



Universidad de la República

Facultad de Ciencias

Programa de Desarrollo de las Ciencias Básicas

Área Biología – Subárea Biología Celular y Molecular

“Hacia la evaluación del corion de los peces como biomarcador de contaminación. Identificación y análisis del patrón de expresión de los genes coriónicos en peces anuales del género *Austrolebias*.”

*Lic. Nicolás Gabriel Papa Rodríguez*

Orientadora: Dra. Nibia Berois

Co-orientadora: Dra. Cora Chalar

Montevideo, Uruguay

2016



“Hacia la evaluación del corion de los peces como biomarcador de contaminación. Identificación y análisis del patrón de expresión de los genes coriónicos en peces anuales del género *Austrolebias*.”

***Lic. Nicolás Gabriel Papa Rodríguez***

Tesis para optar por el título de Magíster en Ciencias Biológicas,  
Subárea Biología Celular y Molecular en el marco del Programa de  
Desarrollo de las Ciencias Básicas  
PEDECIBA Biología

Orientadora: Dra. Nibia Berois

Co-orientadora: Dra. Cora Chalar

Tribunal: Dra. Gabriela Bedó  
Dra. Andrea Villarino  
Dr. Javier García

Montevideo, Uruguay

2016

La presente Tesis contó con la financiación de una Beca de Maestría de la  
Agencia Nacional de Investigación e Innovación



## **Agradecimientos institucionales**

A Facultad de Ciencias por recibirme y ser mi segunda casa desde el 2001.

Agradezco al Programa de Desarrollo de Ciencias Básicas (PEDECIBA) por brindarme el marco para realizar la Maestría, apoyar la investigación con las alcúotas y por financiar parcialmente la Pasantía realizada en el laboratorio de la Dra. Mónica Marín y el Dr. Mario Señorale (Sección Bioquímica, Facultad de Ciencias), con el programa de Pasantías locales.

Agradezco a la Agencia Nacional de Investigación e Innovación (ANII) por financiar la Beca de Maestría que permitió dedicarme con todo el entusiasmo a mi Maestría.

## **Agradecimientos académicos**

En primer lugar, quiero agradecer a mi familia académica desde agosto del 2003, gracias Nibia y a María por recibirme en un grupo de investigación que siento como una familia. Y junto a Cora, me han brindado su guía, apoyo, confianza y amistad, siendo fundamentales en estos años de formación a todo nivel.

Al tribunal: Gabriela, Andrea y Javier, por sus aportes y apoyo en las sugerencias para la tesis, así como el apoyo para el resultado final.

Agradecer a Graciela y Jimena, por varios años de trabajo conjunto y destacando el ensamble, para lograr los capítulos del libro “Annual fishes: history life strategy, diversity and evolution”.

Al resto de los compañeros de la Sección Biología Celular de todos los tiempos: Daniel y Gonzalo, siempre presentes para discutir estrategias experimentales y sobretodo de la vida.

A Flavio y Cristina por su apoyo presente y pasado como coordinadores de la Sección Biología Celular

Andrea, Lucía, siempre presentes en cada clase de práctico de Biología Celular

Camila por cubrirme para la defensa de la tesis

A Gabriela por estar siempre presente

A Gonzalo Greif por su colaboración en la puesta a punto de la amplificación en tiempo real

Mario Señorale por su dedicación y guía, para la producción y purificación de péptidos recombinantes

Mónica Marín por recibirme en su laboratorio para realizar la pasantía de péptidos recombinantes

A los compañeros del laboratorio 305 de Bioquímica: Florencia, Victoria, Silvia entre otros.

A todos los compañeros de pasillo de la Sección Bioquímica

Al grupo de Genética Evolutiva Graciela García y Verónica Gutierrez por su apoyo y experiencia en los arranques con técnicas moleculares

A todos los integrantes del equipo interdisciplinario Biología evolutiva en peces anuales

A todos los compañeros, docentes, estudiantes y funcionarios de Facultad que acompañaron estos años y colaboraron de una u otra forma en mi formación

### **Agradecimientos personales**

Agradezco especialmente a mi gran amor Verónica, por acompañarme, apoyarme incondicionalmente, para proyectarnos a compartir una vida juntos

A toda mi gran familia por estar siempre

Apoyo, esfuerzo y perseverancia mi madre

Padre tenacidad y terquedad para resolver problemas

Sobrino por ser él mismo con todo su cariño

A mis hermanas Tamara y Florencia

A mi abuela graaaan referente, pendiente de todos, uniendo y conectando a toda la familia

A mis primos y tíos, y toda mi familia, los que están y los que siguen acompañando desde otros lugares

A Daniel, más que un amigo es un hermano

A mis grandes amigos: Martín, Cynthia, Laura, Gabriela, Seba, Pablo, Nadia, Gonza, por siempre estar y compartir una vida.

A Lilián por su gran apoyo de siempre

A los amigos de todos los tiempos

# Tabla de contenido

<b>RESUMEN</b>	<b>1</b>
<b>1 INTRODUCCION</b>	<b>2</b>
<b>1.1 Biomarcadores de contaminación por xenoestrógenos</b>	<b>2</b>
<b>1.2 Envoltura coriónica en peces teleósteos</b>	<b>3</b>
<b>1.3 Proteínas coriónicas</b>	<b>5</b>
<b>1.4 Dominio ZP</b>	<b>6</b>
<b>1.5 Genes coriónicos</b>	<b>7</b>
<b>1.6 Modelo biológico</b>	<b>8</b>
<b>1.7 Antecedentes del equipo de trabajo</b>	<b>10</b>
<b>1.8 Descripción del problema a ser abordado y relevancia del mismo</b>	<b>11</b>
<b>OBJETIVO GENERAL:</b>	<b>11</b>
Objetivos específicos:	12
<b>2. MATERIALES Y MÉTODOS</b>	<b>13</b>
<b>2.1 Obtención de muestras biológicas</b>	<b>13</b>
2.1.1 Colecta y mantenimiento de los ejemplares	13
2.1.2 Obtención y cultivo de embriones	14
<b>2.2 Análisis moleculares</b>	<b>14</b>
2.2.1 Fijación y aislamiento de ARN	14
2.2.2 Estimación de la calidad y concentración del ARN obtenido	15
2.2.3 Tratamiento con Desoxiribonucleasa	15
2.2.4 Retrotranscripción. Síntesis de ADNc	16
2.2.5 Evaluación de la síntesis de ADNc	16
2.2.6 Amplificación in vitro e identificación de los genes de interés	18
2.2.7 Purificación de los productos obtenidos	20
2.2.8 Secuenciación y análisis preliminar	20
2.2.9 Designación de secuencias	20
<b>2.3 Clonado de los productos obtenidos</b>	<b>20</b>
2.3.1 Reacción de ligación	20
2.3.2 Competencia de las bacterias	22
2.3.3 Transformación de las bacterias	22
2.3.4 Preservación de transformantes y purificación de plásmidos	23
2.3.5 Secuenciación y análisis de las secuencias	24
2.3.6 Designación de secuencias	24
<b>2.4 Identificación del patrón de expresión de los genes coriónicos usando oligonucleótidos degenerados</b>	<b>25</b>
<b>2.5 Amplificación en tiempo final con oligonucleótidos específicos</b>	<b>25</b>
2.5.1 Diseño de oligonucleótidos específicos	25
2.5.2 Establecimiento de condiciones de amplificación en tiempo final de los oligonucleótidos específicos	26
2.5.3 Patrón de expresión de los genes coriónicos con oligonucleótidos específicos	26
<b>2.6 Amplificación en tiempo real</b>	<b>28</b>

2.6.1 Puesta a punto de ensayos de amplificación en tiempo real _____	28
<b>2.7 Ensayo de expresión de <i>achzpH</i> y <i>achzpL</i> bajo efecto de estradiol _____</b>	<b>30</b>
2.7.1 Tratamiento de peces con Estradiol _____	30
2.7.2 Procesamiento de muestras de tratamiento con estradiol _____	31
2.7.3 Diluciones de trabajo _____	31
2.7.4 Eficiencia _____	32
2.7.5 Cuantificación relativa de muestras de tratamiento con estradiol _____	32
2.7.6 Control con machos salvajes _____	33
<b>2.8 Ensayo de expresión de <i>achzpL</i> y <i>achzpH</i> bajo efecto de xenoestrógeno _____</b>	<b>33</b>
2.8.1 Tratamiento de peces con xenoestrógeno (Nonilfenol) _____	33
2.8.2 Procesamiento de muestras de Machos salvajes y del tratamiento con el xenoestrógeno (Nonilfenol) _____	33
2.8.3 Diluciones de trabajo del Tratamiento con Nonilfenol _____	34
2.8.4 Cuantificación relativa de muestras de tratamiento con xenoestrógeno (Nonilfenol) _____	34
<b>2.9 Tratamiento estadístico de los datos de amplificación en tiempo real _____</b>	<b>35</b>
<b>2.10 Diseño, producción y purificación de péptidos recombinantes de proteínas ZPs de <i>Austrolebias charrua</i> _____</b>	<b>35</b>
2.10.1 Diseño de vector de expresión _____	35
2.10.2 Amplificación y purificación de los productos para la recombinación _____	37
2.10.3 Recombinación, transformación y confirmación _____	39
2.10.4 Expresión de péptido recombinante en <i>E. coli</i> NEB 5alpha _____	41
2.10.4.1 Ensayo I de expresión en <i>E. coli</i> NEB 5alpha _____	41
2.10.4.1a Cromatografía de afinidad con Glutation-agarosa-GST _____	42
2.10.4.1b Electroforesis en Acrilamida 12 % _____	43
2.10.4.2 Ensayo II de expresión en células <i>E. coli</i> NEB 5alpha _____	43
2.10.4.3 Cromatografía de Afinidad por Ión Metálico Inmovilizado (IMAC) _____	44
2.10.5 Expresión de péptido recombinante en <i>E. coli</i> BL21 (STAR) _____	45
2.10.5.1 Transformación de bacterias <i>E. coli</i> BL21 (STAR) _____	45
2.10.5.2 Expresión en <i>E. coli</i> BL21 (STAR) _____	46
2.10.5.2a Fraccionamiento y purificación _____	46
2.10.5.2b Solubilización de Fracción Insoluble zPLGEX 5 con gradiente de Urea _____	47
2.10.5.2c Cromatografía de Afinidad por Ión Metálico Inmovilizado (IMAC) de Fracción Insoluble zPLGEX 5 37°C _____	47
2.10.5.2d Renaturalización de ZPLGEX en IMAC con gradiente de Urea _____	48
2.10.5e Concentración y lavado de Imidazol _____	48
2.10.6 Ensayo de expresión de ZPLGEX y solubilización en Cloruro de Guanidinio _____	48
2.10.6a Renaturalización por Shock, dilución 1:10 _____	49
2.10.6b Segunda renaturalización por Shock, dilución 1:10 _____	50
2.10.6c Cromatografía de Afinidad por Ión Metálico Inmovilizado (IMAC) en AKTA _____	50
2.10.7 Producción de anticuerpos _____	50
<b>3 RESULTADOS Y DISCUSIÓN _____</b>	<b>51</b>
<b>3.1 Identificación de genes coriónicos en <i>Austrolebias charrua</i> _____</b>	<b>51</b>
3.1.1 Estimación de la calidad y concentración del ARN total _____	51
3.1.2 Evaluación de la síntesis del ADNc _____	52
3.1.3 Amplificación en tiempo final con oligonucleótidos degenerados para Coriogenina H _____	53
3.1.4 Amplificación en tiempo final con oligonucleótidos degenerados para Coriogenina L _____	54
3.1.5 Purificación de los productos obtenidos _____	55
3.1.6 Secuenciación directa de los productos de amplificación _____	56
3.1.7 Identificación de las secuencias obtenidas _____	57
3.1.7a Secuencia obtenida con oligonucleótidos para Coriogenina H _____	57

3.1.7b Secuencia obtenida con oligonucleótidos para Coriogenina L _____	58
3.1.7c Secuencia obtenida con oligonucleótidos heterólogos para actina _____	59
3.1.7d Identificación y designación de secuencias _____	59
3.1.8 Obtención de los clones de pJET-achzpH y pJET-achzpL _____	60
<b>3.2 Análisis de las secuencias obtenidas _____</b>	<b>64</b>
3.2.1 Análisis de las secuencias con Clustal X _____	64
3.2.2 Análisis filogenéticos _____	66
3.2.2a Análisis filogenéticos de <i>achzpH</i> _____	66
3.2.2b Análisis filogenéticos de <i>achzpL</i> _____	67
3.2.2c Análisis filogenéticos combinados para <i>achzpH</i> y <i>achzpL</i> _____	68
<b>3.3 Identificación del patrón de expresión de los genes coriónicos en diferentes estadios del ciclo de vida, usando oligonucleótidos degenerados _____</b>	<b>71</b>
<b>3.4 Caracterización de expresión de <i>achzpH</i> y <i>achzpL</i> con oligonucleótidos específicos _____</b>	<b>77</b>
3.4.1 Diseño de oligonucleótidos específicos _____	77
3.4.2 Identificación de patrón de expresión de los genes coriónicos usando oligonucleótidos específicos _____	78
3.4.3 Patrón de expresión de genes coriónicos en machos _____	82
<b>3.5 Amplificación en tiempo real _____</b>	<b>84</b>
3.5.1 Puesta a punto de ensayos de amplificación en tiempo real _____	84
<b>3.6 Expresión relativa de genes coriónicos en el tratamiento con estradiol _____</b>	<b>85</b>
3.6.1 Expresión de <i>achzpL</i> y <i>achzpH</i> en hígados de hembras luego del tratamiento con estradiol _____	86
3.6.2 Expresión de <i>achzpL</i> y <i>achzpH</i> en hígados de machos luego del tratamiento con estradiol _____	87
<b>3.7 Expresión relativa de genes coriónicos en el tratamiento con nonilfenol _____</b>	<b>89</b>
3.7.1 Expresión de <i>achzpL</i> y <i>achzpH</i> en hígados de hembras luego del tratamiento con nonilfenol _____	89
3.7.2 Expresión de <i>achzpH</i> y <i>achzpL</i> en hígados de machos luego del tratamiento con nonilfenol _____	90
3.7.2a Expresión de <i>achzpH</i> en hígados de machos luego del tratamiento con nonilfenol _____	90
3.7.2b Expresión de <i>achzpL</i> en hígados de machos luego del tratamiento con nonilfenol _____	92
3.7.3 Comparación de <i>achzpL</i> y <i>achzpH</i> entre controles de tratamientos de estradiol y nonilfenol _____	93
3.7.3a Comparación de <i>achzpL</i> y <i>achzpH</i> en hígados de hembras en controles de tratamientos de estradiol y nonilfenol _____	93
3.7.3b Comparación de <i>achzpH</i> y <i>achzpL</i> en hígados de machos no tratados _____	95
<b>3.8 Diseño, producción y purificación de péptidos recombinantes de proteínas ZPs de <i>Austrolebias charrua</i> _____</b>	<b>100</b>
3.8.1 Resultados del diseño de vector de expresión _____	100
3.8.1a Oligonucleótidos de <i>achzpL</i> y <i>achzpH</i> con adaptadores de recombinación _____	100
3.8.1b Oligonucleótidos de amplificación y modificación del vector de expresión _____	100
3.8.2 Amplificación de insertos y vector de expresión y recombinación _____	101
3.8.2a Amplificación de insertos _____	101
3.8.2b Amplificación y modificación de vector _____	102
3.8.2c Purificación de insertos y vector de expresión modificado _____	102
3.8.2d Recombinación homóloga <i>in vitro</i> _____	103
3.8.3 Transformación, selección y confirmación de clones _____	104
3.8.3a Transformación de bacterias <i>E. coli</i> NEB 5alpha _____	104
3.8.3b Purificación y confirmación parcial de clones _____	104
3.8.3c Confirmación de clones por secuenciación de clones recombinantes _____	106
3.8.4 Ensayos de expresión en células <i>E. coli</i> NEB 5alpha _____	106
3.8.4a Ensayo I de expresión en el clon zpLGEX 7 <i>E. coli</i> NEB 5alpha _____	107
3.8.4b Ensayo I de expresión en el clon zpHGEX 7 <i>E. coli</i> NEB 5alpha _____	108
3.8.4c Ensayo II de expresión en el clon zpHGEX 7 <i>E. coli</i> NEB 5alpha _____	110

3.8.5 Transformación, purificación y confirmación de clones de <i>E. coli</i> BL21 (STAR)	111
3.8.5a Transformación de bacterias <i>E. coli</i> BL21 (STAR)	111
3.8.6 Ensayos de expresión en células <i>E. coli</i> BL21 (STAR)	113
3.8.6a Ensayo I de expresión en el clon zpLGEX 5 <i>E. coli</i> BL21 (STAR)	113
3.8.6b Confirmación de banda proteica purificada por Espectrometría de Masa	114
3.8.6c Cuantificación de ZPLGEX obtenida en Ensayo I de expresión en <i>E. coli</i> BL21 (STAR)	116
3.8.6d Purificación mediante IMAC de ZPLGEX obtenida con urea 6M en Ensayo I de expresión en <i>E. coli</i> BL21 (STAR)	116
3.8.7 Ensayo de expresión de ZPLGEX y solubilización en Cloruro de Guanidinio	117
<b>4 CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS</b>	<b>120</b>
<b>5 REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b>	<b>125</b>
<b>APÉNDICES</b>	<b>I</b>
<b>Apéndice I: Soluciones utilizadas y medios de cultivo</b>	<b>I</b>
<b>Apéndice II: Informe del Análisis de Espectrometría de masa</b>	<b>V</b>

## RESUMEN

“Hacia la evaluación del corion de los peces como biomarcador de contaminación. Identificación y análisis del patrón de expresión de los genes coriónicos en peces anuales del género *Austrolebias*.”

*Lic. Nicolás Gabriel Papa Rodríguez*

La envoltura vitelina del ovocito de teleósteos, está compuesta por glicoproteínas (coriogeninas, ZPs), cuya síntesis involucra dos tipos de genes *zp* identificados en este grupo. Estos se distinguen por su expresión en el ovario, en el hígado (regulada por estrógenos) o en ambos, dependiendo de la especie. La síntesis de ZPs, así como la organización de la envoltura es afectada por contaminantes acuáticos (especialmente xenoestrógenos), habiendo sido señalada como un biomarcador de gran sensibilidad en diferentes especies. En el marco de esta tesis de Maestría en Biología Celular y Molecular PEDECIBA se han identificado y caracterizado mediante RT-PCR, dos fragmentos de genes *zp* en el pez anual *Austrolebias charrua*: *achzpL* y *achzpH* (con secuencias aminoacídicas deducidas con identidad entre 65 y 80% con ZPs de peces de diversos órdenes), ambos expresados en el hígado. Con el objetivo de explorar si existe regulación estrogénica en la expresión de estos genes, se trataron ejemplares adultos machos y hembras, mantenidos en condiciones de laboratorio, con dos concentraciones de estradiol, 14 y 200 ng/L. Asimismo, se realizaron tratamientos con el xenoestrógeno nonilfenol (8 y 64 µg/L) en machos y hembras provenientes de la naturaleza, con el objetivo de identificar si ocurren alteraciones de expresión en los genes *zp* en relación a este contaminante. Las muestras de hígado de los ejemplares tratados y controles se analizaron mediante amplificación en tiempo real (qPCR). Los resultados de estos experimentos mostraron diferencias significativas entre las expresiones relativas de los ARNm de *achzpL* y *achzpH*, principalmente en los hígados de machos en ambos tratamientos. Se discuten las alteraciones de expresión observadas en ejemplares cultivados en condiciones de laboratorio respecto a ejemplares procedentes de los charcos. Los resultados sugieren que existe regulación estrogénica y que el contaminante nonilfenol tendría la capacidad de alterar la expresión de los genes *zp*. En este sentido y con el interés en profundizar a nivel de expresión y distribución de las coriogeninas de *A. charrua*, se abordó la producción de péptidos recombinantes con el objetivo de generar anticuerpos que permitan detectar cambios en la organización, cantidad y/o distribución de estas proteínas bajo los efectos de los xenoestrógenos. Para ello se diseñaron y generaron vectores de expresión por recombinación homóloga *in vitro* y se establecieron las condiciones de producción y purificación de los péptidos recombinantes ZPLGEX y ZPHGEX (péptido de *achzpL* y *achzpH*, respectivamente, unidos a Glutación-transferasa). A partir de los datos obtenidos se plantea diseñar herramientas moleculares que puedan ser utilizadas en programas de monitoreo ambiental, donde no sólo contribuyan a la protección de la biodiversidad en el área de distribución de *A. charrua* (zona declarada reserva de la Biosfera - sitio Ramsar), sino que sea aplicable a otros ambientes dulceacuícolas.

# 1 INTRODUCCION

## 1.1 Biomarcadores de contaminación por xenoestrógenos

Gran cantidad de las actividades humanas generan contaminación con efectos adversos sobre su propia salud y sobre la naturaleza en general, motivando preocupación creciente a nivel mundial y presión sobre las autoridades encargadas de la salud pública y ambiental. Entre los contaminantes generados se destacan los perturbadores endócrinos, también conocidos como xenoestrógenos, por la capacidad de alterar la regulación endócrina de los organismos. Estos compuestos, resultado de actividades domésticas e industriales, se unen a los receptores celulares de estrógenos o andrógenos interfiriendo con la acción de las hormonas esteroideas propias de cada individuo (Fujita y col. 2004). Los xenoestrógenos actúan en forma catastrófica en momentos críticos del ciclo de vida siendo algunos de los más sensibles: la reproducción y el desarrollo embrionario, ya que alteraciones en estas etapas tienen gran repercusión sobre la población (Denslow y Sepúlveda, 2007). Los efectos adversos pueden demostrarse desde el nivel celular y molecular hasta el poblacional (Arcand-hoy y Benson, 1998; Devlin y Nagahama, 2002; Arukwe y Goksøyr, 2003). Dentro de esta problemática es de gran interés, la contaminación de las masas de agua por estos compuestos y la búsqueda de monitores que permitan una detección precoz.

En particular los peces teleósteos están siendo investigados como posibles indicadores de salud ambiental tanto por el impacto que sobre su reproducción provocan algunos contaminantes, como por la versatilidad de manejo que poseen varias especies. En este sentido, las tecnologías que detectan bajas concentraciones de contaminantes en forma rápida (horas o días) resultan ser imprescindibles para identificar biomarcadores sensibles a fin de determinar niveles basales de contaminación, que permitan actuar antes que la salud del ecosistema se vea alterada (Denslow y Sepúlveda, 2007). Actualmente se destacan dos grupos de proteínas involucradas en la reproducción que son potenciales biomarcadores de contaminación del ambiente acuático por xenoestrógenos: la vitelogenina, principal precursora del vitelo de ovocitos de peces y otros vertebrados, y las proteínas de la envoltura coriónica, cubierta ovocitaria o corion del gameto femenino de los peces teleósteos (Celius y col. 2000; Arukwe y Goksøyr, 2003; Yu y col. 2006). Ambos grupos de proteínas se sintetizan en el hígado bajo la regulación del estradiol (en el caso de las proteínas de la envoltura coriónica esta condición se cumple para la mayoría de las especies, ver sección

1.5) y viajan por la sangre hasta los ovocitos en formación. Comparando ambos grupos de proteínas, se destacan las de la envoltura ovocitaria porque su síntesis precede a la expresión de la vitelogenina y se ha demostrado en algunas especies de peces la pronta respuesta de los respectivos genes, señalando que serían indicadores más tempranos y sensibles a la acción de contaminantes que los genes de vitelogenina (Celius y Walther, 1998; Berois y col. 2007). En este sentido se han realizado varios trabajos en diferentes teleósteos midiendo alteraciones de expresión bajo la acción de estradiol y de xenoestrógenos (Hyllner y col. 2001; Arukwe y col. 1997, 2000, 2002; Berg y col. 2004; Modig y col. 2006; Rhee y col. 2009). Las nuevas tecnologías (genómica, transcryptómica y proteómica) 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). Los principales abordajes han sido la cuantificación del ARNm producto de estos genes (Hyllner y col. 2001; Modig y col. 2006; Yu y col. 2006; Chen y col. 2008) y la cuantificación de las proteínas resultantes (Larsson y col. 1994; Fujita y col. 2002, 2004; Ferraz y col. 2007; Prakash y col. 2007; Hong y col. 2009; Brander y col. 2012).

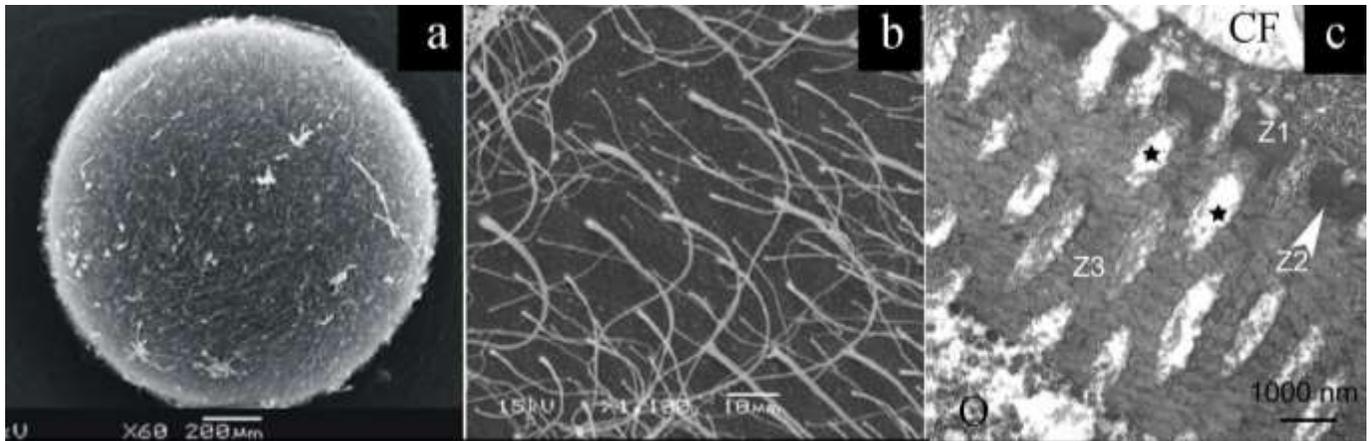
## **1.2 Envoltura coriónica en peces teleósteos**

Durante el proceso de formación de los gametos femeninos de los 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 esta cubierta está involucrada en varios roles durante la fecundación y el desarrollo temprano. Durante la fecundación podría participar en el reconocimiento especie-específico entre ovocitos y espermatozoides, así como la orientación de estos últimos hacia el micrópilo (Yanagimachi y col. 2013). Su rol en el bloqueo de la poliespermia dependería de reordenamientos estructurales de la cubierta coriónica luego de la liberación de los gránulos corticales (Dumont y Brummet, 1980; Kudo, 1980; Shibata y col. 2000, 2012). Durante el desarrollo embrionario protege al embrión y permite la difusión de gases y productos metabólicos de desecho (Iconomidou y col. 2000a). 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, vitelogénesis total y maduración (Selman y Wallace, 1983a,b; Berois y col, 2004). La deposición de la cubierta comienza durante la etapa de vitelogénesis lipídica, depositándose desde la superficie ovocitaria en forma sucesiva en diferentes capas formando 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, desde afuera hacia adentro, zona radial externa, intermedia e interna, o Z1, Z2 y Z3 respectivamente (Fig. 1c). (Guraya, 1986; Arezo y col. 2007; Berois y col. 2007; Rodao y col. 2015). A medida que se van depositando las sucesivas capas, quedan canales que atraviesan toda la envoltura y que contienen microvellosidades de la membrana celular ovocitaria en yuxtaposición con similares proyecciones de las células foliculares (Fig. 1c) (Tesoriero, 1977, 1978; Wallace y Selman, 1981; Arezo y col. 2007; Berois y col. 2007; Rodao y col. 2015).

Las características ultraestructurales de la superficie coriónica de los ovocitos ovulados pueden correlacionarse con la condición de pelágico o demersal del ovocito. (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 (Fig. 1 a y b) (Johnson y Werner, 1986; Loureiro y de Sá, 1996; Li, Wu y Yang, 2000; García y col. 2009).



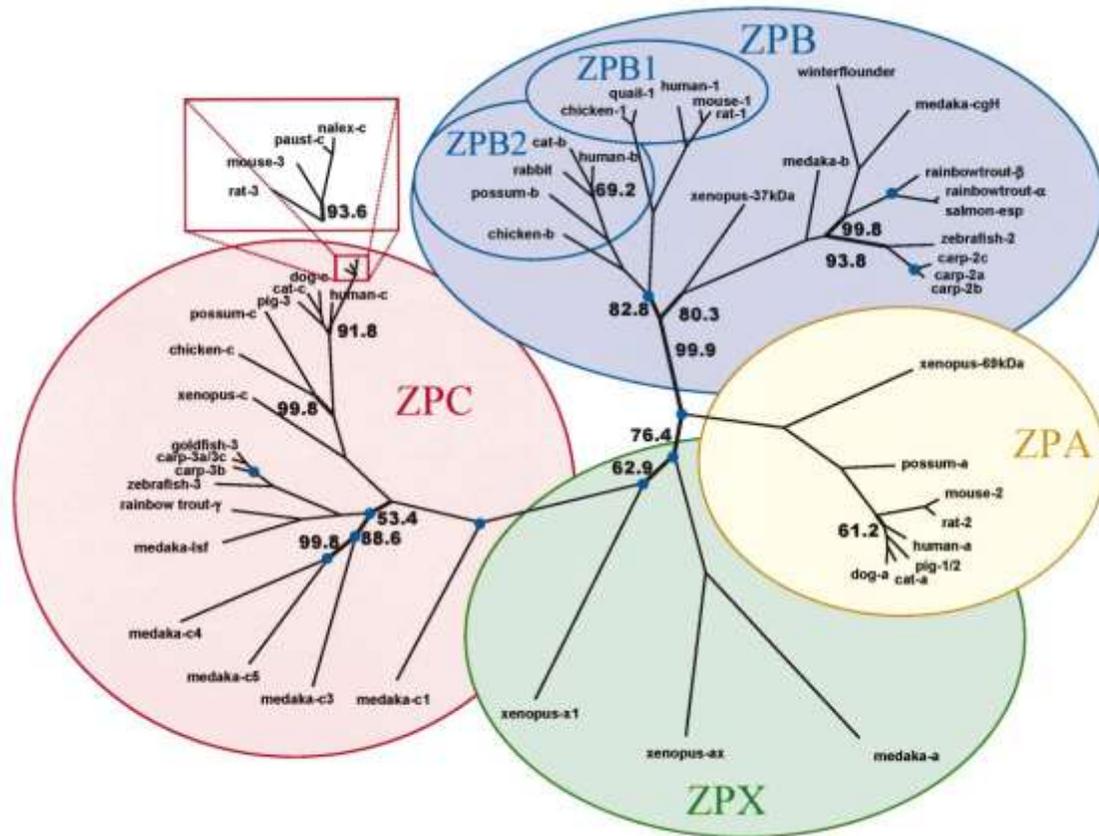
**Figura 1.** a. b. Superficie coriónica de ovocito de *A. charrua* analizada mediante microscopía electrónica de barrido. c. Microscopía electrónica de transmisión de la envoltura coriónica de *A. charrua* mostrando sus tres capas: zona radiata externa (Z1), zona intermedia (Z2) más electrodensa que la anterior, y zona radiata interna heterogénea (Z3). Se observan también parte de una célula folicular (CF), citoplasma ovocitario (O) microvellosidades en los canales (estrellas). Adaptado de Arezo y col. 2007.

### 1.3 Proteínas coriónicas

Múltiples estudios han comparado el perfil bioquímico de la cubierta coriónica de diferentes especies de teleosteos 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. 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; Iconomidou y col. 2000b; Spargo y Hope, 2003; 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. La nomenclatura permanece ambigua respecto a la denominación de estas proteínas (coriogeninas, ChP; proteínas zona pelúcida, ZP; proteínas de zona radiata, ZRP; ó proteínas de envoltura vitelina VEP). Asimismo, en vertebrados es posible identificar cuatro grupos, 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; Spargo y Hope, 2003; Smith y col. 2005; Listcher y Wassarman, 2007).



**Figura 2.** Árbol filogenético de la familia de genes de proteínas ZP con subfamilias etiquetadas ZPA, ZPB, ZPC, y ZPX. Dentro de la subfamilia ZPB se destacan los grupos ZPB1 y ZPB2 (Spargo y Hope, 2003).

### 1.4 Dominio ZP

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

La presencia del dominio ZP no se limita a proteínas de la envoltura coriónica de los vertebrados, sino que se ha identificado en cientos de proteínas extracelulares con funciones diversas en una amplia variedad de tejidos en mamíferos, anfibios, aves, peces, insectos, gusanos, moluscos y tunicados (Jovine y col. 2002b, 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, funcionando como un "módulo de polimerización" (Jovine y col. 2002b). Dividido en dos sub-dominios, N-terminal y C-terminal, se ha sugerido que el primero es responsable de la polimerización, mientras que el sub-dominio C-terminal sería el responsable de regular las interacciones proteína-proteína (Jovine y col. 2005, 2006a,b). Asimismo, algunos autores proponen a estos polímeros como filamentos amiloides naturales presentes en matrices extracelulares o en cubiertas como la envoltura vitelina ovocitaria (Iconomidou y col. 2000; Hamodrakas y col. 2004; Louros y col. 2013).

### **1.5 Genes coriónicos**

A partir de datos ultraestructurales de la ovogénesis del pez medaka (*Oryzias latipes*), se propuso la idea que la cubierta era secretada por el ovocito y por lo tanto en esta célula se expresarían los genes coriónicos (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 (Hyllner y col. 1991, 1992, 2001; Celius y col. 2000; Arukwe y col. 2002). A partir de este hallazgo, ampliado posteriormente por diferentes investigadores a otras especies, se generalizó el concepto de 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. 1992a,b; Hyllner y Haux, 1992; Lyons y col. 1993; Murata y col. 1997; 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 las diferentes clases de 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). Sin embargo, 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 (Conner y Hughes, 2003). Esta diferencia estaría relacionada con el patrón de evolución en las diferentes ramas de peces teleósteos.

## 1.6 Modelo biológico

Los peces anuales (Cyprinodontiformes, Aplocheiloidei) son teleósteos de agua dulce con un ciclo de vida muy breve (aproximadamente 10 meses o menos dependiendo del género y lugar que habitan) que están expuestos a un ambiente extremadamente variable. Se los encuentra en América del Sur y África. Los ejemplares juveniles y adultos habitan masas de aguas temporales que se secan totalmente en la estación seca (Fig. 3 a y b) con la consiguiente muerte de los ejemplares adultos, mientras que los embriones resistentes a la desecación quedan enterrados en el sustrato seco del charco. En la estación lluviosa siguiente, cuando las lluvias vuelven a llenar los charcos, los embriones eclosionan; en pocas semanas los alevines crecen y llegan a la etapa reproductiva, comenzando así un nuevo ciclo de vida anual (Fig. 3). La plasticidad de estas especies es asombrosa y se expresa a diferentes niveles del ciclo de vida. En este sentido, la supervivencia de las especies depende enteramente de los embriones. Los mismos presentan 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) (Myers, 1952; Wourms, 1964; Berois y col. 2012, 2014, 2015).

Los peces anuales comparten, con otros modelos de teleósteos (pez cebra: *Danio rerio*; medaka: *Oryzias latipes*, etc.), varias características ventajosas para la investigación: oviparidad, transparencia de los huevos y embriones, largos períodos de reproducción, así como la facilidad de mantenimiento en condiciones de laboratorio. No obstante, los peces anuales presentan algunos atributos únicos relacionados con su peculiar ciclo de vida y las características del desarrollo indicadas más arriba.

Dentro de los peces anuales de América del Sur se destaca el género *Austrolebias* (*Cynolebias* sensu Parenti) (Costa, 1998) el cual incluye, hasta el momento, 39 especies distribuidas en la cuenca del Paraná-Plata y en el sistema de lagunas Patos-Merín. Se han descrito más de 20 especies del género *Austrolebias* distribuidas en el territorio uruguayo (Costa, 2006; Loureiro y col. 2011).



**Figura 3.** Ciclo anual de un 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 muestran macho y hembra de *Austrolebias charrua*. b) Charco seco durante el verano, los embriones permanecen en el sustrato. Se muestra un embrión de la misma especie en el estadio pre-eclosión (Berois y col. 2012)

Para la presente Tesis se propone a *Austrolebias charrua* (Costa y Cheffe, 2001) como modelo de estudio tanto en la naturaleza como en el laboratorio, debido a que se trata de una especie endémica del este del Uruguay y sur de Brasil (Fig. 4), asociada a los Bañados del Este del Uruguay (zona declarada Sitio de Reserva de la Biosfera y Sitio Ramsar,

Probides 1999; García y col. 2004), de la cual contamos con detallada información ya que viene siendo estudiada a fondo por nuestro grupo de investigación.

### **1.7 Antecedentes del equipo de trabajo**

El grupo “Biología Celular de la Reproducción y del Desarrollo en Peces” dirigido por la Dra. Nibia Berois, (Sección Biología Celular, Facultad de Ciencias, grupo CSIC N° 898), se ha enfocado en el análisis de diferentes aspectos de la biología reproductiva y del desarrollo de diversas especies de peces (Vizziano y Berois, 1990a,b; Pravia y col. 1995; Lorier y Berois, 1995; Viana y col. 2000). En lo referente a peces anuales, nuestro grupo ha trabajado de forma interdisciplinaria con investigadores de Facultad de Ciencias desde hace más de una década dando lugar al grupo “Biología Evolutiva de Peces Anuales” (grupo CSIC N°1653) que agrupa investigadores de Genética, Zoología, Etología y Biología Celular. Actualmente existen interacciones y proyectos conjuntos con laboratorios de otros países, regionales y de EE.UU. En este marco se han publicado resultados referidos a diferentes tópicos: caracterización del desarrollo embrionario temprano (Arezo y col. 2005), mecanismo de diferenciación del sexo (Arezo y col. 2007), datos referidos a la determinación del sexo (Arezo y col. 2014), tres revisiones desde diferentes abordajes que incluyen el modelo (Berois y col. 2011, 2012, 2014) así como numerosos trabajos en congresos científicos nacionales e internacionales.

Desde el 2013 nuestro grupo de investigación estableció una colaboración con el grupo del Dr. Miguel Allende (Centro de Regulación del Genoma, CRG, Universidad de Chile) Convenio Facultad de Ciencias-CRG Transcriptoma en *Austrolebias* (Consejo Facultad de Ciencias Exp. 240011-002362-13) con el objetivo de describir el repertorio de ARN mensajeros y ARNs no codificantes expresados en los estadios previos, durante y después de las diapausas I y III de *A. charrua*. Se ha logrado ensamblar un transcriptoma preliminar de referencia en *A. charrua*, abordando recientemente la secuenciación del genoma que actualmente se encuentra en proceso de refinamiento del ensamble, análisis y anotación por parte del equipo de bioinformática del CRG.

Finalmente, el esfuerzo conjunto llevó a que el 11 de noviembre de 2015, en el marco del II Simposio Internacional sobre Biología de Peces Anuales, realizado en la Facultad de Ciencias (UdelaR, Montevideo) se presentara el libro “Annual fishes: history life strategy, diversity and evolution” de la Editorial CRC Taylor and Francis Group (USA). Los editores

Nibia Berois, Graciela García y Rafael de Sá (Facultad de Ciencias UdelaR y University of Richmond) reunieron investigadores de diferentes países (Uruguay, Brasil, Estados Unidos, Italia y República Checa) para la publicación de 18 capítulos que abordan un amplio espectro de aspectos referentes a la biología de peces anuales, en donde se han incluido datos de la presente tesis.

### **1.8 Descripción del problema a ser abordado y relevancia del mismo**

En el marco de mi tesina de grado y de un proyecto CSIC, se logró identificar y analizar, mediante RT-PCR, la expresión de dos fragmentos de ADNc de genes coriónicos de *Austrolebias charrua*: *achzpL* y *achzpH* (secuencias aminoacídicas deducidas con identidad entre 65 y 80% con ZPs de peces de diversos órdenes), ambos expresados en el hígado. Como se señaló previamente, esta expresión hepática indicaría una posible regulación por estrógenos.

Para la presente Tesis de Maestría PEDECIBA en Biología Celular y Molecular se plantea: avanzar en la caracterización de la expresión de los genes coriónicos incorporando una aproximación cuantitativa (amplificación en tiempo real o Real time PCR), definir si la expresión de los genes identificados es regulada por estrógenos, y de demostrarse lo anterior, establecer si la contaminación por xenoestrógenos altera el patrón de expresión.

#### ***OBJETIVO GENERAL:***

Caracterizar los genes coriónicos de *A. charrua* para generar herramientas que permitan utilizar el corion de los peces anuales como biomarcador de contaminación.

### **Objetivos específicos:**

**a** - Caracterizar la expresión de los genes coriónicos en *Austrolebias charrua*. Conocer el patrón de expresión espacio temporal de dichos genes. Obtención de proteínas recombinantes para la producción de anticuerpos específicos.

**b**- Explorar si la expresión de los genes identificados es regulada por estrógenos.

**c**- Explorar si los xenoestrógenos alteran la expresión de los genes coriónicos.

Para explorar estos objetivos se realizarán los siguientes abordajes:

**a.1** - Caracterizar las secuencias de ADNc de *A. charrua* obtenidas mediante amplificación en tiempo final usando oligonucleótidos degenerados validados en *O. latipes* (Yu y col. 2006).

**a.2** – Diseño y síntesis de oligonucleótidos específicos con el objetivo de realizar la técnica de amplificación en tiempo real, para estudiar niveles basales de expresión de los ARN mensajeros de proteínas coriónicas con mayor “resolución” que a nivel de amplificación en tiempo final.

**a.3** - Se plantea la producción de proteínas recombinantes para la generación de anticuerpos específicos contra las proteínas coriónicas para aportar información sobre el nivel traduccional del patrón de expresión espacio temporal de *A. charrua*.

**b** - Para explorar si existe regulación por estradiol sobre la expresión de los genes coriónicos identificados, se propone realizar amplificación en tiempo real sobre muestras de tejidos de machos y hembras de *A. charrua* sometidos a un tratamiento con estradiol a diferentes concentraciones, con sus respectivos controles.

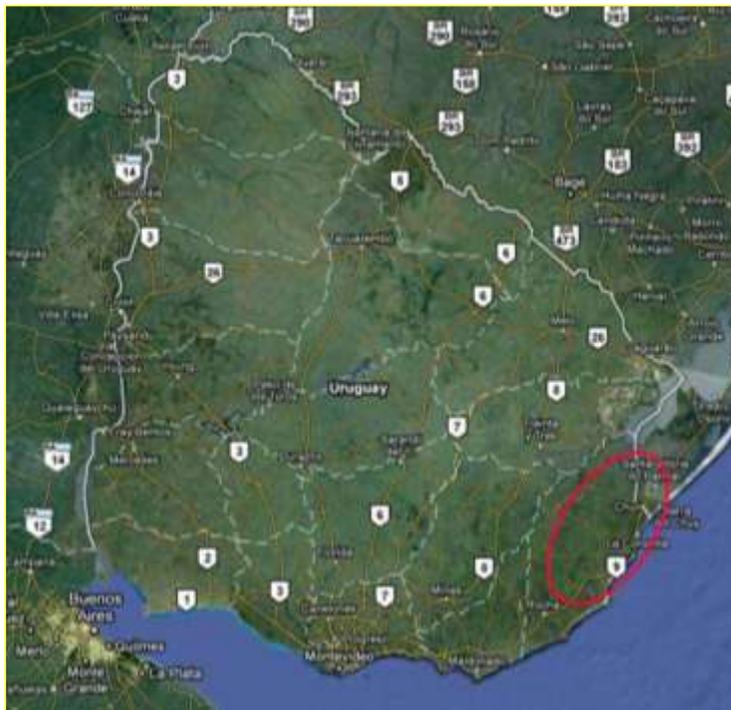
**c** - De confirmar que en la regulación de la expresión de las coriogeninas están implicados los estrógenos, se procederá a repetir el tratamiento con nonilfenol (u otro compuesto xenoestrogénico) y se evaluará el efecto de este mediante la amplificación en tiempo real y los análisis estadísticos pertinentes.

## 2. MATERIALES Y MÉTODOS

### 2.1 Obtención de muestras biológicas

#### 2.1.1 Colecta y mantenimiento de los ejemplares

Peces adultos de *Austrolebias charrua* fueron colectados en charcos temporales del departamento de Rocha, Uruguay, entre los meses de mayo y octubre entre los años 2011 y 2014 (Fig. 3a y 4). Luego del transporte y adaptación a las condiciones de mantenimiento estandarizadas en el Acuario de Facultad de Ciencias (Papa y col. 2015), se mantuvieron en peceras de 20 litros con agua preparada a partir de ósmosis reversa (pH 6,5-7,5 y conductividad entre 300 y 350 $\mu$ S), temperatura ambiente controlada a 19°C y fotoperíodo natural. Los peces se alimentaron diariamente con alimento vivo (*Daphnias sp.* y larvas rojas de mosquito de la familia Chironomidae ó *Tubifex sp.*, dependiendo del diseño experimental). Además de los ejemplares colectados en la naturaleza se ha instrumentado el ciclo completo de esta especie de pez anual, en el acuario de la Facultad de Ciencias, a partir de embriones obtenidos de la reproducción de los individuos colectados previamente en los charcos temporales (Papa y col. 2015).



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

### **2.1.2 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, (Vaz-Ferreira y col. 1964, 1972; García y col. 2008) se entierran en el sustrato y depositan sus huevos.

Los embriones de cada cruzamiento fueron colectados del recipiente utilizando una pipeta plástica y se limpiaron por rodamiento sobre papel de filtro húmedo con agua declorinada. Luego, fueron colocados en placas de *Petri*, o en placas Nunclon, debidamente identificados en cada pozo, en solución de Yamamoto (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) y cultivados a 25 °C en oscuridad. Para la observación se utilizaron cámaras especialmente diseñadas para su observación (1,7 mm de profundidad, fabricadas en portaobjetos con varias capas de cinta aisladora), mediante un microscopio fotónico Olympus Vanox. Utilizando un cubreobjetos, que está en contacto con la superficie del embrión a observar, se realizó la rotación del mismo para optimizar el análisis del estadio del desarrollo. Los embriones seleccionados se clasificaron según Arezo y col. (2005).

## **2.2 Análisis moleculares**

### **2.2.1 Fijación y aislamiento de ARN**

La totalidad de los ejemplares adultos procesados (Tablas 1, 6 y 10) fueron sacrificados por inmersión en 2-fenoxietanol 5 ppm utilizando un protocolo habilitado por la Comisión Honoraria de Experimentación Animal, (CHEA). Inmediatamente después de corroborar la muerte de los ejemplares se efectuó la disección en condiciones libres de ribonucleasas (ARNasas). Se retiró el hígado a cada ejemplar, así como las gónadas, 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. Con respecto a los embriones y luego de seleccionar los estadios de interés, se colocaron 8 embriones por tubo, utilizando 500 µL de TRIZOL. Luego de la inmersión en TRIZOL de cada muestra de tejido, alevines y embriones, se homogeneizó por separado, se mantuvo 20 minutos a temperatura ambiente y se almacenó a -20°C hasta ser utilizada.

El aislamiento del ARN total de los tejidos, se realizó según las recomendaciones del fabricante, con adaptaciones del protocolo para optimizar rendimiento. 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 aumentar la eficiencia de extracción) 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 entre 55 y 60°C durante 10 minutos en bloque térmico (AccuBlock digital Dry Bath Labnet).

### 2.2.2 Estimación de la calidad y concentración del ARN obtenido

La integridad del ARN fue controlada mediante electroforesis en gel de agarosa al 1% en solución tampón TAE 1X (Tris-Acetato 40 mM; 1mM de EDTA; ph 8.0). 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 se utilizó GelRed™ 1X (Biotum) integrado en el gel, observando en un transiluminador ultravioleta.

Muestras procesadas para análisis de patrón de expresión:

Muestras	N° de individuos/tubo	TRIZOL (µL)	Cloroformo (µL)	Isopropanol (µL)	Vol. Final (µL)
Hígado de Hembra adulta	1	800	160	400	30
Ovario de hembra adulta	1	800	160	400	30

**Tabla 1.** Muestras analizadas y volúmenes de sustancias utilizadas para el aislamiento de ARN

### 2.2.3 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) para eliminar posibles trazas de ADN genómico en las muestras. Para ello se utilizaron alícuotas de entre 10 y 15 µL de las muestras provenientes de la extracción de ARN previamente descrita, a las

que se agregó 2  $\mu\text{L}$  de la solución tampón 10X (200mM Tris-HCl pH8,4, 20mM  $\text{MgCl}_2$ , 500mM KCl), 2  $\mu\text{L}$  de enzima ADNasa I (Invitrogen) y agua Amresco libre de ARNasas hasta completar los 20  $\mu\text{L}$ . La mezcla de reacción se agitó suavemente y se incubó por 60 minutos a 37°C. Culminado este tiempo, para la precipitación del ARN se agregaron, 20  $\mu\text{L}$  de agua libre de nucleadas, 4  $\mu\text{L}$  de Cloruro de Litio 4M, 1  $\mu\text{L}$  de dextrano y 90  $\mu\text{L}$  de etanol absoluto. Con el objetivo de acelerar la precipitación, se sumergieron los tubos Eppendorf por 2 segundos en nitrógeno líquido (adaptado de Ausubel y col, 1992). Luego se centrifugó a 4°C, 10.000g, por 30 minutos, se descartó el sobrenadante y lavaron los pellets con 500  $\mu\text{L}$  de etanol 70%. Finalmente se centrifugó nuevamente 4°C y 10.000g, por 5 minutos y se descartó el sobrenadante. Los pellets se secaron bajo lámpara incandescente, se resuspendieron y se sometieron a electroforesis, como en el paso anterior. Se registró la integridad del ARN total mediante fotografía digital de los geles en transiluminador ultravioleta.

Las concentraciones de los ARNs obtenidos fueron medidas con Nanodrop en el Institut Pasteur Montevideo (IP-Montevideo).

Inicialmente el ARN se almacenó a -20°C por un máximo de cuatro días, para luego pasarlo o a -80°C, temperatura que permite mantener al ARN por períodos prolongados.

#### **2.2.4 Retrotranscripción. Síntesis de ADNc**

Para la retrotranscripción se utilizó la enzima Superscript III Reverse transcriptase (Invitrogen) siguiendo el protocolo recomendado por el fabricante. Se incubó durante 5 minutos a 65°C la mezcla de: ARN total (10pg a 5 $\mu\text{g}$ ) con 1 $\mu\text{L}$  de oligo (dT)<sub>20</sub> 50  $\mu\text{M}$  (Invitrogen), 1 $\mu\text{L}$  de dNTPs 10 mM y agua Amresco libre de ARNasas hasta completar 13 $\mu\text{L}$ . Se colocó la mezcla 1 minuto en hielo y se adicionaron: 4 $\mu\text{L}$  de solución tampón 5X, 1 $\mu\text{L}$  DTT 0,1M, 1 $\mu\text{L}$  RNaseOUT (inhibidor de ARNasas Invitrogen), 1 $\mu\text{L}$  de enzima retrotranscriptasa. Por último, la reacción se produjo en el termociclador a 50°C durante 1hora y se finalizó inactivando la enzima a 70°C durante 15 minutos. Para el proceso se utilizó un termociclador Multigene II, de Labnet International, Inc.

#### **2.2.5 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 altamente

conservada del gen de la  $\beta$  Actina (número de acceso del GenBank AF057040, Barralo y col. 1999). Al utilizar estos oligonucleótidos en otra especie, como *Austrolebias charrua* en este caso, se los denomina heterólogos.

$\beta$ -actina-RSA-1: 5' GCCGGTTTTGCTGGAGATGAT 3' Tm: 70 °C

$\beta$ -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:

<i>Actina RSA</i>		
	<i>Temp (°C)</i>	<i>Tiempo</i>
Desnaturalización inicial	94	3 min
Desnaturalización	94	30 seg
Hibridación	55	30 seg
Extensión	72	1 min
<b>Ciclos</b>	<b>32</b>	
Extensión final	72	7 min

**Tabla 2.** Programa para oligonucleótidos de Actina RSA en Termociclador MultiGene II

La mezcla de reacción se realizó calculando un tubo por cada muestra, más un tubo control y sumando un 10% de cada reactivo por posibles errores de pipeteo. El volumen de reactivo para cada tubo fue:

<b>Reactivo</b>	<b>Vol./ tubo (<math>\mu</math>L)</b>
<b>Agua Amresco</b>	9,9
<b>Buffer Taq 10X</b>	1,5
<b>Cloruro de Magnesio 50 mM</b>	0,6
<b>dNTPs 10 mM</b>	0,3
<b>Oligo F 10 <math>\mu</math>M</b>	0,5
<b>Oligo R 10 <math>\mu</math>M</b>	0,5
<b>Taq DNA polimerase 5U/<math>\mu</math>L (Invitogen)</b>	0,2
<b>Volumen por tubo</b>	<b>13,5</b>

**Tabla 3.** Volúmenes utilizados en amplificación con oligonucleótidos de Actina RSA en Termociclador MultiGeneII

Luego de distribuir 13,5 µL de la mezcla de reacción en cada tubo, se agregó 1,5 de cada ADN copia a evaluar. Se preparó un control negativo de la reacción agregando 1,5 µL de agua Amresco, para descartar posibles contaminantes en los reactivos utilizados en la mezcla de reacción. El volumen final de reacción fue de 15 µL. Estos mismos reactivos se utilizarán para todos los ensayos de amplificación en tiempo final.

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) en transiluminador ultravioleta, con posterior registro fotográfico. Como control de reacción se realizó la amplificación en las condiciones antes mencionadas usando ADN genómico como molde. Para la confirmación de la especificidad de los productos obtenidos a partir de ADN copia, se efectuó el recorte de banda, purificación y secuenciación según se explica en sección 2.2.7 y 2.2.8.

### 2.2.6 Amplificación in vitro e identificación de los genes de interés

El ensayo de amplificación de los genes de coriogeninas se realizó con los oligonucleótidos degenerados diseñados por Yu y col. (2006) validados en *Oryzias latipes*:

Oligonucleótidos degenerados para Coriogenina H

*ChgH-F*: 5'ACN GTN CAR TGY ACI AAR GAY 3' Tm: 55,6 °C

*ChgH-R*: 5'RTC NAC RAA NGT RAA CAT YTT 3' Tm: 49,5 °C

Oligonucleótidos degenerados para Coriogenina L

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

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

Las equivalencias de bases nitrogenadas para la síntesis de oligonucleótidos degenerados son: *M=AC*, *R=AG*, *Y=CT*, *I=Deoxy Inosina* y *N= ACGT*

Las reacciones se llevaron a cabo en Termociclador Multigene II, bajo condiciones de amplificación similares a las del punto previo. La mezcla de reacción se calculó manteniendo las cantidades para cada tubo según tabla 4, teniendo en cuenta el control negativo y el 10% de error de pipeteo. Se incorporó al final 1,5 µL de cada ADN copia a evaluar. Al control negativo de la reacción se le agregó 1,5 µL de agua Amresco sustituyendo

el ADNc para descartar posibles contaminantes en los reactivos utilizados. El volumen final de reacción fue de 15 µL.

Reactivo	Vol./ tubo (µL)
Agua Amresco	9,9
Buffer <i>Taq</i> 10X	1,5
Cloruro de Magnesio 50 mM	0,6
dNTPs 10 mM	0,3
Oligo F 10 µM	0,5
Oligo R 10 µM	0,5
<i>Taq</i> DNA polimerase 5U/µL (Invitogen)	0,2
<b>Volumen por tubo</b>	<b>13,5</b>

**Tabla 4.** Volúmenes utilizados en amplificación con oligonucleótidos de Coriogeninas en Termociclador MultiGeneII

Programas utilizados para ambos pares de oligonucleótidos degenerados

	<i>Coriogenina H</i>		<i>Coriogenina L</i>	
	<i>Temp (°C)</i>	<i>Tiempo</i>	<i>Temp (°C)</i>	<i>Tiempo</i>
Desnaturalización inicial	94	3 min	94	3 min
Desnaturalización	94	30 seg	94	30 seg
Hibridación	48	45 seg	52	45 seg
Extensión	72	1 min	72	1 min
<b>Ciclos</b>	<b>32</b>		<b>32</b>	
Extensión final	72	10 min	72	10min

**Tabla 5.** Programa para oligonucleótidos para Coriogeninas en Termociclador MultiGeneII

Para el caso de la amplificación de los ADNc de hígado de hembra adulta y de ovario adulto se realizaron duplicados con tejidos de otra hembra.

En la amplificación con los oligonucleótidos de Coriogenina H se realizó una reamplificación a partir de una dilución 1:20 del producto de la primera amplificación. Para ello se repitió la composición de la mezcla de reacción y el programa de amplificación, variando solo la temperatura de hibridación la cual se aumentó en un grado, quedando en 49°C.

Los productos de las reacciones de amplificación se analizaron en geles de Agarosa (Biotools) en TAE 1X, al 1% para los oligonucleótidos de Coriogenina H y 1,5% para los de Coriogenina L. La electroforesis se realizó a 80 V durante 30 minutos, visualizándose al final mediante el agente intercalante GelRed™ 1X (Biotum) en transiluminador ultravioleta, con posterior registro fotográfico.

### **2.2.7 Purificación de los productos obtenidos**

Se realizaron réplicas por triplicado de aquellas muestras en las que se obtuvieron las bandas de interés y se sometieron a electroforesis en las condiciones antes mencionadas. Las bandas se recortaron con pipetas Pasteur de plástico irradiadas con UV, usándolas como sacabocado, y luego se purificaron con el kit de purificación GFX PCR DNA Gel Band purification kit (G. Electric) según las especificaciones del fabricante.

### **2.2.8 Secuenciación y análisis preliminar**

Los productos de amplificación purificados se enviaron a secuenciar, utilizando para ambos casos los oligonucleótidos F y R, al Servicio de Secuenciación del IP-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).

### **2.2.9 Designación de secuencias**

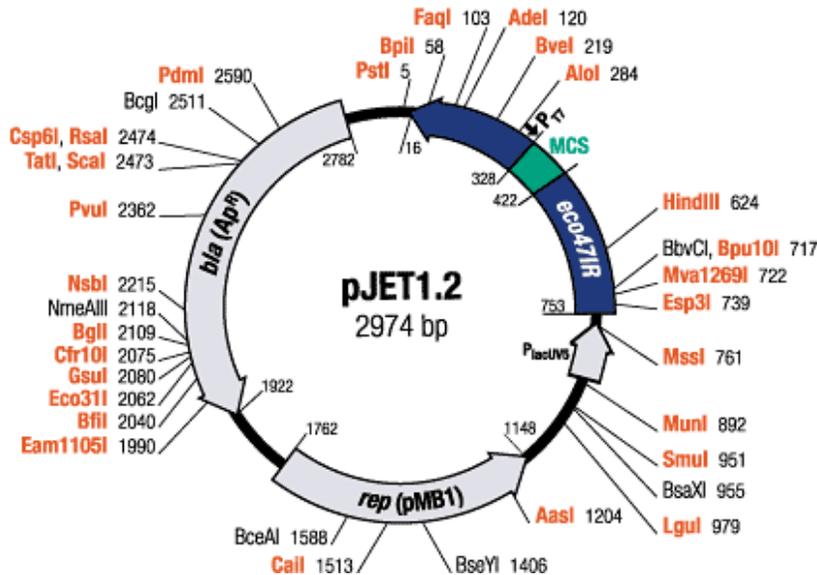
Luego del análisis de homologías de las secuencias de los productos de amplificación obtenidos por secuenciación directa (**sd**), se designaron las secuencias obtenidas con los oligonucleótidos degenerados para Coriogenina H y L como ***achzpH sd*** y ***achzpL sd***, respectivamente (*ach*= *Austrolebias charrua*; *zp*=zona pelucida).

## **2.3 Clonado de los productos obtenidos**

### **2.3.1 Reacción de ligación**

Para la ligación de los productos de amplificación purificados 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 para productos

de amplificación con extremos adhesivos, en la cual se colocó en un tubo Eppendorf estéril: 2  $\mu$ L de agua destilada, 10  $\mu$ L de Tampón 2X, 5  $\mu$ L del producto purificado y 1  $\mu$ L 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  $\mu$ L de vector de clonación pJET 1.2 (Fig. 5) y 1  $\mu$ L de la enzima T4 DNA Ligase (Promega). Nuevamente se mezcló por vortex, se centrifugó por 10 segundos y se incubó 90 minutos a temperatura ambiente de 24°C. Luego se incubó 15 minutos a 70°C con el objetivo de inactivar la Ligasa para optimizar el porcentaje de transformación (Michelsen, 1995). Los productos de la ligación se mantuvieron a -20°C hasta la transformación de las bacterias.



**Figura 5.** Mapa del plásmido pJET 1.2 (Fermentas). El tamaño del plásmido es de 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*), el 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 la cual en ausencia de metilaciones específicas 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>)

### 2.3.2 Competencia de las bacterias

Las bacterias seleccionadas para la transformación fueron de la cepa de *E. coli* JM107 (Promega), recomendadas por el fabricante del kit pJET 1.2 (Fermentas). Para la transformación se utilizó el kit TransformAid (Fermentas), siguiendo el siguiente protocolo (adaptando de las recomendaciones del fabricante):

- Las bacterias *E. coli* de la cepa JM107 congeladas a  $-80^{\circ}\text{C}$  en LB líquido con 20% de glicerol, se descongelaron paulatinamente durante 15 a 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  $37^{\circ}\text{C}$ .

- Mediante un ansa previamente flameada 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 condiciones de esterilidad, se transfirió 1,5 mL del medio de cultivo a un tubo Eppendorf y se centrifugó a  $10.000\text{g}$  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, incluidas en el kit) 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. Luego de 5 minutos en hielo las bacterias se volvieron “competentes” (capaces de incorporar un plásmido).

### 2.3.3 Transformación de las bacterias

La transformación se llevó a cabo transfiriendo  $5\ \mu\text{L}$  de cada producto de ligación a tubos Eppendorf de 1,5 mL rotulados como pJET-H y pJET-L. Los tubos con el producto de ligación permanecieron en hielo por lo menos 2 minutos antes de agregarle suavemente  $50\ \mu\text{L}$  de las bacterias competentes a cada uno. Luego se incubaron 5 minutos en hielo.

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

Para cada mezcla de transformación pJET-H y pJET-L se seleccionaron en total ocho colonias de cada par de placas de transformación. A partir de las colonias seleccionadas se

hicieron estrías mediante un ansa fina de platino en 2 placas LB-agar/ampicilina. Las colonias se denominaron secuencialmente de clon pJET-L1 a clon pJET-L8 y clon pJET-H1 a clon pJET-H8. Las placas se incubaron a 37°C durante 11hs. De cada estría se seleccionó una colonia aislada la cual se inoculó en 3 mL de medio LB líquido con ampicilina (3µL 100mg/mL) (Apéndice I). Se incubaron 12 horas a 37°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°C durante 12 horas.

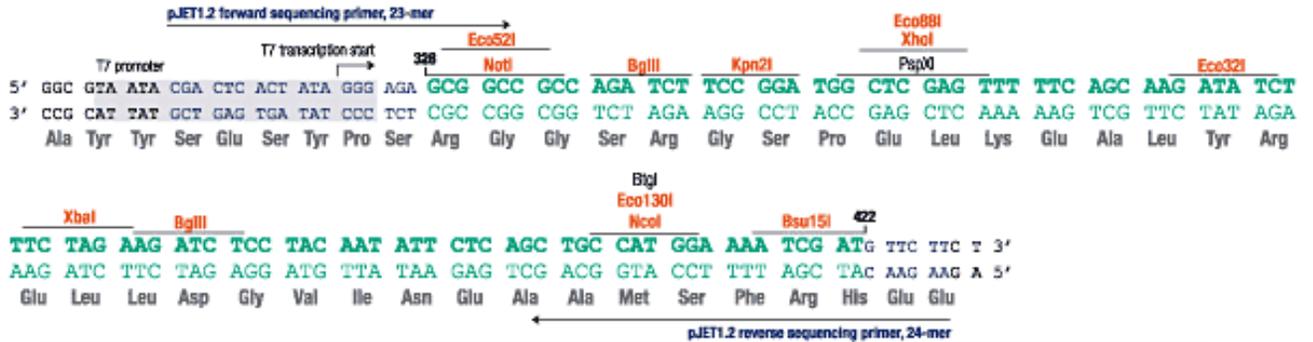
#### **2.3.4 Preservación de transformantes y purificación de plásmidos**

Luego de transcurridas las 12 horas, se transfirieron 800 µL del cultivo líquido a tubos Eppendorf de 1,5 mL estériles previamente rotulados, con 250 µL de Glicerol (Sigma) autoclavado, usado como criopreservador. Se mezcló suavemente y se dividió en 2 tubos por partes iguales, los cuales 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 150 µL 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 y 800 µL de etanol absoluto, se mezcló y se precipitó el ADN plasmídico durante 10 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 40 µL de agua Amresco inicialmente por pipeteo y luego incubando a 60°C 15 minutos. La calidad de la purificación de los productos obtenidos se analizó en geles de Agarosa Biotools al 1%, en TAE 1X, a 80 V 45 minutos visualizados con GelRed™ 1X (Biotum) en transiluminador ultravioleta, con posterior registro fotográfico.

### 2.3.5 Secuenciación y análisis de las secuencias

Los plásmidos purificados se enviaron a secuenciar utilizando ambos oligonucleótidos (pJET1.2 forward y pJET1.2 Reverse) incluidos en el kit de clonación antes mencionado, al Servicio de Secuenciación del IP-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. 5) y ensamblar las secuencias consenso. Una vez obtenidas las secuencias, se rastrearon las bases de datos disponibles en <http://www.ncbi.nih.gov/guide/sequence-analysis/> utilizando el programa BLAST 2.2.22 (Altschul et al.1990) para la búsqueda de homologías. 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 6.0) (Tamura y col. 2013). Luego usando el programa MEGA 6.0 se realizaron análisis filogenéticos para cada secuencia nucleotídica por separado con las secuencias mediante el método máxima parsimonia. Posteriormente se realizó un análisis de Neighbour Joining usando ambas secuencias aminoacídicas deducidas obtenidas junto a las secuencias animoacídicas de las proteínas coriónicas obtenidas de la búsqueda con los programas blastx y tblastx.

### 2.3.6 Designación de secuencias

Luego del análisis de homologías de las secuenciass, se designaron las secuencias de los plásmidos de los clones pJET-H2 y pJET-L6 como *achzpH* y *achzpL*, respectivamente.

## 2.4 Identificación del patrón de expresión de los genes coriónicos usando oligonucleótidos degenerados

Para establecer el patrón de expresión de los genes coriónicos identificados, se realizó el aislamiento de ARN total, tratamiento con DNAsa I, retrotranscripción, valoración de ADNc y amplificación de los genes de interés según fue descrito en sección 2.2.1 a 2.2.6 para las muestras de la tabla 6.

Muestras	Nº de individuos/tubo	TRIZOL (µL)	Cloroformo (µL)	Isopropanol (µL)	Vol. Final (µL)
Hígado de Hembra adulta	1	800	160	400	30
Ovario de hembra adulta	1	800	160	400	30
Alevín Hembra 45 días Post-eclosión	1	800	160	400	30
Embriones 38 días Post-fecundación	8	500	100	250	15
Embriones 30 días Post-fecundación	8	500	100	250	15

**Tabla 6.** Muestras analizadas por amplificación en tiempo final con oligonucleótidos degenerados y volúmenes de sustancias utilizadas para el aislamiento de ARN

## 2.5 Amplificación en tiempo final con oligonucleótidos específicos

### 2.5.1 Diseño de oligonucleótidos específicos

A partir de las secuencias *achzpL* y *achzpH*, se diseñaron dos juegos de oligonucleótidos específicos con los programas web de Integrated DNA Technologies (IDT) e Invitrogen. Se seleccionaron los T<sub>m</sub> de 62 ± 2 °C y largo de amplicón óptimo de 150 ± 25 pares de bases, el resto de los parámetros utilizados fueron los brindados por defecto por cada programa. Posteriormente los oligonucleótidos sugeridos por dichos programas se revisaron con el programa Oligo Analyzer 1.0.3 y se modificaron para minimizar las hibridaciones inespecíficas entre pares de oligonucleótidos y consigo mismos. Estos mismos criterios se utilizaron para generar oligonucleótidos específicos de actina a partir de la secuencia obtenida de la purificación de productos de amplificación usando los oligonucleótidos de actina β RSA obtenida en sección 2.2.5.

Los oligonucleótidos diseñados fueron denominados:

Gen	Juego	Directo (F)	Secuencia de oligonucleótido	Reverso (R)	Secuencia de oligonucleótido
<i>achzpH</i>	1	zpHAch F1	GACGGAGGGGCTGGGTTT	zpHAch R1	AGCCTCAACGGCAGTAGCAGT
	2	zpHAch F2	GTTGAGGCTTTGGTCATTG	zpHAch R2	CAAACCTCCATTGCCAATCCTG
<i>achzpL</i>	1	zpLAch F1	AGTCAAGCCCAGTGTGCCATT	zpLAch R1	AGGGTGAGGTCACTGGATT
	2	zpLAch F2	CACCTGGAAGTACCCTGAAG	zpLAch R2	CTCTTGGCACTGAACAGCAAC
<i>betaactinaach</i>	1	actAch F1	CCCCATCGAGCACGGTATTG	actAch R1	CTGTTGGCCTTGGGGTTCAG
	2	actAch F2	GTTGGTGATGAGGCACAGAGC	actAch R2	TCAGCAGGACTGGGTGCTCCT

**Tabla 7.** Oligonucleótidos específicos diseñados para *achzpH*, *achzpL* y *betaactina* de *A. charrua*.

### 2.5.2 Establecimiento de condiciones de amplificación en tiempo final de los oligonucleótidos específicos

Se ensayaron diferentes condiciones para la amplificación utilizando principalmente el primer par de oligonucleótidos de cada gen, modificando principalmente la combinación y concentración de oligonucleótidos. La temperatura de hibridación (apareamiento) elegida fue de 60°C, ya que es la recomendada para el kit a utilizar para la amplificación en tiempo real. Se ensayaron diferentes concentraciones finales de oligonucleótidos para optimizar los resultados.

A partir de estos ensayos se comenzaron a utilizar puntas de pipeta automática con filtro y la cabina de PCR BIOSAN UVC/T-AR (BIOSAN). En dicha cabina, previa limpieza con alcohol 70% de superficies y gradillas, el agua Amresco libre de nucleasas para las reacciones y el material se somete a 20 minutos de irradiación ultravioleta (UV) con el fin de descontaminar de ácidos nucleicos que pudieran falsear los resultados obtenidos. La radiación ultravioleta genera la dimerización de pirimidinas formando puentes cruzados en los ácidos nucleicos bloqueando el avance de las polimerasas. Dentro de la cabina se realizó el pipeteo y la manipulación para obtener las mezclas de reacción (retrotranscripción y amplificación), así como la irradiación del material a utilizar en pasos subsiguientes. La incorporación del molde respectivo a cada reacción se realizó en una mesada diferente.

### 2.5.3 Patrón de expresión de los genes coriónicos con oligonucleótidos específicos

Para la identificación del patrón de expresión de los genes coriónicos con los oligonucleótidos específicos, se realizaron las reacciones de amplificación con las mismas muestras de ADNc ya utilizadas con los oligonucleótidos degenerados, pero sumando las muestras de alevines de 30 hs y de 7 días post-eclosión (ver Tabla 10). El programa usado

para el termociclador fue el mismo para los 3 juegos de oligonucleótidos (Tabla 9). Las cantidades de reactivos utilizadas para la amplificación se detallan en la tabla 8.

Par Reactivo	oligos	zpHAch1	zpLAch1	actAch1
		Vol./ tubo ( $\mu$ L)	Vol./ tubo ( $\mu$ L)	Vol./ tubo ( $\mu$ L)
H <sub>2</sub> O		4,9	4,9	9,4
Buffer Taq 10X		1,5	1,5	1,5
Cloruro de Magnesio 50 mM		0,6	0,6	0,6
dNTPs 10 mM		0,3	0,3	0,3
Oligo F 1 $\mu$ M		3	3	0,75
Oligo R 1 $\mu$ M		3	3	0,75
Taq Polimerasa		0,2	0,2	0,2
Volumen final		13,5	13,5	13,5

**Tabla 8.** Volúmenes utilizados en amplificación con oligonucleótidos específicos para *achzpH*, *achzpL* y *beta-actina* de *A. charrua* en Termociclador MultiGeneII

Oligonucleótidos	específicos	Temp ( $^{\circ}$ C)	Tiempo
Desnaturalización inicial		94	3 min
Desnaturalización		94	30 seg
Hibridación		60	30 seg
Extensión		72	30 seg
<b>Ciclos</b>		<b>30</b>	
Extensión final		72	3 min

**Tabla 9.** Programa para oligonucleótidos específicos de *A. charrua* en Termociclador MultiGeneII

Muestras	N° de individuos/tubo	TRIZOL ( $\mu$ L)	Cloroformo ( $\mu$ L)	Isopropanol ( $\mu$ L)	Vol. Final ( $\mu$ L)
Hígado de Hembra adulta	1	800	160	400	30
Ovario de hembra adulta	1	800	160	400	30
Alevín Hembra 45 días Post-eclosión	1	800	160	400	30
Alevines 7 días Post-eclosión	5	1000	200	500	30
Alevines 30 horas Post-eclosión	5	1000	200	500	30
Embriones 38 días Post-fecundación	8	500	100	250	15
Embriones 30 días Post-fecundación	8	500	100	250	15

**Tabla 10.** Muestras analizadas por amplificación en tiempo final con oligonucleótidos específicos y volúmenes de sustancias utilizadas para el aislamiento de ARN.

## 2.6 Amplificación en tiempo real

### 2.6.1 Puesta a punto de ensayos de amplificación en tiempo real

Se juntaron 3 muestras de ADNc de hígado de hembra adulta, obtenidos en las etapas previas, se realizaron diluciones seriadas para los ensayos de amplificación en tiempo real. La mezcla inicial se realizó agregando en un tubo 4  $\mu\text{L}$  de cada uno de los ADNc y 108  $\mu\text{L}$  de agua Amresco irradiada con UV (volumen final 120  $\mu\text{L}$ ). Se mezcló por vortex y a partir de esta dilución (1:10) se procedió a realizar las diluciones seriadas al tercio. Para la dilución, inicialmente se tomó 40  $\mu\text{L}$  de la dilución 1:10, se mezcló primero por pipeteo y luego por vortex con 80  $\mu\text{L}$  de agua Amresco. Este procedimiento se llevó a cabo con intervalos mínimos de una hora, con los tubos en hielo mezclando con vortex tres veces en este tiempo. Para todas las diluciones se utilizaron tubos de 500  $\mu\text{L}$  debidamente rotulados. Los intervalos de tiempo y la mezcla permiten maximizar la homogeneización de las diluciones a fin de minimizar desviaciones en la cuantificación al realizar la curva de eficiencia.

Siguiendo este sistema se obtuvieron las diluciones hígado de hembra (hig H) 1:10, 1:30, 1:90, 1:270 y 1:810. Con estas diluciones se realizaron los ensayos de eficiencia en Termociclador Rotor Gene 6000 (Corbett Research [www.corbettresearch.com](http://www.corbettresearch.com)) con rotor de 72 tubos presente en el IP-Montevideo. Se usaron tiras de cuatro tubos diseñados para reacciones de 10  $\mu\text{L}$  (Axygen). Asimismo, se realizaron ensayos de prueba en el termociclador Applied Biosystems 7500 de la Sección Genética- Facultad de Ciencias en tubos ópticos en tiras de 8 (Applied Biosystems®) con un volumen óptimo de reacción de 20  $\mu\text{L}$ .

El kit utilizado para los ensayos de amplificación en tiempo real fue: KAPA SYBR® FAST qPCR 2X (Kapa Biosystems). Este sistema se basa en la fluorescencia emitida por la asociación del SYBR GREEN I (Fig. 7) al acoplarse al surco menor de la doble hebra de ADN resultante en cada ciclo de amplificación, cuando es excitado por un haz de 498 nm de longitud de onda.

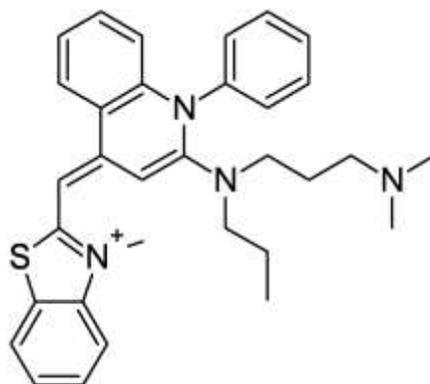


Figura 7. Representación molecular del SYBR GREEN I

Se realizaron diferentes ensayos con ambos pares de oligonucleótidos por gen (descritos en 2.5.1), así como las combinaciones del oligonucleótido directo del primer par con el reverso del segundo par variando las concentraciones de los mismos. En los ensayos se utilizaron las diluciones de ADNc hig H 1:10, 1:30, 1:90, 1:270 y 1:810. Para cada mezcla de reacción se calcularon dos tubos blanco y las cantidades de reactivos por tubo según la tabla 11. Se agregó a esta mezcla un 10% extra de cada reactivo para compensar posibles errores de pipeteo. Se transfirieron 8,5  $\mu\text{L}$  de mezcla de reacción por tubo y 1,5  $\mu\text{L}$  del ADNc correspondiente a cada ensayo.

Reactivo	Vol./ tubo ( $\mu\text{L}$ )
Agua Amresco	1,5
Oligonucleótido F 5 $\mu\text{M}$	1
Oligonucleótido R 5 $\mu\text{M}$	1
KAPA SYBR® FAST qPCR 2X	5
<b>Volumen por tubo</b>	<b>8,5</b>

**Tabla 11.** Reactivos para amplificación en tiempo real en Termociclador Rotor Gene 6000

Se probó el programa bifásico de amplificación sugerido por el fabricante del kit ciclos de 95°C y 60°C, desnaturalización y hibridación-extensión respectivamente. Pero finalmente se utilizó el programa ensayado en la etapa de amplificación en tiempo final (Tabla 9). A esto se le agrega una curva de desnaturalización del ADN con gradiente

creciente de temperatura y mediciones cada un grado en el rango de 70 a 95°C, para detectar si hay productos inespecíficos presentes.

<b>Programa</b>	<b>Temp (°C)</b>	<b>Tiempo</b>
Desnaturalización inicial	95	3 min
Desnaturalización	95	30 seg
Hibridación	60	30 seg
Extensión	72	30 seg
Ciclos	35	

**Tabla 12.** Programa para amplificación en tiempo real en Termociclador Rotor Gene 6000

Con los resultados de intensidad de fluorescencia obtenidos por el termociclador, se realizó una gráfica de ciclo de reacción vs intensidad de fluorescencia. En esta gráfica se define el “Threshold” o umbral, como el valor numérico que refleja un punto estadísticamente significativo por encima de la línea de base del ruido de fondo o “background”, para cada experimento de amplificación. Siendo el Ct el corte de la curva de amplificación de cada muestra con este umbral, donde a partir de los Ct obtenidos para cada juego de oligonucleótidos diseñados (con las combinaciones realizadas para cada gen) se realizó una regresión lineal contra el logaritmo de cada dilución, de manera de obtener la eficiencia de cada reacción de la pendiente de esta gráfica.

Para detectar diferencias de expresión relativa en los tratamientos, el método elegido corresponde a “Fold change” determinado por la función  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  descrita por Livak y Schmittgen (2001) y que consiste en restar los promedios de Ct (triplicados técnicos) de cada juego de oligonucleótidos específicos de coriogeninas con el promedio de Ct del gen de referencia (beta actina). Este resultado obtenido para las situaciones experimentales se normaliza respecto al control con la función descrita previamente, para obtener la diferencia de expresión relativa al control.

## **2.7 Ensayo de expresión de *achzpH* y *achzpL* bajo efecto de estradiol**

### **2.7.1 Tratamiento de peces con Estradiol**

Con el objetivo de comprobar si existe regulación estrogénica de la expresión de genes coriónicos en *Austrolebias charrua*, se realizó un tratamiento de estradiol en individuos provenientes de la cría en condiciones de laboratorio. Se trabajó con tres grupos

de 5 hembras y 5 machos por pecera de 20 litros de agua de clorinada. Los peces fueron aclimatados a la pecera los 3 días previos al tratamiento y alimentados *ad libitum* hasta el día anterior a ser procesados. Se suministraron 2 dosis de estradiol 17 $\beta$  (Sigma N° E8875-1G) usando como vehículo 100  $\mu$ L etanol 100% en cada caso, para lograr 14 y 200 ng/L de concentración final. El control se realizó en las mismas condiciones agregando al agua solo el vehículo. La duración del tratamiento fue de 5 días con un cambio parcial del 50 % del agua el tercer día. La dosis de estradiol fue restituida reponiendo con 50  $\mu$ L de las diluciones de estradiol usadas al principio. Al quinto día (luego de finalizado el tratamiento) se procedió a la eutanasia de los individuos y posterior disección como se indicó previamente en sección 2.2.1. Se tomaron muestras de músculo, hígado y gónadas de cada individuo. Se destinaron pinzas diferentes para retirar cada muestra de la cavidad abdominal de cada pez. Las muestras se colocaron en tubos eppendorf de 1,5 mL libres de nucleasas, agregado TRIZOL (Invitrogen) y homogeneizando inmediatamente con un homogeneizador de plástico irradiado con UV para cada muestra. Se agregó 800  $\mu$ L de TRIZOL (Invitrogen) para cada hígado y 500  $\mu$ L de TRIZOL (Invitrogen) para cada una de las muestras de gónadas y músculo.

### **2.7.2 Procesamiento de muestras de tratamiento con estradiol**

El aislamiento de ARN total, la digestión con Desoxirribonucleasa I, estimación de calidad y cuantificación del ARN de las muestras obtenidas se realizó según se especificó previamente (secciones 2.2.1 a 2.2.3). Para la retrotranscripción se utilizó 1,5  $\mu$ g de ARN total cuantificado por Nanodrop en el IP-Montevideo, en las condiciones especificadas. Los ADNc resultantes se examinaron por amplificación en tiempo final con los oligonucleótidos heterólogos de actina RSA (sección 2.2.5).

### **2.7.3 Diluciones de trabajo**

Se realizaron “diluciones de trabajo” (DT) 1:20, combinando 3 de los 5 ADNc obtenidos de hígados de las hembras; y 2 de los 5 ADNc de hígados de machos de los individuos de cada condición del tratamiento.

Muestras	Dilución de trabajo	Denominación individual	Denominación abreviada
DT Hembras Control Hígado	1:20	CH1	DTHC Hig
		CH3	
		CH4	
DT Hembras 14ng/L E2 Hígado	1:20	14H1	DTH14 Hig
		14H3	
		14H4	
DT Hembras 200ng/L E2 Hígado	1:20	200H1	DTH200 Hig
		200H4	
		200H5	
DT Machos Control Hígado	1:20	CM1	DTMC Hig
		CM3	
		CM4	
DT Machos 14ng/L E2 Hígado	1:20	14M1	DTM14 Hig
		14M3	
		14M4	
DT Machos 200ng/L E2 Hígado	1:20	200M1	DTM200 Hig
		200M4	
		200M5	

**Tabla 13.** Nomenclatura de las combinaciones de ADNc de las diluciones de trabajo usadas para la cuantificación relativa del Tratamiento con Estradiol.

### 2.7.4 Eficiencia

Se realizaron nuevamente dos curvas de eficiencia utilizando diluciones 1:30, 1:90, 1:270 y 1:810 de la mezcla de ADNc de hígado de hembras control CH1, CH3 y CH4 en las condiciones preestablecidas. Se utilizaron las cuatro diluciones y dos blancos por mezcla de reacción, usando los tres juegos de oligonucleótidos (ver Tabla 7).

### 2.7.5 Cuantificación relativa de muestras de tratamiento con estradiol

Para la cuantificación relativa de los transcritos de *achzpH* y *achzpL* respecto a *beta-actina ach* se realizó la amplificación en el termociclador Rotor Gene 6000 (Corbett Research [www.corbettresearch.com](http://www.corbettresearch.com)). El programa de amplificación fue el establecido previamente (sección 2.6). Se realizaron por triplicado los ensayos de amplificación usando

las diluciones de trabajo de la tabla 13. Se calcularon los reactivos para la mezcla de reacción a fin de usar tres tubos problema, más dos blancos y un 20% más por posibles inconvenientes de pipeteo.

#### **2.7.6 Control con machos salvajes**

Se procedió a la eutanasia y disección de tres machos de *A. charrua* 5 horas luego de su colecta en un charco en la Coronilla (33°53'47"S 53°30'56"O) con el fin de obtener muestras de hígado, gónada y músculo de "Machos salvajes" (MS). Cada muestra se colocó en tubos eppendorf de 1,5 mL libres de nucleasas con TRIZOL (Invitrogen) homogeneizando inmediatamente.

### **2.8 Ensayo de expresión de *achzpL* y *achzpH* bajo efecto de xenoestrógeno**

#### **2.8.1 Tratamiento de peces con xenoestrógeno (Nonilfenol)**

Se realizó el tratamiento de nonilfenol de 5 hembras y 5 machos de *A. charrua* por pecera, provenientes de la misma captura que se procesaron los Machos salvajes. Se armaron tres peceras de 20 litros usando una de control y 2 dosis de 8 y 64 ng/L de nonilfenol (Sigma). El vehículo para cada dosis fue de 100 µL de etanol 100% y el control se realizó en las mismas condiciones agregando al agua sólo el vehículo. La duración del tratamiento fue de 5 días con un cambio parcial del 50 % y reponiendo la dosis como en el tratamiento con estradiol. Los peces fueron aclimatados a la pecera por 7 días previos al tratamiento y alimentados *ad libitum* con *Tubifex* sp. hasta el día anterior a ser procesados. Al quinto día se procedió a la eutanasia de los individuos con 2-fenoxietanol 5 ppm y posterior disección, retirando muestras de músculo, hígado y gónadas de cada individuo. Cada muestra se colocó en tubos eppendorf de 1,5 mL libres de nucleasas con TRIZOL (Invitrogen) homogeneizando inmediatamente y usando las mismas proporciones de TRIZOL (Invitrogen) que en el tratamiento anterior.

#### **2.8.2 Procesamiento de muestras de Machos salvajes y del tratamiento con el xenoestrógeno (Nonilfenol)**

El aislamiento de ARN total, la digestión con Desoxirribonucleasa I, estimación de calidad y cuantificación del ARN de las muestras obtenidas se realizó según se especificó previamente. Para la retrotranscripción también se utilizaron 1,5 µg de ARN total

cuantificado por Nanodrop en el IP-Montevideo, en las condiciones especificadas. Los ADNc resultantes se examinaron por amplificación en tiempo final con los oligonucleótidos de actina RSA.

### 2.8.3 Diluciones de trabajo del Tratamiento con Nonilfenol

Con los ADNc resultantes se realizaron combinaciones de 3 ADNc (correspondientes a hígados de individuos) de cada condición del tratamiento y se realizó una dilución 1:20 de cada una. Estas combinaciones se consideraron “diluciones de trabajo” (DT).

Muestras	Dilución de trabajo	Denominación individual	Abreviación
DT Hembras Control Hígado NP	1:20	CH1NP	DTHCNP Hig
		CH2NP	
		CH4NP	
DT Hembras 8ng/L NP Hígado	1:20	8H2NP	DTH8NP Hig
		8H3NP	
		8H4NP	
DT Hembras 64ng/L NP Hígado	1:20	64H1NP	DTH64NP Hig
		64H2NP	
		64H4NP	
DT Machos Salvajes Hígado	1:20	MS1	DTMS Hig
		MS3	
DT Machos Control NP Hígado	1:20	CM2NP	DTMCNP Hig
		CM3NP	
DT Machos 8g/L NP Hígado	1:20	8M1NP	DTM8NP Hig
		8M4NP	
DT Machos 64ng/L NP Hígado	1:20	64M2NP	DTM64NP Hig
		64M3NP	

**Tabla 14.** Individuos incluidos de las combinaciones de ADNc y su denominación usados para la cuantificación relativa de Machos salvajes y del Tratamiento con Nonilfenol.

### 2.8.4 Cuantificación relativa de muestras de tratamiento con xenoestrógeno (Nonilfenol)

Para la cuantificación relativa de los transcritos de *achzpL* y *achzpH* respecto a *beta-actina ach* se realizó la amplificación en el termociclador Rotor Gene 6000 (Corbett Research [www.corbettresearch.com](http://www.corbettresearch.com)). El programa de amplificación fue el establecido previamente. Se realizaron por triplicado los ensayos de amplificación usando las diluciones

de trabajo de la tabla 14. Se calcularon los reactivos para la mezcla de reacción a fin de usar tres tubos problema, más dos blancos y un 20% más para inconvenientes de pipeteo.

## **2.9 Tratamiento estadístico de los datos de amplificación en tiempo real**

Para el tratamiento estadístico de los datos de cuantificación relativa se utilizó el programa GraphPad Prism® versión 6 ([www.graphpad.com](http://www.graphpad.com)) para comparar los triplicados técnicos de cada muestra del tratamiento. Así se compararon los  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  obtenidos cada gen con las diluciones de trabajo de los ADNc de hígado de cada dosis, con el correspondiente al control de cada tratamiento (estradiol o nonilfenol), mediante el test ANOVA de una vía. Al usar el post-test Dunnett (para múltiples comparaciones) se evalúa si existen diferencias significativas de cada valor al compararlo con el control, con un 95% de intervalo de confianza. Para las comparaciones puntuales entre los  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  de dos muestras, se utilizó el test “t” incluido en el programa antes mencionado, con un 95% de intervalo de confianza.

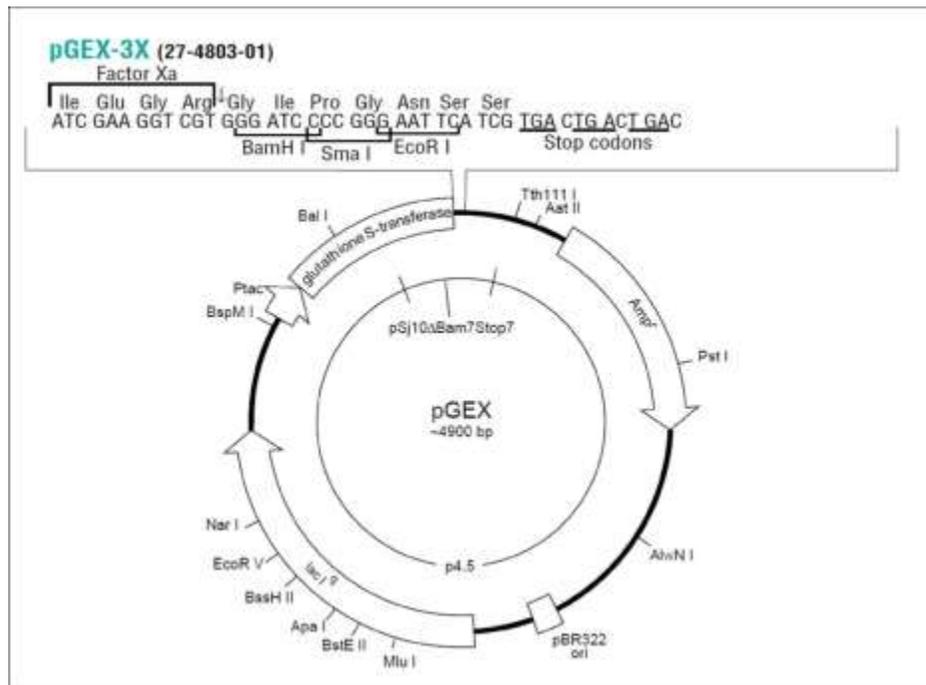
## **2.10 Diseño, producción y purificación de péptidos recombinantes de proteínas ZPs de *Austrolebias charrua***

Con el objetivo de obtener proteínas recombinantes de ZPs de *A. charrua* se realizó un diseño basado en el método SLiCE de recombinación homóloga *in vitro*. El sistema de expresión elegido fue la transformación de bacterias *E. coli* usando el vector de expresión pGEX 3x con una u otra secuencia de las ZP identificadas. Este sistema permitiría expresar un péptido recombinante con la Glutación transferasa en su región N-terminal unido a un fragmento de la ZP correspondiente (*achzpL* o *achzpH*). La actividad práctica de esta etapa fue llevada a cabo bajo la supervisión del Dr. Mario Señorale en el laboratorio dirigido por la Dra. Mónica Marín en la Sección Bioquímica de la Facultad de Ciencias, con financiación parcial del Programa de Pasantías locales de PEDECIBA.

### **2.10.1 Diseño de vector de expresión**

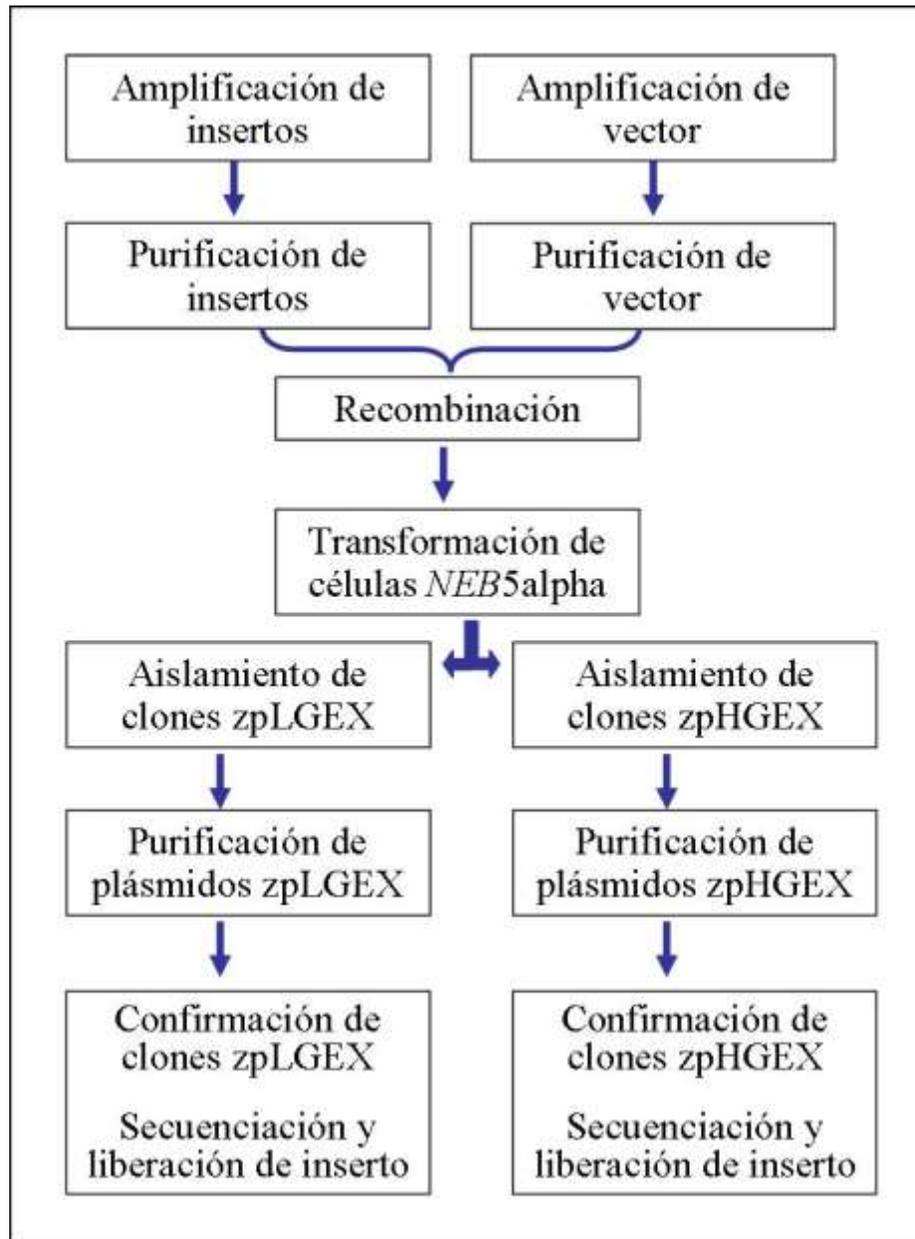
Inicialmente se diseñaron los vectores para expresar *achzpL* y *achzpH* con el programa Serial Cloner 2.6.1. a partir de las secuencias obtenidas previamente y teniendo en cuenta el marco abierto de lectura de las ZPs y la secuencia teórica del vector pGEX 3x. A partir de este diseño teórico y usando el programa Oligo Analyzer se diseñaron dos juegos

de oligonucleótidos para amplificar cada uno de los fragmentos de los ADNc *achzpL* y *achzpH* aislados en *A. charrua*. En estos últimos se agregaron secuencias flanqueantes de 30 pares de bases cuya homología permitiera la inserción al vector pGEX 3x por recombinación homóloga *in vitro*. Los oligonucleótidos del vector fueron diseñados previamente por el Dr. Mario Señorale y agregan al vector comercial una región poli-Histidina en la región amino terminal del péptido recombinante prospectivo, y un sitio de corte *EcoRI* entre la región codificante de GST y el fragmento de la proteína ZP correspondiente.



**Figura 8.** Mapa de vector de fusión glutatión S-transferasa pGEX 3X (Amersham Biosciences).

## Diseño de estrategia para obtención de vectores recombinantes



**Figura 9.** Esquema de obtención de vectores de expresión zpLGEX y zpHGEX

### 2.10.2 Amplificación y purificación de los productos para la recombinación

Con los oligonucleótidos diseñados (Tablas 27 y 28) y sintetizados en Macrogen, se procedió a la amplificación del vector y de los fragmentos de *zp* con adaptadores usando HiFi Kapa ADN polimerasa.

Para la amplificación del vector se utilizó como molde 1  $\mu\text{L}$  de plásmido circularizado pGEX 3X (Amersham Biosciences). Los reactivos para la mezcla de reacción y el programa de termociclador utilizado se observan en las Tablas 15 y 16 respectivamente. Se ensayaron inicialmente tres diluciones del molde plasmídico, 1:10, 1:100 y 1:1000. Para aumentar la cantidad de producto de amplificación, se repitió la amplificación utilizando 5 tubos usando como molde la dilución de 1:100. El volumen final de cada tubo fue de 15  $\mu\text{L}$ .

Reactivo	Vol./ tubo ( $\mu\text{L}$ )
H <sub>2</sub> O	9,2
Buffer HiFi fidelity 5X	3
dNTPs 10 mM Kapa	0,5
Oligo F 10 $\mu\text{M}$	0,5
Oligo R 10 $\mu\text{M}$	0,5
HiFi ADN Polimerasa	0,3
<b>Volumen final</b>	<b>14</b>

**Tabla 15.** Reactivos para amplificación del vector modificado y de los insertos con adaptadores de recombinación en Termociclador MultiGeneII

	<i>Temp (<math>^{\circ}\text{C}</math>)</i>	<i>Tiempo</i>
Desnaturalización inicial	95	6 min
Desnaturalización	98	20 seg
Hibridación-Extensión	68	5 min
<b>Ciclos</b>	<b>20</b>	
Extensión final	68	10 min

**Tabla 16.** Programa para amplificar vector modificado en Termociclador MultiGeneII

Para la amplificación de los fragmentos de *achzpL* y *achzpH* con los adaptadores de recombinación se utilizó como molde 1  $\mu\text{L}$  de plásmido de las minipreparaciones generadas en la clonación de las ZPs con pJET1.2. Las cantidades de reactivos para las mezclas de reacción que se usaron fueron las mismas que en el paso anterior (Tabla 15). El programa de amplificación para ambas ZPs figura en la tabla 17. Se ensayaron inicialmente cuatro diluciones del molde plasmídico, 1:10, 1:100, 1:1000 y 1:10000. Para aumentar la cantidad de producto de amplificación, se repitió la amplificación utilizando 5 tubos para cada ZP usando como molde la dilución de 1:100. El volumen final de cada tubo fue de 15  $\mu\text{L}$ .

<i>Programa</i>	<i>Temp (°C)</i>	<i>Tiempo</i>
Desnaturalización inicial	95	6 min
Desnaturalización	98	20 seg
Hibridación-Extensión	68	45 seg
<b>Ciclos</b>	<b>30</b>	
Extensión final	68	10 min

**Tabla 17.** Programa para amplificar insertos con adaptadores de recombinación en Termociclador MultiGeneII

La visualización de los ensayos de amplificación y selección de dilución de trabajo se realizó mediante electroforesis en agarosa 1% en TAE 1X, teñido con GelRed™ 1X (Biotium) y observado en transiluminador ultravioleta.

Posteriormente se reunieron los productos de amplificación de cada muestra, ZP correspondiente y el vector, y se realizó la digestión con 1 µL de la enzima de restricción *DpnI* para eliminar los moldes plasmídicos. La enzima de restricción *DpnI* reconoce y digiere solamente el ADN metilado, producido en este caso por la amplificación dentro de las bacterias del plásmido usado como molde.

Los productos de digestión se sometieron a electroforesis en las condiciones antes mencionadas, pero se tiñó con GelGreen 1X (Biotium). Los geles se observaron en transiluminador de led azul (Clare Chemical Research) para evitar alteraciones en el ADN con la iluminación Ultravioleta. Los productos se recortaron con pipetas Pasteur de plástico irradiadas con UV, usándolas como sacabocado, para luego ser purificadas con el kit de purificación GFX PCR DNA Gel Band purification kit (G. Electric) según las especificaciones del fabricante.

### **2.10.3 Recombinación, transformación y confirmación**

Para la recombinación se colocaron 4 µL de producto específico y 4 µL de vector con una relación molar aproximada 8:1, más 1 µL de Buffer de ligasa 10X (con ATP) y 1 µL de extracto proteico enriquecido en recombinasas para cada fragmento de ZP. Luego de la incubación a 37°C por 70 minutos se realizó la transformación de bacterias *E. coli* NEB 5alpha competentes (High Efficiency) Biolabs con 5 µL de producto de recombinación, mezclando suavemente con la punta de la micropipeta e incubando por 30 minutos en hielo, para luego aplicar el shock térmico a 42°C (exactos) por 30 segundos en baño de agua. En condiciones de esterilidad se agregaron en cada tubo 950 µL de medio SOC mezclando

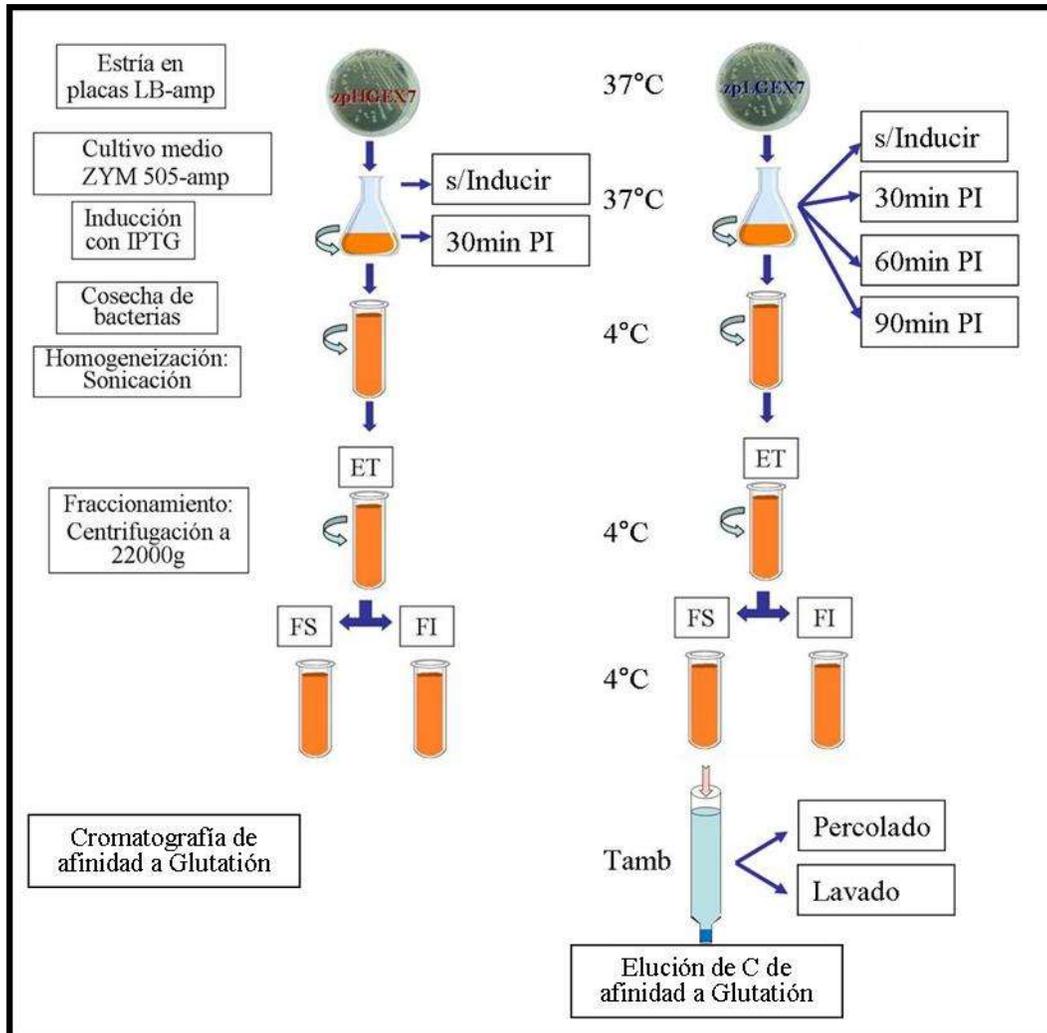
suavemente. Se incubó 60 minutos a 37°C en incubador orbital con agitación de 200 revoluciones por minuto (RPM). Se plaquearon en condiciones de esterilidad 10, 50 y 200 µL de cada transformación en placas LB ampicilina, incubando toda la noche a 37°C. De las colonias obtenidas se seleccionaron 8 colonias aisladas (para cada ZP) y se realizaron estrías finas en placas LB ampicilina divididas en cuadrantes. La nomenclatura utilizada fue zpLGEX 1 a zpLGEX 8 y zpHGEX 1 a zpHGEX 8. Con 6 de estos clones aislados se inocularon 3 mL de medio líquido LB ampicilina para preservarlos y purificar por lisis alcalina el ADN plasmídico. Luego de 14hs de incubación en agitación a 37°C, se transfirieron 400 µL del cultivo líquido a tubos Eppendorf de 1,5 mL estériles con 150 µL de Glicerol (Sigma) los cuales se almacenaron a -20°C para su conservación. Con los 2,6 mL restantes del cultivo líquido se realizó la purificación de los plásmidos según el método de lisis alcalina descrito previamente (adaptación de Sambrook y col. 1989).

Para la confirmación de la presencia de los plásmidos de interés, se realizó inicialmente la digestión del plásmido con *EcoRI* para observar la liberación del inserto. Para esto se agregó 5 µL por tubo de cada plásmido, 1 µL de Buffer *EcoRI* 10X y 1 µL de enzima y se incubó toda la noche a 37°C. La visualización de plásmidos y productos de digestión se realizó mediante electroforesis en agarosa 1% en TAE 1X, teñido con GelRed™ 1X (Biotum) y observado en transiluminador ultravioleta.

Posteriormente se realizó la secuenciación de los plásmidos seleccionados en el servicio del IP-Montevideo.

## 2.10.4 Expresión de péptido recombinante en *E. coli* NEB 5alpha

### 2.10.4.1 Ensayo I de expresión en *E. coli* NEB 5alpha



**Figura 10.** Esquema de Ensayo I de expresión en células *E. coli* NEB 5alpha.

Luego de la confirmación se seleccionaron los clones *zpLGEX 7* y *zpHGEX7* para realizar un ensayo de expresión. Se sembró una placa LB ampicilina por clon con estría gruesa. Se incubaron a 37°C toda la noche. Se inoculó con el raspado de toda la placa un matraz de 250 mL por clon, con 50 mL de medio ZYM 505 (Studier, 2005) (AnexoI) suplementado con ampicilina y se incubó a 37°C en agitación orbital.

Se siguió el crecimiento por  $DO_{600nm}$  hasta alcanzar 1,88 y se agregó IPTG como agente inductor a una concentración final de 1mM. Se tomaron muestras de 1 mL de medio de cultivo y se midió la  $DO_{600nm}$  cada media hora luego de la inducción hasta los 120 minutos.

En este punto se cosecharon las bacterias transfiriendo el medio de cultivo a dos tubos corex de 35 mL centrifugando a 6000g en el rotor JM20 (6000RPM) de la centrífuga refrigerada (Beckman) por 10 minutos a 4°C. El sobrenadante se descartó y el pellet se guardó a -20°C.

El pellet bacteriano se resuspendió en Buffer Tris-NaCl (Tris 50 mM pH 8,3, NaCl 0,1M) en una relación de 10 mL por cada gramo de bacterias. Para la lisis celular se utilizó Sonicador de pulso (Omni International) con 40% del tiempo de pulso, 60% de potencia de sonicación por 15 minutos en baño de hielo y agua. Este procedimiento se continuó hasta obtener fluidez en el goteo luego de aspirarlo con pipeta Pasteur, como indicio de la fragmentación del ADN bacteriano.

Para el Fraccionamiento se centrifugó el homogenato bacteriano, denominado **Extracto Total (ET)**, a 22000g a 4°C. Al sobrenadante de esta etapa se lo denomina **Fracción Soluble (FS)**, y al pellet resuspendido se lo denomina **Fracción Insoluble (FI)**. Para identificar la fracción en que se obtuvo la expresión del péptido recombinante, así como los niveles de expresión luego de la inducción se realizó una electroforesis en acrilamida 12% en condiciones desnaturalizantes.

Las muestras de 1 mL tomadas previamente a la inducción y cada 30 minutos post-inducción, se centrifugaron a 6000g obteniendo un pellet bacteriano que se resuspendió en Buffer Tris-NaCl a razón de 100 µL por cada unidad de DO<sub>600nm</sub>. Las suspensiones bacterianas se sometieron a sonicación hasta la lisis bacteriana y fragmentación del ADN.

#### **2.10.4.1a Cromatografía de afinidad con Glutation-agarosa-GST**

Se realizó una cromatografía de afinidad con Glutation-agarosa y la Fracción soluble (FS) zpLGEX inducida a 37°C en células *E. coli* NEB 5alpha. Se utilizaron 500 µL de matriz Glutation-agarosa (General Electric) en tubo eppendorf de 2 mL

El procedimiento seguido fue:

1. Lavado de matriz con 10 mL de H<sub>2</sub>O (20 volúmenes de lecho matriz).
2. Se equilibró la matriz con 10 volúmenes de buffer de Tris-NaCl.
3. Se centrifugó la muestra FS zpLGEX a 14000g.
4. Se resuspendió la matriz con el sobrenadante de la centrifugación y se incubó en agitación orbital. Los 5 mL de sobrenadante se incorporaron en 3 veces para maximizar la absorción. En cada ocasión se colectó el percolado (P) hasta completar el volumen del sobrenadante agregado.

5. Se lavó la matriz con 5 mL de buffer Tris-NaCl, colectando todo el volumen denominado Lavado (L).

7. Se realizó la elución con 1 mL buffer Tris-NaCl 5 mM de Glutación reducido. La elusión se guardó en baño de hielo y agua en heladera.

De cada paso de la cromatografía se guardó una alícuota bien identificada a -20 °C.

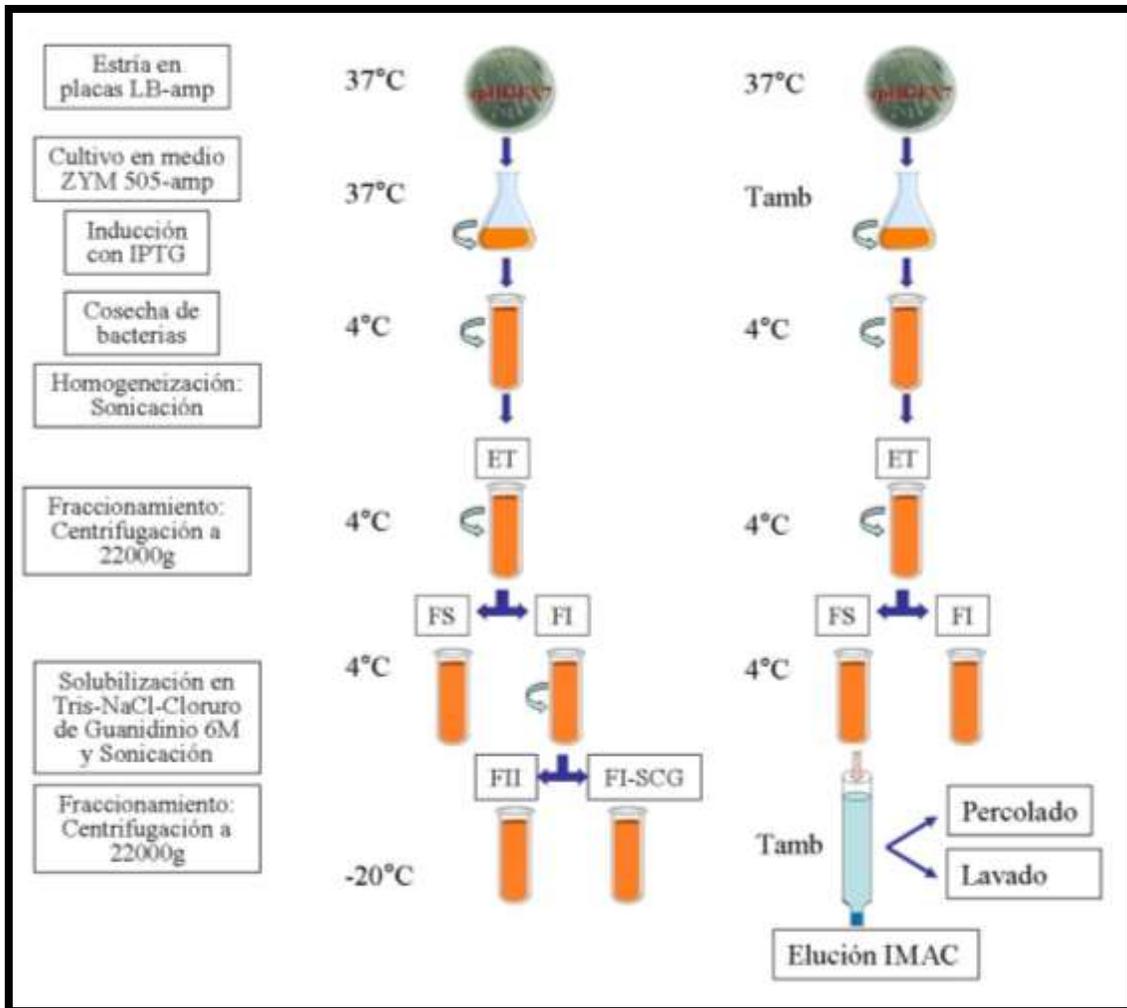
#### **2.10.4.1b Electroforesis en Acrilamida 12 %**

El resultado de la cromatografía se analizó mediante electroforesis en acrilamida al 12% en condiciones desnaturalizantes (Sambrook y col. 1989). El gel concentrador se preparó con un recorrido de 5 mm y en Tris 1X con pH de 6,8. El gel separador se preparó en Tris 1X con pH de 8,8. La corrida se realizó en cuba de electroforesis Biolab por 30 minutos a 60 Volts y una hora a 90 Volts. Las muestras se prepararon con Azul de bromofenol, SDS, Glicerol, TCEP 8,5 mM (como agente reductor). Posteriormente las muestras se incubaron a 65°C por 2 horas, ó 95°C por 10 minutos. Estos procedimientos se siguieron según Sambrook y col. (1989).

#### **2.10.4.2 Ensayo II de expresión en células E. coli NEB 5alpha**

Se realizó un nuevo ensayo de expresión con el clon zpHGEX 7 usando 2 matraces de 1 litro con 300 mL de medio ZYM 505. Uno se incubó en baño orbital a 37°C con 270 minutos de inducción con IPTG. El otro matraz se incubó a temperatura ambiente (Tamb) entre 20 y 24°C con 14hs de inducción.

La cosecha, lisis bacteriana y fraccionamiento se realizaron según se describió previamente y el pellet de las Fracción Insoluble de la inducción a 37°C se resuspendió en Tris-NaCl-Cloruro de Guanidinio 4M. La suspensión resultante se colocó en baño de sonicación con hielo y 3 pasos de 180 segundos, y posteriormente se centrifugó a 22000g por 30 minutos. En este paso se obtuvieron las Fracciones Insoluble-soluble en Cloruro de Guanidinio (FI-SCG) y la Fracción Insoluble-Insoluble.



**Figura 11.** Diseño de ensayo II de expresión en células *E. coli* NEB 5alpha

#### 2.10.4.3 Cromatografía de Afinidad por Ión Metálico Inmovilizado (IMAC)

Se realizó una Cromatografía de Afinidad por Ión Metálico Inmovilizado (IMAC) con la Fracción Soluble de la inducción del clon zpHGEX 7 a Temperatura ambiente (FS zpHGEX7 Tamb). Se utilizó una columna de cromatografía de 12 mL con 2mL de matriz Ni-NTA (General Electric).

El procedimiento seguido fue:

1. Se lavó la matriz con 20 mL de H<sub>2</sub>O (10 volúmenes de lecho de columna).
2. Se equilibró la columna con 10 volúmenes de buffer de Tris-NaCl.
3. Se filtró la muestra FS zpHGEX7 Tamb mediante un filtro de jeringa 0,22 µm.
4. Se colocaron 10 mL de la fracción soluble en la columna. Luego de tajarla se mantuvo en agitación orbital durante 30 minutos para permitir la adsorción.

5. Se recogió el Percolado (P) y se almacenó (inicialmente en hielo y posteriormente a  $-20^{\circ}\text{C}$ ).
  6. Se repitieron los pasos 4 y 5 hasta completar el volumen total de la fracción soluble.
  7. Se lavó la columna con 20 mL de buffer Tris-NaCl, colectando todo el volumen denominado Lavado (L).
  8. Se realizó la elución con el buffer Tris-NaCl 500mM de Imidazol, recogiendo fracciones de 1 mL hasta los 8 mL. El seguimiento del proceso se realizó mediante el método de Bradford “visual” continuando con la elución hasta que ya no se detecte la presencia de proteínas en los eluatos. Las eluciones se guardaron a  $-20^{\circ}\text{C}$ .
- De cada muestra se guardó una alícuota bien identificada a  $-20^{\circ}\text{C}$ .
- Todas las muestras obtenidas se observaron mediante electroforesis en condiciones desnaturalizantes como se describió previamente.

### **2.10.5 Expresión de péptido recombinante en *E. coli* BL21 (STAR)**

#### **2.10.5.1 Transformación de bacterias *E. coli* BL21 (STAR)**

Se transformaron bacterias *E. coli* BL21 (STAR) químicamente competentes que estaban congeladas a  $-80^{\circ}\text{C}$ . La alícuota de bacterias de 100  $\mu\text{L}$  se transfirió de rápidamente de  $-80^{\circ}\text{C}$  a hielo y se mantuvo por 10 minutos. Luego se dividieron los 100  $\mu\text{L}$  en dos tubos con 50  $\mu\text{L}$  de bacterias y se agregaron 50 ng de los plásmidos zpLGEX7 y zpHGEX7, respectivamente a cada tubo. Se mezcló suavemente y se incubó por 20 minutos en hielo. El shock térmico se realizó a  $42^{\circ}\text{C}$  (exacto) en baño de agua por 90 segundos. A cada tubo se le agregó 350  $\mu\text{L}$  de medio LB estéril y se incubó en agitación a  $37^{\circ}\text{C}$  durante 50 minutos. Luego se plaquearon en LB ampicilina 50 y 100  $\mu\text{L}$  por placa, para cada plásmido y se incubaron a  $37^{\circ}\text{C}$  toda la noche. Al día siguiente se realizó el aislamiento de 8 colonias en placas LB ampicilina con cuadrantes. Luego se realizaron las minipreparaciones del ADN plasmídico por lisis alcalina. La confirmación de la transformación se efectuó por liberación de inserto luego de la digestión con *EcoRI* y por secuenciación, como se describió previamente.

## 2.10.5.2 Expresión en *E. coli* BL21 (STAR)

### 2.10.5.2a Fraccionamiento y purificación

Luego de confirmar las secuencias de los clones se seleccionaron zpLGEX 5 y zpHGEX 3 para realizar un nuevo ensayo de expresión. Se sembró una placa LB ampicilina por clon con estría gruesa. Se incubaron a 37°C toda la noche. Se inocularon 50 mL del medio autoinductor ZYM 5052 (AnexoII) suplementado con ampicilina con el raspado de toda la placa un matraz por clon. Se incubó a 37°C en agitación orbital hasta lograr una DO<sub>600nm</sub> de 8 (18hs). Se cosecharon las bacterias centrifugando a 6000g, descartando el sobrenadante.

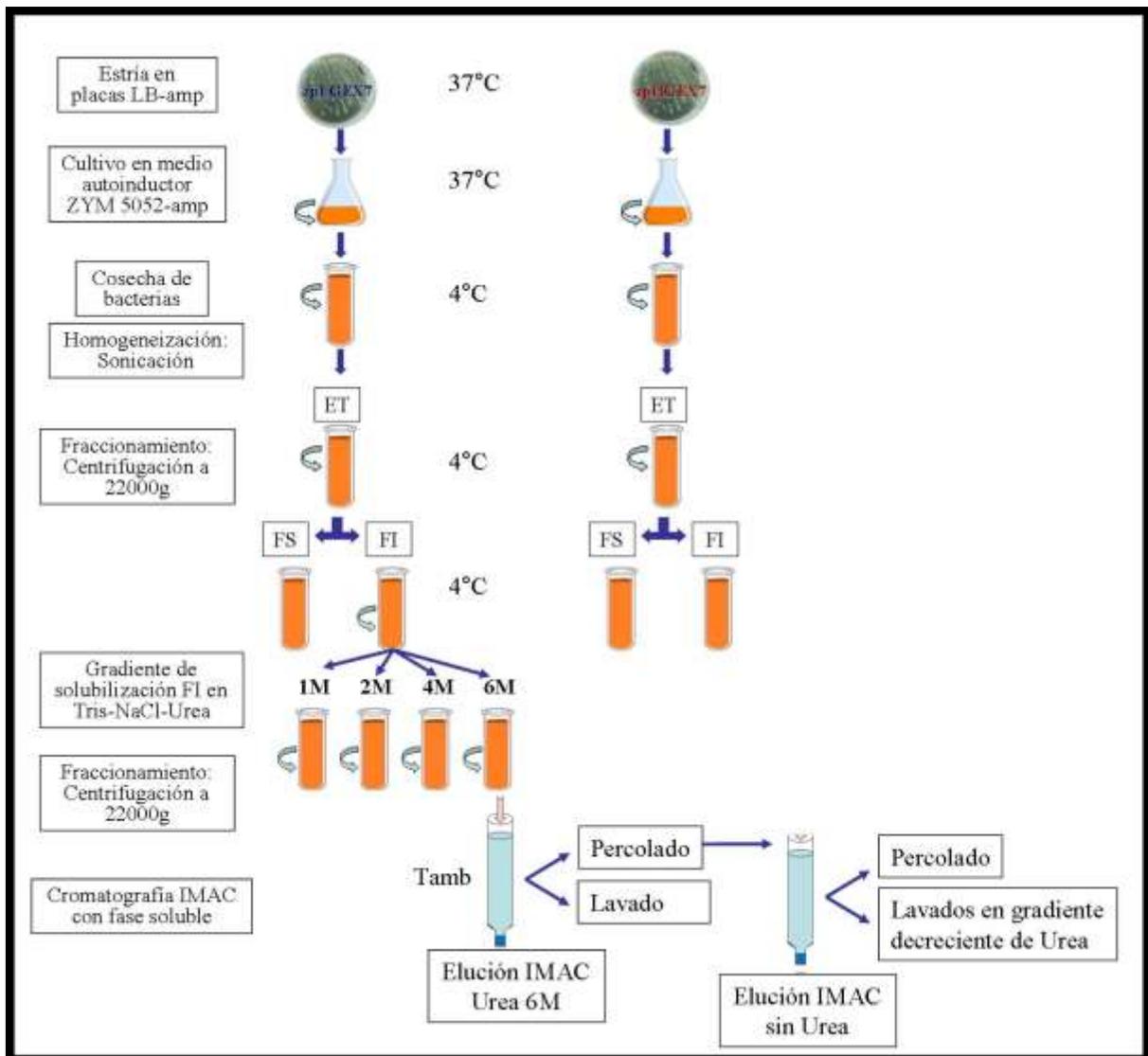


Figura 12. Diseño de expresión, fraccionamiento y purificación de zpLGEX y zpHGEX en *E. coli* BL21(star)

### 2.10.5.2b Solubilización de Fracción Insoluble zpLGEX 5 con gradiente de Urea

Se realizó solubilización con concentraciones crecientes de Urea de la Fracción Insoluble zpLGEX 5 de la inducción a 37°C en *E. coli* BL21 (STAR). A partir de la suspensión proteica de la Fracción Insoluble en Tris-NaCl (Susp. FI), se obtuvieron diluciones en diferentes concentraciones de Urea. El ensayo se llevó a cabo con volumen final de 300 µL y concentraciones de Urea 0, 1, 2, 4 y 6 M según la tabla 18.

Conc. Urea	Vol. Urea 8M (µL)	Vol. de Susp. FI (µL)	% Susp. Inicial (µL)	Vol. de muestra 25% (µL)	Vol. Urea 8M (µL)
s/Urea	0	300	100%	37,5	112,5
1M	37,5	262,5	88%	42,6	107,4
2M	75	225	75%	50	100
4M	150	150	50%	75	75
6M	225	75	25%	150	0

**Tabla 18.** Volúmenes para la preparación de muestras solubilizadas en Urea

Luego de agregar la cantidad correspondiente de Urea 8M se mezcló inicialmente por vortex. Posteriormente se realizaron 5 rondas de baño de sonicación de 8 minutos cada una, usando hielo para mantener baja la temperatura. Se mezcló nuevamente por vortex y se centrifugó a 14000g por 15 minutos. Se retiró de cada tubo el volumen de sobrenadante equivalente al 25% de la muestra inicial. Se agregó Urea 8M hasta completar los 150 µL. Los resultados se observaron mediante electroforesis en Acrilamida 12% con espesor de 1,5 mm usando 40 µL de cada muestra con 10 µL de buffer de azul de bromofenol, glicerol y SDS (sin calentar).

### 2.10.5.2c Cromatografía de Afinidad por Ión Metálico Inmovilizado (IMAC) de Fracción Insoluble zpLGEX 5 37°C

Se realizó una cromatografía de Afinidad por Ión Metálico Inmovilizado (IMAC) de Fracción Insoluble zpLGEX 5 37°C, solubilizada en Urea 6M. El pellet proveniente del fraccionamiento se resuspendió en buffer Tris-NaCl Urea 6M con vortex. Se completó la solubilización con sonicador de pulso (40% del tiempo de pulso, 60% de potencia de sonicación (Power), por 15 minutos en baño de hielo y agua). El extracto proteico se centrifugó a 14000g y el sobrenadante se transfirió a la columna de cromatografía IMAC

equilibrada con Tris-NaCl-Urea 6M. Los siguientes pasos se siguieron según ya se describió, pero usando buffer Tris-NaCl-Urea 6M.

Las muestras obtenidas se analizaron mediante electroforesis en condiciones desnaturizantes como se describió previamente.

#### **2.10.5.2d Renaturalización de ZPLGEX en IMAC con gradiente de Urea**

El percolado del paso anterior (Percolado de IMAC de Fracción Insoluble zpLGEX 5 37°C, solubilizada en Tris-NaCl-Urea 6M) se pasó nuevamente por la columna de cromatografía IMAC equilibrada con Tris-NaCl-Urea 6M y posteriormente se lavó la columna con Tris-NaCl en concentraciones decrecientes de Urea. El gradiente de Urea se generó con 20 mL de Tris-NaCl-Urea 6M, 15 mL de Tris-NaCl-Urea 4M, 15 mL de Tris-NaCl-Urea 2M, 15 mL de Tris-NaCl-Urea 1M, 20 mL de Tris-NaCl-Urea 0,5M, 10 Tris-NaCl-Urea 0,5M, terminando el lavado con 10 mL Tris-NaCl sin Urea.

La elución se realizó con Tris-NaCl 500mM Imidazol colectando en alícuotas de 1 mL.

Las muestras obtenidas se analizaron mediante electroforesis en condiciones desnaturizantes como se describió previamente.

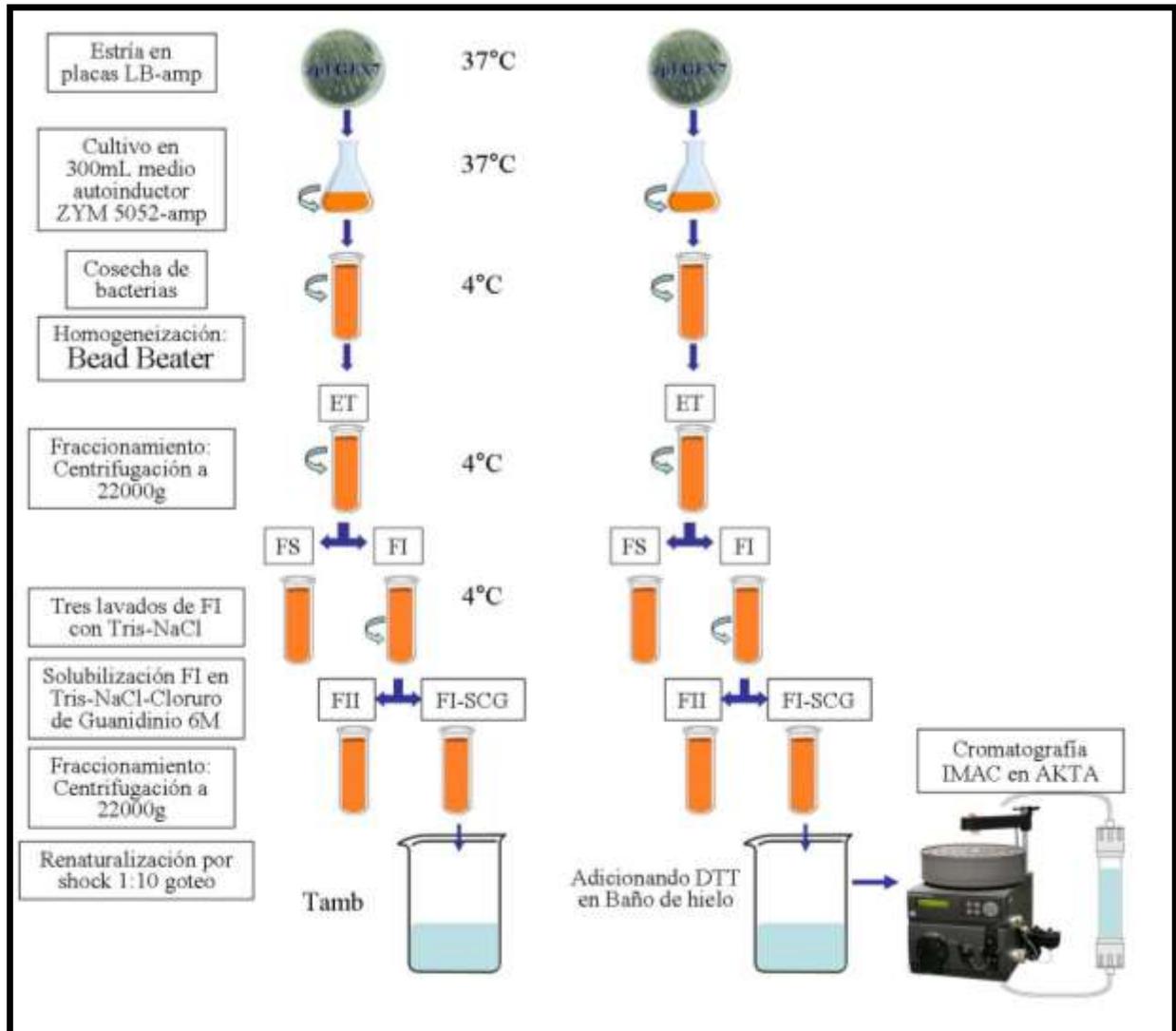
#### **2.10.5e Concentración y lavado de Imidazol**

Se utilizó el Centricon YM10 (Amicon Bioseparations) en las Eluciones 2 a 5 de la cromatografía anterior. Se centrifugaron a 2200g en centrífuga Sigma rotor 13071 a temperatura ambiente de 20°C, agregando 1 mL de elución cada media hora hasta obtener 500µL de volumen de las eluciones. Posteriormente de la misma forma se lavó con 4mL de Buffer Tris-NaCl, para obtener 500µL de Concentrado (C). Este concentrado se observó mediante electroforesis desnaturizante y la concentración se midió con el método Ácido Bicincónico (BCA).

#### **2.10.6 Ensayo de expresión de ZPLGEX y solubilización en Cloruro de Guanidinio**

Se realizó un nuevo cultivo bacteriano de 300 mL de zpLGEX 5 en las condiciones descritas previamente obteniendo 3 gramos de bacterias. La lisis bacteriana se realizó con “Beadbeater” (BioSpec) usando 25 mL de Tris-NaCl y 25 mL de esferas de vidrio entre 200 y 500 µm de diámetro (Thomas Scientific). El ciclado usado fue de 6 ciclos de 1 minuto de giro y 1 minuto de descanso. El fraccionamiento se realizó por centrifugación a 14000g por 15 minutos a 4°C, el sobrenadante se guardó aparte. La Fracción Insoluble se lavó 3 veces

con 20 mL de Tris-NaCl. Posteriormente se solubilizó con Tris-NaCl-Cloruro de Guanidinio 6M. Para facilitar la solubilización se agregaron 8 esferas de vidrio de 5 mm de diámetro usando vortex. Se centrifugó nuevamente a 14000g y el pellet se descartó. El sobrenadante se conservó en baño de hielo y agua en la heladera.



**Figura 13.** Ensayo de expresión de zplGEX y solubilización en Cloruro de Guanidinio

### 2.10.6a Renaturalización por Shock, dilución 1:10

Con el sobrenadante de la solubilización se ensayó la renaturalización por shock de dilución. Se procedió a diluir 5 mL de sobrenadante en 50 mL Tris-NaCl por goteo espaciado

con un flujo de 5 mL por hora. Los 50 mL de buffer se colocaron en agitador magnético y en baño de agua y hielo. La dilución resultante se centrifugó a 14000g por 15 minutos a 4°C.

#### **2.10.6b Segunda renaturalización por Shock, dilución 1:10**

Se realizó un nuevo cultivo y fraccionamiento según se explica a partir de Solubilización con Cloruro de Guanidinio, pero la solubilización se realizó agregando DTT (hasta llegar a una concentración 30 mM) al Tris-NaCl Cloruro de Guanidinio 6M. Posteriormente se efectuó una nueva renaturalización por shock de dilución en las condiciones antes mencionadas.

#### **2.10.6c Cromatografía de Afinidad por Ión Metálico Inmovilizado (IMAC) en AKTA**

Con la Fracción Insoluble Renaturalizada se realizó una cromatografía de Afinidad por Ión Metálico Inmovilizado (IMAC) en AKTA en una columna HisTrap FF crude (General Electric) de 1 mL.

#### **2.10.7 Producción de anticuerpos**

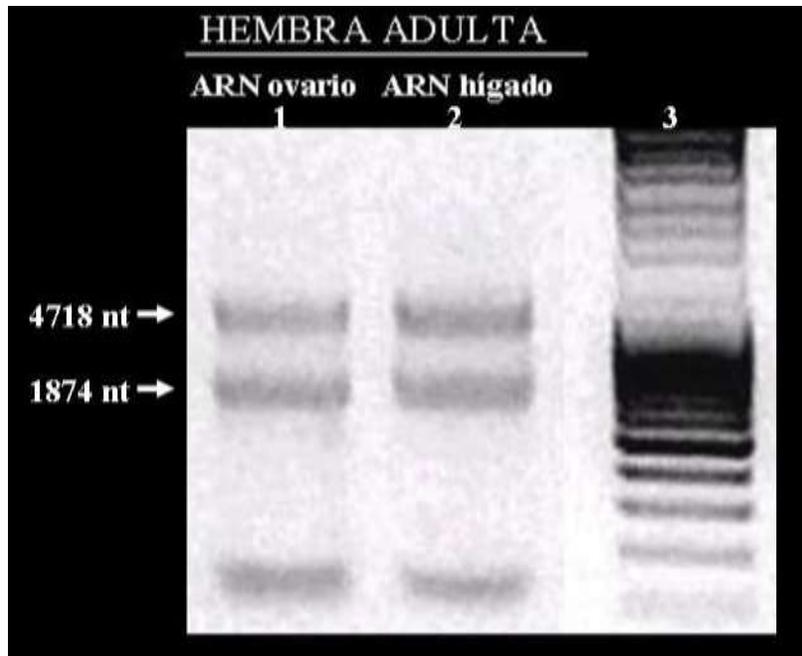
La producción de un antisuero preparado en conejo se realizaría a través del Parque Científico y Tecnológico de Pando. Al cabo de aproximadamente 60 días se entregarían 10 mL de antisuero testeado por Inmunoblot y 1 mL de suero preinmune. Los requerimientos para la obtención serían: no menos de 1,2 mg de la proteína de 240 AA (asumiendo un PM de alrededor de 24 kDa) y no menos de 1,5 mg de la de 90 AA (asumiendo un PM de 9 kDa y sin el fragmento correspondiente a la GST) para inmunizar y realizar la evaluación de la producción de Anticuerpos, a una concentración de 1 mg/mL aprox. En caso de utilizar las proteínas de fusión, alcanzaría con 1.2 mg en ambos casos. La inmunización se realiza con una solución de la proteína emulsificada en adyuvante oleoso.

### 3 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

#### 3.1 Identificación de genes coriónicos en *Austrolebias charrua*

##### 3.1.1 Estimación de la calidad y concentración del ARN total

El análisis electroforético permitió observar la calidad de los ARNs totales obtenidos a partir de ovario e hígado de hembra adulta de *A. charrua*.



**Figura 14. Electroforesis de los ARNs totales obtenidos de *A. charrua* hembra** carril 1- Hígado de hembra; carril 2- Ovario; carril 3- Marcador de pares de bases (Mass Ruler DNA Ladder, Fermentas).

A partir de la imagen obtenida podemos concluir que los ARNs presentaron buena calidad y destacable integridad, sin mostrar indicios de degradación. Esta integridad se aprecia claramente las dos muestras donde se observan las dos bandas correspondientes a los ARN ribosomales 28S (4718 nt) y 18S (1874 nt). La banda inferior observada en ambos carriles 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 que corresponde a los ARN mensajeros.

La estimación de las concentraciones de ARN (Tabla 19) realizada mediante espectrofotómetro de microvolúmenes o Nanodrop, indica que es posible usar estas muestras en el siguiente paso con la enzima retrotranscriptasa Superscript III (Invitrogen) que necesita

un rango de 10 pg–5µg de ARN total para un correcto funcionamiento. Estos resultados habilitan el empleo de los ARNs aislados como molde para la retrotranscripción, validando el método de obtención y fijación de las muestras, así como, el método de aislamiento de ARN total que podrá ser utilizado para las siguientes técnicas.

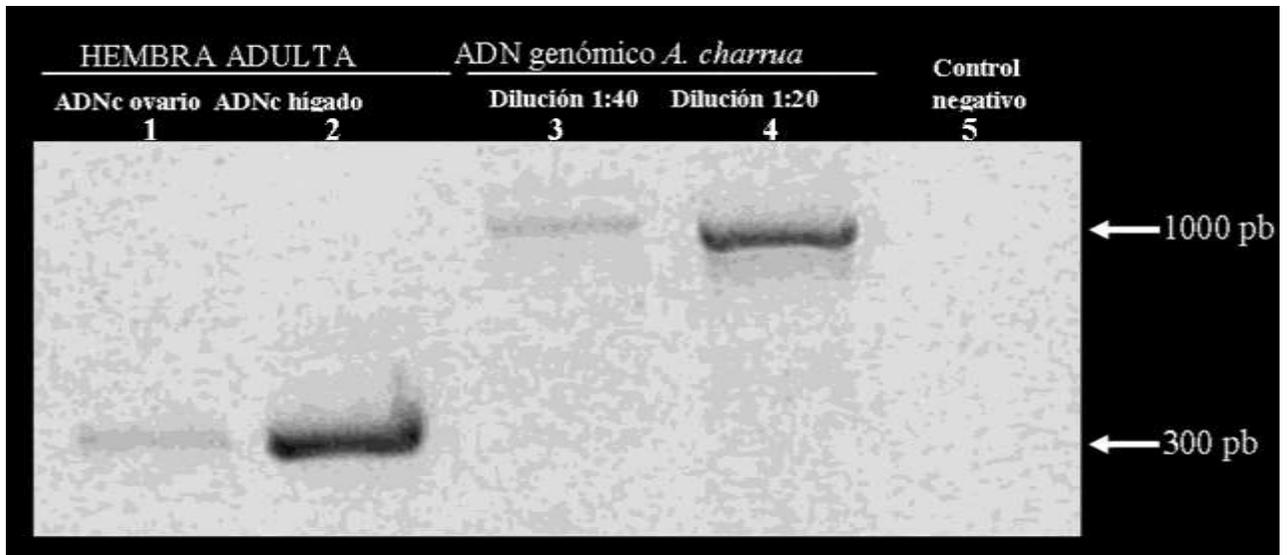
Muestras	Concentración (ng/µl)
Hígado de hembra adulta	194
Ovario de hembra adulta	105

**Tabla 19.** Estimaciones de la concentración de los ARNs

### 3.1.2 Evaluación de la síntesis del ADNc

La calidad del ADNc obtenido se analizó mediante la amplificación de la actina beta utilizando oligonucleótidos diseñados para el ADNc de *Danio rerio*, en las condiciones mencionadas en literal 2.2.5. Mediante la observación de la electroforesis se reveló la amplificación de una banda de aproximadamente 300 pares de bases para los ADNc sintetizados a partir de los ARN de ovario e hígado de hembra adulta (Fig. 15). Estos resultados concuerdan con los descritos para la actina beta de *D. rerio* (banda de 340 pares de bases) (Barralo y col. 1999)

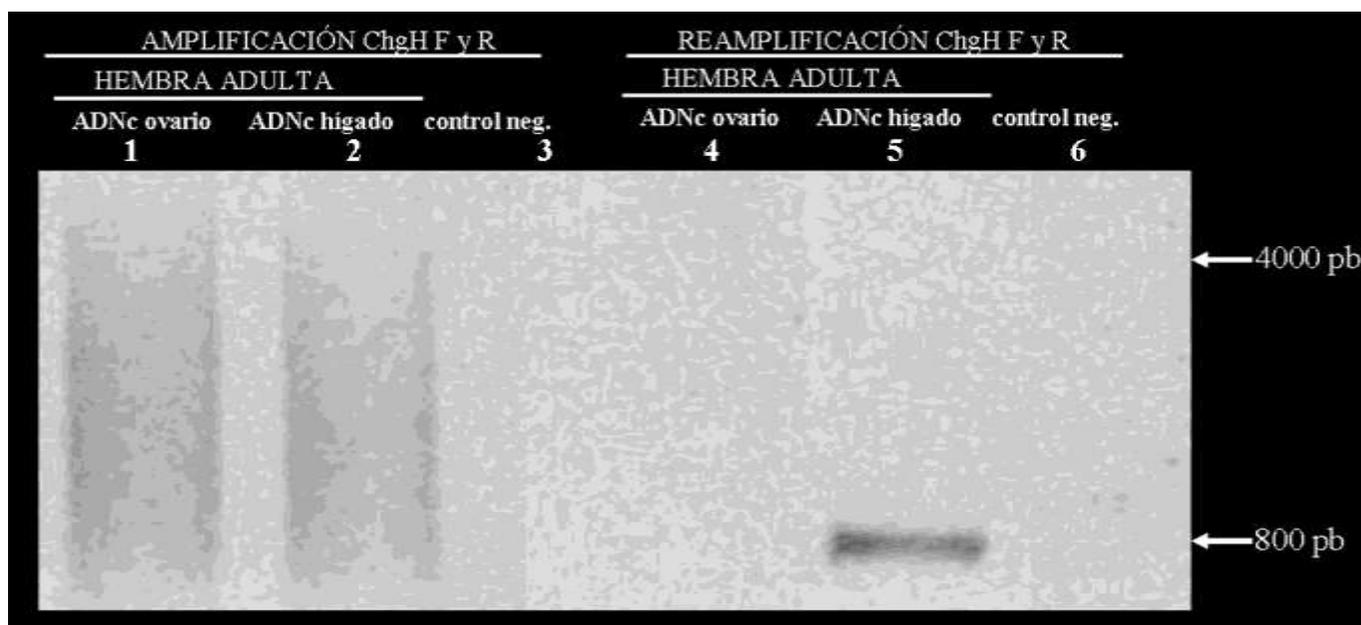
La ausencia de bandas en el carril 5 (control negativo de la reacción) permitió concluir que los productos de amplificación obtenidos no provienen de posibles contaminantes en los reactivos utilizados. A su vez, este experimento confirmó que los ADNc obtenidos no presentaban contaminación con ADN genómico; ya que como se muestra en los carriles 3 y 4, la amplificación en presencia de ADN genómico de *A. charrua*, da una banda de aproximadamente 1000 pares de bases. Esta diferencia en el tamaño de las bandas de amplificación se explicaría por la presencia de intrones en la secuencia de actina del ADN genómico.



**Figura 15. Análisis electroforético de amplificación en tiempo final con los oligonucleótidos heterólogos de  $\beta$ -actina RSA**  
 carril 1- ADNc ovario de hembra adulta; carril 2- ADNc hígado de hembra adulta; carril 3- ADN genómico de *A. charrua* dilución 1:40; carril 4- ADN genómico de *A. charrua* dilución 1:20 hígado de hembra adulta; carril 5- control negativo de la reacción.

### 3.1.3 Amplificación en tiempo final con oligonucleótidos degenerados para Coriogenina H

Luego de comprobada la calidad del ADNc de ovario e hígado de hembra adulta, se realizaron los ensayos de amplificación con los oligonucleótidos degenerados ChgH-F y ChgH-R (Yu y col. 2006) utilizando como temperatura de hibridación 48 °C (1,5 °C por debajo la menor de las temperaturas de hibridación del par de oligonucleótidos). El registro fotográfico de la electroforesis (Fig. 16), revela un sombreado entre los 700 y 5000 pares de bases (para la primera amplificación, carriles 1 y 2), posiblemente por efecto de amplificación inespecífica a partir del ADNc usado como molde. Se descartan posibles contaminaciones por la ausencia de bandas o sombreado en el control negativo. Al realizar una segunda amplificación, se aumentó en 1 °C la temperatura de hibridación para aumentar la especificidad, y al utilizar como molde una dilución 1:20 de los productos de amplificación de la primer reacción se obtuvo una banda de aproximadamente 800 pares de bases en la muestra correspondiente a ADNc de hígado de hembra adulta. En el carril 6 correspondiente al control negativo no se observa amplificación.



**Figura 16. Análisis electroforético de amplificación en tiempo final con oligonucleótidos degenerados para Coriogenina H:** carril 1- Amplificación de ADNc Ovario; carril 2- Amplificación de ADNc Hígado de hembra; carril 3- Control negativo amplificación; carril 4- Reamplificación de Dilución 1:20 del producto de amplificación de Ovario previo; carril 5- Reamplificación de Dilución 1:20 del producto de amplificación de Hígado de hembra previo; carril 6- Control negativo Reamplificación.

### 3.1.4 Amplificación en tiempo final con oligonucleótidos degenerados para Coriogenina L

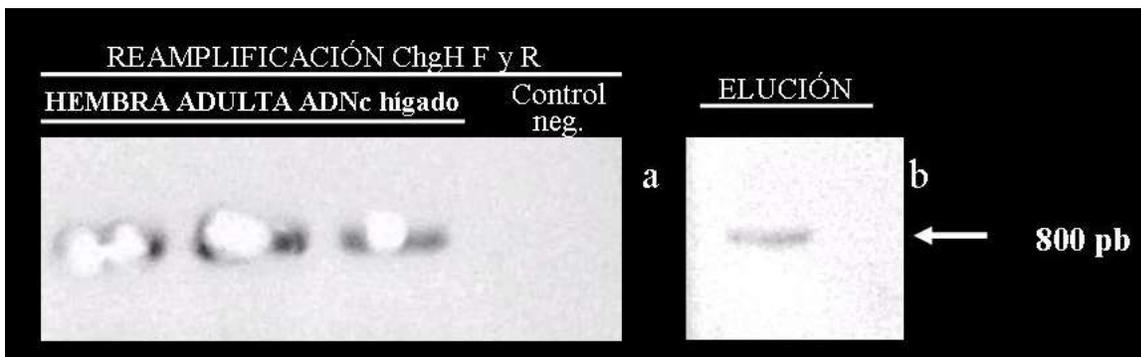
Con los mismos ADNc de ovario e hígado de hembra adulta utilizados previamente, se realizaron los ensayos de amplificación con los oligonucleótidos degenerados ChgL-F y ChgL-R (Yu y col. 2006). En este caso utilizando como temperatura de hibridación 52 °C (0,9 °C por debajo la menor de las temperaturas de hibridación del par de oligonucleótidos) en la primera amplificación se obtuvo una banda de aproximadamente 200 pares de bases en la muestra correspondiente a ADNc de hígado de hembra adulta (Fig. 17). En el carril 3 correspondiente al control negativo no se observa amplificación.



**Figura 17. Análisis electroforético de amplificación en tiempo final con oligonucleótidos degenerados para Coriogenina L:** carril 1- Amplificación de ADNc Ovario; carril 2- Amplificación de ADNc Hígado de hembra; carril 3- Control negativo amplificación.

### 3.1.5 Purificación de los productos obtenidos

Una vez repetidos y confirmados los resultados de las amplificaciones para los tres juegos de oligonucleótidos, los respectivos productos se reunieron y se sometieron a electroforesis en las condiciones detalladas en literal 2.2.7, se realizó el recorte de las bandas obtenidas a partir del ADNc de hígado de hembra adulta (Fig 18a). Luego de la elución de las bandas de ADN, se observó la calidad de la elución al obtener la banda a la altura esperada (Fig. 18b). A modo de ejemplo se muestra el recorte y el producto eluido de la amplificación con los oligonucleótidos para Coriogenina H.



**Figura 18.** a- Zona de recorte de la banda de amplificación con oligonucleótidos degenerados para Coriogenina H usando como molde ADNc de hígado de hembra adulta. b- Producto de elución.

Las concentraciones de las eluciones se estimaron mediante el programa ImageJ (Java Image, Abramoff, 2004; Rasband, 1997-2009).

Amplificación con oligonucleótidos	Concentración de elución (ng/μL)
Coriogenina H	5,2
Coriogenina L	6,7
Actina RSA	5,4

**Tabla 20.** Concentraciones estimadas de las eluciones obtenidas.

### 3.1.6 Secuenciación directa de los productos de amplificación

Luego de comprobar que la concentración de los productos de amplificación se encontraba dentro del rango requerido para su secuenciación, los productos eluidos se enviaron a secuenciar al Servicio de Secuenciación del IP-Montevideo.

Las secuencias resultantes obtenidas, luego del empalme de las lecturas con los oligonucleótidos directo y reverso, fueron:

Secuencia 1: 626pb obtenida con oligonucleótidos para Coriogenina H

```
TCAATTAGTTTACTTGGAAGTGGTCCACATTGCAGTCCTGTTGGTACTACNTCA
GCTTTTGCCATCTACCANTTCCCTGTGACTGAATGTGGCAGTGTGATGACGGA
GGGGCTGGGTTTATAAGTTATGANAAACAGTATGATCTCTTCATACGAAGTGG
CAGTTGGGCTTTTGGATCCATCACCANAGACAGTCACTTTGAGCTGCNTATC
CAGTGCAAATACACTGCTACTGCCGTTGAGGCTTTGGTCATTGAGGTTGGTGT
GGTTCCTGCACCACCAGCAGTTGCAGCTCCTGGACCTCTGCGTGTTGAGCTCA
GGATTGGCAATGGAGTTTGTACTACCAAGGTTGTATCGAANAACAAGTGGC
CTACACCTCCTATTATGCTGATACTGACTACCCTGTTACAAAGGTTCTCAGGG
ACCCAGTGTATATTGAGGTCCACATTCTGGAGAGGACTGATCCCAACATTGTC
CTGACTCTTGGAAGATGCTGGGCAAATACTAACCCCAACCCAACTATCTCCC
ACAGTGGGATTTGTTGATTAATGGATGCCCTACCGTGACGATCACTATCTAA
CAAACCTCATCCCTGTGGATTCTTCATCTGGAGTCACATACCC
```

Secuencia 2: 150pb obtenida con oligonucleótidos para Coriogenina L

```
ATACCCTGTTGCTGCTGCAACTGTTGCTGTTCAAGTCCAAGAGAGTTATGCTC
ACGTGGAAGTCAAGATGGACATGTTCCGCACTGGCCAGATCATCAATCCAGG
TGACCTCACCTAGGTGACTGTGCCCCGTATCCGAGGACCCTGC
```

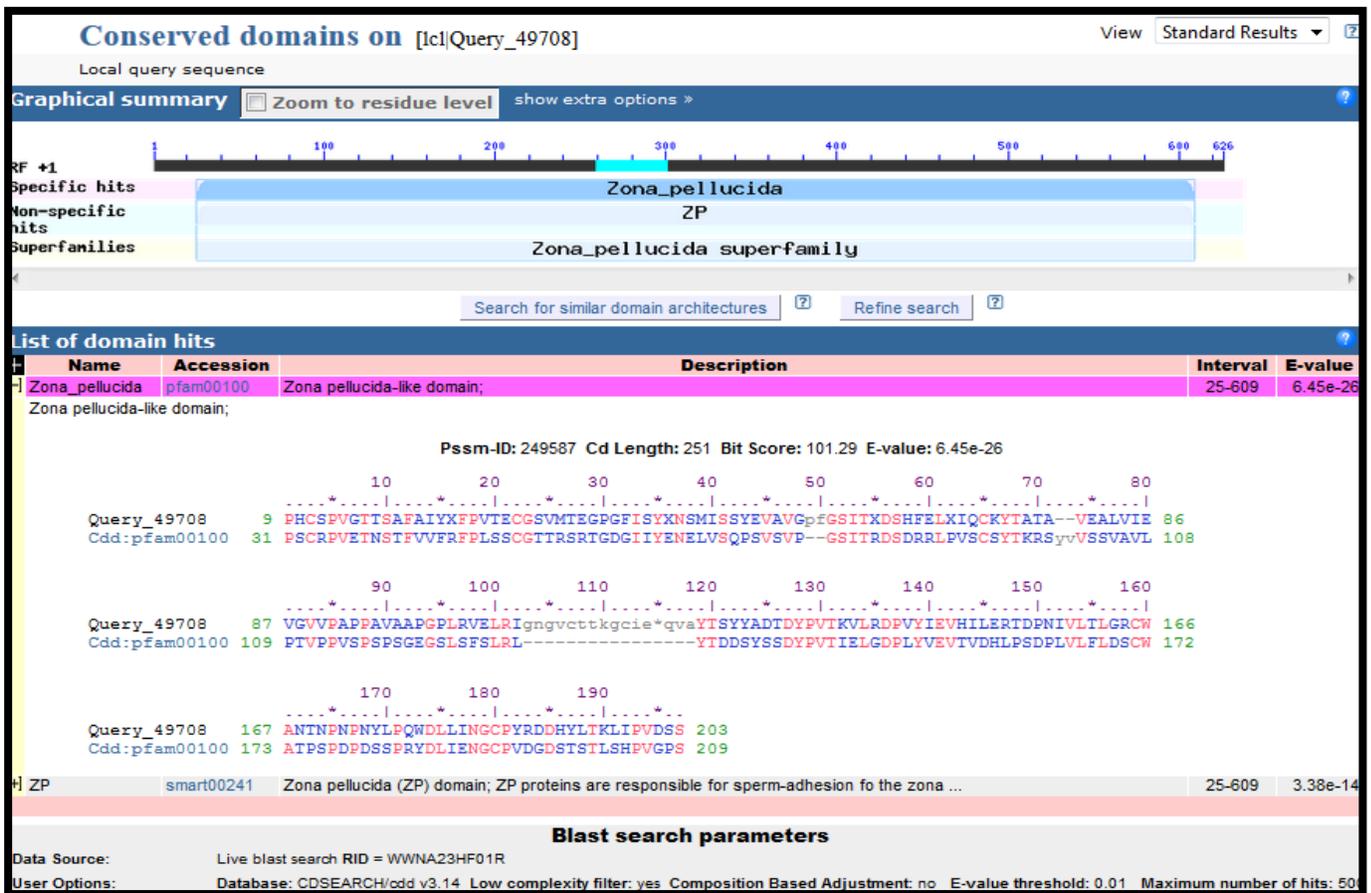
Secuencia 3: 283pb obtenida con oligonucleótidos para actina RSA 283pb

```
TCCATTGTTGGCCGTCCCAGGCATCAGGGTGTAATGGTTGGGATGGGCCAGAA
GGACAGCTATGTTGGTGATGAGGCACAGAGCAAGAGGGGTATCCTGACCCTT
AAATACCCCATCGAGCACGGTATTGTGACTAACTGGGATGACATGGAGAAGA
TCTGGCATCACACTTTCTACAATGAGCTGAGAGTTGCCCTGAGGAGCACCCA
GTCCTGCTGACGGAGGCCCTCTGAACCCCAAGGCCAACAGGGAGAAGATGA
CCCAGATCATGTTTGAGACCT
```

### 3.1.7 Identificación de las secuencias obtenidas

#### 3.1.7a Secuencia obtenida con oligonucleótidos para Coriogenina H

La búsqueda de homologías mediante el programa blastx (BLAST 2.2.22; Altschul y col. 1990) determinó la pertenencia de esta secuencia a la superfamilia Zona\_pellucida, así como la presencia de un dominio ZP (Fig. 19). También se determinó que presenta identidad entre 70 y 78% con Coriogenina H menor y Zona radiata 2 de especies de peces dentro del orden Cyprinodontiformes (Tabla 21), y de 62 y 69% de identidad con proteínas coriónicas de especies de diferentes órdenes dentro de los teleósteos.



**Figura 19.** Identificación de pertenencia a la Superfamilia Zona Pellucida y dominios conservados para la secuencia obtenida con oligonucleótidos para Coriogenina H

Proteína	Especie	Identidad	N° de acceso Gen Bank
choriogenin H minor	<i>Kryptolebias marmoratus</i>	78%	ACL00859.1
choriogenin H minor	<i>Fundulus heteroclitus</i>	75%	BAJ07537.1
PRED: zona pellucida sperm-binding protein 4-like	<i>Fundulus heteroclitus</i>	75%	XP_012735316.1
zona radiata-2	<i>Cyprinodon variegatus</i>	70%	AAT51698.1

**Tabla 21.** Principales homologías encontradas

### 3.1.7b Secuencia obtenida con oligonucleótidos para Coriogenina L

Para esta secuencia la búsqueda de homologías mediante el programa blastx también reconoció el dominio conservado ZP dentro de la secuencia, incluyendo a ésta dentro de la Superfamilia Zona Pellucida. La identidad mayor resultante fue entre 75 y 81% con Coriogenina L y zona radiata 3 de especies dentro del orden Cyprinodontiformes (Tabla 22), como en el caso de la secuencia anterior. La identidad entre 65 y 75% es presentada principalmente con Coriogenina L y proteínas coriónicas de especies de diferentes órdenes dentro de los teleósteos.

**Conserved domains on** [gi|827570265|gb|AKJ93632.1] View Standard Results

zona pellucida L, partial [Austrolebias charrua]

**Graphical summary**  Zoom to residue level show extra options

Query seq. L T M K Y P E A P Q P E V K P S V P F E L R Y P V A A R T V A V Q C Q E S Y A H V E V K M D H F G T G Q I I N P G D L T L G D C A P V S E D P A A Q V L

Non-specific hits: ZP

Superfamilies: Zona\_pellucida, Zona\_pellucida superfamily

**List of domain hits**

Name	Accession	Description	Interval	E-value
[+] ZP	smart00241	Zona pellucida (ZP) domain; ZP proteins are responsible for sperm-adhesion to the zona ...	33-76	1.87e-03
[+] Zona_pellucida	pfam00100	Zona pellucida-like domain;	33-72	3.84e-03

**Blast search parameters**

Data Source: Precalculated data, version = odd.v.3.14

Preset Options: Database: CDSEARCH/odd Low complexity filter: no Composition Based Adjustment: yes E-value threshold: 0.01

**References:**

- Marchler-Bauer A et al. (2015), "CDD: NCBI's conserved domain database.", *Nucleic Acids Res.*43(D)222-6.
- Marchler-Bauer A et al. (2011), "CDD: a Conserved Domain Database for the functional annotation of proteins.", *Nucleic Acids Res.*39(D)225-9.
- Marchler-Bauer A et al. (2009), "CDD: specific functional annotation with the Conserved Domain Database.", *Nucleic Acids Res.*37(D)205-10.
- Marchler-Bauer A, Bryant SH (2004), "CD-Search: protein domain annotations on the fly.", *Nucleic Acids Res.*32(W)327-331.

**Figura 20.** Identificación de pertenencia a la Superfamilia Zona Pellucida y dominios conservados para la secuencia obtenida con oligonucleótidos para Coriogenina L

Proteína	Especie	Identidad	Nº de acceso Gen Bank
zona radiata-3	<i>Cyprinodon variegatus</i>	81%	AAT51699.1
zona pellucida sperm-binding protein 3-like precursor	<i>Fundulus heteroclitus</i>	81%	NP_001296846.1
choriogenin L	<i>Kryptolebias marmoratus</i>	75%	ACL00860.1
PRED: zona pellucida sperm-binding protein 3-like	<i>Cynoglossus semilaevis</i>	75%	XP_008310172.1
PRED: zona pellucida sperm-binding protein 3-like	<i>Stegastes partitus</i>	73%	XP_008289239.1
Chorion protein	<i>Sparus aurata</i>	73%	CAA63709.1

**Tabla 22.** Principales homologías encontradas

### 3.1.7c Secuencia obtenida con oligonucleótidos heterólogos para actina

La búsqueda de homologías mediante el programa blastx reconoció el multidominio conservado de actina que abarca toda la secuencia obtenida. La identidad de la secuencia traducida fue del 100% con actina de diferentes grupos de eucariotas, incluyendo hongos, insectos, mamíferos, etc. Al restringir la búsqueda dentro de peces, se obtuvo una identidad del 100% con beta actina de diferentes taxones de peces (Tabla 23).

Proteína	Especie	Identidad	Nº de acceso Gen Bank
Beta-actin	<i>Rhodeus uyekei</i>	100%	AFE55711.1
Actin	<i>Fundulus heteroclitus</i>	100%	AAK83921.1
Beta-actin	<i>Squalius alburnoides</i>	100%	ABP99936.1
Beta-actin	<i>Haplochromis burtoni</i>	100%	AEH04532.1
Beta-actin	<i>Trematomus bernacchii</i>	100%	ADF45299.1

**Tabla 23.** Homologías principales dentro de peces

### 3.1.7d Identificación y designación de secuencias

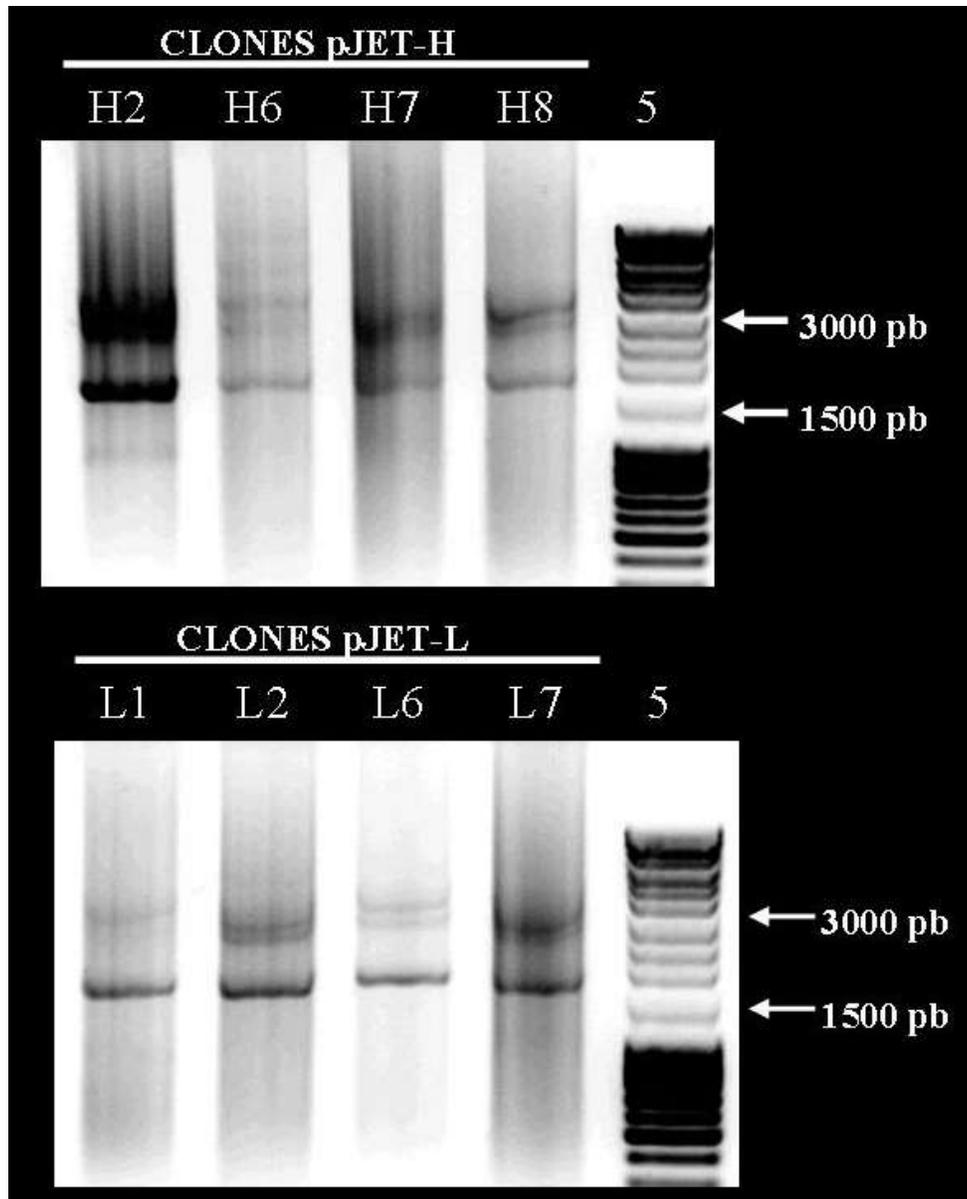
A partir del análisis de homologías se puede determinar que las secuencias obtenidas con los oligonucleótidos degenerados corresponden a dos genes coriónicos de *A. charrua*. Estas secuencias fueron designadas como *achzpH sd* y *achzpL sd*, para Coriogenina H y L, respectivamente. La nueva nomenclatura se refiere a “ach” por *Austrolebias charrua*, “zp” por zona pellucida y “H” o “L” debido a su identificación dentro de cada Familia proteica

como pesada o liviana, respectivamente y “sd” por provenir de productos de amplificación secuenciados directamente.

La secuencia obtenida por secuenciación directa del producto amplificado con los oligonucleótidos de actina RSA, se denominó como *beta-actina*. Esta secuencia se registró en Gen-Bank como *beta-actin*, partial *A. charrua* N°AKJ93634.1

### **3.1.8 Obtención de los clones de pJET-achzpH y pJET-achzpL**

Una vez confirmada la identidad de los fragmentos amplificados, se procedió a la ligación de los mismos en el vector pJET 1.2, a la transformación en las bacterias *E. coli* de la cepa JM107, selección y aislamiento de colonias y finalmente a la purificación de plásmidos mediante lisis alcalina. Por análisis electroforético se confirmó la presencia de plásmidos presumiblemente recombinantes, en las 8 colonias seleccionadas para cada fragmento. Se presentan los clones pJET-H2, pJET-H6, pJET-H7 y pJET-H8; y pJET-L1, pJET-L 2, pJET-L 6 y pJET-L 7 (Fig. 21). Se observan las diferentes conformaciones de los plásmidos: la forma superenrollada se ubica más adelantada, con respecto a la migración de la forma lineal y la de enrollamiento parcial. Se presume que los plásmidos obtenidos son recombinantes dado el sistema de selección del kit pJET 1.2, donde el inserto de ADN foráneo se integra al plásmido interrumpiendo el gen de una enzima de restricción letal para las bacterias que hayan incorporado estos plásmidos.



**Figura 21.** Plásmidos aislados (lisis alcalina) de las clones pJET-H1 a H4 y pJETL1 a L4. carril 5 arriba y abajo- Marcador pb (Mass Ruler DNA Ladder Fermentas)

Luego de analizar por electroforesis se enviaron a secuenciar tres clones de los ocho obtenidos de cada transformación: pJET-H6, pJET-H7 y pJET-H8; pJET-L1, pJET-L6 y pJET-L7. La secuenciación se realizó con los oligonucleótidos suministrados por el kit de transformación, 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 la secuencia de cada clon. Posteriormente se procedió a alinear las secuencias obtenidas por secuenciación directa y las de los plásmidos.





## 3.2 Análisis de las secuencias obtenidas

### 3.2.1 Análisis de las secuencias con Clustal X

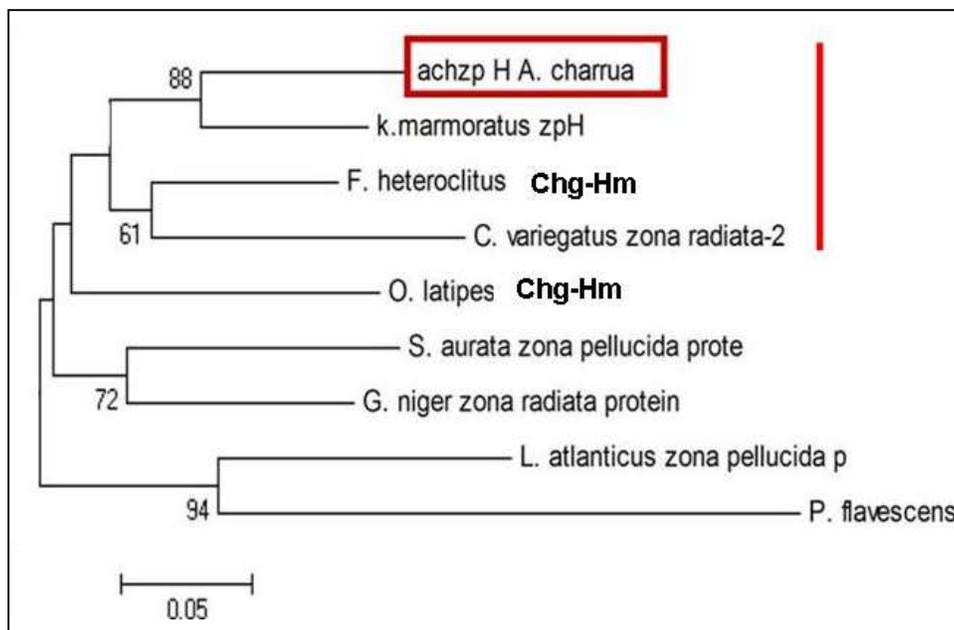
A partir de las secuencias nucleotídicas traducidas obtenidas en la sección anterior se realizaron alineamientos peptídicos, con el fin de compararlos con las secuencias obtenidas a partir de la búsqueda de homologías realizada con el programa blastx (BLAST 2.2.22; Altschul y col. 1990).

Inicialmente se comparó la secuencia *achzpH* de *A. charrua* cuya traducción teórica resultó en 203 residuos aminoacídicos, con secuencias aminoacídicas deducidas de diferentes coriogeninas del grupo H (Fig. 24). Se puede observar la gran conservación de secuencia visualizada según el código de programa Clustal X2 (Larkin y col. 2007) donde los residuos de aminoácidos idénticos se destacan con subrayado en colores y con asteriscos (\*) debajo a la posición; las conservaciones de los grupos fuertes se destacan con dos puntos (:); y la conservación de los grupos débiles se indican mediante un punto (·).

Posteriormente se compararon los 75 residuos aminoacídicos de la secuencia aminoacídica predicha de *achzpL* de *A. charrua*, con secuencias aminoacídicas deducidas de diferentes coriogeninas del grupo L (Fig. 25). En la comparación de secuencias se observan, utilizando el mismo código, una gran identidad de secuencia en la mayor parte del fragmento aminoacídico deducido.





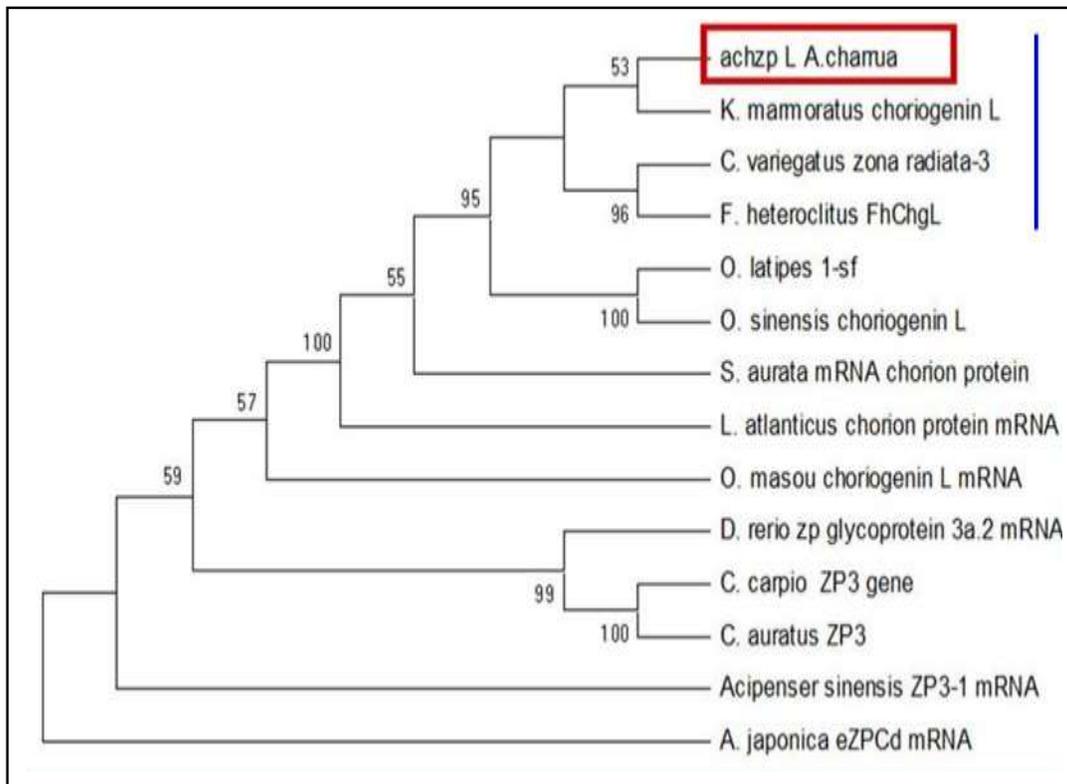


**Figura 26.** Árbol filogenético generado mediante el método de máxima parsimonia para *achzpH* con las coriogeninas de teleósteos agrupadas de la clase H. Se destacan los valores obtenidos mayores al 50%, basados en 1000 repeticiones.

### 3.2.2b Análisis filogenéticos de *achzpL*

El árbol filogenético obtenido para la secuencia nucleotídica de *achzpL* (Fig. 27), también realizado con el método de máxima parsimonia, al comparar con las secuencias de Coriogeninas de la clase L, también muestra que *achzpL* se agrupa con especies de Cyprinodontiformes (línea azul). Esta asociación se corresponde también con la distribución de especies descrita dentro de los teleósteos por diferentes autores (Parenti, 1981; Nelson 1989, 1994; Setiamarga y col. 2008).

Los números de acceso de las secuencias utilizadas para el análisis filogenético de *achzpL* fueron: AY598616 *C. variegatus*; AB533330.1 *F. heteroclitus*; AY758411.1 *O. sinensis*; NM\_001104803.1 *O. latipes*; EU867503.1 *K. marmoratus*; gi3724148 *S. aurata*; gi45239058 *L. atlanticus*; gi158132195 *O. masou*; gi763077 *C. carpio*; gi5834383 *C. auratus*; gi182891941 *D. rerio*; gi226427124 *Acipenser sinensis*; gi317413767 *A. japonica*.



**Figura 27.** Árbol filogenético generado mediante el método de máxima parsimonia para *achzpL* con las coriogeninas de teleósteos agrupadas de la clase L. Se destacan los valores obtenidos mayores al 50%, basados en 1000 repeticiones.

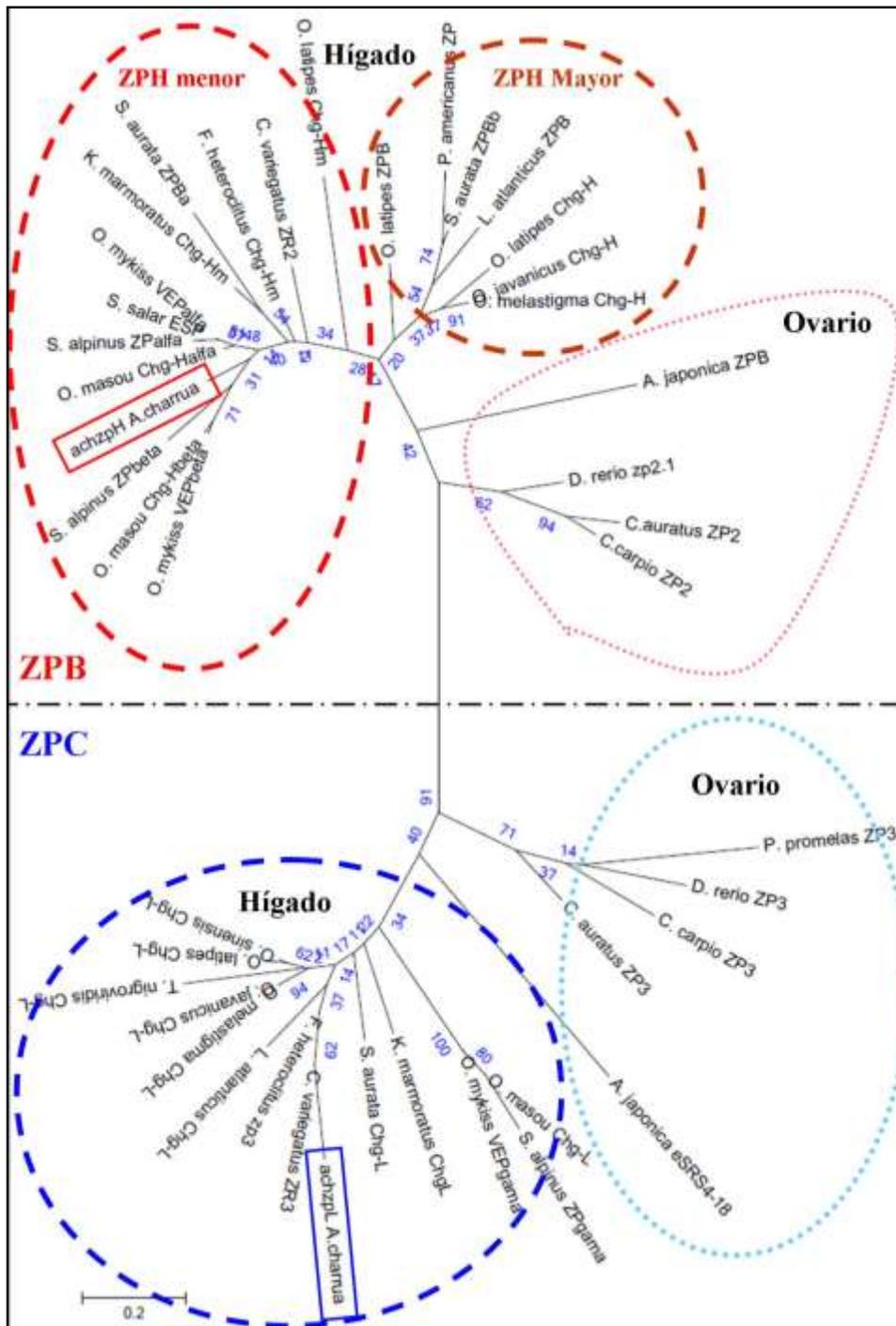
### 3.2.2c Análisis filogenéticos combinados para *achzpH* y *achzpL*

Se realizó el análisis filogenético con el método de Neighbor Joining (100 repeticiones), a partir del alineamiento peptídico de 43 secuencias incluyendo: *achzpH* y *achzpL* traducidas, además de diferentes proteínas coriónicas de la clase ZPB y ZPC (Fig. 28). Las secuencias y sus números de acceso a GenBank utilizadas para el análisis filogenético fueron: para ZPB: *Kryptolebias marmoratus Chg-Hm* (ACL00859.1), *Carassius auratus ZP2* (Z72495.1), *Cyprinus carpio* (Z72491.1), *Danio rerio ZP2* (NP\_571405), *Anguilla japonica* (BAA36592.1), *Oryzias latipes ZPB* (AAD38905.1), *Salmo salar ESP* (NP\_001117169), *Salvelinus alpinus ZPa* (AAR87393.1), *Oncorhynchus mykiss VEPa* (NP\_001117745), *Oncorhynchus masou Chg-Ha* (ABW17263.1), *Salvelinus alpinus ZPβ* (AAR87394.1), *Oncorhynchus mykiss VEPβ* (NP\_001118072), *Oncorhynchus masou Chg-Hβ* (ABW17264.1), *Sparus aurata ZPBa* (AAY21009.1), *Cyprinodon variegatus ZR2* (AAT51698.1), *Oryzias latipes Chg-Hm* (NP\_001098134), *Pseudopleuronectes americanus*

ZP (AAC59642.1), *Sparus aurata* ZPBb (AAY21007.1), *Liparis atlanticus* ZPB (AAS55643.1), *Oryzias latipes* Chg-H (NP\_001098277), *Oryzias javanicus* Chg-H (AAX09342.1), *Oryzias melastigma* Chg-H (ABN13415.1); para ZPC : *Kryptolebias marmoratus* Chg-L (ACL00860.1), *Cyprinus carpio* ZP3 (CAA88837.1), *Carassius auratus* ZP3 (AAD53946.1), *Pimephales promelas* ZP3 (AAG28398.1), *Danio rerio* ZP3 (AAD49113.1), *Anguilla japonica* eSRS4 (BAA36593.1), *Oncorhynchus masou* Chg-L (ABW17265.1), *Oncorhynchus mykiss* VEP $\gamma$  (AAF71260.1), *Salvelinus alpinus* ZP $\gamma$  (AAR87395.1), *Tetraodon nigroviridis* Chg-L (CAG11366.1), *Liparis atlanticus* Chg-L (AAS55644.1), *Sparus aurata* Chg-L (CAA63709.1), *Cyprinodon variegatus* ZR3 (AAT51699.1), *Oryzias latipes* Chg-L (AAM47575.1), *Oryzias sinensis* Chg-L (AAV34196.1), *Oryzias melastigma* Chg-L (ABN13414.1), *Oryzias javanicus* Chg-L (AAX09343.1). Con las abreviaciones: Chg, Coriogenina; eSRS, eel spermatogenesis-related substance; ESP, eggshell protein; VEP, vitelline envelope protein; ZR, zona radiata.

Siguiendo las agrupaciones descritas por diferentes autores (Spargo y Hope, 2003, Kanamori y col. 2003; Modig y col. 2007), resumidas en Rhee y col. (2009) y al compararlas con el árbol obtenido (Fig. 28), se logró identificar a la secuencia *achzpH* dentro de las proteínas coriónicas de la clase ZPB en la subclase H menor de expresión hepática (línea punteada roja, --). Esta secuencia se diferencia del grupo de ZPB de expresión ovárica (línea punteada rosada, \*\*\*), correspondiente principalmente a Cypriniformes.

La secuencia *achzpL* se ubica dentro de las secuencias de proteínas coriónicas de clase ZPC de expresión hepática (línea punteada azul, - -), diferenciándose del grupo de secuencias ZPC de expresión en ovario (línea punteada celeste, \*\*\*). Dado que los fragmentos de las ZPs de *A. charrua* son de tamaño relativamente pequeño no se logra resolver las separaciones entre clados, con índices bajos de significancia dentro de los diferentes grupos de teleósteos. Se logra dilucidar con mayor claridad y significancia a través de los árboles filogenéticos de las secciones “3.3.2 a y b”, usando el método de máxima parsimonia el cual ubica las secuencias obtenidas en *A. charrua*, correctamente dentro de los Cyprinodontiformes.



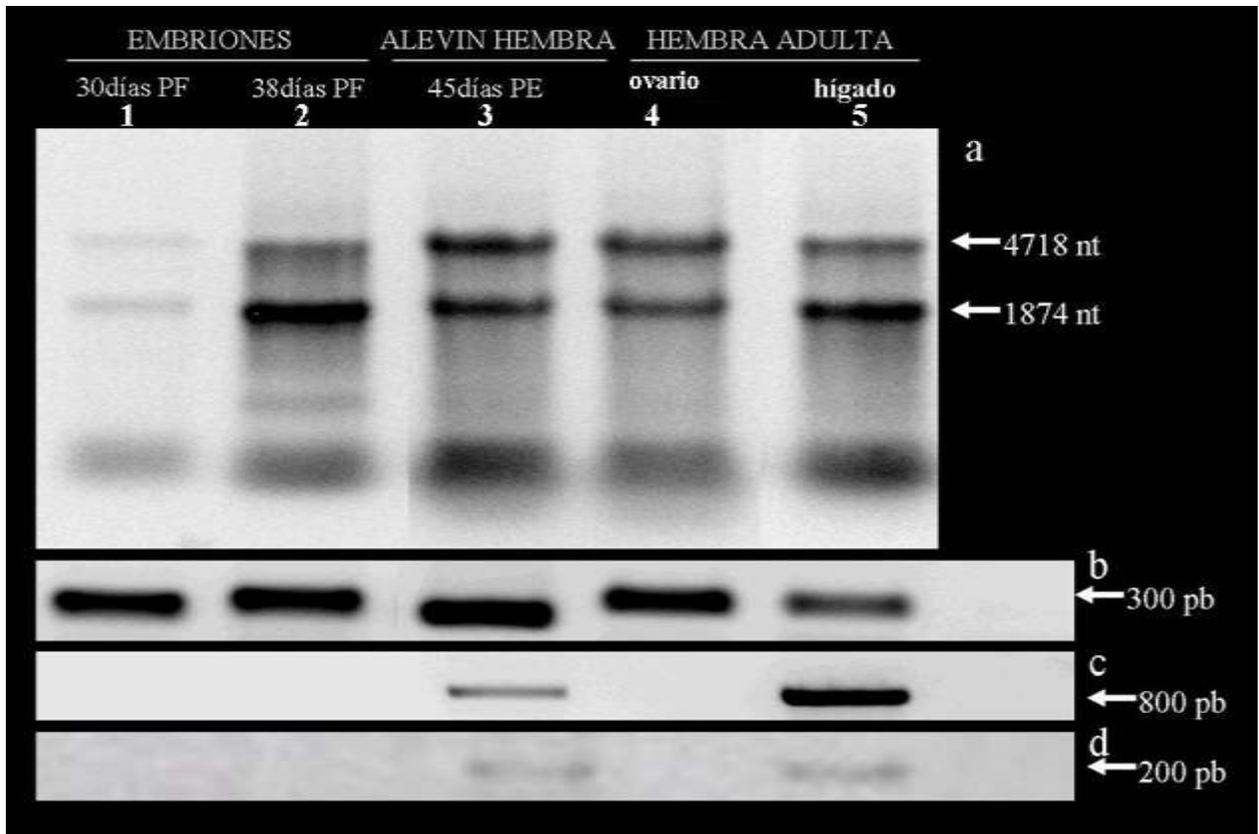
**Figura 28.** Árbol filogenético generado mediante el método de Neighbor Joining para *achzph* y *achzpl* con diferentes coriogeninas de teleósteos. Se muestran valores de bootstrap para 100 repeticiones.

### 3.3 Identificación del patrón de expresión de los genes coriónicos en diferentes estadios del ciclo de vida, usando oligonucleótidos degenerados

Para la identificación del patrón de expresión de los genes coriónicos identificados durante la ontogenia de *A. charrua*, se realizó el aislamiento de ARN total, tratamiento con DNasa I y retrotranscripción según fue descrito en sección 2.2.1 a 2.2.4 para las muestras de la tabla 6. La concentración de los ARN totales obtenidos se presenta en la tabla 24. Se realizó la valoración de la calidad de los ADNc mediante la amplificación en tiempo final con los oligonucleótidos para actina  $\beta$  RSA F y R. Se realizaron reacciones de amplificación utilizando los oligonucleótidos degenerados *ChgL F* y *R*, y *ChgH F* y *R* en las condiciones establecidas en “Amplificación *in vitro* e identificación de los genes de interés” (tablas 4 y 5, sección 2.2.5 a 2.2.6)

Muestras	N° de individuos/tubo	Concentración de ARNtotal (ng/ $\mu$ L)
Hígado de Hembra adulta	1	194
Ovario de hembra adulta	1	105
Alevín Hembra 45 días Post-eclosión	1	142
Embriones 38 días Post-fecundación	8	126
Embriones 30 días Post-fecundación	8	58

**Tabla 24.** Muestras analizadas y concentraciones de ARN total obtenidas luego del aislamiento y el tratamiento con ADNasa.



**Figura 29. Análisis electroforético**

**a) ARN Total:** carril 1- Embriones 30 días post-fecundación; carril 2- Embriones 38 días post-fecundación; carril 3- Alevín hembra 45 días post-eclosión; carril 4- Ovario de hembra adulta; carril 5- Hígado de hembra adulta.

**Reacciones de amplificación en tiempo final:**

**b)** Amplificación con los oligonucleótidos de  $\beta$ -actina RSA: los carriles corresponden con los ADNc resultantes de la retrotranscripción de los ARNs mostrados en a). **c)** Amplificación con los oligonucleótidos degenerados ChgH F y R, para Coriogenina H. **d)** Amplificación con los oligonucleótidos degenerados ChgL F y R, para Coriogenina L. El carril 6- en **b)**, **c)** y **d)** corresponde a los controles negativos de cada reacción.

En el análisis electroforético de los ARNs obtenidos se observan claramente las bandas de los ARN ribosomales 28S (4718 nt) y 18S (1874 nt), así como la banda correspondiente a los ARNs de transferencia (entre 65 y 110nt). No se observan indicios de degradación. Se comprobó la correcta síntesis del ADNc correspondiente a cada muestra y ausencia de inhibidores de amplificación, al obtener una banda única por carril a 300 pares de bases al amplificar con los oligonucleótidos de beta actina RSA, diseñados para el ADNc de esta proteína en *Danio rerio* (Barralo y col. 1999) (Fig. 29a). Al aparecer solo una banda de amplificación se concluye que no existe contaminación con ADN genómico. 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.

En el análisis electroforético de los ensayos de amplificación con los oligonucleótidos degenerados ChgH F y R y ChgL F y R (Yu y col. 2006), se identificó: una banda de amplificación de 800 pares de bases y una banda de 200 pares de bases para los oligonucleótidos ChgH F y R y ChgL F y R, respectivamente; solo para las muestras de alevín hembra (45 días post-eclosión) e hígado de hembra adulta. En el carril 6 de cada amplificación, correspondiente al control negativo, no se observó banda de amplificación. La selección de los estadios del desarrollo embrionario para este análisis se basó en la caracterización del patrón de diferenciación gonadal a escala morfológica y temporal que realizamos para esta especie y publicamos en Arezo y col. (2007). Los estadios abordados para el patrón de expresión de genes coriónicos fueron: 1) embriones de 30 días post-fecundación, con gónadas indiferenciadas (Fig. 30 a y b); 2) embriones pre-eclosión (38 días post-fecundación), donde ya se observan dos tipos gonadales diferentes: gónadas de aspecto indiferenciado (machos presuntivos) y gónadas en las que se identifican ovogonias y ovocitos previtelogénicos (Fig. 30 c y d); 3) alevín hembra de 45 días post-eclosión y 4) ovario e hígado de hembra adulta.

De acuerdo a las condiciones de amplificación establecidas para cada juego de oligonucleótidos podemos inferir la ausencia de los ADNc de *achzpH* y *achzpL*, mensajeros de Coriogeninas H y L respectivamente, en las muestras correspondientes a los embriones de 30 días post-fecundación y embriones pre-eclosión. En los embriones de 30 días post-fecundación resulta coherente ya que de acuerdo a los datos previos (Arezo y col, 2007) y lo que se observa en la figura 30b no hay todavía diferenciación gonadal. En cambio, en embriones pre-eclosión contrariamente a lo esperado, tampoco se detectó amplificación de estos fragmentos. La presunción de la expresión en este estadio se basa en que la envoltura coriónica comienza a depositarse en etapas tempranas de la vitelogénesis (Wallace y Selman, 1981; Berois y col. 2007) y de acuerdo a Arezo y col. (2007) en el pool de embriones analizados deberían encontrarse hembras en desarrollo con ovarios conteniendo ovocitos en este estado. Además, comparando los resultados obtenidos difieren con los obtenidos por Rhee y col. (2009) en una especie de la misma Familia, *Kriptolebias marmoratus* (Cyprinodontiformes, Rivulidae). Estos autores constatan que la expresión de coriogenina L y una corionenina H mayor en embriones desde estadio 2 (embrión somático pigmentado)

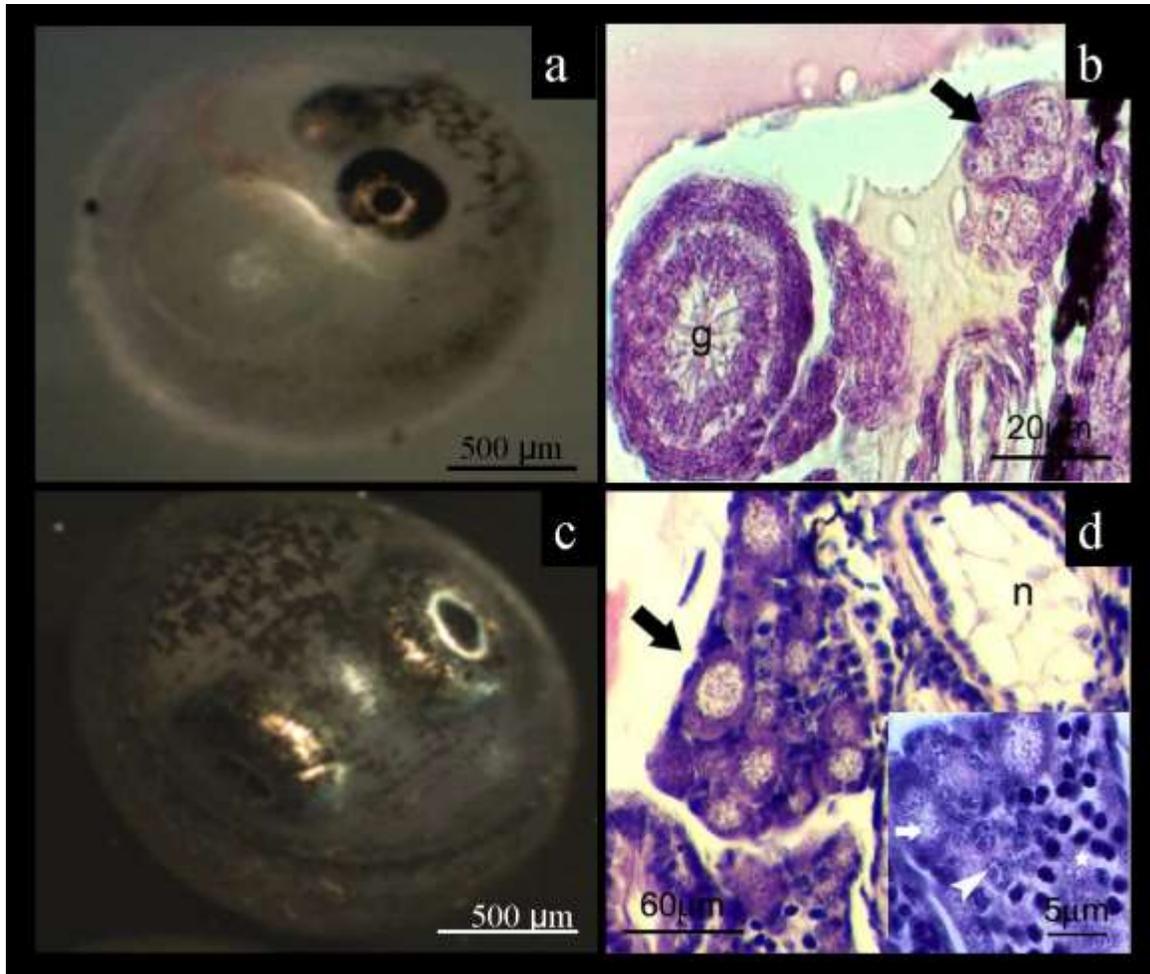
hasta alevín recién eclosionado. La diferencia en el patrón de expresión de la coriogenina L durante el desarrollo embrionario de las dos especies podría atribuirse a que los patrones de expresión son diferentes en ambas especies o a que Rhee y col. (2009) utilizaron ensayos de amplificación cuantitativa en tiempo real. Este ensayo al tener mayor sensibilidad pudo haber detectado niveles mínimos de expresión, no detectables en ensayos de amplificación en tiempo final con oligonucleótidos degenerados como los utilizados en esta etapa de la presente tesis.

Asimismo, se demostró la presencia de los ADNc de *achzpH* y *achzpL*, expresión de los mensajeros de Coriogeninas H y L, en las muestras correspondientes a alevín hembra e hígado de hembra adulta. El resultado positivo en alevines hembra de 45 días post-eclosión resulta relevante por corresponder al inicio de la actividad ovárica durante el proceso de diferenciación sexual en la especie, descrito en Arezo y col. (2007).

La identificación del órgano de expresión de estos genes coriónicos a nivel del hígado en hembras adultas (Fig. 29), se encuentra en concordancia con los análisis filogenéticos presentados previamente (Fig. 28) y con resultados obtenidos en peces de varios órdenes con diferentes grados de divergencia. En particular se destaca la coherencia con los trabajos en que se ha encontrado expresión hepática dentro del orden Cyprinodontiformes al que pertenece *Austrolebias* (*Kryptolebias marmoratus*, Rhee y col. 2009; *Cyprinodon variegatus*, Knoebl y col. 2004), como al orden hermano *Beloniformes* (*Orizyas javanicus*, Yu y col. 2006). Dentro del resto de los peces teleósteos varios trabajos coinciden en señalar la expresión hepática de las coriogeninas, desde salmónidos (*O. mykiss*, *S. alpinus*, *O. masou*), bacalao (*G. morhua*), hasta lenguados (*P. americanus*, *H. hipoglossus*), y perciformes (*D. labrax*), como ejemplos revisados por Litscher y Wassarman (2007), lo cual plantea que en este grupo es el hígado el principal órgano de expresión, pero excluyendo al Orden Cypriniformes, en el que la expresión generalmente es ovárica.

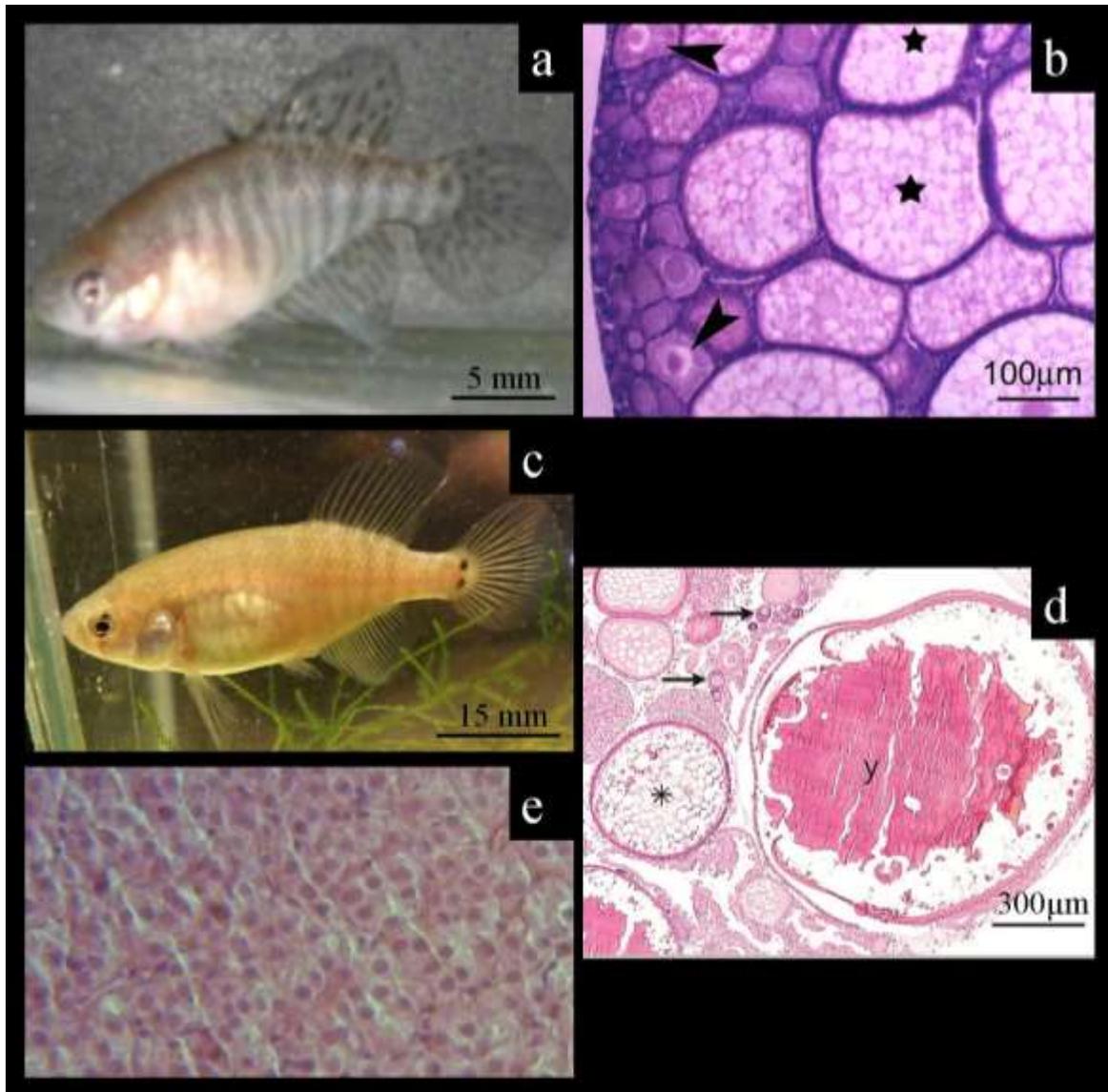
Los resultados recién analizados son el punto de partida para el siguiente capítulo de amplificación en tiempo real de esta Tesis; ya que al comparar las especies en las que existe expresión de genes coriónicos a nivel hepático, ésta sería regulada por estrógenos, (Hyllner y col. 1991, 2001; Modig y col. 2007) con la consiguiente mayor sensibilidad a xenoestrógenos. Este hecho adquiere relevancia a nivel aplicado ya que existe importante información que señala al corion como un biomarcador muy sensible a la acción de estos

contaminantes (Lee y col. 2002a,b; Arukwe and Goksøyr, 2003; Gunnarsson y col. 2007; Chen y col. 2008; Westerlund y col. 2001).



**Figura 30. Imágenes de estadios embrionarios utilizados para el análisis del patrón de expresión de genes coriónicos en *A. charrua***

**a)** Embrión 30 días post-fecundación; **b)** Corte histológico región gonadal correspondiente a embrión 30 días post-fecundación. **c)** Embrión 38 días post-fecundación (Pre-eclosión) **d)** Corte histológico región gonadal correspondiente a embrión hembra de 38 días post-fecundación, en el inserto de la imagen se observa un corte histológico de la región gonadal de un embrión macho equivalente al de la imagen c). Las imágenes de histología gonadal corresponden a Arezo y col. (2007).



**Figura 31. Imágenes de individuos post-eclosión utilizados para el análisis de patrón de expresión de genes coriónicos en *A. charrua***

**a)** Alevín hembra 45 días post-eclosión; **b)** Corte histológico del ovario de alevín hembra 45 días post-eclosión (Arezo y col. 2007); **c)** Hembra adulta; **d)** Corte histológico del ovario de hembra adulta (Rodao y col. 2015); **e)** Imagen histológica de hígado de hembra adulta.

### 3.4 Caracterización de expresión de *achzpH* y *achzpL* con oligonucleótidos específicos

#### 3.4.1 Diseño de oligonucleótidos específicos

De acuerdo a la descripción en sección 2.5.1 se diseñaron los oligonucleótidos específicos de la tabla 25 procurando evitar hibridaciones inespecíficas entre o dentro de cada oligonucleótido.

Gen	Juego	Directo (F)	Secuencia de oligonucleótido	T <sub>m</sub> (°C)	Reverso (R)	Secuencia de oligonucleótido	T <sub>m</sub> (°C)
<i>achzpH</i>	1	zpHAch F1	<b>GACGGAGGGGCTGGGTTT</b>	63,8	zpHAch R1	<u>AGCCTCAACGGCAGTAGCAGT</u>	63,3
	2	zpHAch F2	<b>GTTGAGGCTTTGGTCATTG</b>	55,2	zpHAch R2	<u>CAAACCTCCATTGCCAATCCTG</u>	62
<i>achzpL</i>	1	zpLAch F1	<b>AGTCAAGCCCAGTGTGCCATT</b>	61,3	zpLAch R1	<u>AGGGTGAGGTCACCTGGATT</u>	60,5
	2	zpLAch F2	<b>CACCTGGAAGTACCCTGAAG</b>	60,5	zpLAch R2	<u>CTCTTGGCACTGAACAGCAAC</u>	61,3
<i>Beta-actina ach</i>	1	actAch F1	<b>CCCCATCGAGCACGGTATTG</b>	62,5	actAch R1	<u>CTGTTGGCCTTGGGGTTTCAG</u>	62,5
	2	actAch F2	<b>GTTGGTGATGAGGCACAGAGC</b>	63,3	actAch R2	<u>TCAGCAGGACTGGGTGCTCCT</u>	65,2

**Tabla 25.** Oligonucleótidos diseñados según descripción en sección 2.5.1 para las secuencias obtenidas.

A continuación se presentan los oligonucleótidos diseñados sobre la secuencia correspondiente, destacando cada juego de oligonucleótidos con el objetivo de distinguir un color para el directo (F)(color de letra en negrita) del reverso (R)(subrayado).

Oligonucleótidos diseñados sobre la secuencia *achzpH* (626 pares de bases) según tabla 25.

```
TCAATTAGTTTACTTGGAAGTGGTCCACATTGCAGTCCTGTTGGTACTACNTCAG
CTTTTGCCATCTACCANTTCCCTGTGACTGAATGTGGCAGTGTGCATGACGGAGG
GGCCTGGGTTTAATAAGTTATGANAACAGTATGATCTCTTCATACGAAGTGGCA
GTTGGGCCTTTTGGATCCATCACCANAGACAGTCACTTTGAGCTGCNTATCCAG
TGCAAATACACTGCTACTGCCGTTGAGGCTTTGGTCATTGAGGTTGGTGTGGT
TCCTGCACCACCAGCAGTTGCAGCTCCTGGACCTCTGCGTGTTGAGCTCAGGAT
TGGCAATGGAGTTTTACTACCAAGGGTTGTATCGAANAACAAGTGGCCTACAC
CTCCTATTATGCTGATACTGACTACCCTGTTACAAAGGTTCTCAGGGACCCAGT
GTATATTGAGGTCCACATTCTGGAGAGGACTGATCCCAACATTGTCCTGACTCT
TGGAAGATGCTGGGCAAATACTAACCCCAACCCAACTATCTCCCACAGTGGG
ATTTGTTGATTAATGGATGCCCTACCGTGACGATCACTATCTAACAAACTCA
TCCCTGTGGATTCTTCATCTGGAGTCACATACCC
```

Oligonucleótidos diseñados sobre secuencia *achzpL* (228 pares de bases) según tabla 25.

```
GCTCACCTGGAAGTACCCTGAAGCGCCCCAGCCTGAAGTCAAGCCCAGTGTGC
CATTGAACTGAGATACCCTGTTGCTGCTGCAACTGTTGCTGTTTCAGTGCCAAGA
GAGTTATGCTCACGTGGAAGTCAAGATGGACATGTTTCGGCACTGGCCAGATCATC
AATCCAGGTGACCTCACCTAGGTGACTGTGCCCCCGTATCCGAGGACCCTGCGG
CTCAAGTGCT
```

Oligonucleótidos diseñados sobre la secuencia beta-actina *A. charrua* (283 pares de bases) según tabla 25.

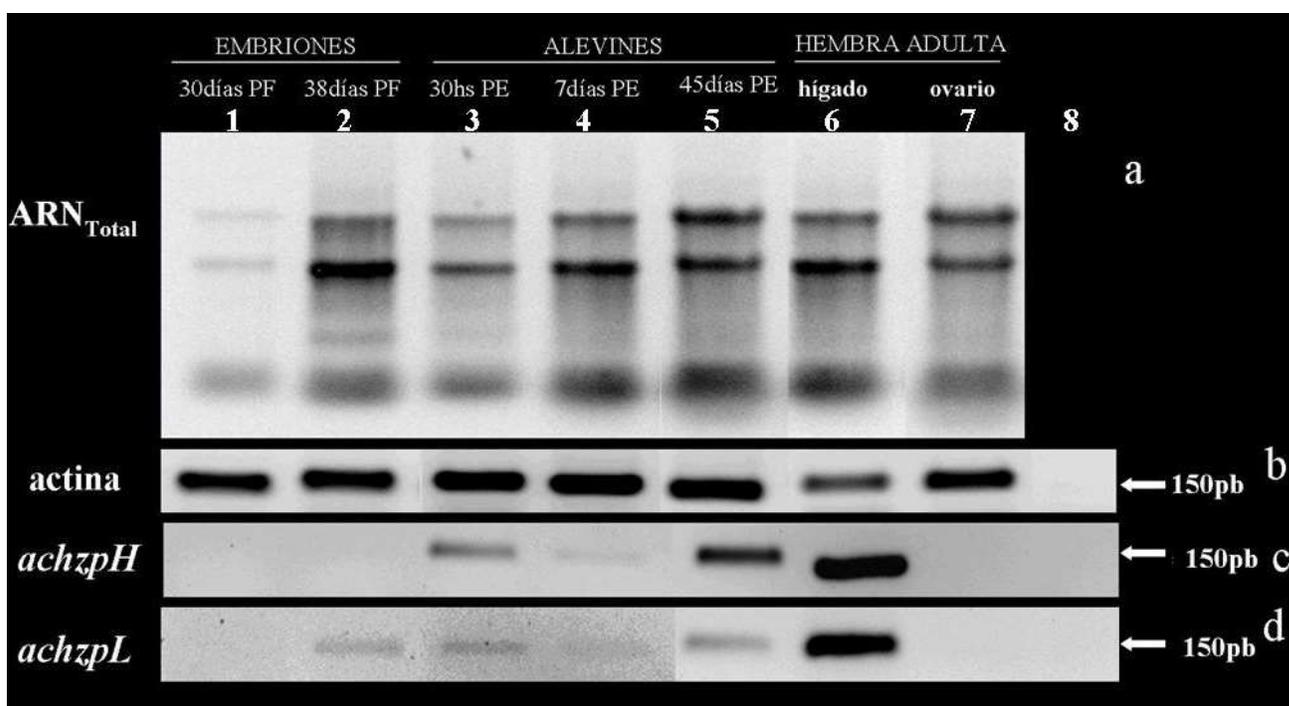
```
TCCATTGTTGGCCGTCCCAGGCATCAGGGTGTAATGGTTGGGATGGGCCAGAAGGA
CAGCTATGTTGGTGATGAGGCACAGAGCAAGAGGGGTATCCTGACCCTTAAATA
CCCCATCGAGCACGGTATTGTGACTAACTGGGATGACATGGAGAAGATCTGGCAT
CACACTTTCTACAATGAGCTGAGAGTTGCCCTGAGGAGCACCCAGTCCTGCTGA
CGGAGGCCCTCTGAACCCCAAGGCCAACAGGGAGAAGATGACCCAGATCATGT
TTGAGACCT
```

### 3.4.2 Identificación de patrón de expresión de los genes coriónicos usando oligonucleótidos específicos

Con el objetivo de refinar y ampliar el estudio del patrón de expresión de los genes coriónicos obtenido con oligonucleótidos degenerados, se realizó el procesamiento de las muestras según fue descrito en secciones 2.2.1 a 2.2.5 hasta obtener la valoración de los ADNc obtenidos, para las muestras de la tabla 26. En estas muestras se agregaron estadios intermedios entre embriones pre-eclosión y el alevín hembra, estadios ubicados en el rango entre ausencia y presencia de banda de amplificación en el patrón de expresión con oligonucleótidos degenerados. Se realizaron reacciones de amplificación utilizando los oligonucleótidos específicos: zpHAch *FI* y *RI*, zpLAch *FI* y *RI* y actAch *FI* y *RI* en las condiciones descritas en sección 2.5.3 (tablas 8 y 9)

Muestras	N° de individuos/tubo	Concentración de ARNtotal (ng/μL)
Hígado de Hembra adulta	1	194
Ovario de hembra adulta	1	105
Alevín Hembra 45 días Post-eclosión	1	142
Alevines 7 días post-eclosión	5	223
Alevines 30hs post-eclosión	5	214
Embriones 38 días Post-fecundación	8	126
Embriones 30 días Post-fecundación	8	58

**Tabla 26.** Muestras analizadas y concentraciones de ARN total obtenidas luego del aislamiento y el tratamiento con ADNasa para las muestras de analizadas con oligonucleótidos específicos.



**Figura 32. Análisis electroforético**

a) ARN total: **carril 1-** embriones 30 días post-fecundación; **carril 2-** embriones 38 días post-fecundación; **carril 3-** alevines 30hs post-eclosión; **carril 4-** alevines 7 días post-eclosión; **carril 5-** alevín hembra; **carril 6-** hígado de hembra adulta; **carril 7-** Ovario de hembra adulta

**Reacciones de amplificación:**

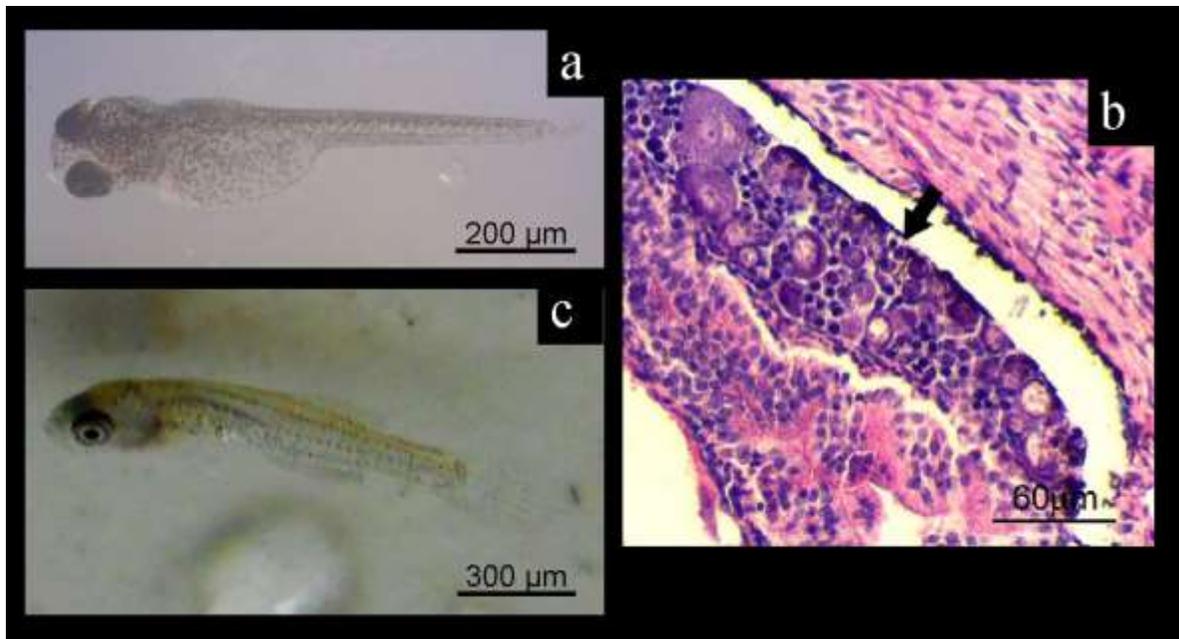
b) Control de amplificación: los ADNc corresponden a cada ARN de arriba. Amplificación con oligonucleótidos específicos para β-actina. **carril 8-** control negativo de reacción.

c) Reacción de amplificación con los oligonucleótidos específicos para *achzpH*, zpAchH-F1/R1.

d) Reacción de amplificación con los oligos específicos para *achzpL*, zpAchL-F1/R1.

Al comparar el patrón de expresión obtenido con los oligonucleótidos degenerados (Fig. 29) y el obtenido con los oligonucleótidos específicos, se destaca que: 1) la expresión

de *achzpH* y *achzpL* coincide en la expresión hepática en el alevín hembra (45 días post-eclosión) y los embriones de 30 días post-fecundación; 2) difiere en la expresión de *achzpL* en los embriones pre-eclosión (38 días post-fecundación), dato que sugiere que los oligonucleótidos presentan un reconocimiento específico con la secuencia, por lo que hibridarían con mayor eficiencia con la secuencia del ADNc del transcripto de *zpL* en estos embriones. Este resultado es más coherente con los resultados que obtuvimos y presentamos en Arezo y col. (2007) (Fig. 30 c y d) donde encontramos ovocitos iniciando la vitelogénesis, etapa relacionada con el comienzo de la deposición del corion (Wallace y Selman, 1981; Berois y col. 2007). Llama la atención que en este estadio del desarrollo solo se detecte expresión de *achzpL*, lo cual sugiere que podría traducirse primero y depositarse en los ovocitos en formación antes que el producto de *achzpH*. Para demostrar esta premisa sería necesario realizar la detección de ambas coriogeninas con anticuerpos específicos en este estadio. Asimismo, la detección de *achzpL* en *A. charrua* coincide con el patrón de expresión obtenido por Rhee y col. (2009) para *K. marmoratus* ya que detecta el homólogo de *achzpL* en el estadio embrionario equivalente al observado. La expresión de *achzpH* en *A. charrua* comienza a detectarse en alevines recién nacidos (30 horas post-eclosión), donde ya se observan ovocitos en vitelogénesis (Fig. 33 b). A partir de este estadio se expresan ambos transcriptos de *zp* hasta llegar a la hembra adulta. El agregado del estadio de alevines de *A. charrua* de 7 días post-eclosión confirma la expresión de ambos transcriptos de *zp* en estadios intermedios entre alevín recién eclosionado y la hembra de 45 días post-eclosión. La variación en la intensidad de las bandas de amplificación en embriones y alevines, podría deberse no solo a un bajo nivel de expresión presente en el comienzo de la maduración ovocitaria; sino al hecho de que la proporción de machos y hembras en el pool de individuos usados por tubo donde la cantidad de hembras puede variar o ser baja.



**Figura 33. Imágenes de individuos post-eclosión utilizados para identificar el patrón de expresión de genes coriónicos en *A. charrua* con oligonucleótidos específicos**  
**a)** Alevín 30 horas post-eclosión; **b)** Corte histológico del ovario de alevín hembra del día de la eclosión (Arezo y col. 2007); **c)** Alevín de una semana post-eclosión.

Cabe destacar que no se realizó un abordaje el análisis del patrón de expresión por amplificación en tiempo real por carecer de un gen de referencia (housekeeping) válido para estadios de desarrollo embrionario. Teniendo en cuenta que hasta este momento solo se cuenta el gen de beta-actina de *A. charrua* como referencia, existen trabajos que no recomiendan usar este gen en estadios embrionarios (Tang y col. 2007; Mc Curley y Callard, 2008). Con el objetivo de obtener un gen de referencia para estadios embrionarios se realizaron ensayos de amplificación con oligonucleótidos para Epidermal Growth Factor 1 de *D. rerio*, sin éxito (datos no mostrados). Asimismo, los estudios paralelos hacia la obtención de un marcador sexo-específico con el objetivo de establecer un determinante del sexo en *A. charrua* presentados en Arezo y col. (2014) sigue en caracterización. Esta herramienta permitirá obtener un marcador para confirmar el sexo de los embriones en los que se analice la expresión de los genes coriónicos.

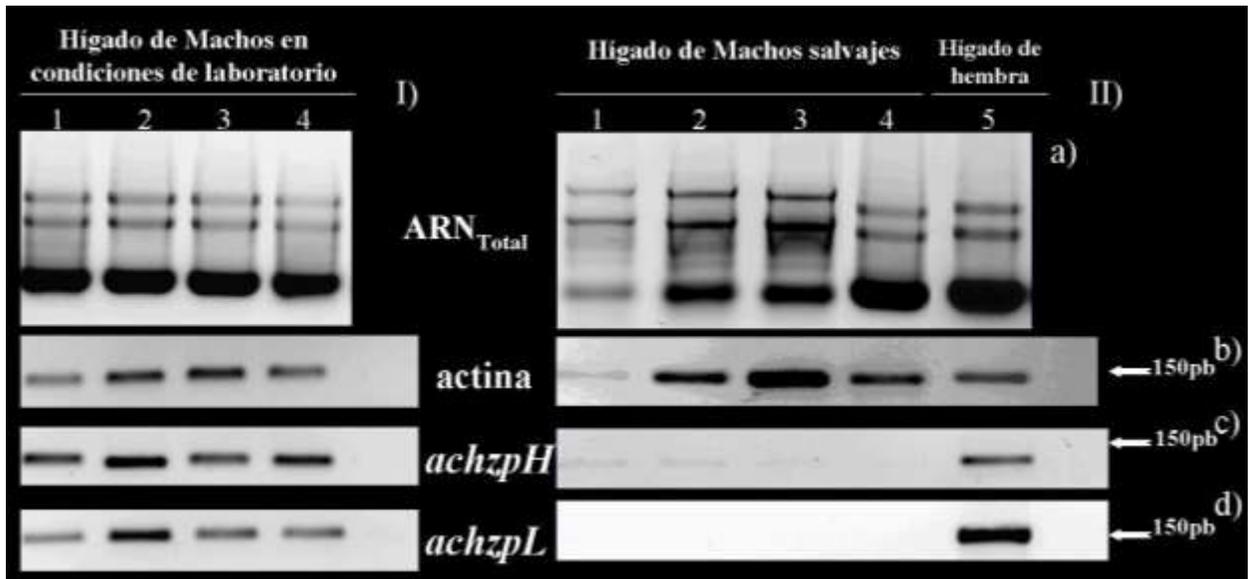
Estos dos inconvenientes (contar con otros genes de referencia en estadios embrionarios y uno o varios marcadores sexo-específicos) podrán ser abordados cuando se complete el análisis del Genoma y del Transcriptoma de *Austrolebias charrua* que se

encuentran en desarrollo por nuestro grupo en asociación con el Centro Regulador del Genoma de la Facultad de Ciencias de Chile.

### **3.4.3 Patrón de expresión de genes coriónicos en machos**

Para resolver la expresión de *achzpH* y *achzpL* en hígado de machos criados en condiciones de laboratorio según Papa y col. (2015) y machos capturados en los charcos originales y procesados inmediatamente (machos salvajes, MS Fig. 34), se realizó la amplificación en tiempo final con los oligonucleótidos específicos: zpHAch *FI* y *RI*, zpLAch *FI* y *RI* y actAch *FI* y *RI* en las condiciones descritas en sección 2.5.3 (tablas 8 y 9)

En los análisis electroforéticos se observa la expresión de *achzpH* y *achzpL* en hígado de todos los machos adultos nacidos y criados en condiciones de laboratorio descritas en Papa y col. (2015). En hígados de machos adultos capturados en el campo y procesados enseguida de llegar al laboratorio, se observa ausencia de bandas de expresión de *achzpL* y bandas de expresión apenas perceptibles para *achzpH* en los carriles 1 a 3 (Fig. 34 II). Estos resultados amplían los análisis de amplificación en tiempo final en hígados de macho adulto y juvenil macho de 45 días post-eclosión nacidos y criados en condiciones de laboratorio, realizados previamente donde se detectó expresión de ambos transcritos de zp (datos no mostrados), lo cual determina una diferencia de expresión entre la condición de laboratorio y la condición de la naturaleza. En este sentido existen trabajos donde se describe la expresión de transcritos de proteínas coriónicas en el hígado de machos de diferentes especies de teleósteos, donde atribuyen la presencia de transcritos de coriogeninas en machos a una expresión basal baja o a efectos inductores por disrupción endócrina. Al analizar el efecto de los xenoestrógenos sobre la expresión de estos transcritos, se destaca su gran sensibilidad como biomarcador de contaminación (Hyllner y col. 1991, 2001; Oppen-Berntsen y col. 1992a; Lee y col. 2002b; Knoebl 2004; Yu y col. 2006; Chen y col. 2008; Lee y col. 2012).



**Figura 34. Análisis electroforético de amplificación de hígados de machos criados en condiciones de acuario y de machos salvajes:**

ARN total: I) carriles 1 a 4 ARN total de machos criados en condiciones de acuario  
 II) carriles 1 a 4 ARN total de machos salvajes; carril 5- hígado de hembra adulta

**Reacciones de amplificación en tiempo final con oligonucleótidos específicos:**

**b)** Control de amplificación con oligonucleótidos específicos para beta-actina:

I) carriles 1 a 4 ADNc correspondientes a cada ARN de arriba. carril 5- control negativo de reacción.

II) carriles 1 a 4 ADNc correspondientes a cada ARN de arriba; carril 5- ADNc hígado de hembra adulta; carril 6- control negativo de reacción.

**c)** Reacción de amplificación con los oligonucleótidos específicos para *achzpH*, zpAchH-F1/R1.

**d)** Reacción de amplificación con los oligonucleótidos específicos para *achzpL*, zpAchL-F1/R1.

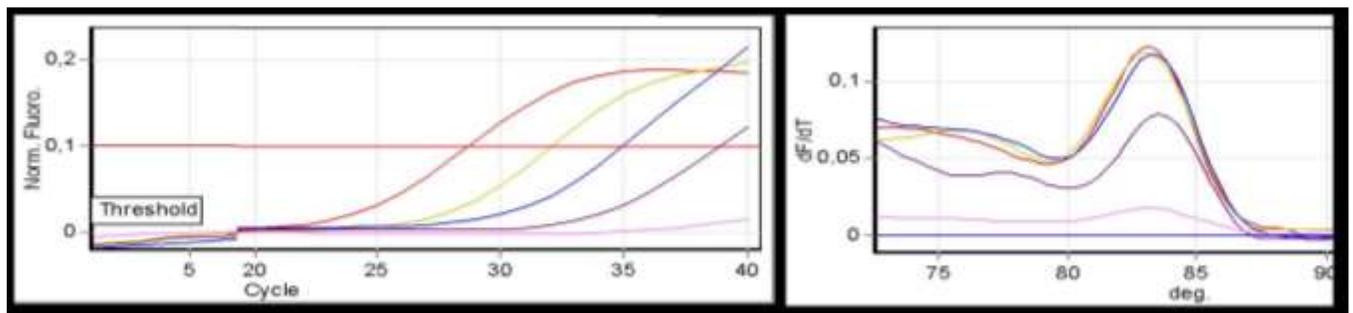
En este caso se observa una diferencia en los niveles de expresión bajo dos condiciones diferentes, lo que estaría revelando la capacidad de inducción de estos genes en *Austrolebias charrua*. De confirmarse este resultado por amplificación en tiempo real, se demostraría la inducción de la transcripción de los genes coriónicos alentado a continuar los experimentos para validar la posible inducción estrogénica de estos dos genes y su posible rol como biomarcador de contaminación con xenoestrógenos.

## 3.5 Amplificación en tiempo real

### 3.5.1 Puesta a punto de ensayos de amplificación en tiempo real

Con este objetivo se realizaron diversas pruebas hasta obtener un único producto de amplificación para cada juego de oligonucleótidos, cuyas curvas de amplificación presentaron Ct en orden de izquierda-derecha a medida que crece el factor de dilución (1:10, 1:30, 1:90, 1:270 y 1:810). Se caracterizaron las curvas de desnaturalización para cada producto de amplificación. A modo de ejemplo se muestra la figura 35 donde se observan las curvas de amplificación en escala lineal, obtenidas a partir de las diluciones del pool de ADNc de hígados de hembra adulta criada en acuario con los oligonucleótidos de actina actAch F1 y R1.

Para las gráficas de desnaturalización obtenidas se observó principalmente la temperatura de desnaturalización, la cual corresponde al corte del eje de temperatura con el punto máximo de la derivada de la fluorescencia sobre la temperatura ( $dF/dT$ ). Se ajustaron las condiciones hasta obtener en éstas gráficas un pico único para los productos de amplificación correspondientes a cada juego de oligonucleótidos, reflejando así que se obtiene solo un producto de amplificación en configuración única. En este sentido fue necesario disminuir la concentración de oligonucleótidos en las reacciones de beta-actina con actAch F1 y R1 hasta llegar a  $0,5 \mu\text{M}$  en la mezcla de reacción, debido a que con mayores concentraciones ocurría amplificación inespecífica a 70 pares de bases (datos no mostrados). Por este hecho se ajustaron las concentraciones de los oligonucleótidos de los genes coriónicos en  $0,5 \mu\text{M}$  en las mezclas de reacción.



**Figura 35.** Amplificación en escala lineal obtenida con oligonucleótidos de actina, actAch1 y curva de desnaturalización de diluciones del pool de ADNc de hígado de hembra adulta: 1:10, 1:30, 1:90, 1:270 y 1:810, en orden de aparición en gráfica a) de izquierda a derecha.

Se obtuvieron curvas similares para los 6 juegos de oligonucleótidos y sus combinaciones. A partir de éstas, se seleccionaron los juegos de oligonucleótidos con mayor eficiencia para cada gen, con la precaución de que presentaran valores similares entre sí de forma que permitiesen realizar los ensayos en paralelo para los tres genes.

Los oligonucleótidos seleccionados fueron:

Gen	Largo de amplicón	Directo (F)	Secuencia de oligonucleótido	T <sub>m</sub> (°C)	Reverso (R)	Secuencia de oligonucleótido	T <sub>m</sub> (°C)
<i>beta-actina ach</i>	158 pb	actAch F1	CCCCATCGAGCACGGTATTG	62,5	actAch R1	CTGTTGGCCTTGGGGTTCAG	62,5
<i>achzpH</i>	237 pb	zpHAch F1	GACGGAGGGGCCTGGGTTT	63,8	zpHAch R2	CAAACCTCCATTGCCAATCCTG	62
<i>achzpL</i>	106 pb	zpLAch F2	CACCTGGAAGTACCCTGAAG	60,5	zpLAch R2	CTCTTGGCACTGAACAGCAAC	61,3

**Tabla 27.** Oligonucleótidos seleccionado para realizar la amplificación en tiempo real de los genes de interés.

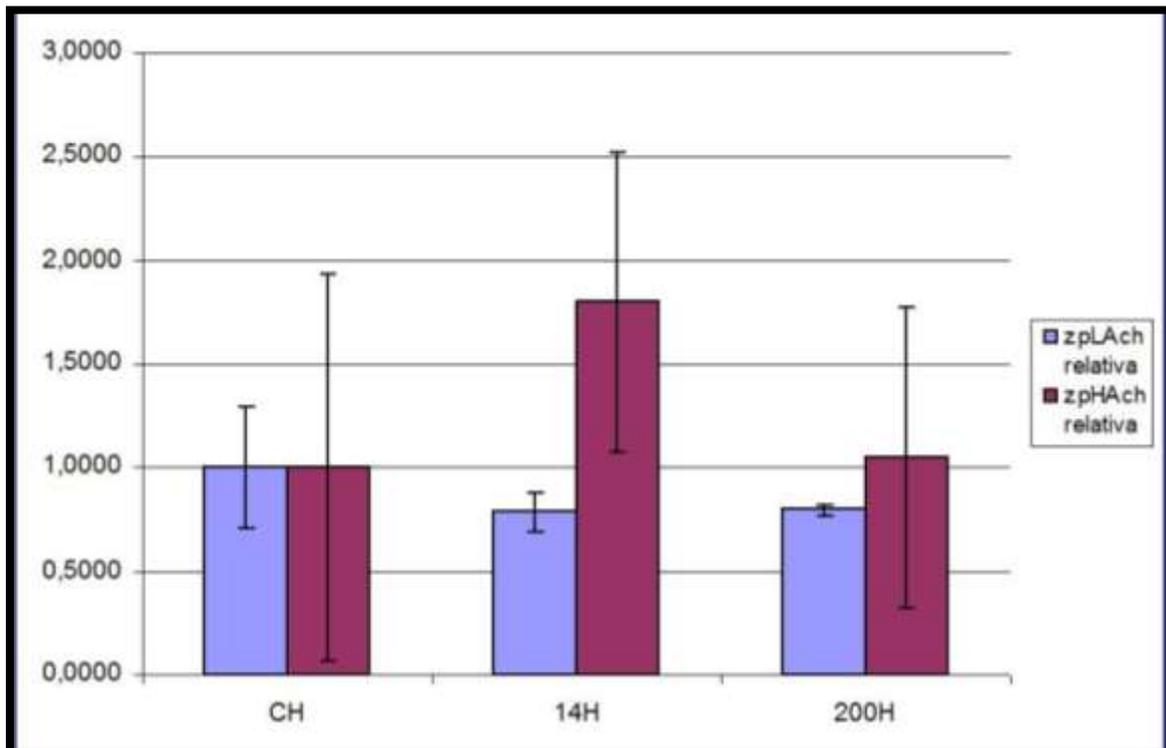
### 3.6 Expresión relativa de genes coriónicos en el tratamiento con estradiol

Con los oligonucleótidos seleccionados se realizó la amplificación en tiempo real usando los ADNc de los hígados de los ejemplares criados en condiciones de laboratorio sometidos al tratamiento con estradiol, y que se obtuvieron según se describió en sección 2.7.1 a 2.7.5.

Se realizó la amplificación en tiempo real por triplicado de las diluciones de trabajo de hígados de hembras y machos: control, sometidos a 14 ng/L y 200 ng/L de estradiol. Los Ct obtenidos para cada juego de oligonucleótidos en cada dilución de trabajo se analizó según el método de “Fold Change” ya descrito en sección 2.6.1.

A continuación, se muestran las gráficas y tablas de resultados para los hígados de hembras y de machos, luego del tratamiento con estradiol (Fig. 36 y 37). En ellas se grafica el cambio de expresión (Fold change) para *achzpL* y *achzpH* en situación control y las dosis 14 y 200 ng/L de estradiol con sus desvíos estándar. También se muestra la tabla utilizada para generar la gráfica donde se indican numéricamente los cambios de expresión para cada situación en expresión relativa y expresión absoluta.

### 3.6.1 Expresión de *achzpL* y *achzpH* en hígados de hembras luego del tratamiento con estradiol



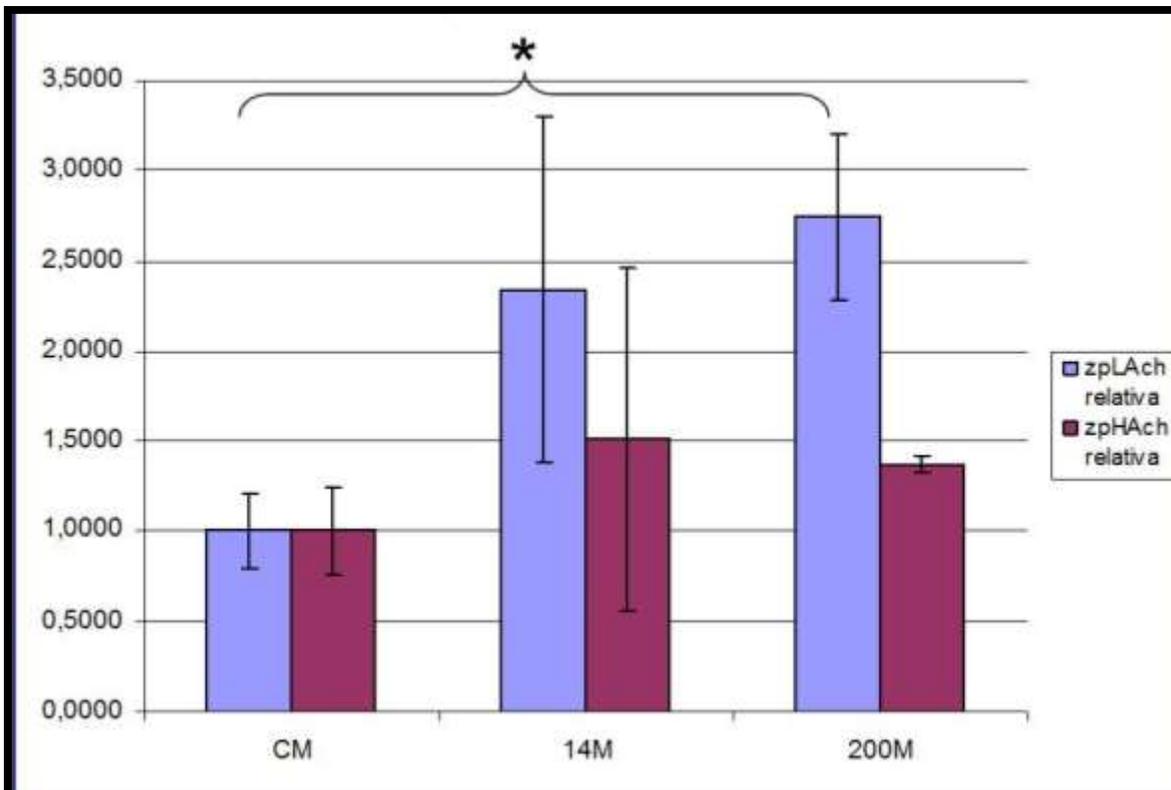
Muestras	zpLach relativa		zpHach relativa		zpLach absoluta		zpHach absoluta	
	Fold Change	Desvio						
CH	1,0000	0,2953	1,0000	0,9321	0,5444	0,1608	9,9568	9,2807
14H	0,7868	0,0956	1,7990	0,7209	0,4283	0,0521	17,9125	7,1776
200H	0,7956	0,0241	1,0491	0,7256	0,4331	0,0131	10,4457	7,2242

**Figura 36.** Expresión relativa de tratamiento con estradiol usando las diluciones de trabajo de ADNc de hígado de hembra Control (CH), 14 ng/L de estradiol (14H) y 200 ng/L de estradiol (200H). El test ANOVA con 95% de intervalo de confianza, no presentó diferencias significativas en ninguna de las condiciones.

La gráfica y la tabla de la figura 36 muestran los niveles de expresión relativa para *achzpL* y *achzpH* de hígados de hembra adulta luego del tratamiento con estradiol. Se evidencian rangos de desvío estándar que se solapan. Al comparar los triplicados del control con los tratados mediante el análisis estadístico ANOVA y el post-test Dunnett, no se observaron diferencias significativas. Este resultado por si solo no permite asumir o negar efecto del estradiol sobre los transcritos de proteínas coriónicas en hembras de *A. charrua*. En cambio, la observación hecha por Chen y col. (2008) demuestran en hembras de *Oryzias melastigma*, una especie de orden hermano de *A. charrua* (Setiamarga y col. 2008), que presenta efecto estrogénico en la expresión de los homólogos de *achzpL* y *achzpH*, *omChgL*

y *omChgH* respectivamente. Obteniendo diferencias significativas al comparar con el control en la expresión de *omChgH*, a partir de de 10 ng/L de estradiol, mientras la diferencia de expresión de *omChgL* comienza a 100 ng/L de estradiol disuelto en agua. Sus resultados fueron obtenidos con un tratamiento similar al utilizado en *A. charrua* donde se realizó amplificación en tiempo real y usando como referencia el gen de ARN ribosomal 18S (Chen y col. 2008).

### 3.6.2 Expresión de *achzpL* y *achzpH* en hígados de machos luego del tratamiento con estradiol



Muestras	zpLAch relativa		zpHAch relativa		zpLAch absoluta		zpHAch absoluta	
	Fold Change	Desvio						
CM	1,0000	0,2054	1,0000	0,2386	0,0301	0,0062	0,9215	0,2199
14M	2,3418	0,9566	1,5097	0,9500	0,0706	0,0288	1,3912	0,8755
200M	2,7417 *	0,4568	1,3711	0,0474	0,0826 *	0,0138	1,2635	0,0437

**Figura 37.** Expresión relativa de *achzpL* y *achzpH* en hígado de macho luego de tratamiento con estradiol. Se indican: Control (CM), 14 ng/L de Estradiol (14M) y 200 ng/L de Estradiol (200M). El asterisco (\*) indica diferencias significativas, según el test ANOVA con 95% de intervalo de confianza.

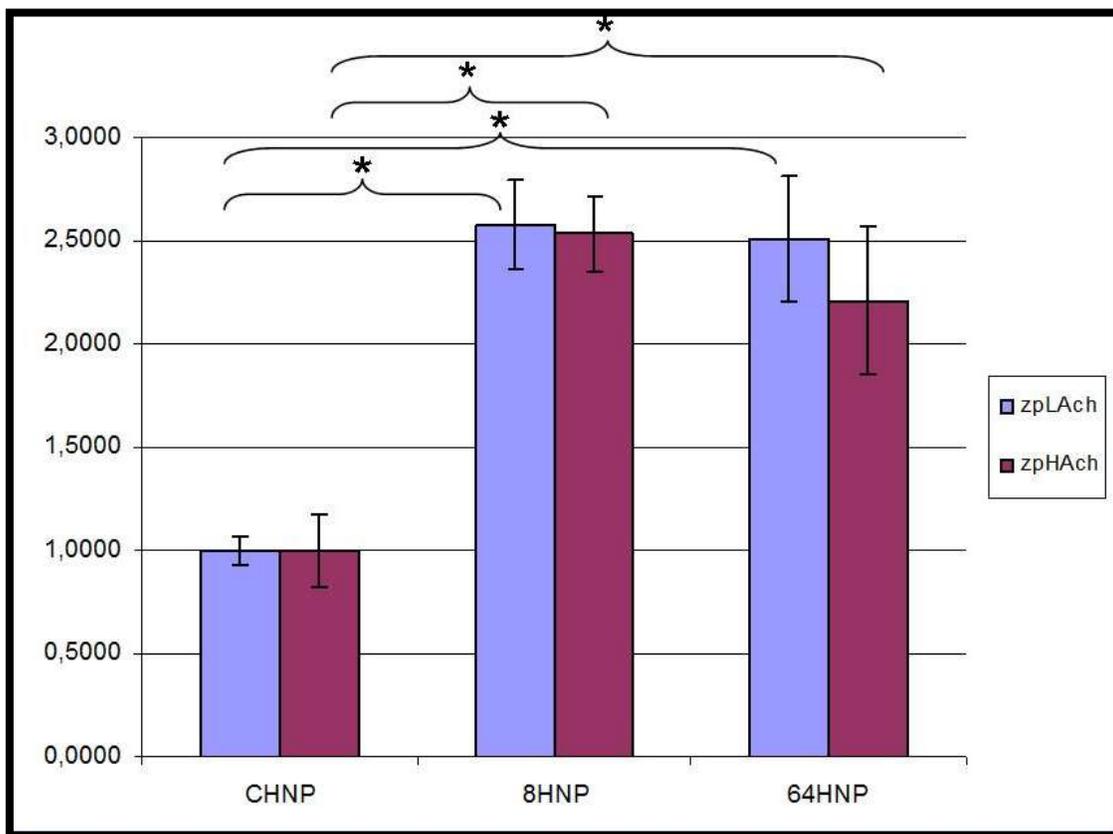
Al observar los niveles de expresión relativa de *achzpL* y *achzpH* en hígados de macho adulto luego del tratamiento con estradiol (Fig. 37), se verifica una tendencia de aumento de la expresión con respecto al control. El aumento se confirma para *achzpL* en la dosis de 200 ng/L, lo cual sugiere un efecto estrogénico sobre la expresión de este gen a altas dosis en las condiciones experimentales utilizadas.

Si bien en las condiciones aplicadas en este análisis se obtuvieron diferencias significativas a los 200 ng/L solo para *achzpL*, en el estudio realizado en *O. melastigma* (Chen y col. 2008) se observa que el homólogo a este transcrito (*omChgL*) se induce a 100 ng/L de estradiol, mientras que este mismo trabajo reporta que el homólogo de *achzpH* se induce a partir de los 10 ng/L, efecto que no se observa en las dosis usados en los machos de *A. charrua*. Asimismo, para transcritos hepáticos de *O. javanicus* se reportaron diferencias significativas de expresión de *ojChgH* y *ojChgL* a 1 ng/L y 5 ng/L de estradiol, respectivamente (Yu y col. 2006). Estos niveles de detección resultan ser menores incluso a los reportados para *O. melastigma*. En *K. marmoratus* luego de una exposición a 100 ng/L de estradiol durante 96 horas, solo *Km-ChgH* demostró diferencias significativas al comparar con el control, en machos secundarios (Rhee y col. 2009). En este sentido Lee y col. (2002a), utilizando una técnica de baja sensibilidad (amplificación en tiempo final semicuantitativa, RT-PCR semicuantitativa) en *O. latipes*, logran describir que los transcritos de coriogeninas L son más sensibles a la inducción de expresión por estradiol que los de coriogeninas H. Estos resultados junto a otros tantos describen el efecto estrogénico sobre los genes coriónicos en machos para varias especies, incluso más que en hembras, brindando un gran espectro donde se presentan sensibilidades diferenciales dentro y entre cada uno los transcritos homólogos.

### 3.7 Expresión relativa de genes coriónicos en el tratamiento con nonilfenol

Aplicando el mismo diseño que para el tratamiento con estradiol, se realizó la amplificación en tiempo real por triplicado de las diluciones de trabajo de hígados de hembras y machos que recibieron tratamiento con nonilfenol. Los grupos de trabajo fueron: control, 8 ng/L y 64 ng/L de nonilfenol. Se graficaron los promedios de los triplicados de los cambios de expresión (Fold Change) de *achzpL* y *achzpH* obtenidos (Fig. 38 y 39).

#### 3.7.1 Expresión de *achzpL* y *achzpH* en hígados de hembras luego del tratamiento con nonilfenol



	zpLAch relativa		zpHAch relativa		zpLAch absoluta		zpHAch absoluta	
	Fold Change	Desvio						
CHNP	1,0000	0,0673	1,0000	0,1806	0,9158	0,0616	15,4835	2,7960
8HNP	2,5772 *	0,2127	2,5382 *	0,1816	2,3602 *	0,1948	39,3000 *	2,8120
64HNP	2,5116 *	0,3013	2,2088 *	0,3564	2,3001 *	0,2759	34,2002 *	5,5180

**Figura 38.** Expresión relativa de *achzpL* y *achzpH* en hígado de hembra luego de tratamiento con Nonilfenol. Se indican: Control (CHNP), 8 ng/L de Nonilfenol (8HNP) y 64 ng/L de Nonilfenol (64HNP). El asterisco (\*) indica diferencias significativas, según el test ANOVA con 95% de intervalo de confianza.

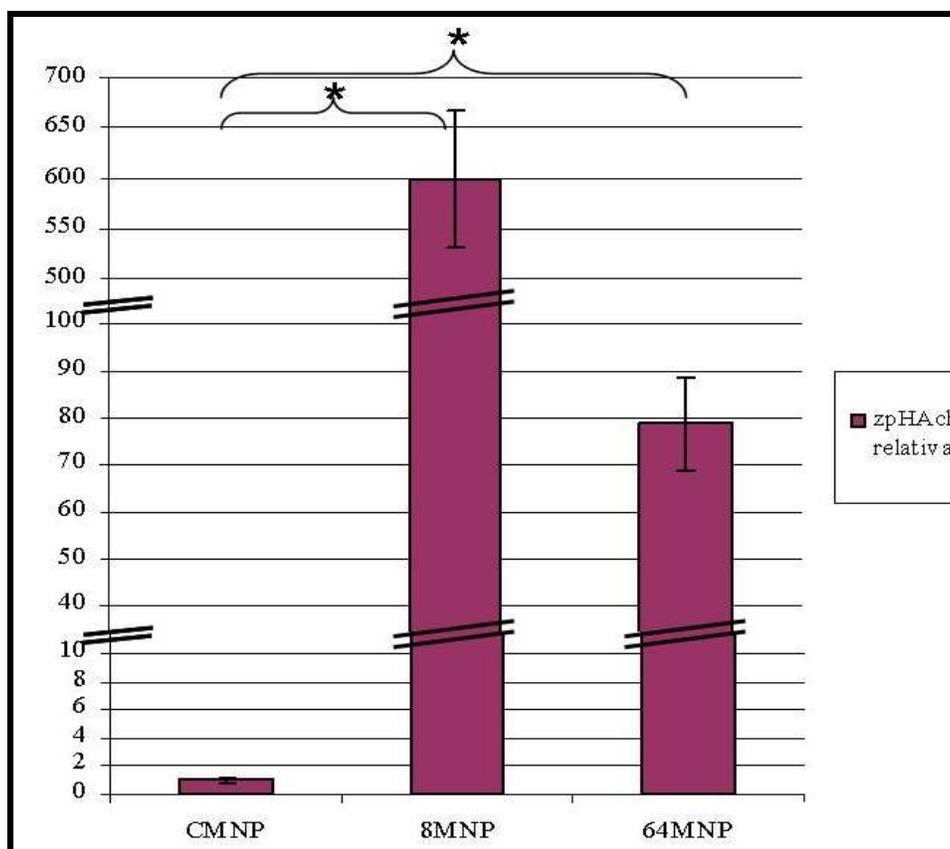
Al observar la gráfica de efectos de nonilfenol sobre los genes coriónicos de hígado de hembras de *A. charrua*, se destacan diferencias significativas de expresión entre el control y las dos concentraciones de nonilfenol utilizadas. Se obtuvo un aumento aproximado de 2,5 veces para ambos genes respecto al control, indicando que el Nonilfenol tendría efectos (directos o indirectos) sobre la expresión de ambos ARNm en hígado de hembra. El análisis realizado por Chen y col. (2008) para *O. melastigma* en un diseño similar al utilizado en *A. charrua*, describe diferencias significativas en la expresión de los homólogos de *achzpL* y *achzpH* respecto al control a dosis de nonilfenol de 100 µg/L. Esta observación demuestra que los genes coriónicos de *A. charrua* tendrían mayor sensibilidad al nonilfenol que *O. melastigma* dado que la dosis mínima a la que se obtuvieron efectos significativos en *A. charrua* es aproximadamente 10.000 veces menor a la dosis en la que se obtuvieron efectos en *O. melastigma*.

### **3.7.2 Expresión de *achzpH* y *achzpL* en hígados de machos luego del tratamiento con nonilfenol**

Los resultados obtenidos en la expresión de ambos genes coriónicos luego del tratamiento con nonilfenol debieron ser analizados por separado, ya que no hubo amplificación de *achzpL* en los hígados de machos del control.

#### **3.7.2a Expresión de *achzpH* en hígados de machos luego del tratamiento con nonilfenol**

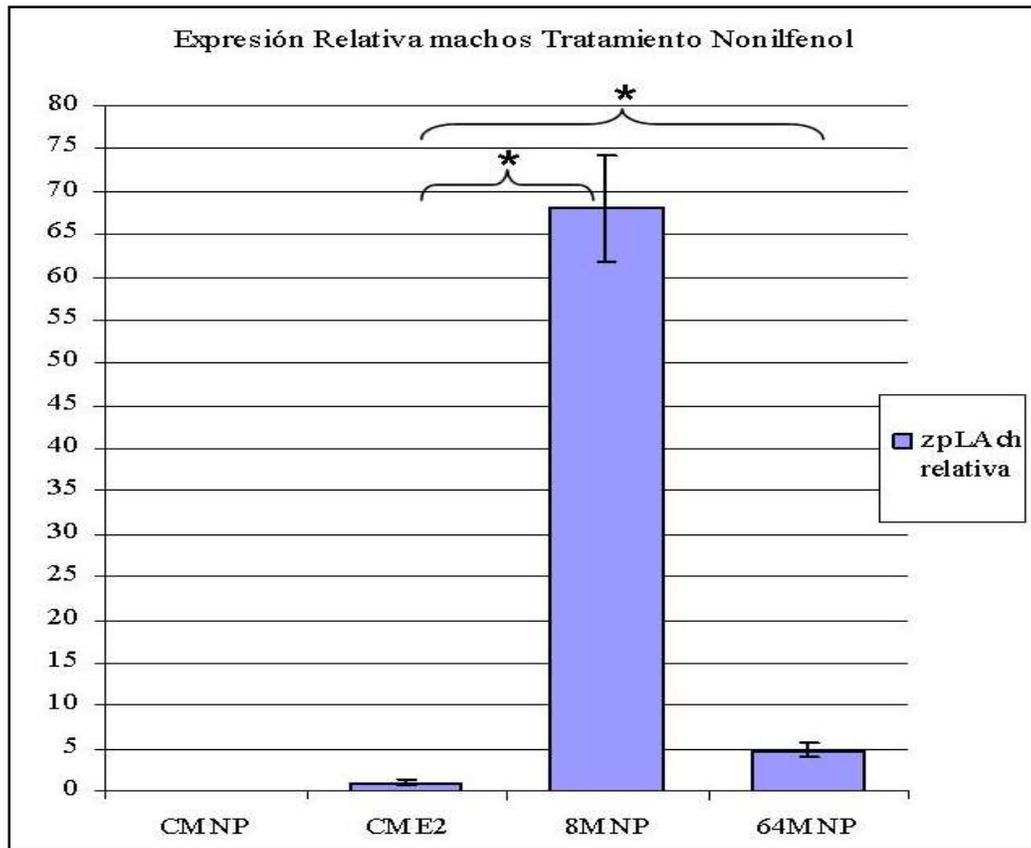
Al analizar la expresión de *achzpH* en hígado de machos sometidos a tratamiento con nonilfenol (8 ng/L y 64 ng/L) se puede observar un aumento de expresión de 600 y 80 veces, respectivamente. Este cambio abrupto es apoyado por los análisis estadísticos (ANOVA) con un 95% de intervalo de confianza. Se destaca que el mayor cambio de expresión (600 veces) respecto al control, se produce a la concentración mas baja de nonilfenol. Se podría suponer una saturación del sistema donde a 64 ng/L de nonilfenol se observa solamente un aumento de 80 veces más que el control. Sin embargo, la concentración mayor de nonilfenol no generó muerte de peces durante el tratamiento, lo que hace suponer que la dosis no genera toxicidad aguda.



	zpHAch relativa		zpHAch absoluta	
	Fold Change	Desvio	Fold Change	Desvio
CHNP	1,00	0,199	0,0133	0,0026
8HNP	599,9 *	68,1	7,9805 *	0,9055
64HNP	78,8 *	9,9	1,0484 *	0,1311

**Figura 39.** Expresión relativa de *achzpH* en hígado de machos luego de tratamiento con nonilfenol. Se indican: Control (CMNP), 8 ng/L de nonilfenol (8MNP) y 64 ng/L de nonilfenol (64MNP). Las barras dobles indican un corte de ejes y cambio de escala, para mejorar la visualización. El asterisco (\*) indica diferencias significativas, según el test ANOVA con 95% de intervalo de confianza.

### 3.7.2b Expresión de *achzpL* en hígados de machos luego del tratamiento con nonilfenol



Muestras	zpLAch relativa		zpLAch absoluta	
	Fold Change	Desvio	Fold Change	Desvio
CMNP	0 #	0	0 #	0
CME2	1,0000	0,2874	0,0079	0,0023
8MNP	67,9748 *	6,1972	0,5351 *	0,0488
64MNP	4,7413 *	0,8654	0,0373 *	0,0068

**Figura 40.** Expresión relativa de las diluciones de trabajo de ADNc de hígados de machos del tratamiento con nonilfenol. El símbolo de numeral (#) indica que en estas dos muestras no se registró amplificación usando 35 ciclos en el ensayo de amplificación en tiempo real, se usó de referencia el control del tratamiento de estradiol. El asterisco (\*) indican diferencias significativas con resultados de condición control de cada gen.

Dado que *achzpL* en la situación control no evidenció expresión, en el análisis de expresión diferencial (Fold change) se comparó el control del tratamiento con estradiol con los niveles de expresión obtenidos para las dos dosis de nonilfenol, 8 ng/L y 64 ng/L respectivamente. Los resultados obtenidos a partir de este análisis demostraron un aumento significativo de casi 70 veces en la dosis 8ng/L y 5 veces para la dosis de 64ng/L;

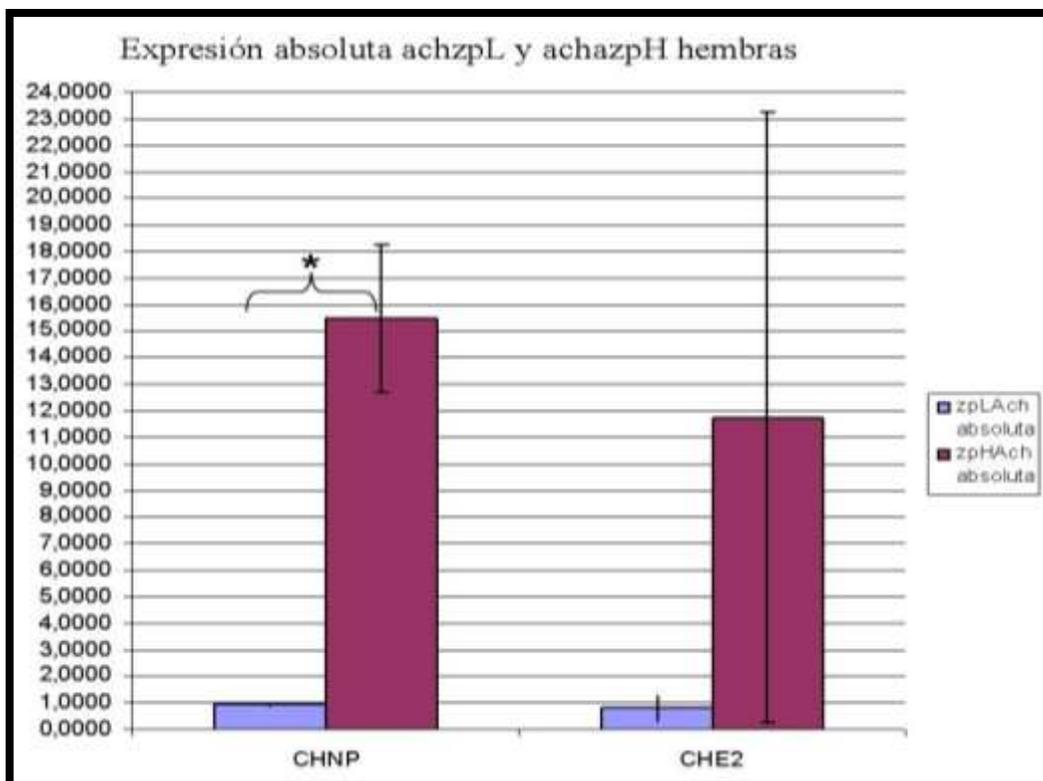
evidenciando así, la existencia de diferencias de expresión de estos genes a dosis bajas de nonilfenol. Recordando que en el control del tratamiento con nonilfenol no se detectó expresión de *achzpL* (en 35 ciclos de amplificación), las diferencias de expresión obtenidas para *achzpL* al compararlo con el control del tratamiento con estradiol podrían estar extremadamente subestimadas. El método de visualización de diferencias de expresión (Fold change) no toma en cuenta esta posibilidad de no tener expresión en el control.

Al comparar nuevamente con los resultados obtenidos por Chen y col. (2008), con el mismo tratamiento se constata que obtuvieron diferencias significativas en la expresión de los homólogos de *achzpL* y *achzpH* en dosis de 100 µg/L de nonilfenol. Asimismo, mediante amplificación en tiempo final semicuantitativa (RT-PCR) se logró observar la dosis mínima a la que se observan diferencias estadísticas, 100 µg/L y 50 µg/L de nonilfenol para *olChgH* y *olChgL*, respectivamente (Lee y col. 2002b). Además, en un análisis de microarray se demostró también para *O. latipes* que *olChgH* se induce menos que *olChgL* luego de una exposición de 24 horas a 100 µg/L de nonilfenol (Kim y col. 2006). Mientras que en machos secundarios de *K. marmoratus* en un tratamiento con 300 µg/L de nonilfenol se observa que la expresión de *Km-ChgH* y de *Km-ChgL* aumentan significativamente poco más de 2 veces (Rhee y col. 2009). Si bien se ha informado de valores mayores a 1000 µg/L de nonilfenol en corrientes de agua del sur de Michigan (Snyder y col. 2001), las concentraciones usadas en los trabajos antes mencionados parece coherente. Sin embargo, los efectos tan destacados observados a concentraciones tan bajas como 8 ng/L de nonilfenol demuestran una sensibilidad extrema de *Austrolebias charrua* a este compuesto.

### **3.7.3 Comparación de *achzpL* y *achzpH* entre controles de tratamientos de estradiol y nonilfenol**

#### **3.7.3a Comparación de *achzpL* y *achzpH* en hígados de hembras en controles de tratamientos de estradiol y nonilfenol**

Esta comparación se realizó por la condición de los experimentos, ya que se usaron peces provenientes de cría y mantenimiento en condiciones de laboratorio y peces capturados en la naturaleza en ambos abordajes. Al comparar los controles podría ocurrir que se determinaran diferencias a nivel del punto de base para estos tratamientos.



Muestras	zpLAch absoluta		zpHAch absoluta	
	Fold Change	Desvio	Fold Change	Desvio
CHNP	0,92	0,06	15,48	2,80
CHE2	0,80	0,48	11,77	11,49

**Figura 41.** Expresión absoluta de *achzpL* y *achzpH* en hígado de hembras de Control de Tratamiento con nonilfenol (CHNP) capturadas en la naturaleza y de estradiol (CHE2) nacidos y criados en condiciones de laboratorio. El asterisco (\*) indica diferencias significativas, según el test t con 95% de intervalo de confianza.

Al comparar la expresión absoluta entre ambos controles no es posible identificar diferencias, debido al desvío estándar principalmente en el control del tratamiento con estradiol (CHE2), se solapa completamente con las medidas de control de nonilfenol (CHNP) para los dos transcritos.

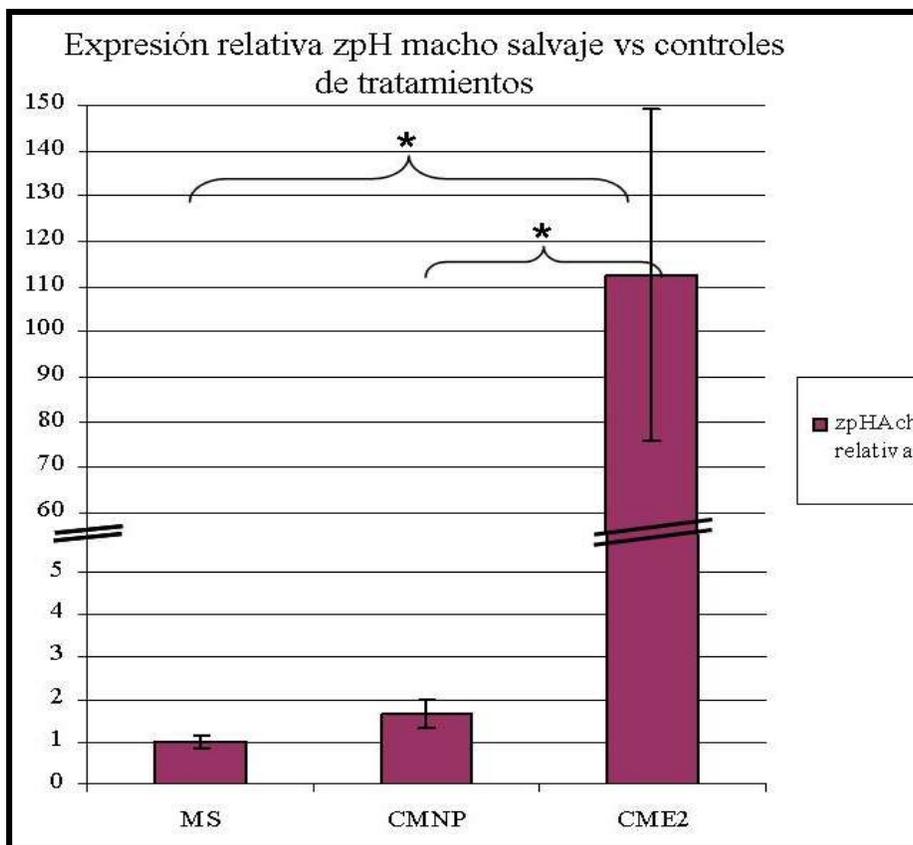
La información que logramos desprender del análisis de los resultados es la relación a nivel de transcritos de *achzpL* respecto a *achzpH* en hígados de hembras del control del tratamiento de nonilfenol (CHNP). En esta relación se observa que *achzpH* se expresa aproximadamente 15 veces más que *achzpL*. Esta observación obedece a la relación entre ambos transcritos en una condición lo más parecida al estado en la naturaleza (individuos colectados luego de 10 días de mantenimiento en condiciones de laboratorio). Cabe destacar que también se observa que esta relación 1:15 entre ambos transcritos se mantuvo

prácticamente constante en las diferentes dosis (8 ng/L y 64 ng/L) de nonilfenol (Fig.38), aunque la expresión de ambos transcritos haya aumentado 2,5 veces. De estos datos se podría inferir una relación funcional, aunque este dato por sí mismo no alcanza para probarla. Para un análisis más certero, esta relación necesita ser contrastada con la proporción proteica producida a nivel del hígado, concentraciones séricas y la relación estructural en el corion de ovocitos en diferentes etapas de desarrollo en *Austrolebias charrua*. A nivel de otras especies es complejo realizar comparaciones ya que de tener información de estos componentes, estos se describen por separado.

### **3.7.3b Comparación de *achzpH* y *achzpL* en hígados de machos no tratados**

A partir de la observación de los resultados previos de presencia de transcritos de genes coriónicos en hígados de machos capturados en la naturaleza y de machos nacidos y criados en condiciones de laboratorio obtenidos en la Sección 3.4.3, se realizó la comparación de expresión de *achzpH* en hígado de los machos usados en los controles de los tratamientos con estradiol y nonilfenol, agregando la expresión de hígados de especímenes capturados en la naturaleza y procesados inmediatamente (MS).

El resultado obtenido es que la expresión de *achzpH* aumenta aproximadamente 110 veces en los machos criados en las condiciones de laboratorio presentadas en Papa y col. (2015) (control del tratamiento con Estradiol; CME2) respecto a los capturados en la naturaleza y procesados inmediatamente (MS). También se puede observar una leve tendencia al aumento de expresión en los hígados de los machos del control de nonilfenol, que no resulta ser significativo, pero corresponden a solo 10 días en condiciones de laboratorio (CMNP).



	zpHach relativa		zpHach absoluta	
	Fold Change	Desvio	Fold Change	Desvio
CHNP	1,0	0,1	0,0080	0,0011
8HNP	1,7 *	0,3	0,0133 *	0,0026
64HNP	112,5 *	36,5	0,9021 *	0,2929

**Figura 42.** Expresión relativa de *achzpH* en hígado de: Machos Salvajes (MS) comparando con Control de tratamiento con nonilfenol (CMNP) capturados en la naturaleza y Control de Tratamiento con Estradiol (CME2), nacidos y criados en condiciones de laboratorio. Las barras dobles indican un corte de ejes y cambio de escala, para mejorar la visualización. El asterisco (\*) indica diferencias significativas, según el test ANOVA con 95% de intervalo de confianza.

Este efecto de aumento de expresión de transcritos en los machos del control del tratamiento de estradiol (CME2), pudo haber enmascarado los efectos producidos por las dosis de estradiol utilizadas. Este efecto de enmascaramiento podría tratarse de un hipotético inductor de la expresión de genes coriónicos inherente a las condiciones de mantenimiento en laboratorio. No obstante, que se observen diferencias significativas con el control en la dosis más alta (200 ng/L) aún en esta situación, permite sugerir la probable regulación estrogénica de los genes coriónicos en *Austrolebias charrua*. Se hace imprescindible para fortalecer esta hipótesis repetir el tratamiento de estradiol con individuos colectados en la

naturaleza. El traslado de esta observación a las hembras del mismo tratamiento, permitiría proponer que este efecto puede impedir la discriminación de diferencias entre la expresión de genes coriónicos en la condición control respecto a las diferentes concentraciones de estradiol, observadas para otras especies. Por ejemplo: individuos hermafroditas de *Kryptolebias marmoratus* (Rhee y col. 2009); juveniles machos y hembras de *Oncorhynchus mykiss* (Celius y col. 2000); machos y hembras de *Oryzias melastigma* (Chen y col. 2008).

Se han descrito diferentes mecanismos que permitirían explicar el efecto observado de niveles altos de expresión basal de genes coriónicos en machos (y posiblemente también en hembras) de *A. charrua* en condiciones de laboratorio. Entre ellos podemos destacar los indicios del aumento de concentración de estradiol en sangre, en el salmón ártico (*S. alpinus*) y en la anguila (*Zoarces viviparus*), al subir la temperatura parámetro que podría incrementar los niveles de expresión de genes ZP (Larsson y col. 2002; Berg y col. 2004). En este sentido, los individuos de *A. charrua* se mantienen a una temperatura constante de 19 °C en las condiciones de laboratorio (Papa y col. 2015), temperatura que se encuentra dentro del rango alcanzado en temporada de reproducción activa en la naturaleza correspondiente a otoño o primavera (VanDoren, comunicación personal). Por lo que se podría asumir que esta temperatura no plantea altos niveles de estrés fisiológico. Miura y col. (1998) sugiere que los genes ZP en peces podrían estar regulados por andrógenos, lo cual agrega otro factor endócrino a la complicada red regulatoria de estos genes.

Por otro lado, se ha descrito para el salmón ártico (*Salvelinus alpinus*) que altos niveles de estrés podrían aumentar los niveles de cortisol, con potencial efecto inductor sobre receptores estrogénicos, sugiriendo una dificultad para correlacionar la expresión de transcritos de proteínas coriónicas y niveles de disruptores endócrinos contaminantes (Berg y col. 2004). Aprovechando que dentro del Grupo interdisciplinario Biología Evolutiva de los Peces Anuales, el Dr. Carlos Passos se encuentra realizando mediciones de cortisol en individuos de *A. reicherti* (especie hermana de *A. charrua*) en laboratorio y en el campo, lo que proporcionará los niveles basales de esta hormona en ambas condiciones. Mediante esta información en conjunto con un tratamiento a diferentes dosis de cortisol, permitiría correlacionar y dimensionar el nivel de estrés (cortisol en plasma) en laboratorio y campo, así como indagar el efecto del cortisol como posible inductor de la expresión de genes coriónicos en *A. charrua*.

Otra fuente del efecto observado de expresión basal en ejemplares de laboratorio podría estar relacionada al alimento vivo *Tubifex* spp. utilizado como principal alimento durante la cría y mantenimiento en condiciones de laboratorio. El *Tubifex* spp. proveniente de colecta en canaletas de efluentes domiciliarios podría aportar compuestos disruptores endócrinos acumulados en sus tejidos con alto contenido lipídico. Esta acumulación se ha comprobado tanto para *Tubifex* spp. como para otros invertebrados bentónicos (Bettinetti y col. 2002a,b; Mäenpää y Kukkonen, 2006). Al ingerir estos invertebrados posiblemente contaminados los ejemplares en condiciones de laboratorio podrían experimentar la alteración de la expresión no solo de los genes coriónicos, sino de otros genes relacionados con la regulación estrogénica.

Los resultados obtenidos alientan a proponer a los genes coriónicos de *A. charrua* como biomarcadores de contaminación ambiental, principalmente para monitorear los charcos estacionales en que habitan. Para realizar una propuesta más eficiente será necesario implementar la cría y mantenimiento en laboratorio de esta especie, suministrando alimentos vivos criados de tal forma que se encuentren libres de posibles disruptores endócrinos, con el fin de descartar posibles interferencias desde el alimento. A tal fin se están adaptando e innovando en diversos cultivos de alimentos vivos para peces. Entre ellos se encuentran *Daphnia magna*, *Daphnia pulex*, *Lombrículus variegatus*, *Tubifex* spp., *Enchitraeus* spp., entre otros propuestos en Papa y col. (2015).

Las discrepancias en la respuesta de los genes coriónicos en los estudios analizados podrían explicarse por sensibilidad desigual a estrógenos entre diferentes especies, diferentes métodos de detección (RT-PCR, amplificación en tiempo real, técnicas de microarrays) y/o variaciones entre la concentración efectiva de los compuestos estrogénicos disponibles en el agua de acuario. Estudios previos observan que los compuestos estrogénicos en general se encuentran en concentraciones efectivas bajas y decrecen rápidamente, posiblemente por errores en la preparación de los stocks de los compuestos, absorción por los peces y/o microorganismos expuestos en el acuario dosificador, así como la absorción en paredes del mismo acuario, o directamente la rápida degradación de compuestos como estradiol y etinilestradiol en ambientes acuáticos (Nimrod y Benson, 1998; Jürgens y col. 2002; Kiparissis y col. 2003; Maunder y col. 2007). Estos factores implican que las concentraciones de exposición reales de los disruptores endócrinos ensayados en los diferentes estudios (Lee y

col. 2002a,b; Kim y col. 2006; Yu y col. 2006; Chen y col. 2008) pueden en realidad, ser más bajos que las concentraciones nominales. Sin embargo, a pesar de las diferentes sensibilidades entre los genes coriónicos y posibles variaciones entre las concentraciones nominales y reales de los disruptores endócrinos utilizados (estradiol y nonilfenol) que actuaron sobre los genes coriónicos de *A. charrua*, presentan relevancia a nivel ambiental.

Los resultados obtenidos serían relevantes en la respuesta diferencial de los genes coriónicos L y H, a los diferentes disruptores endócrinos ya que se han detectado altas concentraciones en ambientes acuáticos. Se han detectado frecuentemente disruptores endócrinos en sistemas acuáticos incluyendo lagos, ríos, estuarios y el ambiente marino (revisado por Goksøyr, 2006). En efluentes tratados de Inglaterra fueron detectadas concentraciones de estradiol mayores a 48 ng/L (Mills y Chichester, 2005), y la media de la concentración en 139 puntos de colecta en ríos de Estados Unidos fue de 160 ng/L (Kolpin et al., 2002). Fueron encontradas similares concentraciones en aguas residuales de algunos municipios canadienses, detectando 178 ng/L de etinilestradiol (Fernandez y col. 2007) y se informaron valores mayores a 1000 µg/L de nonilfenol en el sur de Michigan (Snyder y col. 2001). De este modo, la mayor concentración de bisfenol A (BPA) ambiental reportada fue de 490 ng/L en el efluente de tratamiento de aguas de Suecia (Mills y Chichester, 2005). Debido a que algunos productos estrogénicos pueden afectar negativamente a los organismos en concentraciones muy bajas, observar concentraciones tan altas de estos compuestos genera particular preocupación. Por ejemplo, la exposición de larvas de *O. latipes* a 10 ng/L estradiol durante 1 mes dio lugar a poblaciones monosexo hembra (Nimrod y Benson, 1998). Aunque la composición y las concentraciones de disruptores endócrinos varían de un sitio a otro, los equivalentes estrogénicos se encuentran relativamente altos comúnmente en las aguas de todo el mundo (Fernández y col. 2007; Mills y Chichester, 2005).

### 3.8 Diseño, producción y purificación de péptidos recombinantes de proteínas ZPs de *Austrolebias charrua*

#### 3.8.1 Resultados del diseño de vector de expresión

##### 3.8.1a Oligonucleótidos de *achzpL* y *achzpH* con adaptadores de recombinación

En la tabla 27 se muestran los oligonucleótidos resultantes del diseño que combina los fragmentos para amplificar los ADNc de proteínas coriónicas de *A. charrua* con secuencias flanqueantes de 30 pares de bases. Según el método SLiCE (Zhang y col. 2012), la homología de este fragmento flanqueante permitiría la inserción por recombinación homóloga *in vitro*, tomando en cuenta el marco abierto de lectura del fragmento de ADNc de ZP insertado en fase con la Glutación transferasa (GST) del vector.

Oligonucleótido	Secuencia
zpL-pGEX F	acgtttggtggtggcgaccatcctC <sup>AAAA</sup> gaattcggc <sup>CTCACCTGGAAGTACCCTG</sup>
zpL-pGEX R	cagtcagtcacTTAGAATTCGT <sup>GATGGTGATGGTGATGCACTTGAGCCGCAGG</sup>
zpH-pGEX F	ggtggcgaccatcctC <sup>AAAA</sup> gaattcggc <sup>CTCACCTGGAAGTACCCTG</sup>
zpH-pGEX R	gtcacTTAGAATTCGT <sup>GATGGTGATGGTGATGTCTCCTGTAGTGTGTGGG</sup>

**Tabla 28.** Oligonucleótidos correspondientes a los fragmentos de ADNc de *achzpL* y *achzpH* (**fucsia**), que incluyen sitio de corte de *EcoRI* (**azul**) y homología con el vector pGEX 3XHis. Se destacan las regiones de homología a la GST del vector (**verde**), región poli-histidina (**anaranjado**) y región de vector no codificante (**negro**).

##### 3.8.1b Oligonucleótidos de amplificación y modificación del vector de expresión

Los oligonucleótidos de modificación de pGEX 3X presentes en la tabla 28, fueron diseñados previamente por el Dr. Mario Señorale, de manera de agregar al vector un sitio de corte por enzima de restricción *EcoRI* (**azul**) y un fragmento poli-Histidina. Esta última modificación permitirá la purificación del péptido recombinante mediante una cromatografía de afinidad a iones metálicos (IMAC). El sitio de corte para la enzima *EcoRI* (**azul**) permite la liberación específica del inserto para confirmar la transformación con el vector recombinante deseado.

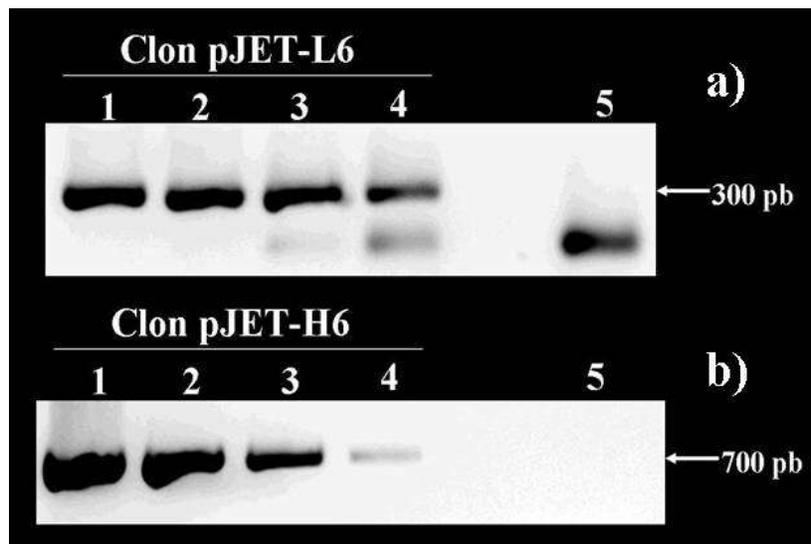
Oligonucleótido	Secuencia
Oligo12_08_501	GCCGAATTCTTTTGGAGGATGGTCGCCACCACC
Oligo12_08_502	CATCACCATCACCATCACGAATTCTAAGTGACTGACTGACGATCTGCCTCGCGCG

**Tabla 29.** Oligonucleótidos de modificación de vector, agregan al vector un sitio de corte de *EcoRI* (azul) y región poli-Histidina (anaranjado). Se destacan las regiones de homología a GST (verde) y región de vector no codificante (negro).

### 3.8.2 Amplificación de insertos y vector de expresión y recombinación

#### 3.8.2a Amplificación de insertos

A partir de las condiciones detalladas en la sección 2.10.2 se obtuvieron bandas de amplificación para todas las diluciones de plásmidos utilizadas (Fig. 43). Se obtuvieron los productos de amplificación para el clon pJET-L6 con menos interferencias (una sola banda de amplificación) en las diluciones 1:10 y 1:100, carriles 1 y 2 de figura 43a, respectivamente.



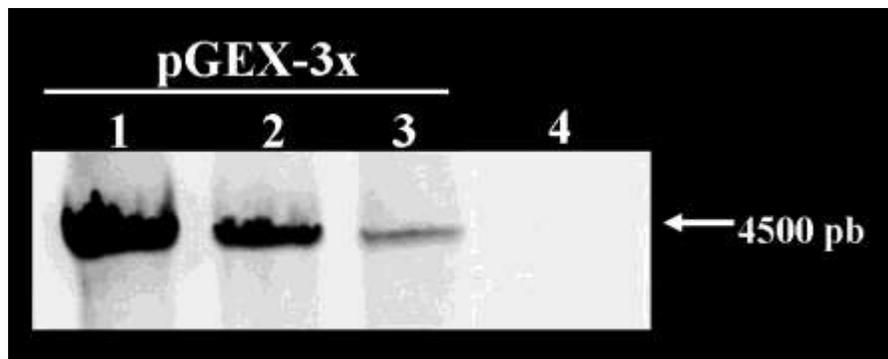
**Figura 43. Amplificación de insertos:**

- a) Carriles 1 a 4 - amplificación con oligonucleótidos zpL-GEX FyR usando como molde el plásmido clon pJET-L6 en diluciones 1:10, 1:100, 1:1000 y 1:10000. Carril 5 – control negativo de reacción
- b) Carriles 1 a 4 - amplificación con oligonucleótidos zpH-GEX FyR usando como molde el plásmido clon pJET-H6 en diluciones 1:10, 1:100, 1:1000 y 1:10000. Carril 5 – control negativo de reacción

Para el clon pJET-H6 las diluciones que produjeron las mejores bandas de amplificación fueron 1:100 y 1:1000, correspondientes a los carriles 2 y 3 en la figura 43b. Se descartan para el próximo paso de amplificación los productos obtenidos con las diluciones extremas 1:10 y 1:10000, por observarse una sombra o smear bajo la banda de amplificación y baja amplificación en las respectivas diluciones. Para aumentar la cantidad de cada inserto para la purificación, se repitieron las condiciones de amplificación obtenidas para 5 tubos de 15  $\mu$ L más su respectivo control negativo, para cada uno de los insertos usando para ambos la dilución 1:1000 (resultado no mostrado).

### 3.8.2b Amplificación y modificación de vector

Con las condiciones detalladas en la sección 2.10.2 se obtuvieron bandas de amplificación del presunto vector de expresión modificado para las tres diluciones de plásmido utilizadas (Fig. 44). Se obtuvo el mejor resultado en la dilución 1:100 de plásmido pGEX-3x, ya que en la dilución 1:10 se observa una sombra bajo la banda de amplificación y se evidencia baja concentración de producto en la dilución 1:1000.



**Figura 44. Amplificación de vector:**

Carriles 1 a 3 - amplificación con oligonucleótidos Oligo 12\_08\_501 y Oligo 12\_08\_502, usando como molde el plásmido pGEX-3x en diluciones 1:10, 1:100 y 1:1000. Carril 4 – control negativo de reacción

### 3.8.2c Purificación de insertos y vector de expresión modificado

Luego de la amplificación del vector y los fragmentos de ADNc *achzpL* y *achzpH* con los adaptadores de recombinación, junto con sus réplicas, se reunieron: 1) *achzpL*-adaptadores: las 5 réplicas más los productos de amplificación de las diluciones 1:10 y 1:100; 2) *achzpH*-adaptadores: las 5 réplicas más los productos de amplificación de las diluciones

1:100, 1:1000 y 1:10000; 3) las 5 réplicas y los productos de amplificación de las diluciones 1:100, 1:1000 del vector. Luego de la digestión de los moldes plasmídicos con la enzima de restricción *DpnI*, se purificaron los tres productos de amplificación. Las concentraciones de las eluciones obtenidas fueron:

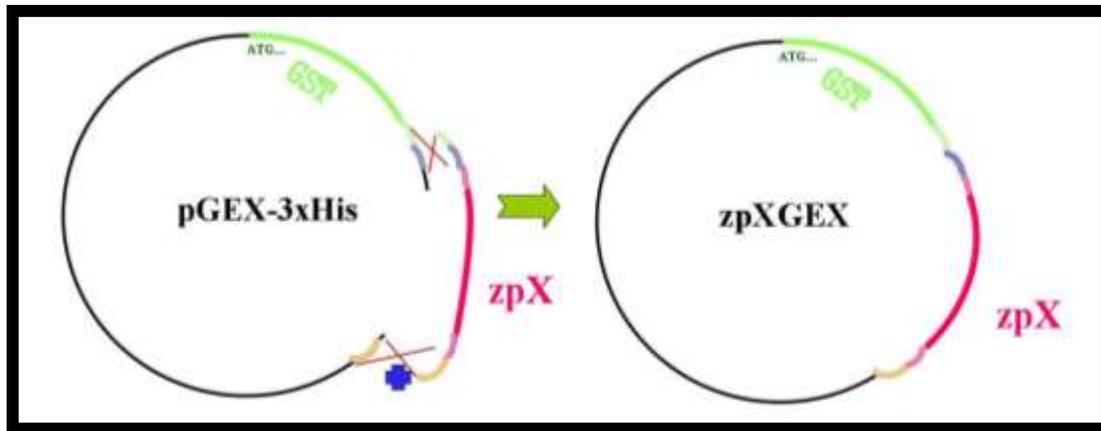
Producto de amplificación		Concentración (ng/uL)
zpL-GEX FyR	Elución 1	20
	Elución 2	10
zpH-GEX FyR	Elución 1	33
	Elución 2	6,2
Vector	Elución 1	25
	Elución 2	18

**Tabla 30.** Concentraciones de las eluciones obtenidas

Se comprobó que las concentraciones de los productos de amplificación eluidos son adecuadas para realizar la reacción de recombinación, ya que puede obtenerse una relación estequiométrica de cada inserto y el vector entre 8:1 y 10:1, usando 8  $\mu$ L entre ambos. Esta relación es la recomendada por Zhang y col. (2012) para una óptima recombinación homóloga “*in vitro*”.

### 3.8.2d Recombinación homóloga *in vitro*

El resultado de la reacción de recombinación homóloga “*in vitro*” obedece al esquema de la figura 45 y se comprobó luego de realizar con su producto la transformación de bacterias *E. coli* NEB 5alpha competentes (High Efficiency) Biolabs por shock térmico. La elección de esta cepa bacteriana obedece a su alta eficiencia de transformación ya que se asume que la cantidad de plásmido circularizado en fase es pequeña, y que esta cepa admite la incorporación de ADN plasmídico sin metilación, como es el caso de los productos de recombinación provenientes de productos de amplificación.



**Figura 45.** Esquema de diseño de vector y reacción teórica de recombinação homóloga “*in vitro*”. Se destacan los fragmentos de ADNc de *achzpl* y *achzph* como zpX (fucsia), punto de comienzo de transcripción (ATG...), región codificante de GST (verde), región poli-Histidina (anaranjado), y sitio de corte de *EcoRI* (azul).

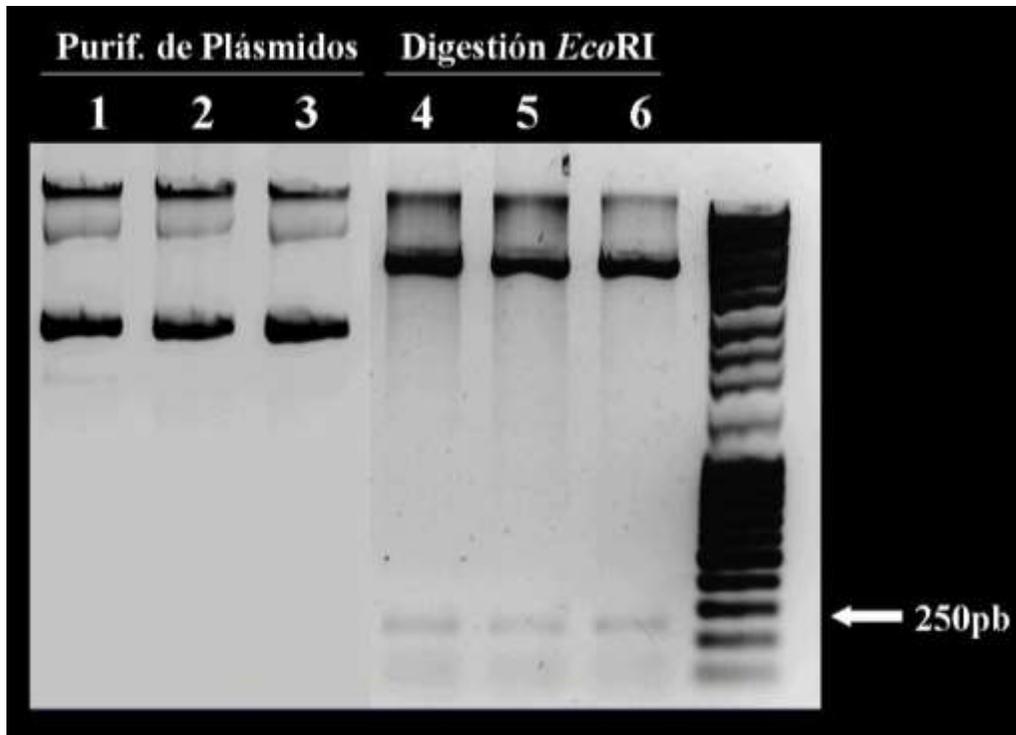
### 3.8.3 Transformación, selección y confirmación de clones

#### 3.8.3a Transformación de bacterias *E. coli* NEB 5alpha

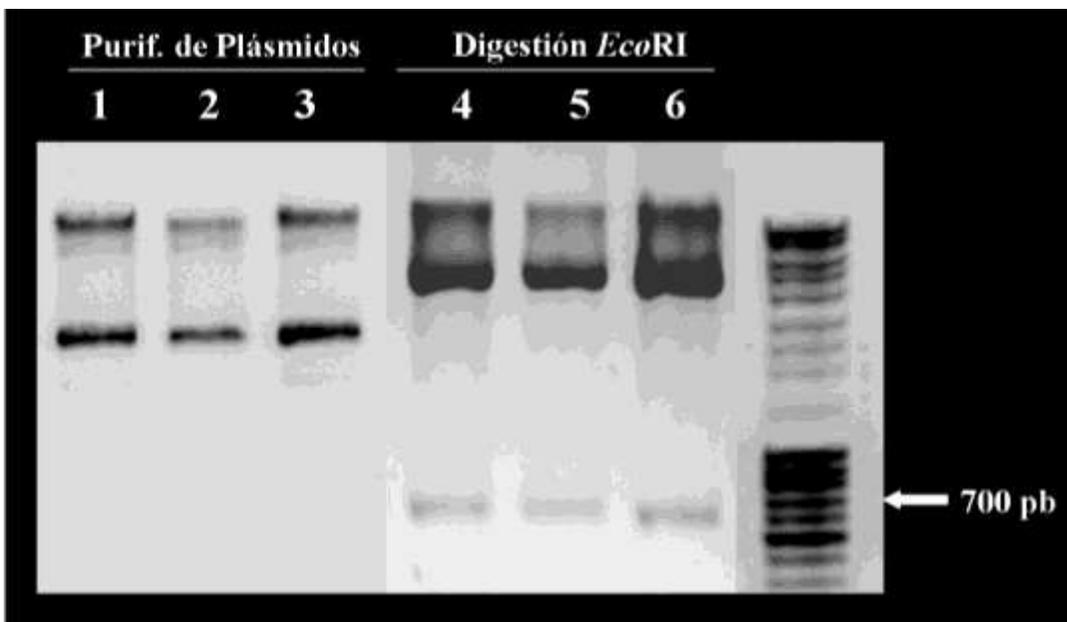
Luego de la reacción de recombinação homóloga “*in vitro*” y la transformación de bacterias *E. coli* NEB 5alpha, se obtuvieron colonias solo en las placas sembradas con 50 y 200 µL de producto de transformación de ambos insertos. Se aislaron 8 de las colonias obtenidas, de las cuales crecieron solo 6 clones para cada inserto. En las figuras 46 y 47 se muestran 3 de las purificaciones plasmídicas (zpLGEX 1, 7 y 8; zpHGEX 2, 6 y 7) antes y después de liberar el inserto mediante la digestión con la enzima de restricción *EcoRI*.

#### 3.8.3b Purificación y confirmación parcial de clones

En la figura 46 (carriles 1 a 3) se confirma la presencia de plásmidos en los clones zpLGEX 1, 7 y 8; en los carriles 4 a 6 se confirma la liberación del inserto al observar una banda de aproximadamente 250 pares de bases. El tamaño del fragmento de ADN liberado coincide con los 252 pares de bases de la construcción teórica obtenida en el diseño.



**Figura 46.** Carriles 1, 2 y 3 – Minipreparaciones de clones zpLGEX *NEB5*alfa 1, 7 y 8 respectivamente. Carriles 4, 5 y 6 – Digestiones con *Eco*RI de clones zpLGEX *NEB5*alfa 1, 7 y 8 respectivamente



**Figura 47.** Carriles 1, 2 y 3 – Minipreparaciones de clones zpHGEX *NEB5*alfa 2, 6 y 7 respectivamente. Carriles 4, 5 y 6 – Digestiones con *Eco*RI de clones zpHGEX *NEB5*alfa 2, 6 y 7 respectivamente

Asimismo, en la figura 47 se confirma la presencia de plásmidos en los clones zpHGEX 2, 6 y 7 (carriles 1 a 3) y la liberación de un fragmento de ADN que coincide aproximadamente con los 722 pares de bases de la construcción teórica.

### 3.8.3c Confirmación de clones por secuenciación de clones recombinantes

A partir de la secuenciación de los plásmidos de los clones obtenidos se logró identificar la secuencia del fragmento de *achzpL* y de *achzpH* en los clones zpLGEX 7 y 8, y zpHGEX 2 y 7, respectivamente. Si bien esto coincide con los resultados de liberación de inserto con *EcoRI*, al revisar si el marco abierto de lectura de los fragmentos de genes coriónicos se encontraba en fase con el marco abierto de lectura de la Glutation-transferasa (GST) del vector: se confirmó que tres de los cuatro clones habían quedado en fase, pero en el clon zpHGEX 2 (Tabla 31) no había coincidencia en los marcos de lectura abiertos.

Los resultados de purificación de plásmidos con liberación de insertos que concuerdan con el tamaño esperado, y la secuenciación de los mismos en los que se comprueba que los fragmentos de proteínas ZP en fase con la GST, confirman que la recombinación homóloga “*in vitro*” fue exitosa.

	Clones	Secuenciación	Secuencia en fase de marco abierto de lectura
zpLGEX	7	Sí	Sí
	8	Sí	Sí
zpHGEX	2	Sí	No
	7	Sí	Sí

**Tabla 31.** Confirmación de secuenciación de los clones de zpLGEX y zpHGEX y fase del marco abierto de lectura del fragmento de *achzpL* o *achzpH* con el de Glutation-transferasa del vector.

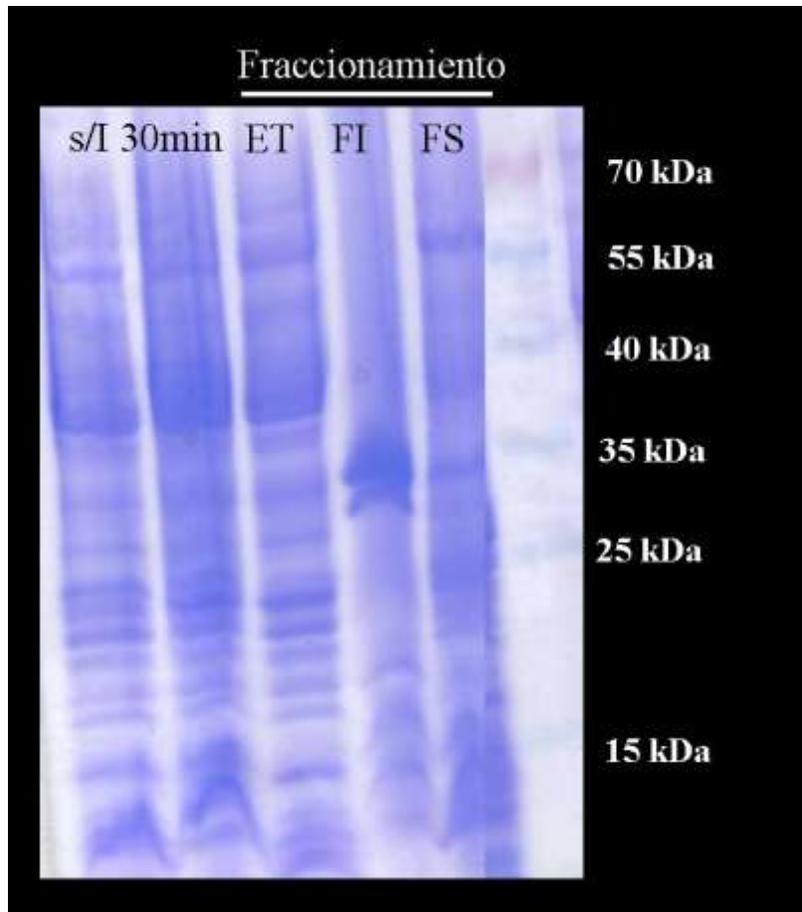
### 3.8.4 Ensayos de expresión en células *E. coli* NEB 5alpha

A partir de los clones en *E. coli* NEB 5alpha se realizaron ensayos preliminares de expresión para intentar obtener los péptidos recombinantes ZPLGEX-7 y ZPHGEX-7.

### **3.8.4a Ensayo I de expresión en el clon zpLGEX 7 *E. coli* NEB 5alpha**

En el primer ensayo de expresión de ZPLGEX en células *E. coli* NEB 5alpha, se obtuvo crecimiento bacteriano luego de inocular el clon zpLGEX-7 a 50mL de medio ZYM 505 (Studier, 2005) a 37°C. El seguimiento de la inducción y del fraccionamiento se analizó mediante electroforesis desnaturizante SDS-PAGE y se observa en la figura 48. Luego del fraccionamiento de extracto total a los 120 minutos de inducción, detallado en la sección 2.10.4.1, se obtuvieron la fracción insoluble (FI, carril 4) y la fracción soluble (FS, carril 5).

En el análisis electroforético de los extractos proteicos antes y después de la inducción, carriles 1, 2 y 3 de la figura 48, se observan diferentes bandas proteicas sin diferencias de intensidad apreciables. Esta observación sugiere que si existe inducción de expresión, ésta podría ser a bajo nivel. Al observar el carril 4 de la Fracción insoluble, se observan dos bandas proteicas contiguas por debajo de los 35 kDa, coincidiendo con los 35 kDa predichos a partir de la secuencia teórica usando el programa Protparam (<http://web.expasy.org/cgi-bin/protparam>). El hecho que aparezcan dos bandas proteicas y que ambas se ubiquen por debajo de la del peso molecular estimado podría deberse a alteraciones de migración durante la electroforesis o a modificaciones estructurales ocurridas durante la expresión. Al observar la fase soluble (FS) se observa que se mantienen varias bandas proteicas del extracto total (ET) pero sin aumento de expresión aparente en ninguna de ellas.

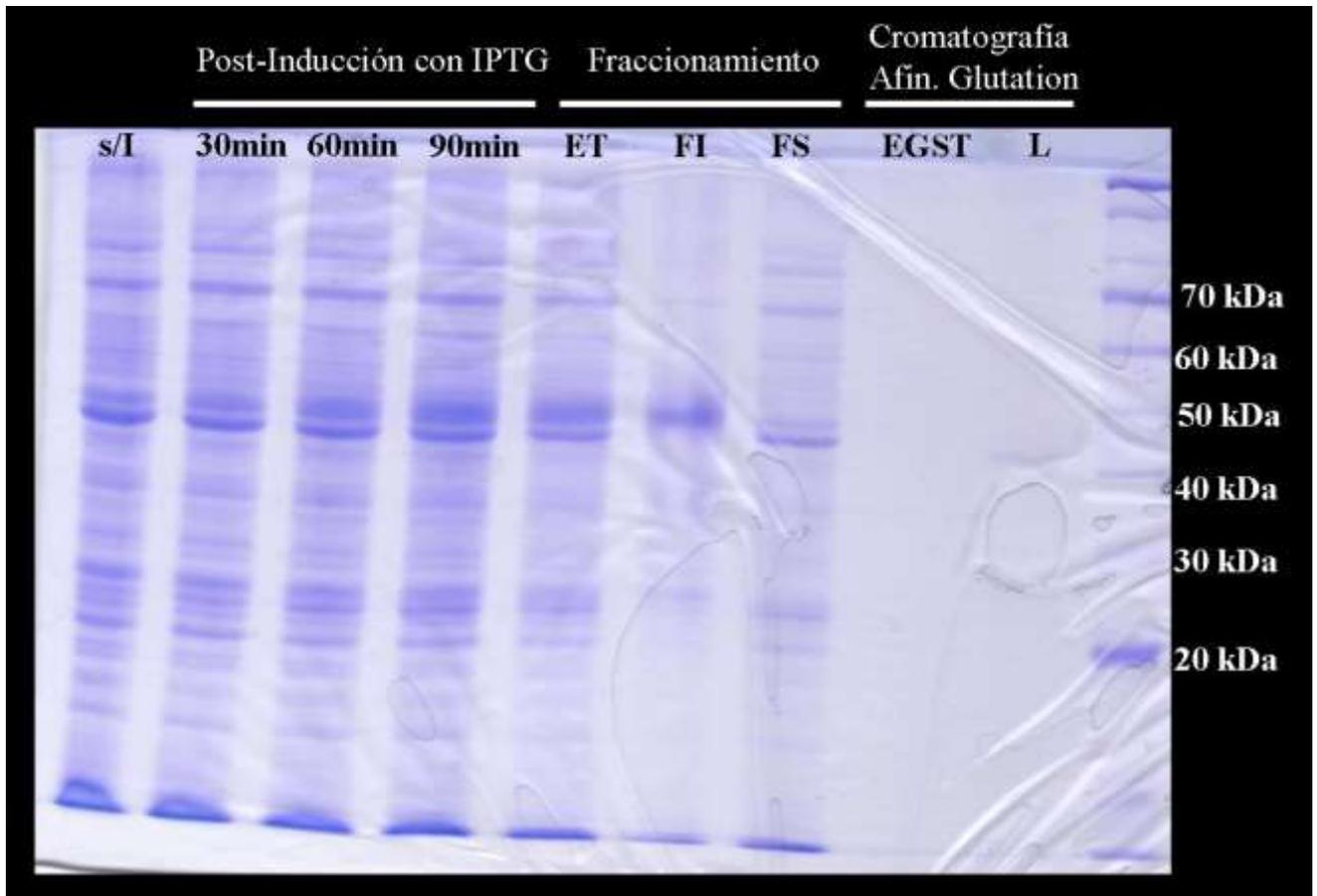


**Figura 48.** Ensayo I de expresión de ZPLGEX-7 en células *E. coli* NEB 5alpha: crecimiento bacteriano para expresión del péptido recombinante a partir del Clon zpLGEX-7 en 50mL de medio ZYM 505 (Studier, 2005) a 37°C. Carril 1-Extracto proteico sin inducir (s/I), carril 2 Extractos proteicos luego de 30 minutos de inducción con IPTG. Fraccionamiento: carril 3- Extracto Proteico Total correspondiente a 120 minutos de inducción (ET), carril 4- Fracción Insoluble (FI) carril 5- Fracción Soluble (FS).

### 3.8.4b Ensayo I de expresión en el clon zpHGEX 7 *E. coli* NEB 5alpha

Al realizar el ensayo de expresión de ZPHGEX 7 en células *E. coli* NEB 5alpha en las mismas condiciones que ZPHGEX, se siguió la expresión mediante extractos proteicos totales desde el punto antes de inducir hasta los 120 minutos (s/I, 30min, 60min, 90min, 120min) en los que se realizó el fraccionamiento y posterior ensayo de purificación por Cromatografía de afinidad a Glutación. Al analizar los carriles de los diferentes tiempos de inducción con IPTG se puede observar que la mayor parte de las bandas proteicas se mantienen, pero una banda próxima a los 50 kDa va aumentando a medida que pasa el tiempo. Esta banda proteica se corresponde con los 52,3 kDa predichos por el programa

Protparam (<http://web.expasy.org/cgi-bin/protparam>) a partir de la secuencia teórica de ZPHGEX. Al observar las muestras luego del fraccionamiento se evidencia una banda proteica de gran intensidad próxima a los 50 kDa en la fracción insoluble, a la vez que se observa que en esta muestra existe poca cantidad de otras proteínas. Por otro lado, al observar la fracción soluble (FS) se constata casi la misma proporción de proteínas que en la muestra sin inducir (s/I).



**Figura 49.** Ensayo I de expresión de ZPHGEX 7 en células *E. coli* NEB 5alpha: crecimiento bacteriano para expresión del péptido recombinante a partir del Clon zpHGEX-7 en 50mL de medio ZYM 505 (Studier, 2005) a 37°C. Carril 1-Extracto proteico sin inducir (s/I), carril 2 a 4-Extractos proteicos luego de 30, 60 y 90 minutos de inducción con IPTG, respectivamente (30min, 60min y 90 min). Fraccionamiento: carril 5- Extracto Proteico Total correspondiente a 120 minutos de inducción (ET), carril 6- Fracción Soluble (FS) carril 7- Fracción Insoluble (FI). Cromatografía de afinidad a Glutación: Elución de cromatografía GST (EGST) y lavado de columna (L)

Cuando se observa la elución y el lavado de la cromatografía de afinidad a Glutación no se detectan bandas proteicas, lo que puede indicar que no hay suficiente ZPHGEX en la

fracción soluble o que la misma no está en una conformación que permita la unión de GST con el Glutatión unido a la matriz de la cromatografía.

Comparando los dos análisis electroforéticos se concluye que ambos péptidos recombinantes se logran expresar, pero al realizar el fraccionamiento éstos quedan en la fracción insoluble de cada uno de los ensayos.

#### **3.8.4c Ensayo II de expresión en el clon zpHGEX 7 *E. coli* NEB 5alpha**

Los resultados del fraccionamiento de la expresión del clon zpHGEX 7 inducido con IPTG a 37 °C y a temperatura ambiente (entre 20 y 24 °C), no mostraron expresión aumentada en ninguna de las bandas proteicas respecto a la muestra sin inducir. Se comprobó también que la cromatografía de afinidad por ión metálico no permitió una purificación al no aparecer bandas proteicas en el carril de la elución (datos no mostrados). Asimismo, al momento de cargar las muestras de la solubilización con Cloruro de Guanidinio, éste precipitó al contacto con el buffer de corrida, impidiendo así la observación de las muestras: Fracciones Insoluble-soluble en Cloruro de Guanidinio (FI-SCG) y la Fracción Insoluble-Insoluble. Teniendo como premisa la descripción realizada por Berrow y col. (2006), donde comprueban aumento de la solubilidad de diferentes péptidos recombinantes al disminuir la temperatura de inducción, se concluye que en las condiciones establecidas para el clon zpHGEX 7 *E. coli* NEB 5alpha, en contra de lo esperado, no se observan diferencias de expresión a temperatura ambiente, respecto a la inducción a 37°C.

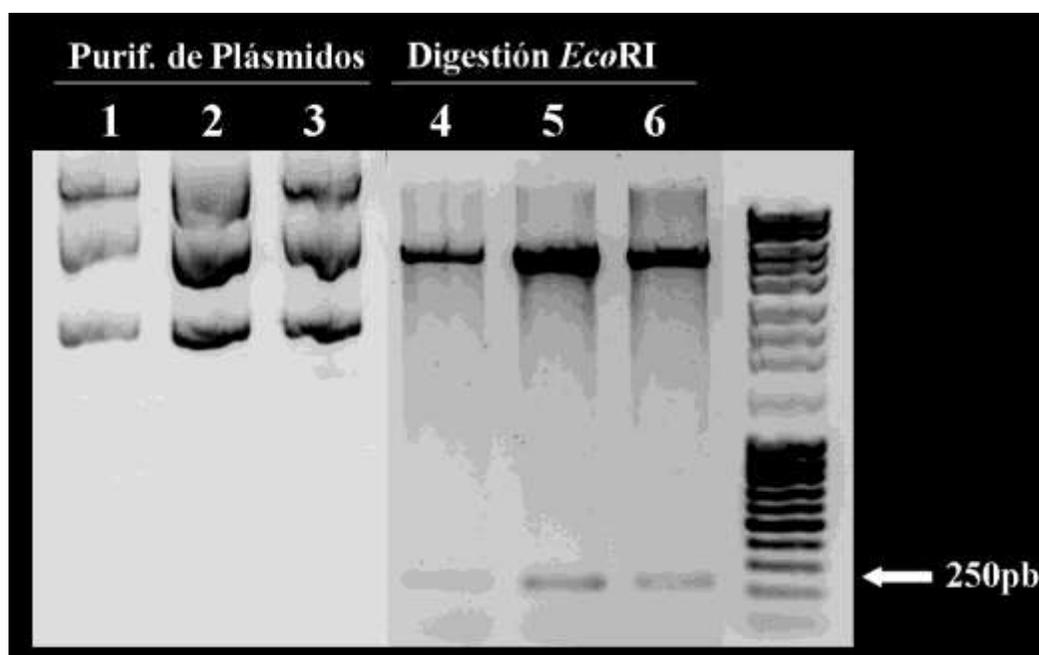
Con el objetivo de mejorar el nivel de expresión e intentando que en el fraccionamiento se obtengan los péptidos recombinantes en la fracción soluble, se realizó la transformación de la cepa de bacterias *E. coli* BL21 (STAR). Esta cepa bacteriana permite realizar la inducción de expresión por la complementaridad del promotor pBAD actuando con el promotor *T7lac* de respuesta a la arabinosa del medio auto-inductor ZYM 5052 (Studier, 2005). Además, la cepa BL21 (STAR) de *E. coli* al ser deficiente de ARNasas permitiría mayor disponibilidad de ARNs mensajeros recombinantes que podrían ser degradados en la situación en que la construcción plasmídica generase conformaciones de ARNm alteradas.

### 3.8.5 Transformación, purificación y confirmación de clones de *E. coli* BL21 (STAR)

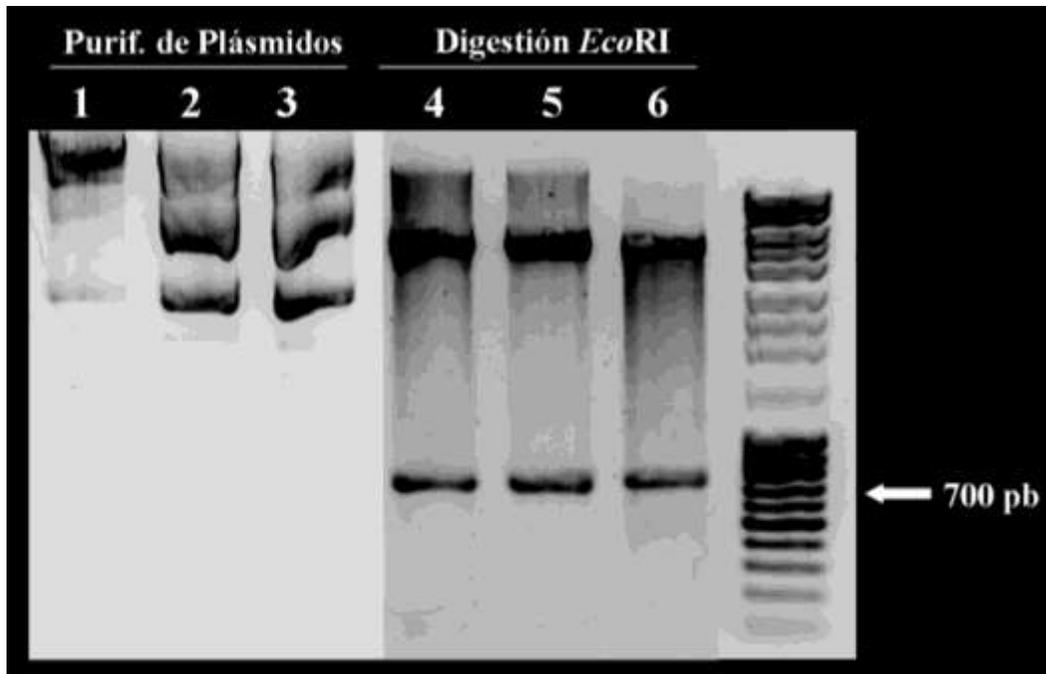
#### 3.8.5a Transformación de bacterias *E. coli* BL21 (STAR)

La transformación de bacterias *E. coli* BL21 (STAR) se realizó con los plásmidos obtenidos de los clones zpLGEX-7 y zpHGEX-7. Se obtuvieron más de 10 colonias por placa de transformación, 2 placas por inserto. De las colonias obtenidas se aislaron 8 clones para cada plásmido. Si bien el resultado coincide en los 6 clones purificados, se muestran los resultados de las purificaciones plasmídicas de 3 de los clones obtenidos para cada inserto, carriles 1 a 3 de las figuras 50 y 51 (zpLGEX y zpHGEX).

En esta oportunidad la confirmación de transformación con el inserto indicado se realiza por digestión con la enzima de restricción *EcoRI*, carriles 4 a 6 de las figuras 50 y 51 (zpLGEX y zpHGEX) y la confirmación de la correcta fase de marco de lectura entre el fragmento de ZP y la GST del vector, por secuenciación de 2 de los plásmidos de los clones obtenidos para cada fragmento de gen coriónico (Tabla 31).



**Figura 50.** Carriles 1, 2 y 3 – Minipreparaciones de clones zpLGEX *E. coli* BL21 (STAR) 2, 5 y 7 respectivamente. Carriles 4, 5 y 6 – Digestiones con *EcoRI* de clones zpLGEX *E. coli* BL21 (STAR) 2, 5 y 7 respectivamente



**Figura 51.** Carriles 1, 2 y 3 – Minipreparaciones de clones zpHGEX *E. coli* BL21 (STAR) 1, 2 y 7 respectivamente. Carriles 4, 5 y 6 – Digestiones con *EcoRI* de clones zpHGEX BL21 (STAR) 1, 2 y 7 respectivamente.

	Clones	Secuenciación	Secuencia en fase de marco abierto de lectura
zpLGEX	5	Sí	Sí
	7	Sí	Sí
zpHGEX	1	Sí	Sí
	2	Sí	Sí

**Tabla 32.** Confirmación de secuenciación de los clones BL21(STAR) de zpLGEX y zpHGEX, y fase del marco abierto de lectura del fragmento de *achzpL* o *achzpH* con el de Glutacion-transferasa del vector.

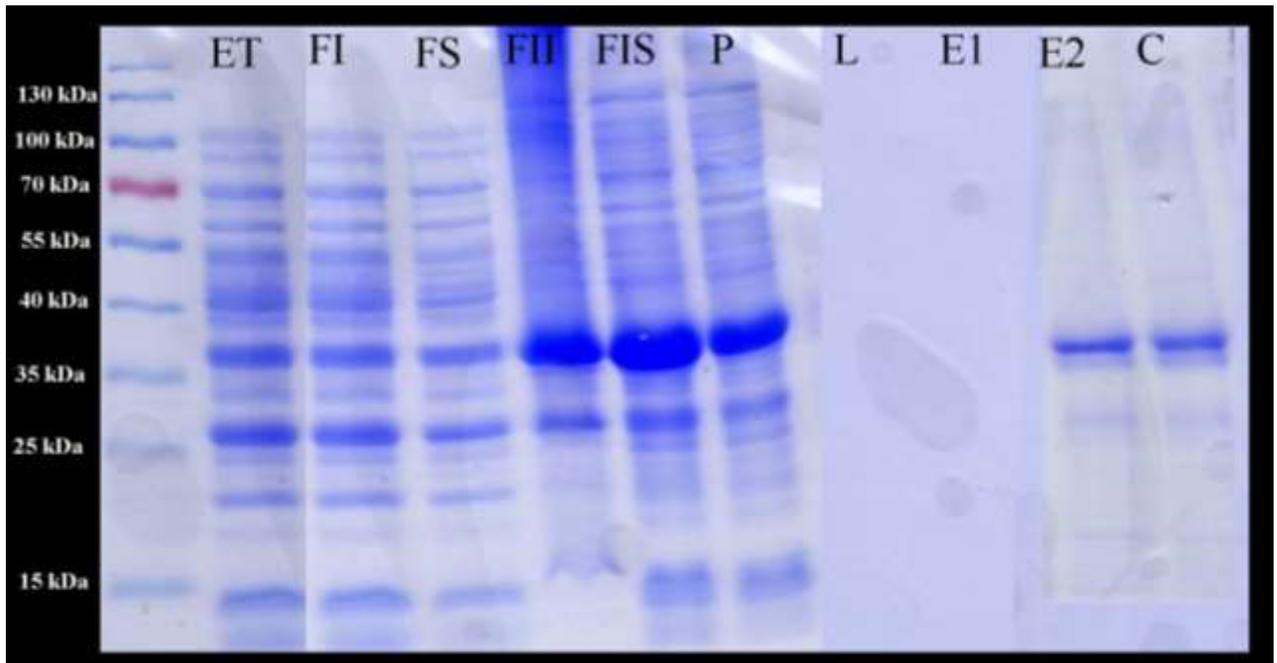
A partir de los resultados de las electroforesis se puede concluir que se obtuvieron plásmidos recombinantes a partir de todos los clones aislados. De los clones seleccionados para secuenciación, los cuatro (2 de *achzpL* y 2 de *achzpH*) contenían el inserto adecuado con su marco de lectura abierto en fase con el de la Glutacion-transferasa. Con esta información se seleccionaron los clones de *E. coli* BL21 (star) zpLGEX-5 y zpHGEX-2 para realizar los ensayos de expresión.

### 3.8.6 Ensayos de expresión en células *E. coli* BL21 (STAR)

#### 3.8.6a Ensayo I de expresión en el clon zpLGEX 5 *E. coli* BL21 (STAR)

Para el primer ensayo de expresión de ZPLGEX en células *E. coli* BL21 (STAR), el crecimiento bacteriano el Clon zpLGEX-5 se inoculó en el medio autoinductor ZYM 5052 (Studier, 2005) a 37°C y se cosechó al llegar a una DO<sub>600nm</sub> de 8.

El seguimiento del fraccionamiento, solubilización y purificación se resume en el gel obtenido luego de una electroforesis desnaturizante SDS-PAGE, figura 52.



**Figura 52. Fraccionamiento, solubilización y purificación de ZPLGEX**

Fraccionamiento: Extracto Proteico Total (ET), Fracción Soluble (FS) y Fracción Insoluble (FI). Solubilización: Fracción Insoluble Soluble en Urea 6M (FIS) y Fracción Insoluble-Insoluble en Urea 6M (FII).

Purificación y resolubilización: la Fracción Insoluble Soluble se somete Percolado (P) de Cromatografía de Afinidad a Ión Metálico o IMAC, Lavado (L) y Eluciones de 1mL (E1, E2). Concentración y Desalado: Concentrado (C).

Al analizar el gel resultante se puede observar que no hay mayores diferencias al observar el Extracto proteico total (ET) respecto a la fracción soluble (FS) y la insoluble (FI). En cambio, al realizar la solubilización con urea 6M, se aprecia tanto en la fracción insoluble/soluble en urea (FIS) como en la fracción insoluble-insoluble en urea (FII), un aumento en la intensidad de una banda proteica sobre los 35 KDa. Esta banda correspondería

a los 35,2 KDa de ZPLGEX calculados a partir de la secuencia teórica. En ambas muestras se observa gran cantidad de proteínas bacterianas acompañantes. Este resultado concuerda con la solubilización a diferentes concentraciones de urea en donde se obtiene a una concentración de 6M de urea el mayor rendimiento en solubilización de la banda de 35 kDa, aunque las cantidades de bandas de proteínas bacterianas fueron equivalentes (dato no mostrado).

Luego de pasar la FIS por la columna de Cromatografía de Afinidad a Ión Metálico (IMAC), se observa que el Percolado (obtenido luego de haber atravesado por la matriz, la FIS) contiene gran concentración de la proteína correspondiente a la banda de 35KDa. Esta observación evidencia que existe gran cantidad de esta proteína que se mantiene en la suspensión, generado por: 1 - saturación de la resina HisTrap (General Electric) por exceso de proteína en solución, o 2 - por la posible alteración de la conformación del sector polihistidina en la región amino-terminal de la proteína recombinante producido por la alta concentración de urea que impide la unión con la resina. La muestra proveniente de los lavados en gradiente decreciente de urea, indica que se diluyeron las proteínas bacterianas acompañantes. A su vez al no aparecer la banda proteica de interés, sugiere que puede haber quedado retenida en la matriz. Al observar las muestras de elución se comprueba que en el primer mililitro de elución no se desprende la proteína de interés. A partir de la segunda elución y hasta la quinta se obtuvieron bandas proteicas sobre los 30 KDa. Para concentrar estas muestras y lavar el Imidazol se utilizó el sistema Centricón (Amicon).

La banda obtenida luego de concentrar la muestra se recortó y se envió para su análisis al servicio del espectrómetro de masas MALDI-TOF-TOF del Institut Pasteur de Montevideo.

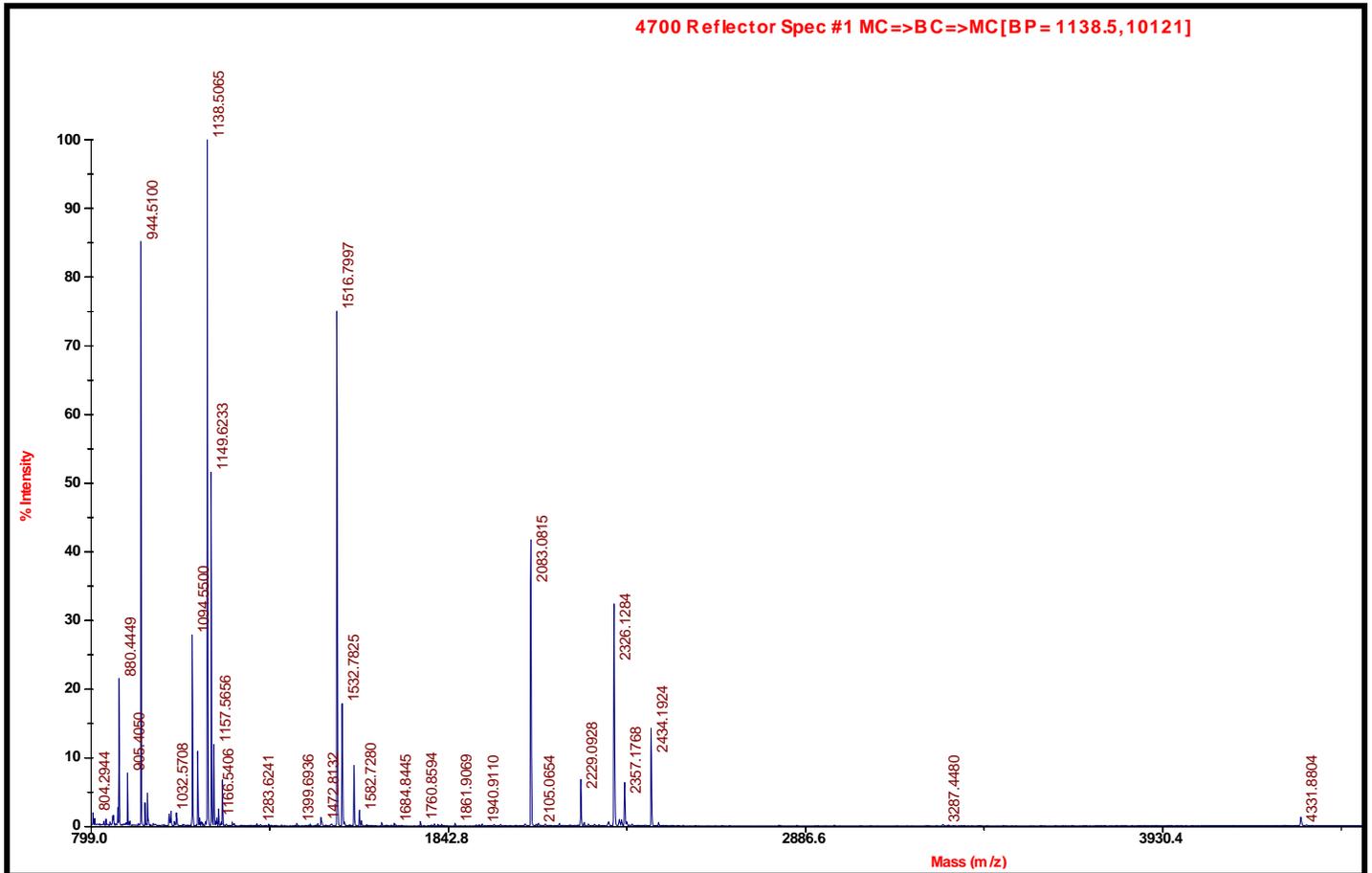
### **3.8.6b Confirmación de banda proteica purificada por Espectrometría de Masa**

La banda proteica purificada se recortó, eluyó y se sometió a una digestión por tripsina para realizar el análisis de fragmentos trípticos ionizados con el Espectrómetro de masa MALDI-TOF-TOF en modo reflector positivo. En la figura 53 se grafican los iones de fragmentos trípticos obtenidos a partir de la banda proteica purificada.

Al comparar el resultado obtenido de los iones de fragmentos trípticos con la secuencia teórica de ZPLGEX mediante un análisis de búsqueda con motor Mascot ([www.matrixscience.com](http://www.matrixscience.com)), se identificaron los péptidos principales de la muestra y su

coincidencia con la secuencia teórica (Fig. 54). En la secuencia de la figura 54 se identifican los péptidos principales (rojo), la secuencia proteica de Glutation-transferasa se destaca en verde, la secuencia del fragmento de ZPL de *A. charrua* se subrayó en gris.

A partir de este análisis se concluye que la muestra analizada coincide de manera estadísticamente significativa ( $p < 0,05$ ) con la secuencia teórica de la proteína ZPLGEX y la cobertura obtenida es del 67% (Informe adjunto Apéndice II).



**Figura 53.** Espectro obtenido a partir de los péptidos trípticos ionizados en modo reflector positivo, obtenidos de la purificación proteica del clon zPLGEX 5.

**MSPILGYWKIKGLVQPTRLLEYLEEKYEEHLYERDEGDKWRN**  
**KKFELGLEFPNLPYYIDGDVKLTQSMAIRYIADKHNMLGGCPK**  
**ERAEISMLEGAVLDIRYGVSRYAISKDFETLKVDFLSKLPEMLK**  
**MFEDRLCHKTYLNGDHVTHPDFMLYDALDVVLYMDPMCLDAF**  
**PKLVCFKKRIEAIPQIDKYLKSSKYIAWPLQGWQATFGGGDHP**  
**KEFGLTWKYPEAPQPEVKPSVPFELRYPVAAATVAVQCQESYAH**  
**VEVKMDMFGTGQIINPGDLTLGDCAVSEDPAAQVHHHHHHEF**

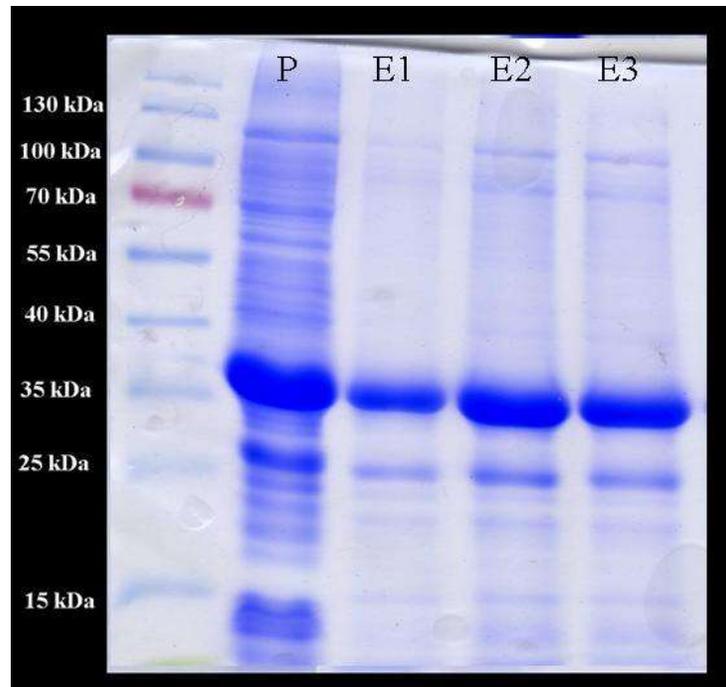
**Figura 54.** Péptidos principales identificados sobre la secuencia teórica de la proteína recombinante ZPLGEX.

### **3.8.6c Cuantificación de ZPLGEX obtenida en Ensayo I de expresión en *E. coli* BL21 (STAR)**

Con el método de cuantificación proteica del ácido bicinonínico se determinó que la concentración de la muestra purificada y concentrada fue de 400 µg/mL. Esta cantidad no es suficiente para la inmunización ya que, según protocolos del Polo Tecnológico de Pando, se necesitarían 1,2 mg de proteína en 500 µL (equivalente a 2,4 mg/mL) de solución acuosa para emulsionar con un adyuvante oleoso.

### **3.8.6d Purificación mediante IMAC de ZPLGEX obtenida con urea 6M en Ensayo I de expresión en *E. coli* BL21 (STAR)**

Si bien se obtuvo gran cantidad de ZPLGEX (Fig. 55) purificada mediante IMAC, al realizar la elución en urea 6M, dada la cantidad de proteína recuperada, fue imposible utilizar la misma para inmunizar conejos a fin de obtener anticuerpos por su alta concentración de urea. En este sentido, los protocolos actuales de la Comisión Honoraria de Experimentación Animal (CHEA) tampoco permiten la inmunización a partir de geles de acrilamida. Por estos motivos este resultado es alentador por la cantidad obtenida, pero no permite cumplir el objetivo principal de la inmunización.



**Figura 55. Purificación de ZPLGEX por IMAC con Urea 6M**

Se destacan el Percolado (P) de la Cromatografía de Afinidad a Ión Metálico o IMAC realizada a partir de la Fracción Insoluble Soluble en Urea 6M y las Eluciones de 1mL (E1, E2 y E3) realizadas en buffer Tris-urea 6M y 500mM de Imidazol.

### 3.8.7 Ensayo de expresión de ZPLGEX y solubilización en Cloruro de Guanidinio

Con el objetivo de aumentar la cantidad de ZPLGEX para su purificación se realizaron nuevos ensayos de producción adoptando la estrategia de renaturalización por shock de dilución 1:10. La solubilización en este caso se realizó con el agente caotrópico Cloruro de Guanidinio. En el primer ensayo, luego de la dilución 1:10 se obtuvo una suspensión que se centrifugó a 14000g por 10 minutos. El sobrenadante precipitó a los 15 minutos a temperatura ambiente.

En el segundo ensayo durante la solubilización de la fracción insoluble se utilizó 30mM del agente reductor DTT en el buffer con Cloruro de Guanidinio 6 M. Luego de realizar la dilución y centrifugación se observó que el sobrenadante fue más estable a temperatura ambiente que el primer ensayo. Este sobrenadante se utilizó para realizar una Cromatografía IMAC en AKTA. Durante el pasaje del sobrenadante (dilución con el agente reductor) aumentó la presión en la columna, impidiendo el pasaje completo de los 45 mL de sobrenadante. Se realizó el lavado con 10 volúmenes de columna con bajo flujo ya que la presión era la máxima permitida por la columna. Al intentar la elución con el buffer con

imidazol 500mM, no hubo desprendimiento de ZPLGEX, asumiendo que la proteína recombinante precipitó en la columna.

Si bien el objetivo de estos ensayos era producir mayor cantidad de péptidos recombinantes en estado soluble, los resultados permiten concluir que con el tratamiento con el agente reductor (DTT) la proteína ZPLGEX sería más estable (menos propensa a la precipitación) que en la condición sin reductor. Esta observación concuerda con el hecho subestimado *a priori* durante el diseño, de que en la secuencia traducida de *achzpL* incluida en ZPLGEX existe un dominio ZP con residuos de cisteína que tendrían la capacidad de formar puentes disulfuro. Y teniendo en cuenta que existen datos que apuntan a que éstos dominios pueden funcionar como nucleadores de polimerización (Lekanidou y col.1986, Jovine y col. 2002b, 2006a,b), se propone que el dominio ZP del fragmento de *achzpL* integrado en la proteína ZPLGEX generó su alta tendencia a precipitar en todas las condiciones ensayadas. Dado que el fragmento de *achzpL* contaba sólo con 228 pares de nucleótidos, equivalentes a 76 residuos aminoacídicos, el pequeño tamaño del fragmento fue determinante en la decisión de utilizar la totalidad del mismo. Si bien para *achzpH* se contaba con un fragmento de mayor tamaño, 626 pares de nucleótidos (equivalentes a 208 residuos aminoacídicos) también se decidió utilizar la región codificante completa del fragmento de ADNc obtenido. Este hecho probablemente haya generado que no solo ZPLGEX, sino que ambos péptidos recombinantes de proteínas corionicas de *A. charrua* (ZPLGEX y ZPHGEX) precipitaran al contener dominios ZP. Por su parte la insolubilidad se mantiene, aunque durante el diseño y producción se haya fusionado a GST, estrategia comprobada para diferentes péptidos recombinantes que resulta en el aumento de su solubilidad (Kapust y Waugh, 1999, Sørensen y Montensen, 2005). Esta situación queda demostrada durante la implementación de los métodos de purificación ensayados, donde en la totalidad de los fraccionamientos los péptidos recombinantes quedaron en la fracción insoluble, y en éstos la precipitación por puentes disulfuro de los dominios ZP deben ser determinantes. Asimismo, se comprobó que el elemento más ventajoso para la purificación de las proteínas es la región amino terminal con poli-histidinas, que permitió la purificación mediante cromatografía de afinidad por ión metálico o IMAC. En este sentido, como ya se mencionó la inclusión de la proteína Glutación–transferasa no tuvo el efecto esperado sobre la solubilidad, luego de realizar la solubilización con los elementos caotrópicos usados (urea y guanidinio) el sistema de purificación por Glutación estabilizado se vuelve ineficaz. Por este motivo se propone

pág. 118

eliminar la GST para un nuevo diseño que a su vez evitará que al usar péptidos pequeños, como es el caso de ZPLGEX, donde buena parte de la respuesta de anticuerpos durante la inmunización se obtendría contra la GST.

En este sentido, para producir la proteína completa en estado soluble sería imprescindible contar con la secuencia proveniente del Transcriptoma de *A. charrua* que se encuentra en procesamiento, poniendo especial énfasis en la fracción C-terminal. Se ha reportado en *O. latipes* que en la región C-terminal de los precursores de Coriogenina H y L se encuentran fragmentos de 34 y 27 residuos peptídicos, respectivamente encargados de conferir la solubilidad suficiente como para ser transportados vía sanguínea hasta el corion en formación. Estos fragmentos se encuentran ausentes en las Coriogeninas H y L en el ovario y serían los responsables de la solubilidad de estas proteínas (Sugiyama y col. 1999). En su ausencia de los péptidos de solubilización en C-terminal, las proteínas coriónicas podrían actuar como nucleadora de polimerización (Jovine y col. 2002b, 2005, 2006b) y/o formar estructuras amiloides naturales (Hamodrakas y col. 2004, Iconomidou y col. 2000a). Otra estrategia posible al contar con el Transcriptoma de *A. charrua* puede ser: 1- elegir a partir de la secuencia de la ZP correspondiente los fragmentos de residuos peptídicos de mínima homología con otras proteínas, es decir fragmentos específicos. 2- Los fragmentos elegidos a su vez, tienen que llegar a aproximadamente 9 KDa como mínimo, según protocolos del Polo Tecnológico de Pando y 3- poseer mayoritariamente aminoácidos polares para facilitar su solubilidad en solución acuosa. Las secuencias nucleotídicas de estos fragmentos seleccionados permitirían su producción en un sistema de expresión pET con poli-His, resultando en péptidos recombinantes con mayor solubilidad y probablemente mayor eficiencia en la producción y purificación para la inmunización y obtención de anticuerpos específicos.

## 4 CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS

En cuanto a los objetivos planteados de avanzar en la caracterización de la expresión de los genes coriónicos, se abordó por un lado el patrón de expresión temporal de los genes en análisis, y por otro lado mediante una aproximación cuantitativa (amplificación en tiempo real) la determinación si la expresión de los genes identificados es regulada por estrógenos, para posteriormente establecer si la contaminación por xenoestrógenos altera el patrón de expresión. Los resultados obtenidos sobre la expresión durante el desarrollo embrionario y el período post-eclosión concuerdan con el proceso de diferenciación sexual de la especie (Arezo y col. 2007) y el estadio de la ovogénesis que comienza a depositarse el corion (Guraya, 1986; Arezo y col. 2007; Berois y col. 2007). Éste proceso se evidencia al observarse el comienzo de la expresión de ambos genes coriónicos a apartir de embriones pre-eclosión de *A. charrua*, en los que los ovocitos se encuentran en comienzo de la vitelogénesis según se describió para esta especie en Arezo y col. (2007).

En cuanto a si la expresión de los genes coriónicos de *Austrolebias charrua* está regulada por estrógenos, se partió por la caracterización mediante amplificación en tiempo final de dos fragmentos de ADNc de hígado, *achzpL* y *achzpH*, ortólogos a los genes que codifican a las proteínas coriónicas de teleósteos de clase L y H (sub-clase H menor) respectivamente. Los análisis filogenéticos realizados ubican a las secuencias aminoacídicas correspondientes a *achzpL* y *achzpH* en las familias de proteínas coriónicas ZPC y ZPB, respectivamente, de expresión hepática, concordando con los resultados obtenidos mediante amplificación en tiempo final (RT-PCR). Este hecho alentó a la implementación de estrategias cuantitativas con el fin de comprobar una posible regulación estrogénica sobre la expresión de estos genes, así como su potencial sensibilidad a xenoestrógenos.

La implementación de estrategias cuantitativas orientó hacia los abordajes de amplificación en tiempo real y de cuantificación mediante anticuerpos específicos.

Mediante amplificación en tiempo real se obtuvieron resultados que confirmaron el efecto estrogénico sobre la expresión de *achzpL* a altas dosis de estradiol en hígados de machos de *A. charrua*, en tanto no se observaron diferencias significativas en la expresión de *achzpH* en las condiciones experimentales utilizadas. En este sentido en hígado de hembras no se observaron diferencias significativas entre el control y las dosis de estradiol utilizadas. Cuando los ejemplares fueron tratados con el compuesto xenoestrogénico

nonilfenol, se observaron efectos moderados directos o indirectos sobre la expresión de ambos ARNm en el hígado de hembras. Mientras que los resultados sobre estos genes en individuos machos indicaron un efecto destacado con cambios de expresión muy significativos a bajas dosis del compuesto xenoestrogénico. Las concentraciones en las que se observan grandes efectos en la expresión de genes coriónicos en hígado de machos son mucho menores respecto a las dosis de nonilfenol máximas encontrados en ambientes polucionados, hecho que alienta el monitoreo en la naturaleza y la exploración de la presente estrategia a fin de detectar compuestos xenoestrogénicos en diferentes sistemas dulceacuícolas, desde ambientes poco polucionados hasta los muy contaminados.

Dentro de esta metodología y comparando individuos eclosionados y criados en laboratorio con individuos provenientes de la naturaleza se evidencian niveles de expresión 110 veces más altas de *achzpH* en los primeros, lo cual sugiere un nivel de inducción de *achzpH* alterado en los individuos criados en laboratorio respecto a los provenientes de la naturaleza. El análisis de estos resultados nos lleva a sugerir dos posibles explicaciones: 1) que el alimento vivo que reciben en condiciones de laboratorio esté contaminado con xenoestrógenos y/o, 2) que los ejemplares del laboratorio presenten altos niveles de cortisol provocado por estrés. Esto lleva a concluir que es posible que los resultados del tratamiento con estradiol, en el que se usaron peces criados en condiciones de laboratorio podrían estar subestimados en machos. A nivel de las hembras esta alteración de inducción, podría enmascarar cualquier efecto apreciable, al no observarse diferencias significativas en los niveles de expresión relativa de *achzpL* y *achzpH* en el hígado de éstas luego del tratamiento con estradiol.

Para fortalecer las hipótesis planteadas, mejorar la eficiencia y condiciones de amplificación de los genes seleccionados, y complementar la información proveniente del transcriptoma y genoma de *A. charrua*, se proponen como abordajes inmediatos:

- 1) A partir del genoma obtenido en colaboración con CRG-Chile, se abordará el análisis de las secuencias reguladoras de los genes corionicos, con el fin de explorar la existencia de secuencias blanco del receptor de estrógenos.
- 2) Repetir el tratamiento de estradiol exclusivamente con individuos provenientes de la naturaleza, y que no hayan sido alimentados con alimetos sospechosos de contener xenosetrógenos.

3) Fortalecer los resultados obtenidos repitiendo los mismos con nuevos juegos de oligonucleótidos diseñados a partir de las secuencias coriónicas completas que se están identificando a partir del transcriptoma. En este sentido, también sería necesario diseñar oligonucleótidos para otros genes de referencia o “housekeeping” más apropiados para ensayos de disrupción endócrina.

4) Completando los estudios paralelos en los marcadores sexo-específicos en conjunto con la Dra. María José Arezo, se podrían realizar estudios de niveles de expresión e inducción estrogénica y xenoestrogénica en embriones o alevines recién eclosionados. En este sentido, se deben validar nuevos genes de referencia para estadios del desarrollo que permitiera implementar con este conjunto de genes un sistema de testeado de agua dulce práctico y portable usando embriones pre-eclosión.

En lo referente al estudio detallado de los elementos que inducirían la expresión de los genes coriónicos en condiciones de cría en laboratorio se proponen diferentes abordajes:

- a) Para evitar la ingesta de disruptores endócrinos provenientes de la dieta, ya se están implementando cultivos de alimentos vivos (*Tubifex* spp., *Lombrículus variegatus*, *Daphnia magna* y *D. pulex*, anélidos del género *Enchytraeus*, etc.) en condiciones libres de xenoestrógenos.
- b) Implementar ensayos de amplificación en tiempo real con individuos machos alimentados bajo diferentes regimenes alimenticios.
- c) Realizar la cuantificación de estradiol y compuestos xenoestrogénicos en diferentes muestras de *Tubifex* spp., alimento utilizado en la presente tesis en los ejemplares de laboratorio. La estrategia más directa sería mediante la preparación de muestras para identificación y cuantificación mediante Cromatografía de Alta Presión Líquida- masa o HPLC-masa.
- d) A partir de las mediciones de niveles de cortisol en plasma de *Austrolebias reicherti* en la naturaleza respecto a sus niveles en condiciones de laboratorio, realizadas recientemente para correlacionarlas con niveles de estrés por el Dr. Carlos Passos, se ha propuesto una colaboración a fin de poner a punto tratamientos con cortisol para correlacionarlos con niveles de expresión de genes coriónicos. Esta colaboración está planeada para el segundo semestre de 2016.

Como conclusión de esta parte de la tesis, estimamos que los resultados obtenidos, aún con las consideraciones detalladas anteriormente, alientan a proponer la expresión de los genes coriónicos de *A. charrua* como biomarcadores de contaminación ambiental, principalmente para monitorear los charcos estacionales en que habitan. Luego de haber optimizado las condiciones de cría y mantenimiento en laboratorio de la especie (libres de disruptores endócrinos) y visto la incidencia en la expresión sobre los genes por contaminantes, se contará con datos útiles para ser utilizadas en programas de monitoreo ambiental, donde no sólo contribuyan a la protección de la biodiversidad en el área de distribución de *A. charrua* (zona declarada reserva de la Biosfera - sitio Ramsar), sino que sea aplicable a otros ambientes dulceacuícolas.

A nivel del “Diseño, producción y purificación de péptidos recombinantes de ZPs de *Austrolebias charrua*” se comprobó que a partir de los fragmentos de ADNc *achzpL* y *achzpH*, se logró diseñar y construir vectores de expresión utilizando un sistema basado en recombinación homóloga *in vitro* (Zhang y col. 2012). Estos vectores permitieron obtener los péptidos recombinantes ZPLGEX y ZPHGEX en la fracción insoluble luego del fraccionamiento primario.

Si bien fue posible recuperar mediante la solubilización solamente el péptido ZPLGEX con el buffer con Urea 6M, no se logró obtener la cantidad de proteína en estado soluble sin urea, necesaria para realizar la inmunización en conejos. Sumado al dato anterior, las fracciones en la que se obtuvo mayor cantidad de ZPLGEX no pueden ser usadas para la inmunización.

Si bien la cantidad de proteína obtenida todavía es insuficiente para la inmunización, se pusieron a punto las condiciones que permitirán realizar el escalado y obtener cantidades necesarias para los siguientes ensayos.

Se espera que la obtención de anticuerpos específicos contribuya a la determinación del rol fisiológico de las coriogeninas (expresión, dinámica y localización). Asimismo, si se confirmara la regulación estrogénica a nivel de la expresión proteica de estos genes, los mismos podrán ser usados para complementar las herramientas basadas en la detección de ARNm de genes coriónicos propuestos para programas de monitoreo ambiental. Las aplicaciones proyectadas para los anticuerpos serían: western blot, inmunolocalización en cortes histológicos e *in toto* y ensayos cuantitativos como ELISA, entre otros.

A nivel fisiológico, una vez obtenidos los anticuerpos se podrá ampliar el patrón de expresión a nivel proteico, así como su distribución y patrón de deposición en los ovocitos durante su maduración. Del mismo modo se podrán complementar los estudios de expresión, detectando la distribución post-transcripcional a nivel espacial de ambos genes coriónicos en condiciones control *versus* tratamientos o exposiciones a componentes estrogénicos y xenoestrogénicos.

## 5 REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abramoff, M.D.; Magelhaes, P.J.; Ram, S.J. (2004) Image Processing with ImageJ. **Biophotonics International**, 11:36-42.
- Altschul, S.F.; Gish, W.; Miller, W.; Myers, E.W.; Lipman, D.J. (1990) Basic Local Alignment Search Tool. **Journal of Molecular Biology**, 215:403-410.
- Arcand-Hoy, L.D.; Benson, W.H. (1998). Fish reproduction: An ecologically relevant indicator of endocrine disruption. **Environmental Toxicology and Chemistry**, 17:49-57.
- Arezo, M.J.; Pereiro, L.; Berois, N. (2005) Early development in the annual fish *Cynolebias viarius*. **J Fish Biol**, 66:1357-1370
- Arezo, M.J.; Dalessandro, S.; Papa, N.; de Sa, R.; Berois, N. (2007) Sex differentiation pattern in the annual fish *Austrolebias charrua* (Cyprinodontiformes: Rivulidae). **Tissue Cell**, 39: 89-98.
- Arezo, M.J., N. Papa, V. Gutiérrez, G. García, Berois, N. (2014) Sex determination in annual fishes: Searching for the master sex-determining gene in *Austrolebias charrua* (Cyprinodontiformes, Rivulidae). **Genetics and Molecular Biology**, 37:364-374.
- Arukwe, A.; Knudsen, F.R.; Goksøy, R.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, B.T.; Goksøy, 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.; Kullman, S.W.; Berg, K.; Goksøy, A.; Hinton, D.E. (2002) Molecular cloning of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) eggshell zona radiata protein complementary DNA: mRNA expression in 17beta-estradiol- and nonylphenol-treated fish. **Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol**. 132(2):315-26.
- Arukwe, A.; Goksøy, 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, F.M. (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.
- Barrallo, A.; Gonzalez-Sarmiento, R.; Garcia-Isidoro, M.; Ciudad, 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.
- Begovac, 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.
- Berg, A.H.; Westerlund, L.; Olsson, P.E. (2004) Regulation of Arctic char (*Salvelinus alpinus*) egg shell proteins and vitellogenin during reproduction and in response to 17beta-estradiol and cortisol. **Gen. Comp. Endocrinol**. 135:276-285

- 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, M.J.; Chalar, C.; Brauer, M.M. 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, M.J.; Papa, N. (2011) Gamete interactions in teleost fish: The egg envelope as an environmental biomonitor. **Biol Res** 44: 119-124
- Berois, N.; Arezo, M.J.; Papa, N.G.; Clivio, G.A. (2012) Annual fish: Developmental adaptations for an extreme environment. **WIREs Developmental Biology** 1:595–602
- Berois, N.; Arezo, M.J.; de Sá, R.O. 2014. The neotropical genus *Austrolebias*: An emerging model of annual killifishes. **Cell and Developmental Biology** 3:136.
- Berois, N.; Arezo, M.J.; Papa, N.G; Chalar, C. (2015) Life Cycle, Reproduction, and Development in Annual Fishes. Cellular and Molecular Aspects. En **Annual Fishes: Life History Strategy, Diversity, and Evolution**. (33-45). Boca Raton: CRC Press.
- Berrow, N.; Diprose, J.; Owens, R.; Büssow, K.; Scheich, C.; Coutard, B.; Vincentelli, R.; Ekberg, M.; Lieu, V.; Folkers, G.; Levy, N.; Peleg, Y.; Pinaglia, C.; Quevillon-Cheruel, S.; Salim, L.; Busso, D. 2006. Recombinant protein expression and solubility screening in *Escherichia coli*: A comparative study. **Acta Crystallographica Section D: Biological Crystallography**, 62:(10) 1218-1226
- Bettinetti, R.; Cuccato, D.; Galassi, S.; Provini, A. (2002a) Toxicity of 4-nonylphenol in spiked sediment to three populations of *Chironomus riparius*. **Chemosphere**, 46:201–207
- Bettinetti, R.; Provini, A. (2002b) Toxicity of 4-nonylphenol to *Tubifex tubifex* and *Chironomus riparius* in 28-day whole-sediment tests. **Ecotox. Environ. Saf.** 53: 113–121.
- Bonsignorio, D.; Perego, L.; Del Giacco, L.; Cotelli, F. (1996) Structure and macromolecular composition of the zebrafish egg chorion. **Zygote**, 4:101–108.
- Brander, S.; Cole, B.; Cherr, G. (2012) An approach to detecting estrogenic endocrine disruption via choriogenin expression in an estuarine model fish species. **Ecotoxicology**, 21(4) 1272.
- Celius, T.; Walther, B.T. (1998) Oogenesis in Atlantic salmon (*Salmo salar*) occurs by zonagenesis preceding vitellogenesis in vivo and in vitro. **J. Endocrinol.** 58: 259–266.
- Celius, T.; Matthews, J.B.; Giesy, J.P.; Zacharewski, T.R. (2000) Quantification of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) zona radiata and vitellogenin mRNA levels using realtime PCR after in vivo treatment with estradiol-17beta or  $\alpha$ -zearalenol. **J. Steroid Biochem. Mol. Biol.** 75:109–119.
- Chang, Y.S.; Hsu, C.C.; Wang, S.C.; Taso, C.C.; Huang, F.L. (1997) Molecular cloning, structural analysis and expression of carp ZP2 gene. **Mol Reprod Dev**, 46: 258-267.
- Chen, X.; Li, V.T.; Yu, R.K.; Cheng, S.H. (2008) Choriogenin mRNA as a sensitive molecular biomarker for estrogenic chemicals in developing brackish medaka (*Oryzias melastigma*). **Ecotoxicology And Environmental Safety**, 71:200-208.

- Conner, S.J.; Hughes, D.C. (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, W.J.E.M. (1998) Phylogeny and classification of Rivulidae revisited: evolution of annualism and miniaturization in rivulid fishes (Cyprinodontiformes: Aplocheiloidei). **Journal of Comparative Biology**, 3: 33-92.
- Costa, W.J.E.M.; Cheffe M.M. (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, W.E.J.M. (2006) The South American annual killifish genus *Austrolebias* (Teleostei: Cyprinodontiformes: Rivulidae): phylogenetic relationships, descriptive morphology and taxonomic revision. **Zootaxa**, 1213:1–162.
- Darje, C.C.; Binióssek, M.L.; Jovine, L.; Litscher, E.S.; Wassarman, P.M. (2004) Structural characterization of fish egg vitelline envelope proteins by mass spectrometry. **Biochemistry**, 43(23):7459-7478
- Denslow, N.D.; Sepúlveda, M.S. (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, R.H.; Nagahama, Y. (2002) Sex determination and sex differentiation in fish: an overview of genetic, physiological and environmental influences. **Aquaculture**, 208: 191–364.
- Dumont, J.N.; Brummet A.R. (1980) The vitelline envelope, chorion and micropyle of *Fundulus heteroclitus* eggs. **Gamete Res.** 3:25-44.
- Fernandez, M.P.; Ikonomou, M.G.; Buchanan, I. (2007) An assessment of estrogenic organic contaminants in Canadian wastewaters. **Sci. Total Environ.** 373:250–269.
- Ferraz, N.; Carnevia, D.; Nande, G.; Rossotti, M.; Miguez, M.N.; Last, J.A.; Gonzalez-Sapienza, G. (2007). Specific immunoassays for endocrine disruptor monitoring using recombinant antigens cloned by degenerated primer PCR. **Analytical & Bioanalytical Chemistry**, 389(7/8), 2195-2202.
- Fujita, T.; Shimizu, M.; Hiramatsu, N.; Fukada, H.; Hara, A. (2002) Purification of serum precursor proteins to vitelline envelope (choriogenins) in masu salmon, *Oncorhynchus masou*. **Comp. Biochem. Physiol. B** 132, 599–610.
- Fujita, T.; Fukada, H.; Shimizu, M.; Hiramatsu, N.; Hara, A. (2004) Quantification of serum levels of precursors to vitelline envelope proteins (choriogenins) and vitellogenin in estrogen treated masu salmon, *Oncorhynchus masou*. **Gen. Comp. Endocrinol.** 136: 49–57.
- García, D.; Loureiro, M.; Tassinio, 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, M.J.; Casanova, G.; Clivio, G.; 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.
- Goksøyr, A. (2006) Endocrine disruptors in the marine environment: mechanisms of toxicity and their influence on reproductive processes in fish. **Journal of Toxicology and Environmental Health**, A69:175-184.
- Gunnarsson, L.; Kristiansson, E.; Förlin, L.; Nerman, O.; Larsson, D.G.J. (2007). Sensitive and robust gene expression changes in fish exposed to estrogen – a microarray approach. **BMC Genomics**, 8:149
- Guraya, S.S. (1986) The cell and molecular biology of fish oogenesis. **Monogr Dev. Biol.** 18:1-223
- Hamodrakas, S.J.; Hoenger, A.; Iconomidou, V.A. (2004) Amyloid fibrillogenesis of silkworm chorion protein peptide-analogues via a liquid-crystalline intermediate phase. **Journal of Structural Biology** 145: 226–235
- Hong, L.; Fujita, T.; Wada, T.; Amano, T.; Hiramatsu, N.; Zhang, X.; Todo, T.; Hara, A. (2009) Choriogenin and vitellogenin in red lip mullet (*Chelon haematocheilus*): Purification, characterization, and evaluation as potential biomarkers for detecting estrogenic activity. **Comparative Biochemistry and Physiology, Part C** 149:9–17
- Hyllner, S.J.; Oppen-Berntsen, D.O.; Helvik, J.V.; Walther, B.T.; Haux C. (1991) Oestradiol 17-β induces the major vitelline envelope proteins in both sexes in teleosts. **J Endocrinol**, 131: 229–236.
- Hyllner, S.J.; 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, S.J.; Westerlund, L.; Olsson, P.E.; Schopen, A. (2001). Cloning of rainbow trout egg envelope proteins: members of a unique group of structural proteins. **Biol. Reprod.** 64: 805-811
- Iconomidou, V.A.; Vriend, G.; Hamodrakas, S.J. (2000a) Amyloids protect the silkworm oocyte and embryo. **FEBS Letters**, 479:141-145
- Iconomidou, V.A.; Chryssikos, D.G.; Gionis, V.; Pavlidis, M.A.; Hamodrakas, S.J. (2000b) 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, V.J.R. Cardoso, D.; Servo, Rossi-Wongtschowski, G.C.L. B. (1988) Aspects of the spawning biology of the Brazilian sardine, *Sardinella brasiliensis*, (Clupeidae). **J. Fish. Biol.** 32:383-396.
- Johnson, E.Z.; Werner, R.G. (1986) Scanning electron microscopy of the chorion of selected freshwater fishes. **Journal of Fish Biology**, 29: 257-265.
- Jovine, L.; Litscher, E.; Wassarman, P.M. (2002a). Egg zona pellucida, egg vitelline envelope, and related extracellular glycoproteins. En: **Advances in developmental biology and biochemistry**. Vol. 12. Wassarman P.M.(ed). Elsevier. CA. pp 31-54.

- Jovine, L.; Qi, H.; Williams, Z.; Litscher, E.; Wassarman, P.M. (2002b). The ZP domain is a conserved module for polymerization of extracellular proteins. **Nature Cell Biol.** 4:457-461.
- Jovine, L.; Darie, C.C.; Litscher, E.S.; Wassarman, P.M. (2005) Zona pellucida domain proteins. **Annu Rev Biochem.** 74:83-114.
- Jovine, L.; Qi, H.; Williams, Z.; Litscher, E.S.; Wassarman, P.M. (2006a). Features that affect secretion and assembly of zona pellucida glycoproteins during mammalian oogenesis. **Soc Reprod Fertil Suppl.** 63:187-201
- Jovine, L.; Janssen, W.G.; Litscher, E.S.; Wassarman, P.M. (2006b) The PLAC1-homology region of the ZP domain is sufficient for protein polymerisation. **BMC Biochem.** 7:11
- Jürgens, M.D.; Holthaus, I.E.; Johnson, A.C.; Smith, J.J.L.; Hetheridge, M.; Williams, R.J. (2002) The potential for estradiol and ethinylestradiol degradation in English Rivers. **Environ. Toxicol. Chem.** 21:480-488.
- Kanamori, A.; Naruse, K.; Mitani, H.; Shima, A.; Hori, H. (2003). Genomic organization of ZP domain containing egg envelope genes in medaka (*Oryzias latipes*) **Gene.** 305(1):35-45
- Kapust, R.B.; Waugh, D.S. (1999) Escherichia coli maltose-binding protein is uncommonly effective at promoting the solubility of polypeptides to which it is fused. **Protein Sci.** 8:1668-1674.
- Kim, I.C.; Lee, Y.M.; Lee, C.; Kim, H.M.; Oda, S.; Lee, Y.S.; Mitani, H.; Lee, J.S. (2006) Expression profiles of 4-nonylphenol-exposed medaka (*Oryzias latipes*) analyzed with a 3.4 K microarray. **Marine Environmental Research** 62: S141-S146
- Kiparissis, Y.; Akhtar, P.; Hodson, P.V.; Brown, R.S.; (2003) Partitioncontrolled delivery of toxicants: a novel in vivo approach for embryo toxicity testing. **Environ. Sci. Technol.** 37: 2262-2266.
- Kolpin, D.W.; Furlong, E.T.; Meyer, M.T.; Thurman, E.M.; Zaugg, S.D.; Barber, L.B.; Buxton, H.T.; (2002) Pharmaceuticals, hormones, and other organic wastewater contaminants in US streams, 1999-2000: a national reconnaissance. **Environ. Sci. Technol.** 36:1202-1211.
- Knoebl, I.; Hemmer, M.J.; Denslow, N.D. (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.
- Larkin, M.A.; Blackshields, G.; Brown, N.P.; Chenna, R.; McGettigan, P.A.; McWilliam, H.; Valentin, F.; Wallace, I.M.; Wilm, A.; Lopez, R.; Thompson, J.D.; Gibson, T.J.; Higgins, D.G. (2007) Clustal W and Clustal X version 2.0. **Bioinformatics,** 23:2947-2948.

- Larsson, D.G.; Hyllner, S.J.; Haux, C. (1994). Induction of vitelline envelope proteins by estradiol-17 beta in 10 teleost species. **General and Comparative Endocrinology**, 96(3), 445–50.
- Larsson, D.G.J.; Mayer, I.; Hyllner, J.S.; Forlin, L. (2002) Seasonal variations of vitelline envelope proteins, vitellogenin, and sex steroids in male and female Eelpout (*Zoarces viviparous*). **Gen. Comp. Endocrinol.** 125, 184–196.
- Lekanidou, R.; Rodakis, G.C.; Eickbush, T.H.; Kafatos F.C. (1986) Evolution of the silkmoth chorion gene superfamily: gene families CA and CB. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, 83: 6514–6518
- Lee, C.; Jeon, S.H.; Na, J.; Choi, Y.; Park, K. (2002a) Sensitivities of mRNA expression of vitellogenin, choriogenin and estrogen receptor by estrogenic chemicals in medaka, *Oryzias latipes*. **J. Health Sci.** 48:441–445.
- Lee, C.; Na, J.G.; Lee, K.C.; Park, K. (2002b) Choriogenin mRNA induction in male medaka, *Oryzias latipes* as a biomarker of endocrine disruption. **Aquat. Toxicol.** 61: 233–241.
- Lee, SY; Kim, D.S.; Nam, Y.K. (2012) Gene Structure and Estrogen-Responsive mRNA Expression of a Novel Choriogenin H Isoform from a Marine Medaka *Oryzias dancena*. **Fish Aquat Sci** 15(3), 221–231
- Li, Y.H.; Wu, C.C.; Yang, J.S. (2000) Comparative ultrastructural studies of the zona radiate of marine fish eggs in three genera of Perciformes. **Journal of Fish Biology**, 56: 615–622.
- Listcher E.S.; Wassarman, P.M. (2007) Egg extracellular coat proteins: from fish to mammals. **Histol Histopathol** 22:337-347
- Livak, K.J.; Schmittgen, T.D. (2001) Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. **Methods (San Diego, Calif.)**, 25(4):402–8.
- Loureiro, M.; de Sá, R.O. (1996). External Morphology of the Chorion of the Annual Fishes *Cynolebias* (Cyprinodontiformes: Rivulidae). **Copeia** 4:1016-1022.
- Loureiro, M.; Duarte, A.; Zarucki, M. (2011) A new species of *Austrolebias* Costa (Cyprinodontiformes: Rivulidae) from northeastern Uruguay, with comments on distribution patterns. **Neotrop. ichthyol.** 9(2):335-34
- Louros, N.N.; Iconomidou, V.A.; Giannelou, P.; Hamodrakas, S.J. (2013) Structural Analysis of Peptide-Analogues of Human Zona Pellucida ZP1 Protein with Amyloidogenic Properties: Insights into Mammalian Zona Pellucida Formation, **PLOS ONE** 8 (9): e73258
- Lorier, E.; Berois, N. (1995) Reproducción y nutrición embrionaria en *Cnesterodon decemmaculatus* (Teleostei: Poeciliidae). **Revista Brasileira de Biologia**, 55: 27-44.
- Lyons, C.E.; Payette, K.L.; Prince, J.L.; Huang, R.C.C. (1993) Expression and structural analysis of a teleost homolog of a mammalian zona pellucida gene, **J. Biol. Chem.** 268:21351–21358.
- Mäenpää, K.; Kukkonen, J.V.K. (2006) Bioaccumulation and toxicity of 4-nonylphenol (4-NP) and 4-(2-dodecyl)-benzene sulfonate (LAS) in *Lumbriculus variegatus* (Oligochaeta) and *Chironomus riparius* (Insecta). **Aquatic Toxicology** 77:329–338

- Maunder, R.J.; Matthiessen, P.; Sumpter, J.P.; Pottinger, T.G. (2007) Rapid bioconcentration of steroids in the plasma of three-spined stickleback *Gasterosteus aculeatus* exposed to waterborne testosterone and 17 $\beta$ -oestradiol. **J. Fish Biol.** 70: 678–690.
- McCurley, A.T.; Callard, G.V. (2008). Characterization of housekeeping genes in zebrafish: male-female differences and effects of tissue type, developmental stage and chemical treatment. **BMC Mol. Biol.** 9: 102
- Michelsen, B.K. (1995) Transformation of *Escherichia coli* Increases 260-Fold upon Inactivation of T4 DNA Ligase. **Analytical Biochemistry**, 225:172-174.
- Mills, L.J.; Chichester, C. (2005) Review of evidence: are endocrinedisrupting chemicals in the aquatic environment impacting fish populations? **Sci. Total Environ.** 343:1–34.
- Miura, T.; Kudo, N.; Miura, C.; Yamauchi, K.; Nagahama, Y. (1998) Two testicular cDNA clones suppressed by gonadotropin stimulation exhibit ZP2- and ZP3-like structures in Japanese eel. **Molecular Reproduction and Development**, 51:235–242
- Modig, C.; Modesto, T.; Canario, A.; Cerdà, J.; von Hofsten, J.; Olsson, P.E. (2006) Molecular characterization and expression pattern of zona pellucida proteins in gilthead seabream (*Sparus aurata*). **Biol Reprod.** 75(5):717-25.
- Modig, C.; Westerlund, L.; Olsson, P. (2007). Oocyte zona pellucida proteins. En **The Fish Oocyte: From Basic Studies to Biotechnological Applications**(pp.113-139). Holanda: Springer.
- 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):2050-2055
- Myers, G.S. (1952) Annual fishes. **Aquarium Journal**, 23:125–141.
- Nelson, G. (1989) Phylogeny of major fish groups. En: Fernholm, B.; Bremer, K.; Jörnvall, H. (Eds.), **The Hierarchy of Life**. Excerpta Medica, Amsterdam, pp. 325–336.
- Nelson, J.S. (1994) **Fishes of the World**, third ed. Wiley, New York.
- Nimrod, A.C.; Benson, W.H. (1998) Reproduction and development of Japanese medaka following an early life stage exposure to xenoestrogens. **Aquat. Toxicol.** 44:141–156.
- 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.; Hyllner, S.; Haux, C.; Helvik, J.; Walther, B. (1992a) 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. (1992b) Zona radiata proteins are synthesized by rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) hepatocytes in response to oestradiol-17. **J Endocrinol** 135:293-302.

- Papa, N.G.; Clivio, G.A.; Montagne, J. (2015). Husbandry, Reproduction, and Embryo Culture of Annual Fishes under Laboratory Conditions. En **Annual Fishes: Life History Strategy, Diversity, and Evolution**. (99-110). Boca Raton: CRC Press.
- Parenti, L.R. (1981) A phylogenetic and biogeographic analysis of Cyprinodontiform fishes (Teleostei, Atherinomorpha). **Bulletin of the American Museum of Natural History**, 168(4): 335-557
- Prakash, O.; Goswami, S.; Sehgal, N. (2007). Establishment of ELISA for murrel vitellogenin and choriogenin, as biomarkers of potential endocrine disruption. **Comparative Biochemistry And Physiology**, Part C, 146:540-551.
- Pravia, M.; García, C.; Ares, L.; Berois, N. (1995) Estimación de la fecundidad y determinación del tipo de desova de la corvina blanca, *Micropogonias furnieri* (Teleostei: Sciaenidae). **Revista Brasileira de Biología (Brazil)** 55: 13-25.
- Probides. Uruguay (1999). **Reserva de biosfera Bañados del Este**. Rocha: Probides
- Rasband, W.S. (1997-2009) ImageJ, U.S. National Institute of Health, Bethesda, Maryland, USA, <http://rsb.info.nih.gov/ij/>
- Rhee, J.S.; Kang, H.S.; Raisuddin, S.; Hwang, D.S.; Han, J.; Kim, R.O.; Seo, J.S.; Lee, Y.M.; Park, G.S.; Lee, S.J.; Lee, J.S. (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.
- Rodao, M.; Montagne, J.; Clivio, G.A.; Papa, N.G.; Casanova, G. (2015). Sperm and Egg Envelope Ultrastructure and Some considerations on Its Evolutionary Meaning. En **Annual Fishes: Life History Strategy, Diversity, and Evolution**. (47-62). Boca Raton: CRC Press.
- Sambrook, J.; Fritsch, E.F.; 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* (Teleostea, Serranidae). **Mol Reprod Dev**, 38:48-53.
- Selman, K.; Wallace, R. (1983a) Oocyte growth in the sheepshead minnow: Uptake of exogenous proteins by vitellogenic oocytes. **Tissue and Cell** 14(3):555-571
- Selman, K.; Wallace, R.A. (1983b) Oogenesis in *Fundulus heteroclitus* III. Vitellogenesis. **J Exp Zool**. 226(3):441-57.
- Setiamarga, D.H.E.; Miya, M.; Yamanoue, Y.; Mabuchi, K.; Satoh, T.P.; Inoue, J.G.; Nishida, M. (2008) Interrelationships of Atherinomorpha (medakas, flyingfishes, killifishes, silversides, and their relatives): The first evidence based on whole mitogenome sequences. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, 49(2): 598–605
- 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 up on fertilization. **J. Biol. Chem**. 275:8349–8354.

- Shibata, Y.; Iwamatsu, T.; Suzuki, N.; Young, G.; Naruse, K.; Nagahama, Y.; Yoshikuni, M. (2012) An oocyte-specific astacin family protease, alveolin, is released from cortical granules to trigger egg envelope hardening during fertilization in medaka (*Oryzias latipes*). **Developmental Biology** 372:239–248
- Smith, J.; Paton, I.R.; Hughes, D.C.; Burt, D.W. (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.
- Snyder, S.A.; Keith, T.L.; Naylor, C.G.; Staples, C.A.; Giesy, J. P. (2001). Identification and quantitation method for nonylphenol and lower oligomer nonylphenol ethoxylates in fish tissues. **Environmental Toxicology and Chemistry**, 20(9):1870–1873.
- Sørensen, H.P.; Montensen, K.K. (2005) Soluble expression of recombinant proteins in the cytoplasm of *Escherichia coli*. **Microbial Cell Factories**, 4:1 doi:10.1186/1475-2859-4-1
- Spargo, S.C.; Hope, R.M. (2003). Evolution and nomenclature of the zona pellucida gene family. **Biol Reprod**, 68:358-362.
- Studier, F.W. (2005) Protein Production by Auto-Induction in High-Density Shaking Cultures. Recipes and stock solutions described in **Protein Expression and Purification** 41:207-234
- Sugiyama, H.; Murata, K.; Iuchi, I.; Nomura, K.; Yamagami, K. (1999) Formation of Mature Egg Envelope Subunit Proteins from Their Precursors (Choriogenins) in the Fish, *Oryzias latipes*: Loss of Partial C-Terminal Sequences of the Choriogenins. **J. Biochem.** 125:469-475
- Tamura, K.; Stecher, G.; Peterson, D.; Filipowski, A.; Kumar, S. (2013) MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 6.0. **Molecular Biology and Evolution**, 30: 2725-2729.
- Tang, R.; Dodd, A.; Lai, D.; McNabb, W.C.; Love, D.R. (2007). Validation of zebrafish (*Danio rerio*) reference genes for quantitative real-time RT-PCR normalization. **Acta Biochimica Et Biophysica Sinica**, 39(5): 384-390.
- Tesoriero, J.V. (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, J.V. (1978) Formation of the chorion (zona pellucida) in the teleost, *Oryzias latipes*. III. Autoradiography of [3H]proline incorporation. **J Ultrastruct Res.** 64(3):315-326.
- Vaz-Ferreira, R.; Sierra, B.; Scaglia S. (1964) Eco-etología de la reproducción en los peces del género *Cynolebias* Steindachner, 1876. **Apartados de los Archivos de la Sociedad de Biología de Montevideo**, 26:44-49.
- Vaz-Ferreira, R.; Sierra, B. (1972) Caracteres etológicos genéricos y específicos en los peces del género *Cynolebias* Steindachner. **Boletín de la Sociedad Zoológica del Uruguay**, 2: 22-35.
- Viana, F.; Acuña A.; Berois, N.; Danulat, E. (2000) Testes morphology and reproductive aspects of male Brazilian codling (*Urophycis brasiliensis* Kaup 1858). **J. Appl. Ichthyol.** 16:134-135.
- Vizziano, D.; Berois, N. (1990a). Ciclo histológico del ovario de *Macrodon ancylodon* (Bloch & Schneider, 1801) (Teleostei: Sciaenidae). **Biología Pesquera**, 19:39-47.

- Vizziano, D.; Berois, N. (1990b). Histología del ovario de *Macrodonancylodon* (Bloch y Schneider, 1801) Teleostei: Sciaenidae. Ovogénesis. Folículos post-ovulatorios. Atresia. **Revista Brasileira de Biología**, 50:523–536.
- Wallace, R.A.; 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.
- Westerlund, L.; Hyllner, S.J.; Schopen, A.; Olsson, P.E. (2001) Expression of three vitelline envelope protein genes in arctic char. **Gen. Comp. Endocrinol.** 122:78-87.
- Wourms, J.P. (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.
- Yanagimachi, R.; Cherr, G.; Matsubara, T.; Andoh, T.; Harumi, T.; Vines, C.; Pillai, M.; Griffin, F.; Matsubara, H.; Weatherby, T.; Kaneshiro, K. (2013) Sperm attractant in the micropyle region of fish and insect eggs. **Biol Reprod.** 28;88(2):47.
- Yu, R.; Wong, M.; Kong, R.; Wu, 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.
- Zhang, Y.; Werling, U.; Edelmann, W. (2012) SLiCE: a novel bacterial cell extract-based DNA cloning method. **Nucleic Acids Res.** 40(8):e55.

## **APÉNDICES**

### **Apéndice I: Soluciones utilizadas y medios de cultivo**

#### Solución de Yamamoto (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 enrazar 1L

Nota: Se guarda en heladera y una alícuota se mantiene en la estufa de 25° donde están creciendo los embriones. Se opta por no agregar penicilina: 0.06 g/lt (100 U/mL)

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

Receta Tris puro 242 g

Ácido acético glacial puro 57,1 mL

E.D.T.A. 0.5M, Ph 8 100 mL

Hidróxido sódico puro hasta llegar a pH 8

Agua MiliQ hasta enrazar a 1L

Notas: Solución concentrada para preparar tampón en el que correr las electroforesis de ácidos nucleicos. Solución 1X; 40 mM Tris–Acetato ph 8.0; 1mM de EDTA

#### Solución E.D.T.A. 0.5M, pH 8

Receta E.D.T.A puro 18,61 g

Agua MiliQ hasta enrazar a 100 mL

Hidróxido sódico 4M hasta llegar a pH 8.0

Nota: Es recomendable añadir poca agua (25 mL.) llevar a pH 8 para que se disuelva la sal de EDTA para luego completar el volumen, ajustar el pH nuevamente y enrazar.

### Solución de Cloruro de Litio 4M

Preparación de 5 mL para separa en alícuotas de 0,5mL

LiCl puro                      848 mg

Agua libre de nucleasas hasta enrazar a 5 mL

Nota: Autoclavar

### 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 Agar (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 mezclo 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 plásmido por lisis alcalina

#### Solucion 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

Medios de cultivo líquidos de alto rendimiento para bacterias

Medio de cultivo ZYM- 505 (Studier, 2005)

Composición final

N-Z-amina AS	1 %
Extracto de levadura	0.5%
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	25 mM
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	25 mM
NH <sub>4</sub> Cl	50 mM
Na <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	5 mM
MgSO <sub>4</sub>	2 mM
Metales (opcional)	0.2x
Glicerol = 54 mM	0.5%
Glucosa = 2.8 mM	0.05%

Autoclavar

Almacenamiento      4°C

Medio de cultivo Austoinductor ZYM-5052 (Studier, 2005)

Composición final

N-Z-amina AS	1 %
Extracto de levadura	0.5%
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	25 mM
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	25 mM
NH <sub>4</sub> Cl	50 mM
Na <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	5 mM
MgSO <sub>4</sub>	2 mM
Metales (opcional)	0.2x
Glicerol = 54 mM	0.5%
Glucosa = 2.8 mM	0.05%
$\alpha$ -lactosa = 5.6 mM	0.2%

Autoclavar

Almacenamiento 4°C

**Nombre:** Nicolas Papa – Mario Señorale

**Fecha:** 23/06/2014

### Objetivo del análisis:

- Identificación de proteínas por mapeo peptídico.
- Confirmación de secuencia:

#### **Secuencia aminoacídica teórica zpLGEX5:**

MSPILGYWKIKGLVQPTRLLEYLEEKYEEHLYERDEGDKWRNKKFELGLEFPNLPYYIDGDVKLTQSMAI  
IRYIADKHNMLGGCPKERAEISMLEGA VLDIRYGVSR IAYSKDFETLKVDFLSKLPEMLKMFEDRLCHKTY  
LNGDHVTHPDFMLYDALDVVLYMDPMCLDAFPKLVCFKKRIEAI PQIDKYLKSSKYIAWPLQGWQATFGG  
GDHPPKEFGLTWKYPEAPQPEVKPSVPFELRYPVAAATVA VQCCQESYAHVEVKMDMFMGTGQIINPGDLTL  
GDCAPVSEDPAAQVHHHHHHEF

**Imagen del gel:**



### En suma general del análisis:

Utilizando datos de ms y ms/ms, se identificaron las siguientes proteínas:

Rotulo de la muestra	Masa mol. en el gel (kDa.)	Proteína identificada por EM	Masa mol. teórica (kDa.)	Link al resultado (Nro. pág.)
zpLGEX5	36,48	zpLGEX5	34.9	2

### Tutorial de Mascot:

<http://view6.workcast.net/?pak=3003276531895477&cpak=7053452047055213>



1516.7997 ions(173.1268, 175.1375, 201.1252, 219.1022, 228.1543, 229.1443, 243.1804, 258.1252, 271.1995, 272.2131, 288.2187, 298.1992, 300.2080, 314.1994, 328.2026, 332.1907, 383.2307, 385.2453, 386.2132, 401.2291, 403.2399, 456.2811, 457.3122, 470.2576, 474.2471, 499.2830, 502.2491, 504.2359, 514.2704, 516.3066, 518.2167, 532.2617, 571.3255, 585.3353, 589.2737, 598.3772, 615.3923, 617.3207, 645.3588, 661.2717, 686.4102, 698.4365, 701.4088, 702.3871, 726.4412, 742.4012, 743.4463, 759.3494, 773.4530, 774.3608, 789.3504, 797.5123, 800.5082, 831.3770, 855.4313, 872.4816, 884.4410, 902.4157, 968.5490, 985.5502, 1001.4745, 1114.5079, 1116.6139, 1203.5992, 1316.6801, 1370.8253)  
1532.7825, 1538.7811, 1554.7555, 1565.7251, 1566.7949, 1582.7280, 1588.7921, 1604.7544, 1647.7004, 1684.8445, 1760.8594, 1801.9427, 1811.9656, 1822.9467, 1861.9069, 1940.9110, 1976.0366, 2066.1702, 2083.0815, 2099.0740, 2105.0654, 2125.0957, 2166.9805, 2167.4436, 2229.0928, 2239.1174, 2251.0901, 2269.1392, 2309.2344, 2324.1362, 2326.1284, 2342.1355, 2348.1343, 2356.0544, 2357.1768, 2363.1584, 2380.1736, 2434.1924, 2456.1860, 3287.4480  
4331.8804 ions(394.1185, 549.1522, 604.2446, 706.4202, 741.2401, 741.4468, 792.4996, 843.4069, 878.4832, 980.2571, 980.5852, 990.3283, 1015.4398, 1015.6959, 1046.6863, 1117.3851, 1117.6454, 1119.7813, 1152.1772, 1152.4114, 1152.8494, 1216.5823, 1216.7722, 1251.4342, 1289.7334, 1290.1716, 1290.7557, 1329.6353, 1344.2876, 1345.9063, 1346.7687, 1415.4044, 1415.8167, 1416.5360, 1419.7994, 1436.8152, 1486.9246, 1498.9501, 1565.7262, 1575.1049, 1582.4550, 1582.7428, 1583.6736, 1583.9806, 1584.8341, 1596.2594, 1682.6414, 1683.8638, 1698.8420, 1701.1587, 1916.0190, 2111.2024, 2111.7996, 2112.9043, 2113.4397, 2340.4724, 2356.2776, 2360.7390, 2361.5471, 2471.8909, 2472.4541, 2529.1995, 2530.5164, 2642.3904, 2742.4543, 2853.5757, 2855.5374, 2858.2219, 2953.5190, 3124.6587, 3128.4351, 3238.8267, 3352.7932, 3491.8655, 3627.9734, 3630.3389, 3765.1357, 3903.9189, 4086.0701, 4091.0339, 4289.2832)

**Búsqueda realizada en nuestra base de datos local donde se encuentra depositada la secuencia enviada por el usuario:**

### Search Parameters

Type of search : Sequence Query  
Enzyme : Trypsin/P  
Variable modifications : Oxidation (M), Propionamide (C)  
Mass values : Monoisotopic  
Protein Mass : Unrestricted  
Peptide Mass Tolerance :  $\pm$  0.1 Da  
Fragment Mass Tolerance:  $\pm$  0.4 Da  
Max Missed Cleavages : 1  
Instrument type : MALDI-TOF-TOF  
Number of queries : 78



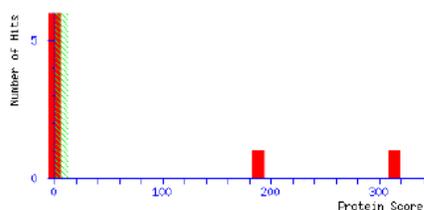
## Resultado del análisis utilizando el motor de búsqueda Mascot

([www.matrixscience.com](http://www.matrixscience.com))

Database : Uniproteina 2013-01-24 (266 sequences; 103015 residues)  
 Timestamp : 23 Jun 2014 at 16:47:31 GMT  
 Protein hits : [Mario Senorale zPLGEX5](#)  
[FC16STCtenv Federrico](#) (100%)

### Mascot Score Histogram

Ions score is  $-10^4 \text{Log}(P)$ , where P is the probability that the observed match is a random event. Individual ions scores  $\geq 12$  indicate identity or extensive homology ( $p < 0.05$ ). Protein scores are derived from ions scores as a non-probabilistic basis for ranking protein hits.



### Peptide Summary Report

Format As: Peptide Summary [Help](#)

Significance threshold p < 0.05 Max. number of hits AUTO

Standard scoring  MudPIT scoring  Ions score or expect cut-off 0 Show sub-sets 0

Show pop-ups  Suppress pop-ups  Sort unassigned Decreasing Score Require bold red

Select All Select None Search Selected Error tolerant Archive Report

1. [Mario Senorale zPLGEX5](#) Mass: 34894 Score: 314 Matches: 5(5) Sequences: 5(5)  
 Check to include this hit in error tolerant search or archive report

Query	Observed	Mr(expt)	Mr(calc)	Delta	Miss	Score	Expect	Rank	Unique	Peptide
<input checked="" type="checkbox"/> <a href="#">9</a>	944.5100	943.5027	943.5127	-0.0100	0	58	1.6e-006	1	U	K.PSVPEELR.Y
<input checked="" type="checkbox"/> <a href="#">10</a>	1094.5500	1093.5427	1093.5630	-0.0203	0	68	2.1e-007	1	U	-MSEILQWK.I
<input checked="" type="checkbox"/> <a href="#">21</a>	1138.3065	1137.4992	1137.3090	-0.0098	0	53	3.1e-006	1		K.YEEMLYER.D
<input checked="" type="checkbox"/> <a href="#">37</a>	1516.7997	1515.7924	1515.7966	-0.0042	0	116	2.6e-012	1		R.AEISMLEGAVLDIR.Y
<input checked="" type="checkbox"/> <a href="#">70</a>	4331.0604	4330.6731	4330.9372	-0.0640	0	71	7.7e-008	1	U	K.NDMFGTQIINPGLTLGDQAPVSEDPAQVHGGGDEF.- + Propionami



**Protein View**

Match to: Mario\_Senora1e\_zpL6EX3 Score: 538 Expect: 4.2e-032

Nominal mass (M<sub>n</sub>): 34994; Calculated pI value: 5.63  
 NCBI BLAST search of Mario\_Senora1e\_zpL6EX3 against nr  
 Unformatted [sequence string](#) for pasting into other applications

Variable modifications: Oxidation (M), Propionamide (C)  
 Cleavage by Trypsin/P: cuts C-term side of KR  
 Sequence Coverage: 67%

Matched peptides shown in **Bold Red**

```

1  MSPILGZWKI KGLVQPTRELL LEYLEEKYEE HLYERDEGDK WRNKKEFELGL
51  EPFNLPPYID GDVKLTQSMALIR YILDKRN MLGGCCPKERA EISMLEGAVL
101 DIRYGVSRIA YSRDFETLKV DFLSKLPEML RKFEDLRLCK TYLNGDHVTH
151 PDFMLYDALD VVLYKMPMCL DAFPKLVCFK KRIEALPQID KYLKSSKYLIA
201 WPLQGWQATF GGGDHPPEF GLTWKYPEAP QPEVKEVPE ELRYVAAAT
251 VAVQCQESYA HVEVKDMEG TGQINPGDL TLGDCAPVSE DRAAQVRRGH
301 IQEEF
    
```

Show predicted peptides also

Sort Peptides By  Residue Number  Increasing Mass  Decreasing Mass

Start - End	Observed	Mr(expt)	Mr(calc)	Delta	Miss	Sequence
1 - 9	1094.5500	1093.5427	1093.5630	-0.0203	0	<b>MSPILGZWK</b> .I (Ions score 66)
1 - 9	1110.5454	1109.5381	1109.5579	-0.0198	0	<b>MSPILGZWK</b> .I Oxidation (M) (No match)
2 - 9	963.5105	962.5032	962.5225	-0.0193	0	<b>MSPILGZWK</b> .I (No match)
19 - 27	1149.6233	1148.6160	1148.6328	-0.0168	0	<b>RLLLEYLEEK</b> .Y (No match)
19 - 35	2269.1392	2268.1319	2268.1313	0.0006	1	<b>RLLLEYLEEKYEEHLYER</b> .D (No match)
28 - 35	1138.5065	1137.4992	1137.5090	-0.0098	0	<b>KYEEHLYER</b> .D (Ions score 53)
36 - 42	905.4050	904.3977	904.4039	-0.0062	1	<b>RDEGDKWR</b> .M (No match)
43 - 64	2357.1768	2356.1695	2356.1991	-0.0296	1	<b>KKFEELGEPFNLPPYIDGDK</b> .L (No match)
46 - 64	2229.0928	2228.0855	2228.1041	-0.0186	0	<b>KFEELGEPFNLPPYIDGDK</b> .L (No match)
65 - 73	1032.5708	1031.5635	1031.5797	-0.0162	0	<b>KLTQSMALIR</b> .Y (No match)
65 - 73	1048.5632	1047.5559	1047.5746	-0.0187	0	<b>KLTQSMALIR</b> .Y Oxidation (M) (No match)
79 - 87	936.5072	935.4999	935.4368	0.0631	0	<b>KHMLGGCPK</b> .E (No match)
79 - 87	1027.5115	1026.5042	1026.4739	0.0303	0	<b>KHMLGGCPK</b> .E Propionamide (C) (No match)
88 - 103	1801.9427	1800.9354	1800.9403	-0.0049	1	<b>KRAEISMLEGAVDIR</b> .Y (No match)
90 - 103	1516.7997	1515.7924	1515.7966	-0.0042	0	<b>RAEISMLEGAVDIR</b> .Y (Ions score 116)
90 - 103	1532.7823	1531.7752	1531.7916	-0.0163	0	<b>RAEISMLEGAVDIR</b> .Y Oxidation (M) (No match)
182 - 191	1182.6686	1181.6613	1181.6768	-0.0155	1	<b>KRIEALPQID</b> .Y (No match)
183 - 191	1026.5610	1025.5537	1025.5757	-0.0220	0	<b>RTEATPQID</b> .Y (No match)
198 - 218	2326.1284	2325.1211	2325.1331	-0.0120	0	<b>KYLAWPLQGWQATFGGGDHPK</b> .E (No match)
219 - 225	880.4449	879.4376	879.4491	-0.0114	0	<b>KFGLTWK</b> .Y (No match)
226 - 235	1157.5656	1156.5583	1156.5764	-0.0181	0	<b>KYPEAPQPEVK</b> .E (No match)
226 - 243	2083.0615	2082.0742	2082.0766	-0.0043	1	<b>KYPEAPQPEVKPSVPELR</b> .Y (No match)
236 - 243	944.5100	943.5027	943.5127	-0.0100	0	<b>KPSVPELR</b> .Y (Ions score 58)
244 - 265	2363.1584	2362.1511	2362.1627	-0.0116	0	<b>RYPVAAATVAVQCQESYAHVEVK</b> .M (No match)
244 - 265	2434.1924	2433.1851	2433.1998	-0.0147	0	<b>RYPVAAATVAVQCQESYAHVEVK</b> .M Propionamide (C) (No match)
266 - 304	4331.0604	4330.0731	4330.0732	-0.0640	0	<b>KMDMEGTGQIINEGDLTLGDCAPVSEDRAAQVRRHQQEEF</b> .- Propionamide (C) (Ions sco

Los siguientes links solo funcionan en la Pc del servicio:

Link "peptide summary report":

[http://ubypa8/mascot/cgi/master\\_results.pl?file=./data/20140623/F007746.dat](http://ubypa8/mascot/cgi/master_results.pl?file=./data/20140623/F007746.dat)

Link "protein summary report":

[http://ubypa8/mascot/cgi/master\\_results.pl?file=./%2Fdata%2F20140623%2FF007746.dat&REP TYPE=protein&sigthresh=0.05&REPORT=AUTO&\\_server\\_mudpit\\_switch=0.00000001 &\\_ignoreionsscorebelow=0&\\_showsubsets=0&\\_showpopups=TRUE&\\_sortunassigned=scoredo wn&\\_requireboldred=0](http://ubypa8/mascot/cgi/master_results.pl?file=./%2Fdata%2F20140623%2FF007746.dat&REP TYPE=protein&sigthresh=0.05&REPORT=AUTO&_server_mudpit_switch=0.00000001 &_ignoreionsscorebelow=0&_showsubsets=0&_showpopups=TRUE&_sortunassigned=scoredo wn&_requireboldred=0)



**Link “protein view”:**

[http://ubypa8/mascot/cgi/protein\\_view.pl?file=../data/20140623/F007746.dat&hit=1](http://ubypa8/mascot/cgi/protein_view.pl?file=../data/20140623/F007746.dat&hit=1)

**Búsqueda realizada en base de datos pública:**

**Link “peptide summary report”:**

[http://www.matrixscience.com/cgi/master\\_results.pl?file=../data/20140623/FFFnriiaT.T.dat:report=20](http://www.matrixscience.com/cgi/master_results.pl?file=../data/20140623/FFFnriiaT.T.dat:report=20)

**Link “protein summary report”:**

[http://www.matrixscience.com/cgi/master\\_results.pl?file=../data/20140623/FFFnriiaT.T.dat&REPTYPE=protein&sigthreshold=0.05&REPORT=20&minpeplen=7&server\\_mudpit\\_switch=99999999&ignoreionsscorebelow=0&showsubsets=0&showpopups=TRUE&sortunassigned=scoredown&requireboldred=0&prefertaxonomy=0&sessionID=guest\\_guestsession](http://www.matrixscience.com/cgi/master_results.pl?file=../data/20140623/FFFnriiaT.T.dat&REPTYPE=protein&sigthreshold=0.05&REPORT=20&minpeplen=7&server_mudpit_switch=99999999&ignoreionsscorebelow=0&showsubsets=0&showpopups=TRUE&sortunassigned=scoredown&requireboldred=0&prefertaxonomy=0&sessionID=guest_guestsession)

**Conclusión:**

- Con la búsqueda realizada en base de datos local, en esta muestra se identifica de manera estadísticamente significativa la secuencia de la proteína enviada por el usuario:
  - “zpLGEX5”
- Con la búsqueda realizada en base de datos pública, en esta muestra se identifica de manera estadísticamente significativa la siguiente proteína:
  - “glutathione S-transferase” *organismo*.