó en 3 ml de medio LB líquido con  $3\ \mu\text{l}$  de ampicilina ( $100\text{mg/ml}$ ) (Apéndice I). Se incubaron 12 horas a  $37^{\circ}\text{C}$  en agitación continua. A su vez, esas mismas colonias se transfirieron a una placa LB agar ampicilina con divisiones para mantenerlas aisladas y se incubaron en la estufa a  $37^{\circ}\text{C}$  durante 12 horas.

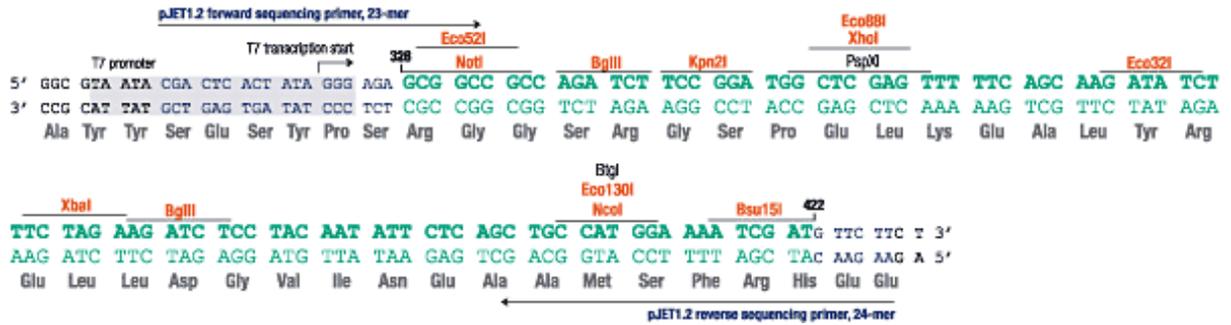
### **c- Preservación de transformantes y purificación del plásmido**

Luego de transcurridas las 12 horas, se transfirieron 800 µl del cultivo líquido a tubos Eppendorf de 1,5 ml estériles previamente rotulados, con 250µl de Glicerol (Sigma) autoclavado usado como criopreservador, se mezcló suavemente y se dividió en 2 tubos por partes iguales, se mantuvieron en hielo 10 minutos y se almacenaron a -20°C para su conservación.

Los 2,2 ml restantes del cultivo líquido se centrifugaron a 10.000g 2 minutos a temperatura ambiente y se descartó el sobrenadante. La purificación de los plásmidos se realizó según el método de lisis alcalina (adaptación de Sambrook y col. 1989 pag. 1.31). El mismo consiste en resuspender el pellet en 100 µl de Solución I (Apéndice I), mezclar por vortex, agregar 200µl de Solución II recién preparada (Apéndice I), invertir 5 veces cada tubo y colocar en hielo. Luego en frío se agregaron 150µl de Solución III fría (Apéndice I) se invirtió 10 segundos y se incubó en hielo entre 3 y 5 minutos. Las muestras se centrifugaron 5 minutos a 10.000g y se transfirió el sobrenadante a otro tubo (aproximadamente 400µl). Se agregó 1µl de ARNasa (10mg/ml) e incubó 30 minutos a 37°C en bloque térmico. Se agregó 1µl de Dextrano Sigma 20µg/mL y 800µl de etanol absoluto, se mezcló y se precipitó el ADN plasmídico durante 5 minutos a temperatura ambiente. Posteriormente se centrifugó 5 minutos a 10.000g, se descartó el sobrenadante y el pellet se lavó 2 veces con 1 ml de etanol 70% cada vez. Se centrifugó a 10.000g y se descartaron nuevamente los sobrenadantes. Se secaron los pellets bajo lámpara incandescente, para luego resuspenderlos en 40µl de agua Amresco inicialmente por pipeteo y luego incubando a 60°C 15 minutos. La estimación de la concentración de los productos obtenidos se realizó por electroforesis en geles de Agarosa Biotools al 1%, en TAE 1X, a 80 V 45 minutos visualizados con GelRed™ 1X (Biotum/Nº de catálogo 41003) en transiluminador ultravioleta, tomándose registro fotográfico.

### **d- Secuenciación y análisis de las secuencias**

Los plásmidos purificados se enviaron a secuenciar utilizando ambos oligonucleótidos del vector (pJET1.2 forward y pJET1.2 Reverse) suministrados en el kit de clonación antes mencionado, al Servicio de Secuenciación del Instituto Pasteur de Montevideo (secuenciador automático, ABI3130 Applied Biosystems).



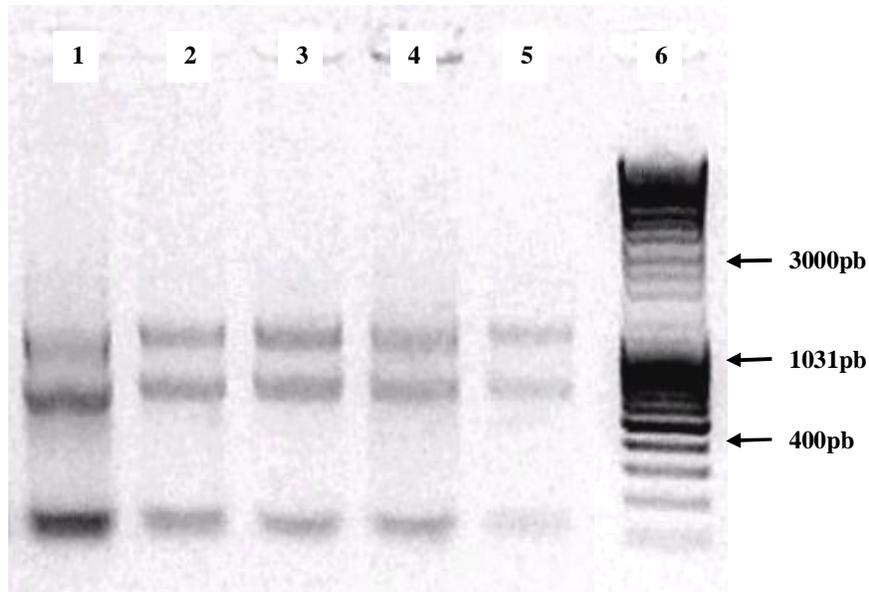
**Figura 6.** Segmento de secuencia del plásmido pJET 1.2 en el que aparecen las secuencias de reconocimiento de endonucleasas de restricción y de los oligonucleótidos de secuenciación pJET1.2 forward y pJET 1.2 reverse, así como el promotor de la ARN polimerasa T7.

Las secuencias obtenidas fueron analizadas en el programa Sequencher 4.10.1 ([www.genecodes.com](http://www.genecodes.com)), para eliminar la secuencia perteneciente al vector (Fig. 6) y ensamblar el clon. Una vez obtenidos los clones, se rastrearon las bases de datos disponibles en <http://www.ncbi.nih.gov/guide/sequence-analysis/> utilizando el programa BLAST 2.2.22 (Altschul y col.1990) para la búsqueda de homología. Se realizó un análisis comparativo del conjunto de secuencias obtenidas mediante clonación, secuenciación directa de los productos de amplificación y secuencias obtenidas del GenBank, usando el método de múltiples alineamientos del programa Clustal W (MEGA 4.0) (Tamura y col. 2007).

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 1) Valoración del ARN total

La integridad de los ARNs totales obtenidos se evaluó mediante la electroforesis de las muestras en geles de agarosa (Fig. 7) y la concentración de las mismas se estimó (Tabla 2) mediante la correlación de absorción/emisión del ARN con respecto al marcador de pares de bases de ADN (Mat. y Met. pag 10-11), utilizando el programa Image J (Java Image, Abramoff, 2004, Rasband, 1997-2009).



**Figura 7. Electroforesis de los ARNs totales obtenidos de *A. charrua***  
 1- Hígado de hembra adulta; 2- Ovario adulto; 3- Alevín hembra;  
 4- Embriones Pre-eclosión; 5- Embriones un mes post-fecundación;  
 6- Marcador pb (Mass Ruler DNA Ladder, Fermentas)

ARN	Concentración (ng/μl)
Hígado de hembra adulta	194
Ovario adulto	105
Alevín hembra	142
Embriones pre-eclosión	126
Embriones un mes post fecundación	58

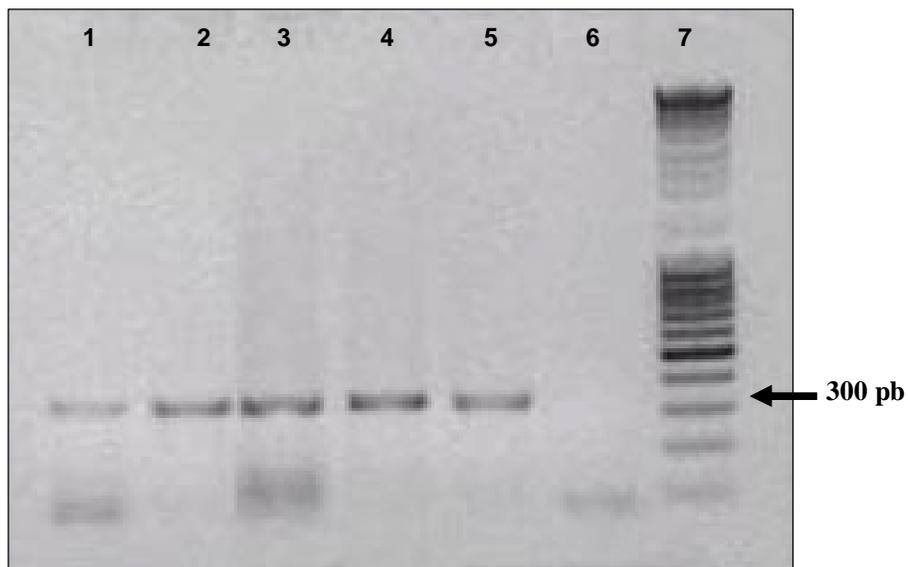
**Tabla 2.** Estimaciones de la concentración de los ARNs obtenidos.

A partir de la imagen obtenida podemos concluir que los ARNs presentaron una destacable integridad, sin mostrar indicios de degradación. Esta integridad se aprecia claramente en todas las muestras donde se observan dos bandas ubicadas a los 1250 pb y 700 pb (respecto al marcador de pares de bases de ADN), correspondientes a los ARN ribosomales 28S (4718 nt) y 18S (1874 nt) respectivamente. La banda inferior corresponde a los ARN de transferencia (entre 65 y 110nt). También puede observarse un sombreado por debajo de las bandas de ARN 28S y 18S perteneciente a los ARN mensajeros. Este resultado permite la utilización de los ARNs aislados como molde para la Retrotranscripción.

## 2) Evaluación del ADNc sintetizado

Para verificar la síntesis de ADNc se realizó una amplificación de un fragmento del gen de la actina beta, utilizando oligonucleótidos diseñados para el ADNc de esta proteína en *Danio rerio*. El análisis mediante electroforesis reveló la amplificación de una banda de aproximadamente 300 pares de bases para todos los ADNc sintetizados (Fig. 8). Estos resultados concuerdan con los descritos para la actina beta de *D. rerio* (banda de 340pares de bases) (Barralo y col. 1999)

La ausencia de bandas en el carril 6 (control negativo de la reacción) permitió concluir que los productos de amplificación obtenidos no provienen de posibles contaminantes de los reactivos utilizados. A su vez, este experimento confirmó que los ADNc obtenidos no presentaban contaminación con ADN genómico (ausencia de una banda de aproximadamente 500 pares de bases).



**Figura 8. Electroforesis de los productos de amplificación utilizando los oligonucleótidos de actina.** Resultados de amplificación usando ADNc de: 1- Hígado de hembra adulta; 2- Ovario adulto; 3- Alevín hembra; 4- Embriones Pre-eclosión; 5- Embriones un mes post-fecundación; 6- Control negativo de la reacción; 7- Marcador pb (Mass Ruler DNA Ladder Fermentas)

### Verificación de la identidad de la banda amplificada en *Austrolebias charrua*

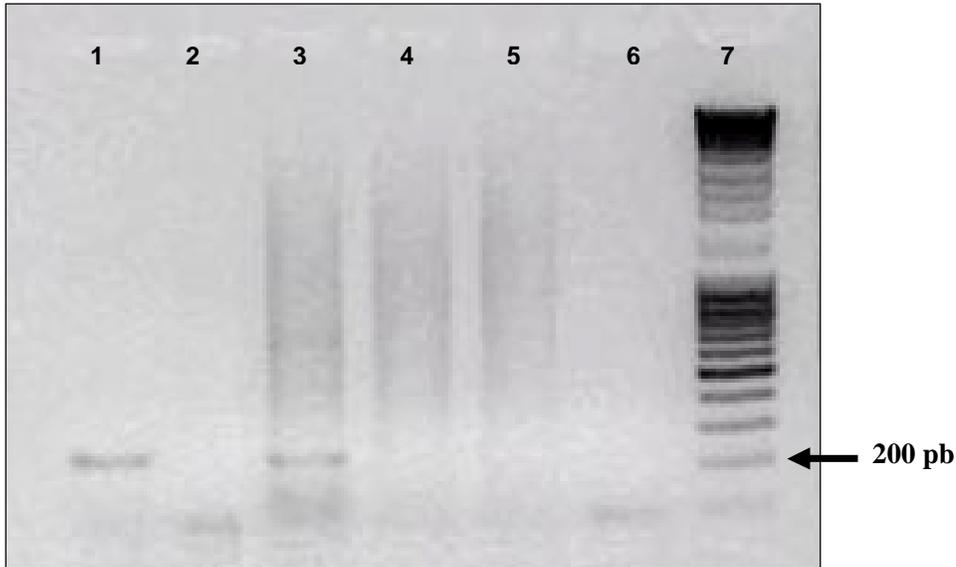
La banda obtenida a partir ADNc de embriones pre-eclosión, se purificó, se secuenció (Fig. 9) y se realizó la búsqueda de homologías de secuencias aminoacídicas deducidas utilizando el programa BLAST 2.2.22 (Altschul y col.1990). El análisis comparativo del conjunto de secuencias presentes en el GenBank mostró homologías entre un 85 y 89 % de identidad con secuencias de actina beta de peces de diversos órdenes, dentro de los que encontramos géneros como *Monopterus*, *Oreochromis*, *Cobitis*, *Perca*, *Tetraodon*, entre otros. El elevado nivel de homología observado entre la secuencia deducida y la actina beta de peces de diferentes órdenes permite confirmar que la banda obtenida en *A. charrua* corresponde al transcripto que codifica a esta proteína. Asimismo, este resultado permite validar este ensayo para la evaluación del ADNc sintetizado a partir de ARN de *A. charrua*.

```
ATGGGGTATTTAANGGTNAGGATTCGCCCTTTGCTCTGTGCCTCATCACAACA  
TANCTGTCCTTCTGGCCCATCCCAACCATTACACCCTGATGCCTGGGACGGCCA  
ACAATGGAAGGAAAGACACNACGTGGAGCATCATCTCCAGCAAAACCG
```

**Figura 9.** Secuencia obtenida a partir de la amplificación de ADNc de embriones de *A. charrua* con oligonucleótidos de actina beta de *D. rerio*.

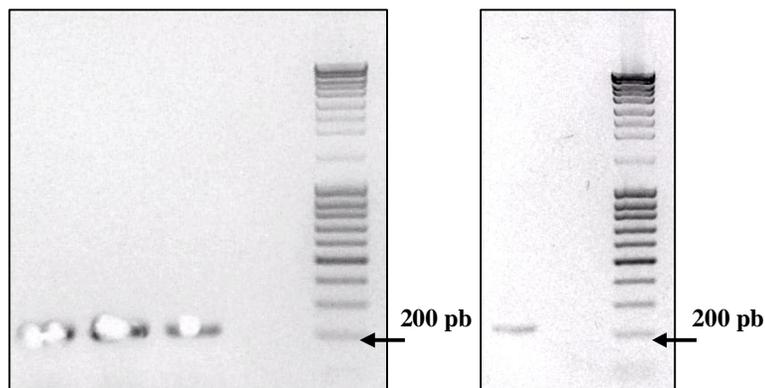
### 3) Amplificación *in vitro* de los genes de interés

Luego de comprobada la calidad del ADNc de hígado de hembra adulta, ovario adulto, alevín hembra, embriones pre-eclosión y de un mes post-fecundación, se realizaron los ensayos de amplificación con los oligonucleótidos degenerados ChgL-F y ChgL-R (Yu y col. 2006) El análisis del registro fotográfico de la electroforesis (Fig. 10), revela la amplificación de una banda de aproximadamente 200 pares de bases en las muestras correspondientes a ADNc de hígado de hembra adulta y a ADNc de alevín hembra. En el carril 6 correspondiente al control negativo solo se evidencian los oligonucleótidos.



**Figura 10.** Resultados de amplificación usando los oligonucleótidos degenerados ChgL-F y ChgL y ADNc de: 1- Hígado de hembra adulta; 2- ovario adulto; 3- Alevín hembra; 4- Embriones pre-eclosión; 5- Embriones un mes post-fecundación; 6-Control negativo de la reacción. 7- Marcador pb (Mass Ruler DNA Ladder Fermentas)

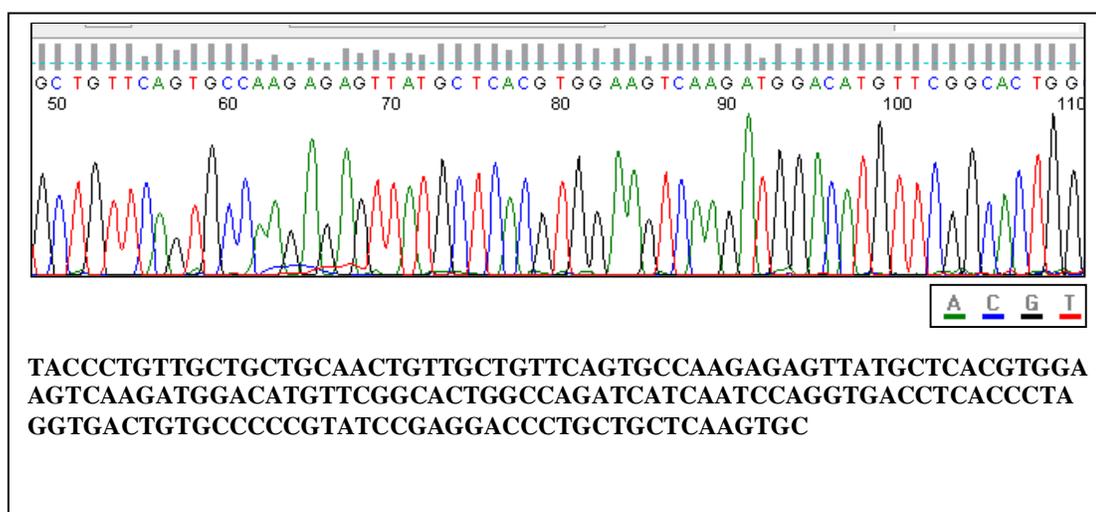
Una vez repetido y confirmado el resultado, los productos se sometieron a electroforesis en idénticas condiciones para el recorte de la banda obtenida a partir del ADNc de hígado de hembra adulta (Fig. 11 a). Luego de la elución de la banda, se corroboró la presencia de ésta, a la altura esperada (Fig. 11 b). La concentración de la misma fue de 6,7 ng/  $\mu$ l, calculada mediante el programa ImageJ (Java Image, Abramoff, 2004; Rasband, 1997-2009).



**Figura 11.** a. Zona donde se efectuó el recorte de la banda de amplificación obtenida a partir de ADNc de hígado de hembra adulta. b. Banda eluída

#### 4) Secuenciación directa de producto de amplificación

El producto de amplificación purificado se envió al servicio de secuenciación del Institut Pasteur de Montevideo y la secuencia obtenida se editó con el programa FinchTV (<http://www.geospiza.com/Products/finchtv.shtml>) (Fig. 12 a y b)



**Figura 12. a.** Cromatograma de la secuencia obtenida a partir de la amplificación de ADNc de hígado de hembra adulta con los oligonucleótidos ChgL F y ChgL R. **b.** Secuencia resultante.

#### 5) Análisis preliminar de la secuencia

La secuencia obtenida se sometió a la función **blastn** del programa BLAST 2.2.22 (Altschul y col.1990). El análisis comparativo del conjunto de secuencias presentes en el GenBank presentó la mayor identidad con el ARNm de Coriogenina L de *Kriptolebias marmoratus* (84%). A su vez presentó un 80 % de identidad con la zona radiata-3 de *Cyprinodon variegatus* y Coriogenina L de *Liza haematocheila*, así como un 79% de identidad con la coriogenina L de *Fundulus heteroclitus* y de *Tetraodon nigroviridis* (Fig. 13).

Dada la similitud de la secuencia obtenida con varias secuencias de proteínas coriónicas, especialmente coriogenina L de diferentes especies, se denominará al

fragmento de secuencia obtenido como *achzpL h* (*ach*= *Austrolebias charrua*; *zp*=zona pelúcida; *h*= *hembra*).

```

>[gb|EU867503.1] Kryptolebias marmoratus choriogenin L mRNA, complete cds
Length=1433

Score = 174 bits (192), Expect = 1e-40
Identities = 134/159 (85%), Gaps = 0/159 (0%)
Strand=Plus/Plus

Query 1      TACCCTGTTGCTGCTGCAACTGTTGCTGTTTCAGTGCCAAGAGAGTTATGCTCACGTGGAA 60
            ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| |||
Sbjct 270    TACCCTGTTCCCTGCTGCAACTGTTGCTGTCGAGTGCAGAGAGAGTACGGCTCACGTGGAA 329

Query 61     GTCAAGATGGACATGTTTCGGCACTGGCCAGATCATCAATCCAGGTGACCTCACCCCTAGGT 120
            ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| |||
Sbjct 330    GTCAAGAAGGACATGTTTCGGGATTGGCCAGTTCATCAGTCCGGCTGACCTCACCCCTGGGT 389

Query 121    GACTGTGCCCCCGTATCCGAGGACCCCTGCTGCTCAAGTG 159
            ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| |||
Sbjct 390    GACTGTGGCCCATTCAGAGGACAATACTGCTCACGTG 428

>[gb|AY598616.1] Cyprinodon variegatus zona radiata-3 mRNA, partial cds
Length=1248

Score = 147 bits (162), Expect = 2e-32
Identities = 126/156 (81%), Gaps = 0/156 (0%)
Strand=Plus/Plus

Query 4      CCTGTTGCTGCTGCAACTGTTGCTGTTTCAGTGCCAAGAGAGTTATGCTCACGTGGAAGTC 63
            ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| |||
Sbjct 229    CCTGTTGCTGCTGCAACTGTAGCTGTCGAATGCAGAGAGAGCATCGCTCACGTGGAGGTC 288

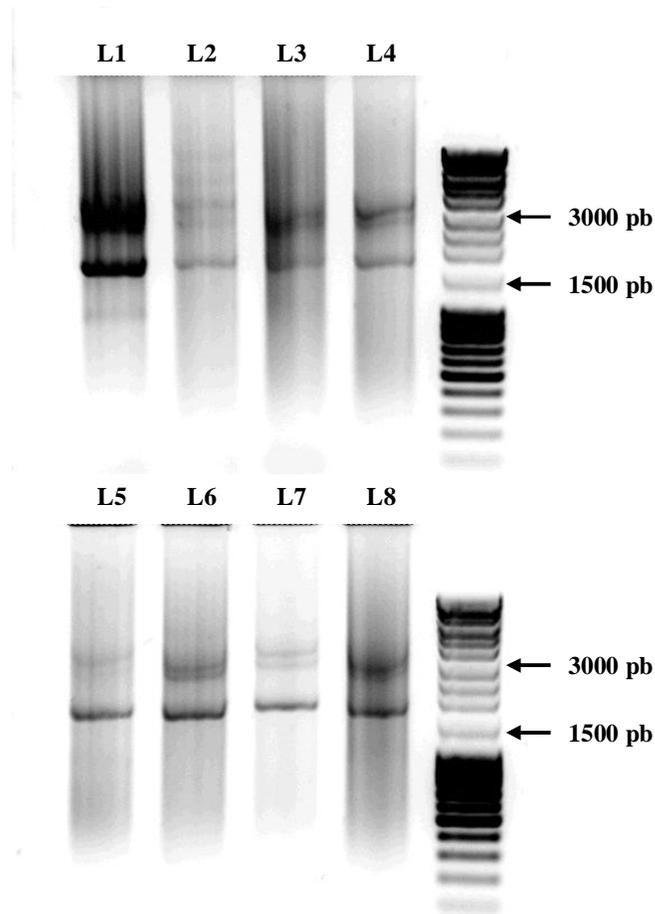
Query 64     AAGATGGACATGTTTCGGCACTGGCCAGATCATCAATCCAGGTGACCTCACCCCTAGGTGAC 123
            ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| |||
Sbjct 289    AAGAAAGACATGTTTGGCATTGGCCAGCCTATCAATCCAAATGACCTCACCTTGGGTAAC 348

Query 124    TGTGCCCCCGTATCCGAGGACCCCTGCTGCTCAAGTG 159
            ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| |||
Sbjct 349    TGTGCTCCTGTTTCTGAGGATAATGCTGCTCAAGTG 384

```

**Figura 13.** Alineamientos obtenidos con función **blastn** del programa BLAST 2.2.22 (Altschul y col.1990).

Luego de confirmada la identidad del fragmento amplificado se procedió a la clonación del mismo en el vector pJET 1.2 y transformación de las bacterias *E. coli* de la cepa JM107. Se seleccionaron 8 colonias denominadas L1 a L8 y se purificaron los plásmidos incorporados mediante lisis alcalina (adaptación de Sambrook y col pag. 1.31). Los productos obtenidos se analizaron por electroforesis en un gel de agarosa (Fig. 14), donde se observaron, en todas las muestras analizadas, las diferentes conformaciones de los plásmidos. La forma superenrollada se ubica más adelantada, con respecto a su migración en un gel sometido a un campo eléctrico, en relación a las otras 2 formas (lineal y de enrollamiento parcial).



**Figura 14.** Plásmidos aislados (lisis alcalina) de las colonias L1 a L8.  
Carril 5 arriba y abajo- Marcador pb (Mass Ruler DNA Ladder Fermentas)

Se enviaron a secuenciar tres de los clones (L1, L6 y L7) con ambos oligonucleótidos del vector (pJET1.2 forward y pJET1.2 Reverse). Las secuencias obtenidas se analizaron mediante el programa Sequencher 4.10.1 ([www.genecodes.com](http://www.genecodes.com)), para eliminar la secuencia del vector y ensamblar los clones.

**Clon L1**

```
AGCACTTGAGCCGCAGGATCCTCGGATACGGGGGCACAGTCACCTAGGGT
GAGGTCACCTGGATTGATGATCTGGCCAGTGCCGAACATGTCCATCTTGAC
TTCCACGTGAGCATAACTCTCTTGGCACTGAACAGCAACAGTTGCAGCAG
CAACAGGGTATCTCAGTTCGAATGGCACACTGGGCTTGACTTCAGGCTGG
GGCGCTTCAGGGTACTTCCAGGTGAGC
```

Clon L6

AGCACTTGAGCCGCAGGGTCTTCGGATACGGGGGCACAGTCACCTAGGGT
GAGGTCACCTGGATTGATGATCTGGCCAGTGCCGAACATGTCCATCTTGAC
TTCCACGTGAGCATAACTCTCTTGGCACTGAACAGCAACAGTTGCAGCAG
CAACAGGGTATCTCAGTTCGAATGGCACACTGGGCTTGACTTCAGGCTGG
GGCGCTTCAGGGTACTTCCAGGTGAGC

Clon L7

AGCACCTGAGCCGCAGGGTCTTCGGATACGGGGGCACAGTCACCTAGGGT
GAGGTCACCTGGATTGATGATCTGGCCAGTGCCGAACATGTCCATCTTGAC
TTCCACGTGAGCATAACTCTCTTGGCACTGAACAGCAACAGTTGCAGCAG
CAACAGGGTATCTCAGTTCGAATGGCACACTGGGCTTGACTTCAGGCTGG
GGCGCTTCAGGGTACTTCCAGGTGAG

Figura 15. Secuencias de los tres obtenidas luego de la secuenciación y armado de los Clones con el programa Sequencher 4.10.1 (www.genecodes.com).

6) Análisis comparativo entre las secuencias obtenidas

6.1 Análisis de la secuencia nucleotídica

Se realizó un análisis comparativo utilizando el programa Clustal W (MEGA 4.0) (Tamura y col. 2007) de las secuencias obtenidas revelando una identidad casi total (Fig. 16). Para los sucesivos análisis se utilizará el Clon L6, ya que su secuencia representa el consenso entre las cuatro secuencias obtenidas.

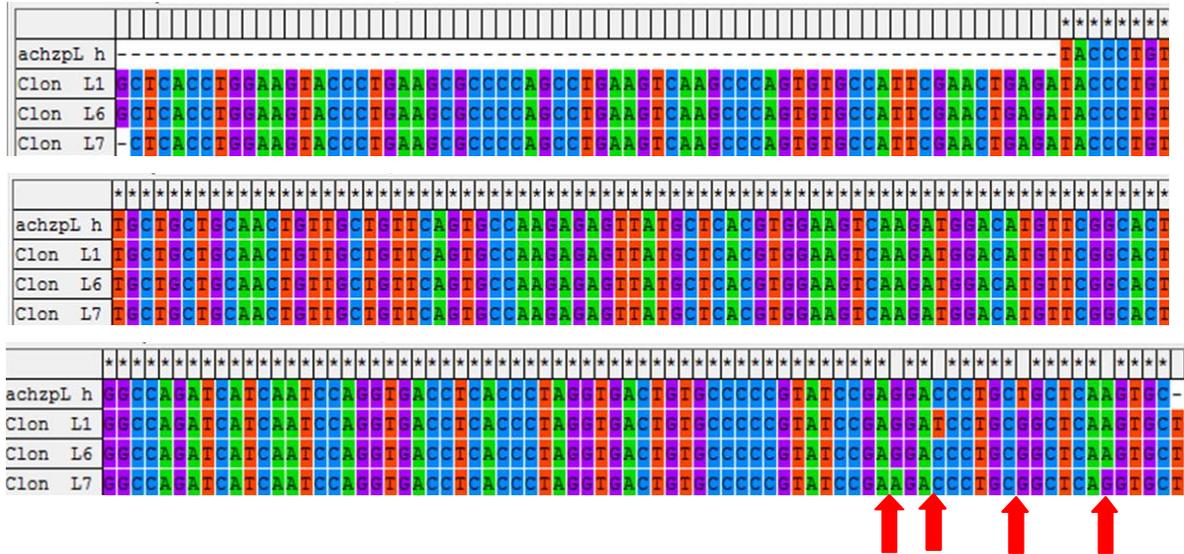


Figura 16. Análisis comparativo entre achzpL hembra y los Clones L1, L6 y L7 utilizando Clustal W (MEGA 4.0) (Tamura y col. 2007). Los asteriscos marcan los sitios conservados y las flechas rojas señalan las diferencias entre las secuencias.

La secuencia del Contig L6 se sometió a la función **blastn** del programa BLAST 2.2.22 (Altschul y col.1990). El análisis comparativo con las secuencias presentes en el GenBank presentó la mayor identidad con el ARNm de coriogenina L de *Kriptolebias marmoratus* (85%), a su vez presento un 80 % con la coriogenina L de *Fundulus heteroclitus*, 79% con la zona radiata-3 de *Cyprinodon variegatus*. y entre 75% y 76% con Coriogeninas L de especies del género *Oryzias* y peces de diferentes órdenes como *Liza*, *Liparis* y *Tetraodon*

### Alineamiento de secuencias nucleotídicas de coriogeninas y el Clon L6 (Fig.15)



**Figura 17.** Alineamiento múltiple usando el programa Clustal W (MEGA 4.0) (Tamura y col. 2007), comparando el Clon L6 con diferentes secuencias de coriogeninas de peces pertenecientes a los órdenes *Cyprinodontiformes* y *Beloniformes*. Se señalan con asteriscos las identidades.



Dada la homología encontrada a nivel de secuencia nucleotídica y proteína deducida, permiten concluir que se ha identificado el gen ortólogo de Coriogenina L en *Austrolebias charrua* perteneciente al grupo ZPC (Yu y col. 2006).

## 7) Análisis del patrón de expresión de la coriogenina L

La selección de los estadios del desarrollo embrionario para este análisis se basa en la caracterización del patrón de diferenciación gonadal a escala morfológica y temporal realizada para esta especie. Los estadios abordados son: 1) embriones de 30 días post-fecundación (en esta etapa del desarrollo, las gónadas aún se encuentran indiferenciadas); 2) embriones pre-eclosión (en esta etapa del desarrollo es posible observar dos tipos gonadales diferentes: gónadas de aspecto indiferenciado (machos presuntivos) y gónadas en las que se identificaron ovogonias y ovocitos previtelogénicos (Arezo y col. 2007); 3) alevines hembras y 4) hígado y ovario de hembras adultas.

Bajo las condiciones establecidas no se detectó amplificación de coriogenina L en los embriones de un mes post-fecundación. En embriones pre-eclosión, tampoco se detectó amplificación de este fragmento. Esperábamos la existencia de expresión de coriogenina L en este estadio dado que la envoltura coriónica comienza a depositarse en etapas tempranas de la vitelogénesis (Wallace y Selman, 1981; Berois y col. 2007) Nuestros resultados difieren con los obtenidos por Rhee y col (2009) en una especie de la misma Familia que *Austrolebias*, *Kriptolebias marmoratus* (Cyprinodontiformes, Rivulidae) donde se detectó expresión de coriogenina L desde embriones en estadio 2 (embrión somítico pigmentado) hasta alevín recién eclosionado. Estas diferencias en el patrón de expresión de la coriogenina L durante el desarrollo embrionario podría atribuirse a que los patrones de expresión son diferentes en ambas especies o debido a que los autores utilizaron ensayos de amplificación cuantitativa en tiempo real. Este ensayo al tener una gran sensibilidad pudo haber permitido detectar niveles mínimos de expresión, no detectables en ensayos de amplificación regulares como los utilizados en este trabajo.

Se demostró la expresión de coriogenina L en alevines hembra de 45 días post-eclosión (Fig. 10), estadio donde se evidencian ovocitos en vitelogénesis durante el proceso de diferenciación sexual en la especie (Arezo y col. 2007)

En los ejemplares hembra adultas, se identificó que el órgano de expresión de este ARNm es el hígado (Fig. 10). Estos resultados concuerdan con los obtenidos en peces de

varios órdenes con diferentes grados de divergencia. En particular apoyando los resultados obtenidos se ha encontrado expresión hepática de este gen tanto en peces pertenecientes al mismo orden Cyprinodontiformes (*Kryptolebias marmoratus*, Rhee y col. 2009; *Cyprinodon variegatus*, Knoebl y col. 2004), como al orden hermano *Beloniformes* (*Orizyas javanicus*, Yu y col. 2006) de *Austrolebias charrua*. Asimismo, varios trabajos demuestran la expresión hepática de las coriogeninas, en salmónidos (*O. mykiss*, *S. alpinus* *O. masou*), bacalao (*G. morhua*), lenguados (*P. americanus*, *H. hipoglossus*), y perciformes (*D. labrax*), planteando que en este grupo es principalmente el hígado el responsable de dicha expresión, pero excluyendo al Orden Cypriniformes, en el que la expresión generalmente es ovárica (revisado por Litscher y Wassarman, 2007).

En especies en las que existe expresión de genes coriónicos a nivel hepático (regulada por estrógenos)(revisado en Denslow y Sepúlveda, 2007) existiría mayor sensibilidad a los xenoestrógenos. Este hecho adquiere relevancia a nivel aplicado ya que basado en esto ha surgido información que señala al corion como un biomonitor muy sensible a la acción de estos contaminantes. Los xenoestrógenos provocarían perturbaciones endocrinas, que podrían inducir alteraciones sobre estas proteínas llegando a causar cambios notables en la síntesis de proteínas de ovocitos de peces, con posibles cambios en el ensamblado de la envoltura coriónica, amenazando la fertilidad y la protección del embrión durante el desarrollo (Arukwe y col. 1997 y 2000, Arukwe y Goksøyr, 2003). Por este motivo los teleósteos han comenzado a aparecer como importantes indicadores de salud ambiental ya que varios contaminantes provocan impacto sobre la reproducción. Los efectos ocurren desde el nivel celular y molecular hasta los niveles poblacionales (Devlin y Nagahama, 2002; Arukwe y Goksøyr, 2003). Las nuevas tecnologías basadas en el registro de los cambios a nivel génico y proteico constituyen herramientas valiosas para desentrañar mecanismos bioquímicos que alteran la reproducción de los peces (Denslow y Sepúlveda, 2007).

Al profundizar en la caracterización de la envoltura coriónica y explorar los mecanismos de regulación de la expresión de sus genes, se aportarán herramientas de base aplicables al diagnóstico de posibles efectos adversos de xenoestrógenos en una especie que habita en los "Baños del Este" del Uruguay, zona declarada Sitio de Reserva de la Biosfera y Sitio Ramsar (Probides 1999).

## Perspectivas

Se plantea evaluar, mediante la técnica de amplificación en tiempo real, los estadios embrionarios utilizados en este trabajo para validar o no los resultados obtenidos en el mismo. Se propone incluir muestras ya almacenadas de alevines en crecimiento desde la eclosión hasta el alevín hembra de 45 días. Dado el mayor poder de resolución de esta técnica (capacidad de detectar pequeñas cantidades de ARN mensajero en las muestras) será factible definir con mayor certeza la etapa en la cual comienza la transcripción del ARN mensajero de esta proteína, así como sus niveles de expresión.

Por otro lado ya se cuenta con el fragmento de *achzp L* clonado, lo que permitirá determinar el patrón espacial de expresión del ARNm de la coriogenina L para *Austrolebias charrua*, mediante la transcripción *in vitro* y generación de sondas para la técnica de hibridación *in situ*.

En cuanto a la inducción por estradiol de la expresión de proteínas coriónicas inicialmente demostrado por Murata y col. (1997) en el hígado del pez medaka, una serie de trabajos han utilizado compuestos catalogados como xenoestrógenos (17 $\alpha$ -etinilestradiol, nonilfenol,  $\alpha$ -zearalenol y dietilstilbestrol entre otros) para evaluar su capacidad de comportarse como disruptores endócrinos. En este sentido, en el marco del proyecto CSIC “Caracterización de los genes responsables de la síntesis de las proteínas coriónicas en peces. Proteómica y posible valor del corion como biomonitor de contaminación” se han realizado tratamientos con estradiol 17 $\beta$ , en concentraciones de 14 y 200 mg/L, en individuos de *A. charrua* (cinco machos y cinco hembras por grupo, con sus respectivos controles). Dicho tratamiento se efectuó para analizar las muestras de hígado y ovario mediante amplificación cuantitativa en tiempo real y demostrar si el estradiol está involucrado en la inducción de la expresión de coriogeninas en esta especie. De estar involucrado en este proceso, es posible proponer experimentos donde se analicen los efectos de los xenoestrógenos en la expresión de estas proteínas y se contará con datos esenciales para el desarrollo de los programas de monitoreo ambiental. La envoltura vitelina de *A. charrua* podrá ser propuesta como biomonitor de contaminación de sistemas hídricos con un manejo en tiempo y costos relativamente bajos con respecto a los problemas potenciales que puede resolver, como ya han demostrado ser útiles en este aspecto otras especies de Cyprinodontiformes (Rosa-Molinar y col. 1996, Arenzon y col. 2003).

## Referencias bibliográficas

ABRAMOFF MD, MAGELHAES PJ, RAM SJ. (2004) “Image Processing with ImageJ”. *Biophotonics International*, 11 (7): 36-42.

ALTSCHUL SF, GISH W, MILLER W, MYERS EW, LIPMAN DJ. (1990) Basic Local Alignment Search Tool. *Journal of Molecular Biology* 215: 403-410.

AREZO MJ, PEREIRO L, BEROIS N. (2005) Early development in the annual fish *Cynolebias viarius*. *J Fish Biol* 66: 1357-1370.

AREZO MJ, CASANOVA G, OLIVERA A, BEROIS N. (2004) “Oogenesis and chorion ultrastructure in annual fishes *Cynolebias*”. IX Congreso Iberoamericano de Biología Celular. Campinas, Brasil.

AREZO MJ, DALESSANDRO S, PAPA N, DE SÁ R, BEROIS N. (2007) Sex differentiation pattern in the annual fish *Austrolebias charrua* (Cyprinodontiformes: Rivulidae). *Tissue Cell* 39: 89–98.

ARENZON A, PINTO RF, COLOMBO P, RAYA-RODRIGUEZ MT. (2003) Assessment of the fresh water annual fish *Cynopoecilus melanotaenia* as a toxicity test organism using three reference substances. *Environ. Toxicol.* 22, 2188–2190.

ARUKWE A, KNUDSEN FR, GOKSØYR A. (1997) Fish zona radiata (egg shell) protein: A sensitive biomarker for environmental estrogens. *Environ. Health Perspect* 105: 418–422.

ARUKWE A, CELIUS T, WALTHER BT, GOKSØYR A. (2000) Effects of xenoestrogen treatment on zona radiata protein and vitellogenin expression in Atlantic salmon (*Salmo salar*). *Aquat Toxicol* 49:159–170.

ARUKWE A, GOKSØYR A. (2003) Eggshell and egg yolk proteins in fish: Hepatic proteins for the next generation: oogenetic, population, and evolutionary implications of endocrine disruption. *Comp Hepatol* 2, 4.

AUSUBEL FM. (1992) Short protocols in molecular biology : a compendium of methods from Current protocols in molecular biology. Brooklyn, NY New York, NY, Greene Pub. Associates; Wiley.

BABIN P, CERDÀ J, LUBZENS E. (2007) The Fish Oocyte: From Basic Studies to Biotechnological Applications. Springer.

BARRALLO A, GONZALEZ-SARMIENTO R, GARCIA-ISIDORO M, CIAD P, PORTEROS A, RODRIGUEZ R. (1999) Differential brain expression of a new beta-actin gene from zebrafish (*Danio rerio*).*Eur. J. Neurosci.* 11 (1), 369-372.

BEGOVAR P, WALLACE R. (1989) Major vitelline envelope proteins in pipefish oocytes originate within the follicle and are associated with the Z3 layer. *J Exp Zool* 251: 56–73.

BEROIS N, BOLATTO C, BRAUER M, BARROS C. (2004) Gametogenesis, histological gonadal cycle and in vitro fertilization in the whitemouth croaker (*Micropogonias furnieri*, Desmarest, 1823) *Journal of Applied Ichthyology* 20(3):169–175.

BEROIS N, AREZO MJ, CHALAR C, BRAUER MM. and BARROS C. (2007) Ultrastructure and protein composition of the oocyte envelope in the whitemouth croaker (*Micropogonias furnieri*, Desmarest, 1823, Sciaenidae, Perciformes) *Journal of Applied Ichthyology* 23:34–39.

BEROIS N, AREZO MJ, PAPA N. (2011) Gamete interactions in teleost fish: The egg envelope as an environmental biomonitor. *Biol Res* 44: 119-124.

BONSIGNORIO D, PEREGO L, DEL GIACCO L, COTELLI F. (1996) Structure and macromolecular composition of the zebrafish egg chorion. *Zygote* 4: 101–108.

CHANG YS, HSU CC, WANG SC, TASO CC, HUANG FL. (1997). Molecular cloning, structural analysis and expression of carp ZP2 gene. *Mol Reprod Dev* 46: 258-267.

CONNER SJ, HUGHES DC. (2003) Analysis of fish ZP1/ZPB homologous genes-evidence for both genome duplication and species-specific amplification models of evolution. *Reproduction* 126:347-352.

COSTA WJEM. & CHEFFE MM. (2001) Three new annual fishes of the genus *Austrolebias* from the Laguna dos patos system, southern Brazil, and a redescription of *A. adloffii* (AHL) (Cyprinodontiformes: rivulidae). *Comun. Mus. Ciênc. Tecnol. PUCRS, Sér. Zool. Porto Alegre* 14(2):179-200.

COSTA WEJM. (2006) The South American annual killifish genus *Austrolebias* (Teleostei: Cyprinodontiformes: Rivulidae): phylogenetic relationships, descriptive morphology and taxonomic revision. *Zootaxa*, 1213:1–162.

DARIE CC, BINIOSSEK ML, JOVINE L, LITSCHER ES, WASSARMAN PM. (2004) Structural characterization of fish egg vitelline envelope proteins by mass spectrometry. *Biochemistry*. 43(23):7459-78

DENSLOW ND, SEPÚLVEDA MS. (2007) Ecotoxicological effects of endocrine disrupting compounds on fish reproduction. In: Babin PJ, Cerda J, Lubzens E, editors. *The Fish Oocyte: From Basic Studies to Biotechnological Applications*. The Netherlands: Springer Publishing Co. pp. 255–322.

DEVLIN RH, NAGAHAMA Y. (2002) Sex determination and sex differentiation in fish: an overview of genetic, physiological and environmental influences. *Aquaculture* 208: 191–364.

DUMONT JN. & BRUMMET AR. (1980) The vitelline envelope, chorion and micropyle of *Fundulus heteroclitus* eggs. *Gamete Res.* 3: 25-44.

GARCÍA D, LOUREIRO M, TASSINO B. (2008) Reproductive behavior in the annual fish *Austrolebias reicherti* Loureiro & García 2004 (Cyprinodontiformes: Rivulidae). Neotropical Ichthyology, 6(2):243-248.

GARCÍA G, CLARAMUNT S, LALANNE A. (2004) Genetic differentiation among annual fish of the genus *Cynolebias* (Cyprinodontiformes, Rivulidae) in a Biosphere Reserve Site from Uruguay. Environmental Biology of Fishes 70: 247– 256.

GARCÍA G, LOUREIRO M, BEROIS B, AREZO MJ, CASANOVA G, CLIVIO G and OLIVERA A. (2009) Pattern of differentiation in the annual killifish genus *Austrolebias* (Cyprinodontiformes: Rivulidae) from a biosphere reserve site in South America: a multidisciplinary approach. Biological Journal of the Linnean Society. 98, 620–635.

GURAYA SS. (1986) The cell and molecular biology of fish oogenesis. Monogr Dev. Biol. 18:1-223

HYLLNER SJ, OPPEN-BERNTSEN DO, HELVIK JV, WALTHER BT, HAUX C. (1991) Oestradiol 17- $\beta$  induces the major vitelline envelope proteins in both sexes in teleosts. J Endocrinol 131: 229–236.

HYLLNER SJ, HAUX C. (1992) Immunochemical detection of the major vitelline envelope proteins in the plasma and oocytes of the maturing female rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. J Endocrinol 135:303-309.

HYLLNER SJ, WESTERLUND L, OLSSON PE, SCHOPEN A. (2001) Cloning of rainbow trout egg envelope proteins: members of a unique group of structural proteins. Biol. Reprod. 64: 805-811

ICONOMIDOU VA, CHRYSIKOS DG, GIONIS V, PAVLIDIS MA, HAMODRAKAS SJ. (2000) Secondary structure of chorion proteins of the teleostean fish *Dentex dentex* by ATR FT-IR and FT-Raman spectroscopy. J Struct Biol 132: 112-122.

ISAAC-NAHUM VJ, CARDOSO RD, SERVO G. and ROSSI-WONGTSCHOWSKI CL. (1988) Aspects of the spawning biology of the Brazilian sardine, *Sardinella brasiliensis*, (Clupeidae). *J. Fish. Biol.* 32:383-396.

JOVINE L, QI H, WILLIAMS Z, LITSCHER E, WASSARMAN PM. (2002) The ZP domain is a conserved module for polymerization of extracellular proteins. *Nat Cell Biol.* 4(6):E154-5.

JOVINE L, DARIE CC, LITSCHER ES, WASSARMAN PM. (2005) Zona pellucida domain proteins. *Annu Rev Biochem.* 74:83-114.

JOVINE L, JANSSEN WG, LITSCHER ES, WASSARMAN PM. (2006) The PLAC1-homology region of the ZP domain is sufficient for protein polymerisation. *BMC Biochem.* 7:11.

KNOEBL I, HEMMER MJ AND DENSLOW ND. (2004) Induction of zona radiata and vitellogenin genes in estradiol and nonylphenol exposed male sheepshead minnows (*Cyprinodon variegatus*) *Mar. Environ. Res.* 58 (2-5), 547-551

KUDO S. (1980) Ultrastructure and ultracytochemistry fertilization envelope formation in the carp egg. *Develop. Growth. Differ.* 24. 327-339

KUDO S, INOUE M. (1989) Bacterial action of fertilization envelope extract from eggs of the fish *Cyprinus carpio* and *Plecoglossus altivelis*. *J Exp Zool.* 250(2):219-28.

KUDO S. (2000) Enzymes responsible for the bactericidal effect in extracts of vitelline and fertilisation envelopes of rainbow trout eggs. *Zygote.* 8(3):257-65.

LI YH, WU CC, YANG JS. (2000) Comparative ultrastructural studies of the zona radiata of marine fish eggs in three genera of Perciformes. *Journal of Fish Biology* 56: 615–622.

LITSCHER ES, WASSARMAN PM. (2007) Egg extracellular coat proteins: from fish to mammals. *Histol Histopathol* 22:337-347.

MICHELTEN BK. (1995) Transformation of Escherichia coli Increases 260-Fold upon Inactivation of T4 DNA Ligase. Analytical Biochemistry 225:172-174.

MURATA K, SUGIYAMA H, YASUMASU S, IUCHI I, YASUMASU I, YAMAGAMI K. (1997) Cloning of cDNA and estrogen-induced hepatic gene expression for choriogenin H, a precursor protein of the fish egg envelope (chorion). Proc. Natl. Acad. Sci. U S A. 94(5):2050-5.

OPPEN-BERNTSEN D, HELVIK J, WALTHER B. (1990) The major structural proteins of cod (Gadus morhua) eggshell and protein crosslink during teleost egg hardening. Dev Biol 137:258-265.

OPPEN-BERNTSEN D, HYLNER S, HAUX C, HELVIK J, WALTHER B. (1992 a) Eggshell zona radiata-proteins from cod (Gadus morhua): extra-ovarian origin and induction by estradiol-17. Int J Dev Biol 36:247-254.

OPPEN-BERNTSEN D, GRAM-JENSEN E, WALTHER B. (1992 b) Zona radiata proteins are synthesized by rainbow trout (Oncorhynchus mykiss) hepatocytes in response to oestradiol-17. J Endocrinol 135:293-302.

RASBAND WS. (1997-2009) ImageJ, U.S. National Institute of Health, Bethesda, Maryland, USA, <http://rsb.info.nih.gov/ij/>

RHEE JS, KANG HS, RAISUDDIN S, HWANG DS, HAN J, KIM RO, SEO JS, LEE YM, PARK GS, LEE SJ, LEE JS. (2009) Endocrine disruptors modulate expression of hepatic choriogenin genes in the hermaphroditic fish, Kryptolebias marmoratus. Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol. 150(2):170-8.

ROSA-MOLINAR E, FRITZSCH B, HENDRICKS SE. (1996) Organizational-activational concept revisited: sexual differentiation in an atherinomorph teleost. Horm Behav 30:563-75.

SAMBROOK J, FRITZSCH EF, MANIATIS T. (1989). Molecular cloning: a laboratory manual. Cold Spring Harbour Laboratory, New York.

SCAPIGLIATI G, CARCUPINO M, TADDEI A, MAZZINI M. (1994) Characterization of the main egg envelope proteins of the sea bass *Dicentrarchus labrax* L. (Teleostea, Serranidae). *Mol Reprod Dev* 38:48-53.

SELMAN K. and WALLACE R. (1983) Oocyte growth in the sheepshead minnow: Uptake of exogenous proteins by vitellogenic oocytes. *Tissue and Cell* 14(3):555-571.

SHIBATA Y, IWAMATSU T, OBA Y, KOBAYASHI D, TANAKA M, NAGAHAMA Y, SUZUKI N, YOSHIKUNI M. (2000) Identification and cDNA cloning of alveolin, an extracellular metalloproteinase, which induces chorion hardening of medaka (*Oryzias latipes*) eggs upon fertilization. *J Biol Chem.* 275(12):8349-8354.

SMITH J, PATON IR, HUGHES DC, BURT DW. (2005) Isolation and mapping the chicken zona pellucida genes: an insight into the evolution of orthologous genes in different species. *Mol Reprod Dev* 70: 133-145.

SPARGO SC, HOPE RM. (2003) Evolution and nomenclature of the zona pellucida gene family. *Biol Reprod* 68: 358-362.

TAMURA K, DUDLEY J, NEI M, KUMAR S. (2007) MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) Software Version 4. *Mol. Biological Evolution.* 24:1596-1599.

TESORIERO JV. (1977) Formation of the chorion (zona pellucida) in the teleost, *Oryzias latipes*. II. Polysaccharide cytochemistry of early oogenesis. *J Histochem Cytochem.* 25(12):1376-80.

TESORIERO JV. (1978) Formation of the chorion (zona pellucida) in the teleost, *Oryzias latipes*. III. Autoradiography of [<sup>3</sup>H]proline incorporation. *J Ultrastruct Res.* 64(3):315-326.

SELMAN K, WALLACE RA. (1983) Oogenesis in *Fundulus heteroclitus* III. Vitellogenesis. *J Exp Zool.* 226(3):441-57.

VAZ-FERREIRA R. & SIERRA B. (1973) Trab. V. Cong. Latinoamer. Zool., 1:245-260.

WALLACE RA, SELMAN K. (1981) Cellular and dynamic aspects of oocyte growth in teleosts. Amer Zool 21:325-343

WANG H, GONG Z. (1999) Characterization of two zebrafish cDNA clones encoding egg envelope proteins ZP2 and ZP3. Biochim Biophys Acta 1446:156-160.

WOURMS JP. (1964) Comparative observations on the early embryology of *Nothobranchius taeniopygus* (Hilgendorf) and *Aplocheilichthys pumilis* (Boulenger) with special reference to the problem of naturally occurring embryonic diapause in teleost fishes. Annual Report E Afr Freshwat Fish Res Organ Appendix H, pp. 68–73.

YAMAMOTO T. (1967) Medaka. In *Methods in Developmental Biology* (101-111). WiltFredH., Wessels, N. Edit. Thomas and Crowell Company. N.Y.

YU R, WONGA M, KONGA R, WUA R, CHENG S. (2006). Induction of hepatic choriogenin mRNA expression in male marine medaka: A highly sensitive biomarker for environmental estrogens. *Aquatic Toxicology* 77: 348-358.

## **Apéndice I: Soluciones utilizadas**

### Solución de Yamamoto sin penicilina (1 lt)

NaCl: 7,5 g  
KCl: 0,2 g  
CaCl<sub>2</sub>·2H<sub>2</sub>O: 0,3 g  
Llevar a pH 7.3 con NaOH antes de usar.  
Agua MiliQ hasta enrasar 1L

Nota: Se guarda a 4°C y una alícuota se mantiene en la estufa de 25° donde están creciendo los embriones.

### Solución tampón Tris-Acetato\_EDTA (TAE) stock 50x

Tris-base: 242 g  
Ácido acético glacial: 57,1 ml  
E.D.T.A. 0.5M, pH 8: 100 ml  
Hidróxido de sodio hasta llegar a pH 8  
Agua MiliQ hasta enrasar a 1L

### Solución tampón Tris-Acetato\_EDTA (TAE) de trabajo 1X

TAE 50X: 20 ml  
Agua MiliQ: enrasar a 1 lt.

### Solución EDTA 0.5M, pH 8

EDTA: 18,61 g  
Agua MiliQ hasta enrasar a 100 ml  
Hidróxido sódico 4M hasta llegar a pH 8.0

### Solución de Cloruro de Litio 4M

LiCl: 848 mg  
Agua libre de nucleasas hasta enrasar a 5 mL  
Autoclavar  
Nota: alicuotar de a 0,5mL

### Preparación de material para clonación

#### Medio de cultivo líquido

Se resuspendieron en un matraz 0,5 gramos de LB Sigma /N° de catálogo L3022 (Digestión pancreática de caseína 10 gramos/litro, extracto de levadura 5 gramos/litro y NaCl 5 gramos/litro) en 25 ml de agua MiliRO, para luego transferir 3mL por tubo de cultivo y se taparon con algodón. La relación de LB a utilizar es 20 gramos /litro. Luego se esterilizaron 10 minutos a 165°C y 2 atmósferas de presión en Autoclave automático (Suarez: Modelo SP12)

#### Medio de cultivo sólido

Se resuspendieron 3,2 gramos de LB Sigma, 2,4 gramos de Agar A Sigma en 160 ml de agua MiliRO. Luego todo se esterilizó 10 minutos a 165°C y 2 atmósferas de presión, en Autoclave automático (Suarez: Modelo SP12). Inmediatamente de dejar enfriar el matraz, hasta una temperatura manejable sin que llegara a solidificar el Agar. En condiciones de esterilidad sobre el mechero se colocaron en 2 placas estériles aproximadamente 20mL en cada una y se dejaron enfriar. Manteniéndose en condiciones de esterilidad a los 140 ml restantes se le agregaron 80 µl de Ampicilina Ión 200mg/ml (quedando un rango óptimo entre 50 y 100 µg/ml), se mezcló por agitación manual y dividió el contenido en 7 placas con 20mL aproximadamente cada

una. Las placas se dejaron secar de un día para el otro a temperatura ambiente y se colocaron en heladera a 4°C con el medio hacia abajo.

### Soluciones para purificación de plásmidos por el método de lisis alcalina

#### Solución I (10ml)

EDTA 0,5M: 200 µl

Tris-HCl 1M: 250 µl

Agua MiliQ: 9,3ml

Autoclavar 10 minutos a 2 atmósferas

Agregar 250µl de Glucosa 2M filtrada

Almacenamiento temperatura ambiente

#### Solución II (2ml) preparación en el momento

NaOH: 10M 40µl

SDS 10%: 200µl

Agua MiliQ: 1,760 ml

#### Solución III

Acetato de Potasio 5M: 6 ml

Ácido Acético Glacial: 1,15 ml

Agua MiliQ: 2,85 ml

Almacenamiento: 4°C

## **Apéndice II: Mantenimiento General de *Austrolebias charrua* en Acuario de Facultad de Ciencias**

### **Colecta y acondicionamiento de los ejemplares**

Juveniles y/o adultos de la especie *Austrolebias charrua* se colectan con redes de mano o calderines en charcos temporales del departamento de Rocha, Uruguay, entre los meses de Mayo y Octubre. Luego del transporte, se realiza una adaptación, en la cual los peces se colocan en recipientes con agua del charco, dentro de peceras acondicionadas previamente con tal propósito. El recipiente posee un orificio por el que se intercambiara el agua de charco por el agua de la pecera de manera paulatina. La pecera de adaptación se suplementa con NaCl en una concentración de 15 a 20 gramos/litro, como preventivo para varias enfermedades.

### **Mantenimiento de adultos**

Los ejemplares en etapa reproductiva ya sean, capturados (luego de la adaptación) o criados en el Acuario de Facultad de Ciencias (entre 2 y 3 meses post-eclosión), se separan en parejas o tríos (2 hembras y 1 macho) y se mantienen en peceras de 20-30 litros, con agua corriente filtrada y declorinada (pH 6,5-7) con filtración, aireación continua y recambio parcial del 25% cada 5 días o 2 veces a la semana según el número de ejemplares. El agua se retira por sifoneo arrastrando restos de alimentos y desechos del fondo. El ciclo de iluminación es el natural, con temperatura ambiente controlada a 19°C mediante aire acondicionado. El agua a utilizar en los cambios se filtra mediante filtro comercial de carbón y es almacenada en contenedores de vidrio de 200 litros. La declorinación se realiza por exposición al aire durante al menos 24hs, con tubo de aireador y piedra porosa.

Las peceras de adultos tienen una división parcial inferior (pared de vidrio de 5 cm que separa 2 zonas del piso, izquierda y derecha). En una mitad se instala un filtro biológico con plaquetas plásticas, pico y piedras, este sistema es accionado mediante un aireador con burbujeo constante, que no debe generar demasiado movimiento del agua,

ya que en exceso provoca estrés. A su vez hay que asegurarse de mantener un buen nivel de oxígeno. Un aireador de dos salidas puede rendir para 4 o 5 peceras por salida, dependiendo de la potencia del mismo. Este sistema de aireación y filtración sería el más indicado para el mantenimiento de varias peceras. En este sector, se pueden colocar plantas, por lo general, Elodea y/o Musgo de Java para proporcionar refugio a los peces y disminuir el estrés. La otra mitad del fondo queda libre para colocar el recipiente de plástico con turba Xaxim para la puesta de huevos. Esa zona a su vez, facilita la alimentación.

La alimentación de los peces adultos es diaria con alimento vivo *Tubifex* sp. Estos anélidos, constituyen el mejor alimento para peces anuales, se mantienen en bandejas profundas con poco agua y enjuagues diarios. Tomando con una pinza, se ofrecen en el área libre de piedras y plantas. Los peces rápidamente se acostumbran a la zona y de esa forma se facilita el mantenimiento de las condiciones de limpieza de la pecera. En el caso de falta de *Tubifex*, es posible la alimentación con *Gammarus* sp. o con pastas de corazón vacuno (Apéndice III). Existen dos desventajas en relación a la utilización este último tipo de alimento: 1. estos peces son predadores activos y prefieren las presas vivas, 2. contamina más rápido el agua por lo que se deben aumentar los cambios de la misma, sifoneando obligatoriamente los excedentes no consumidos en un lapso de 20 a 30 minutos luego de la alimentación.

### **Condiciones generales de reproducción y/o producción de embriones:**

Para maximizar el rendimiento de los ejemplares, es conveniente mantenerlos separados en diferentes peceras hasta el momento de la reproducción. Las hembras pueden agruparse (en bajo número) en una pecera, pero en el caso de los machos debido al comportamiento agresivo de éstos (establecimiento de jerarquías) es conveniente mantener un único macho por acuario.

Dependiendo del abordaje experimental en cada pecera de reproducción, se coloca un macho con una, dos y hasta tres hembras, cuidando la competencia por alimento y sitios de desove. Estas especies presentan un elaborado cortejo de puesta que culmina con el parcial o total enterramiento de ambos en la turba (García y col, 2004). Allí se sincroniza la liberación de los gametos. Los huevos fecundados pueden

recuperarse, con pipeta, al examinar la turba. La turba utilizada (previamente hervida, enfriada y enjuagada con agua de clorinada) se coloca en recipientes sin aristas filosas, de plástico de unos 4cm de altura, base de 15 x 15cm o 20cm de diámetro si es circular. Esta debe llegar a 2cm de altura y a 1,5 o 2cm del borde superior del recipiente.

Dado que el desove es diario, es conveniente incluir un descanso de los adultos 2 a 3 veces al mes, por un período de 5 días, retirando la turba. De esta forma, se optimiza la viabilidad de los embriones.

Para un suministro constante se mantiene la turba en cada pecera entre 10 y 15 días alternando las diferentes peceras según las necesidades. Aplicando el protocolo de mantenimiento antes descrito, es posible obtener entre 100 y 250 embriones en cada período.

### **Cultivo de embriones**

Los ovocitos fecundados se recuperan mediante una pipeta plástica. Se limpia la superficie del corion por rodamiento del huevo sobre un papel de filtro humedecido en agua de acuario, con la ayuda de un pincel. Los embriones limpios se llevan a otra placa con solución de Yamamoto (Yamamoto, 1967). Se diagnostica el estadio de desarrollo de cada embrión (Arezo y col. 2005) observándolo en una cámara confeccionada con un portaobjetos y varias capas de cinta aislante con una cavidad rectangular (piso es el mismo portaobjetos y las paredes son de cinta. En la cámara se deposita cada embrión con una gota de Yamamoto y se cubre con un cubreobjetos. El suave deslizamiento del cubreobjetos sobre el embrión permite girarlo y observarlo totalmente. Una vez diagnosticado el estadio, se llevan los diferentes embriones a cámaras Nunclon de 24 pozos (clasificados por estadios) donde se cultivan en una estufa a 25 °C, en oscuridad y solución de Yamamoto. El registro de avance del desarrollo se realiza en planillas diseñadas para tal fin.

## **Mimetizando la estación seca en el laboratorio**

Al retirar la turba, se escurre el excedente de agua con cuidado de no arrastrar embriones superficiales y si los hay, cubrirlos con la misma turba. Se permite la desecación hasta alcanzar cierto grado de humedad. Se ha establecido que la humedad óptima para el desarrollo de estas especies se alcanza cuando al poner un papel de filtro sobre la superficie éste no se humedece al contactar con la turba. Luego de esta fase inicial, se coloca en una bolsa de nylon, manteniendo un volumen de aire similar al de turba (hasta 1,5 veces de aire). Se mantiene la bolsa (rotulada con los datos de especie, procedencia, etc) cerrada, en oscuridad, a una temperatura de 19°C entre 3 y 7 meses. Pasado este tiempo la viabilidad de los embriones va disminuyendo gradualmente.

## **Eclosión de alevines**

La eclosión en *A. charrua* se realiza colocando la turba obtenidas según se indicó, en una o dos peceras pequeñas de entre 1,5 y 3 litros de capacidad. La turba debe formar una capa de uno a dos centímetro de espesor, la cual se humedece con pulverizador y/o se agrega lentamente agua de clorinada (pH recomendado 6,8-7,3) hasta cubrir la turba para que ésta se hidrate. Una hora después se completa con esta agua hasta llegar a los 4 centímetros del fondo y se agrega aireación suave, evitando exceso de turbulencias. La temperatura de todo el proceso se mantiene entre 18 y 20 °C. En estas condiciones el tiempo promedio de mayor eclosión ocurre entre las primeras 8 a 24 horas. A estos pasos se los denomina Día cero (Día=0), en que no se suministra alimentación durante estas primeras horas porque ya que los alevines mantienen restos del saco vitelino suficientes para esta etapa (datos previos mediante histología). Pero se debe contar con un Cultivo de *Artemia sp.* dispuesto para que eclosione al día siguiente.

A la mañana siguiente (Día 1) y a partir de este momento se alimentan los alevines con nauplius de *Artemia* y/o microgusano 2 veces al día. Luego de transcurridas 2 horas luego de la alimentación, se duplica el volumen de agua en la pecera. Opcionalmente pueden agregarse ejemplares adultos de *Daphnia pulex* que mejorarán las condiciones sanitarias al consumir los restos del medio de cultivo de los microgusanos.

Entre el segundo y tercer día (Día 2 y 3) se continúa con el régimen anterior de alimentación y duplicación de agua, pero ya se recomienda que extraer los alevines (aspirando con pipeta de plástico) y ubicarlos en otra pecera de iguales características sin turba. A partir de este momento, se alimenta y después de una hora, se sifonea el fondo. Luego se duplica el volumen de agua y se coloca nuevamente ejemplares de *D. pulex* que se reproducirán en la pecera proporcionando otro alimento a los alevines en el momento en que puedan capturarlos.

Los primeros 20 días se mantienen con este régimen estrictamente diario de alimentación (con *Artemia*, *microgusanos* y *Daphnia*) y cambios del 50% del agua. Este período corresponde al de mayor mortalidad de ejemplares por lo que se deben retirar los alevines muertos cada vez que se detecten. Luego de estos 20 días es posible que los alevines pasen un día sin alimentación. Durante este tiempo los alevines se van separando de acuerdo a los tamaños y cantidad para evitar hacinamiento.

Entre los 30 a 40 días se alimentan ocasionalmente con nauplius o larvas mayores de *Artemia sp.* y básicamente con *Daphnia pulex* mejorando la eficiencia al hacerlo luego del último cambio de agua del día ya que pueden permanecer vivas por varias horas e incluso días si no son consumidas. Se mantiene la alimentación diaria con *Daphnia* hasta 1 mes post-eclosión donde se comienza a suministrar alternadamente *Tubifex* trozado mediante bisturí. Aproximadamente a los dos meses post-eclosión, se evidencia el dimorfismo sexual en los juveniles de *Austrolebias*. A partir de este punto se separan de acuerdo a los tamaños y/o sexo de los individuos.

### **Preparación de pasta de corazón vacuno**

Ingredientes:

- 200 gr. de corazón vacuno crudo en trozos sin grasa y sin fibras
- 1 cucharadita de té, de polen
- 2 cucharadas soperas de espinaca (hojas sin tallo, ni nervaduras, picadas con dos días en el Freezer)
- 1 sobre de gelatina sin sabor, previamente disuelta en agua tibia

- 1 cucharadita de té de Dayamineral en Jarabe u otro complemento vitamínico.
- 1 pastilla de calcio pulverizada

**Preparación:**

Se colocan todos los ingredientes antes mencionados en una procesadora para obtener una pasta uniforme y mezclada de forma homogénea. Se distribuye sobre un nylon fraccionando y se coloca en el freezer. Es posible administrarla congelada.