

**UNIVERSIDAD DE CIENCIAS
Y ARTES DE CHIAPAS
CENTRO DE INVESTIGACIONES COSTERAS**

T E S I S

**Expresión del gen tripsinógeno durante la
ontogenia inicial de *Cichlasoma
trimaculatum* (*Amphilophus trimaculatus*)**

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
LICENCIADO EN BIOLOGÍA MARINA Y
MANEJO INTEGRAL DE CUENCAS**

**PRESENTA
ANDREA GUADALUPE HILERIO RUIZ**

**DIRECTOR:
M en C. FRANCISCO JAVIER TOLEDO SOLÍS
LABORATORIO DE NUTRICION Y SANIDAD ACUICOLA.
UNICACH**

ASESORES
JR. CARLOS ALFONSO ÁLVAREZ GONZÁLEZ **DR. MIGUEL SÁENZ DE RODRIGÁÑEZ**
LABORATORIO DE ACUACULTURA TROPICAL LABORATORIO DE NUTRICION Y SANIDAD ACUICOLA
UJAT UNICACH





Tuxtla, Chiapas.
25 de mayo de 2017.

C. Andrea Guadalupe Hilerio Ruiz

Pasante del Programa Educativo de: Lic. en Biología Marina y Manejo Integral de Cuencas

Realizado el análisis y revisión correspondiente a su trabajo recepcional denominado:

"Expresión del gen tripsinógeno durante la ontogenia inicial de *Cichlasoma trimaculatum*"

En la modalidad de TESIS

Nos permitimos hacer de su conocimiento que esta Comisión Revisora considera que dicho documento reúne los requisitos y méritos necesarios para que proceda a la impresión correspondiente, y de esta manera se encuentre en condiciones de proceder con el trámite que le permita sustentar su Examen Profesional.

ATENTAMENTE

Revisores:

Dr. Miguel Ángel Sáenz de Rodríguez

M. en C. Francisco Javier Toledo Solís

M. en C. Arkady Uscajja Martínez

Suplente:

M. en C. Jesús Manuel López Vila

Firmas:

Ccp. Expediente

Dedicatoria

A Dios:

Por darme la oportunidad de vivir y de concluir mis estudios.

A Papá y mamá:

Sr. Daniel Hilerio Paredes

Sra. Olga Lilia Ruiz Sosa

Por ser quienes hicieron todo en la vida para que yo pudiera lograr mis sueños, por motivarme y darme aliento cuando sentía que las fuerzas me abandonaban, a ustedes por siempre mi corazón y mi agradecimiento infinito.

A mama Olgui:

Por compartir tu sabiduría conmigo y ser una pieza fundamental en mi vida para lograr mis objetivos.

A mis hermanos:

Paty, Ale, Dany y Kris.

Por su paciencia y comprensión en mis malos ratos y por radiar la energía que necesito para seguir adelante.

Agradecimientos

A mi director de tesis el M en C. Francisco Javier Toledo Solís por compartir cada uno de sus conocimientos conmigo, ser guía y amigo en este largo camino. Y enseñarme que el éxito solo se logra a través de esfuerzo y trabajo, infinitamente gracias.

A mi asesor externo el Dr. Carlos Alfonso Álvarez González por todo su apoyo para financiar este trabajo de investigación, por sus consejos y asesorías, gracias.

A mis asesor interno, el Dr. Miguel Sáenz de Rodrigáñez, por su valiosa asesoría y por ser compañero de aventuras, gracias.

Al M en C. Luís Daniel Jiménez Martínez por su valiosa colaboración y ser un compañero más en la travesía, mil gracias.

Al centro de Investigaciones coseras de la Universidad de Ciencias y Artes de Chiapas por ser la institución que me brindo mi formación profesional.

A la Universidad Juárez Autónoma de Tabasco por todas las facilidades brindadas en la realización del presente trabajo, principalmente al Laboratorio de Acuicultura de la DACBiol, donde tuve la oportunidad de reforzar mis bases en el campo de la investigación.

Agradecimiento a la Secretaria de Educación Superior por el apoyo económico dentro del Programa para el Desarrollo Profesional Docente (PRODEP) en su versión Apoyo a la Incorporación de Nuevos Profesores de Tiempo Completo.

A mis amigos, compañeros de laboratorio y cada uno de los ángeles que de alguna forma hicieron más fácil el camino y contribuyeron a que el proyecto se hiciera realidad.

Índice.	
Portada.....	I
Dedicatoria.....	II
Agradecimientos.....	III
Índice de figuras.....	IV
Índice de tablas.....	V
Glosario.....	VI
Resumen.....	VII
1. Introducción.....	1
2. Antecedentes.....	3
2.1.- Estudios de <i>Cichlasoma trimaculatum</i>	3
2.2.- Fisiología digestiva en peces.....	5
2.3.- Estudios moleculares en genes precursores de enzimas digestivas.....	7
3. Objetivos.....	11
4.- Materiales y métodos.....	12
4.1.- Identificación de genes en juveniles de <i>C. trimaculatum</i>	12
4.1.1- Obtención de juveniles	12
4.1.2.- Diseño de oligonucleótidos	12
4.1.3.- Extracción de órganos	13
4.1.4.- Extracción de ARN total	13
4.1.5.- Síntesis de ADNc	14
4.1.6.- RT-PCR de ADNc	15
4.1.7- Electroforesis de agarosa (visualización de bandas)	16
4.1.8- Purificación del transcrito parcial de tripsinógeno	16
4.1.9 Secuenciación del ADNc purificado	17
4.1.10- Análisis de secuencia e identificación del gen	17
4.2- Expresión de genes durante la ontogenia inicial de <i>C. trimaculatum</i>	18

4.2.1- Obtención de larvas	18
4.2.2- Alimentación de larvas	18
4.2.3- Colecta de muestras	18
4.2.4- Diseño de oligonucleótidos para qRT-PCR	19
4.2.5- Extracción de ARN total y Síntesis de ADNc	19
4.2.6- Cuantificación de la expresión del tripsinógeno por qRT-PCR (Tiempo real)	20
4.2.7- Curva de estandarización de oligonucleótidos	21
4.3-Análisis estadísticos.	21
5.- Resultados	23
5.1 Identificación de la secuencia parcial del gen tripsinógeno	23
5.2 Análisis de la secuencia obtenida	24
5.3 Ubicación de los exones que conforman la secuencia obtenida	25
5.4 Análisis de similitud	26
5.5 Longitud y peso de los organismos cultivados.	27
5.6 Cuantificación relativa para la expresión del gen tripsinógeno.	28
6.- Discusión	29
7.- Conclusiones	33
8.- Referencias	34
9.- Anexo	43
Anexo 1.- Protocolo de extracción de ARN.....	43
Anexo 2.- Protocolo de Síntesis de cDNA.....	45
Anexo 3.- Protocolo de RT-PCR de ADNc.....	47
Anexo 4.- Electroforesis para visualizar fragmentos de ADN.....	49
Anexo 5.- protocolo de extracción y purificación de ADN en gel de agarosa.....	50
ANEXO 6.- Curva estándar de amplificaciones a partir de diluciones seriadas de cDNA de larvas de <i>C. trimaculatum</i> con concentración conocida. n=4.....	51
ANEXO 7.- Melting curve de q-PCR: oligonucleótidos de tripsinógeno durante la ontogenia inicial de <i>C. trimaculatum</i>	52

INDICE DE FIGURAS

Figura 1.- Ejemplar de *C. trimaculatum* donde se observan las características morfológicas representativas de la especie.

Figura 2.- Electroforesis de agarosa al 1.5% del fragmento del gen tripsinógeno en juveniles de *C. trimaculatum* en los tejidos de E= estómago, I = intestino, P = páncreas; C- = Control negativo y M = Marcador molecular.

Figura 3.- Secuencia parcial de nucleótidos y aminoácidos del gen tripsinógeno en juveniles de *C. trimaculatum*.

Figura 4.- Ubicación de los exones de la secuencia parcial del gen tripsinógeno en juveniles de *C. trimaculatum* con respecto a la secuencia ENSONIT00000020695.1 (try-201).

Figura 5.- Peso húmedo promedio de larvas de *C. trimaculatum* cultivadas en condiciones experimentales (media \pm E.E.) n=5.

Figura 6.- Longitud total promedio de larvas de *C. trimaculatum* cultivadas en condiciones experimentales (media \pm E.E.) n=5.

Figura 7.- Medias \pm E.E. de la expresión relativa del gen tripsinógeno durante la ontogenia inicial de *C. trimaculatum*. Letras diferentes en minúsculas indican diferencias estadísticas significativas ($p < 0.05$) n=3. Letras en mayúsculas indican pautas de alimentación SV = Saco vitelino, NA= Nauplios de *Artemia* sp. CO= Coalimentación de Nauplios de *Artemia* sp. y alimento balanceado y AB= Alimento balanceado.

INDICES DE TABLAS

Tabla 1.- Diseño de oligonucleótidos para la identificación parcial del tripsinógeno en juveniles de *C. trimaculatum*.

Tabla 2.- Cuantificación del ARN total en diferentes tejidos de juveniles de *C. trimaculatum*.

Tabla 3.- Volúmenes utilizados para síntesis de ADNc en diferentes tejidos de juveniles de *C. trimaculatum*.

Tabla 4.- Programación del termociclador para la síntesis de ADNc.

Tabla 5.- Preparación del master mix para las condiciones de tripsinógeno.

Tabla 6.- Condiciones de ADNc para cada muestra.

Tabla 7.- Programación de la RT-PCR para la amplificación del gen tripsinógeno.

Tabla 8.- Condiciones de envío para secuenciación del fragmento del tripsinógeno de juveniles de *C. trimaculatum*.

Tabla 9.- Días de muestreo de larvas durante la ontogenia inicial *C. trimaculatum*.

Tabla 10.- Secuencia de oligonucleótidos para la cuantificación de la expresión del tripsinógeno.

Tabla 11.- Reacción para qRT-PCR de la ontogenia inicial de *C. trimaculatum*.

Tabla 12.- Condiciones estandarizadas en el termociclador para la cuantificación de la expresión del gen tripsinógeno.

Tabla 13.- Reacción para la validación de oligonucleótidos de q-PCR.

Tabla 14.- Datos obtenidos del análisis de similitud realizado en Blast del GenBank de la secuencia parcial del tripsinógeno en juveniles de *C. trimaculatum*.

Glosario

ADN: Acrónimo de ácido desoxirribonucleico. Es un tipo de ácido nucleico, cuya estructura tiene dos hélices formadas por nucleótidos. Molécula que contiene la información genética en los seres vivos.

ADNc: Molécula de ADN obtenida por transcripción inversa utilizando como molde una cadena de ARN.

ADN polimerasa: La ADN polimerasa es la principal enzima de la replicación. Partiendo de una cadena inicial o “primer” la ADN polimerasa añade nucleótidos complementarios a la cadena molde extendiendo la nueva cadena de ADN en dirección 5'- 3'.

Agua ultrapura: Es agua desmineraliza mediante una filtración con membranas o mediante un sistema de intercambio iónico. En su estructura contiene H₂O además de iones H⁺ y OH⁻ en equilibrio.

ARNm: Molécula de ARN que lleva la información necesaria para la síntesis de una proteína. Se origina por el proceso de transcripción, en el cual al enzima ARN polimerasa sintetiza ARN usando al ADN como molde.

°C: Grados centígrados.

Cebadores: Segmentos cortos de ADN que se aparean a una cadena simple de ácido nucleico y sirven de punto de partida para la síntesis de una cadena complementaria, en presencia de nucleótidos y la enzima ADN polimerasa.

CÓDIGO GENÉTICO: Conjunto de reglas por el cual cada codón (tripleto de nucleótidos) en el ARN codifica para un determinado aminoácido en las proteínas.

CODÓN: Secuencia de tres nucleótidos en una molécula de ARNm (ARN mensajero) que se aparea (forma enlaces puentes de hidrógeno) con el anticodón complementario del ARNt (ARN de transferencia). Cada codón codifica para un aminoácido, salvo tres codones para los cuales no hay aminoácidos posibles y que por lo tanto señalan la terminación de la síntesis proteica (traducción).

dde: Días después de eclosion.

dNTP: Acrónimo de desoxirribonucleótidos trifosfatos. Sustratos para la síntesis de ADN.

Electroforesis: Es la técnica por la cual las moléculas de proteínas, ADN o ARN se separan en un gel a través de un campo eléctrico de acuerdo al tamaño y a su carga eléctrica.

Expresión génica: Proceso por el cual la información codificada en un gen se transcribe a un ARN ribosomal, de transferencia o mensajero. La información contenida en los ARN mensajeros luego se traduce a proteínas.

Expresión relativa: Comparación entre diferentes muestras (tejidos, tratamientos, time-points, etc.) la cantidad relativa o relación del mRNA de un gen específico respecto a la cantidad de mRNA de un gen constitutivo (control endógeno).

Gen de referencia: También denominados “housekeeping” o control endógeno. Son genes constitutivos que se utilizan en las técnicas de cuantificación relativa y

encuentran presentes en todas las muestras analizadas, permiten normalizar la cuantificación del ARNm y de esta forma se eliminan diferencias debidas a concentración inicial.

Hibridación *in situ*: Es una técnica de laboratorio que consiste en marcar una hebra sencilla de ARN o ADN denominada sonda y permitir que se empareje con su secuencia complementaria en el ARN o el ADN presente en una muestra de tejido o de cromosomas. La sonda está marcada con una sustancia trazadora química o radiactiva por lo que su unión puede ser visualizada.

Mg: Miligramos

Nucleótidos: Un nucleótido es una molécula orgánica, que en combinación con otros nucleótidos, produce ADN o ANR. Un nucleótido está compuesto de un azúcar, un fosfato y una de las bases: adenina, timina, guanina, citosina.

Oligonucleótidos: Son polímeros cortos del ácido nucleico, se componen de 13 a 25 nucleótidos.

Pb: Pares de bases (las cuales componen los ácidos nucleicos).

PCR: Reacción en cadena de la polimerasa. La PCR es una técnica que permite llevar a cabo la síntesis *in vitro* de fragmentos de ADN. Está basada en una reacción enzimática catalizada por una ADN polimerasa, que produce múltiples copias (amplificación) de un mismo fragmento de ADN.

Polimerasa: Es una enzima capaz de transcribir o replicar ácidos nucleicos. Resultan cruciales en la división celular y en la transcripción del ADN.

Primers: Son pequeñas secuencias de oligonucleótidos que se utilizan para iniciar la síntesis de ADN.

Primer Fw: Primer sentido.

Primer Rw: Primer antisentido.

q-PCR: Reacción en cadena de la polimerasa-tiempo real. Método de análisis cuantitativo para cualquier secuencia de ADN amplificable, el cual detecta la acumulación de ADN en base a la fluorescencia emitida por la muestra.

Retrotranscriptasa: Componente de reacción PCR que convierte el RNA en cDNA.

RT-PCR: Reacción en cadena de la polimerasa-punto final. Es una técnica de alta sensibilidad utilizada para amplificar regiones génicas específicas. La generación del producto final se detecta hasta que la amplificación ha terminado y el amplicón es visualizado en un gel de agarosa.

Síntesis de proteínas: Se conoce como síntesis de proteínas al proceso por el cual se componen nuevas proteínas a partir de los aminoácidos esenciales. En este proceso, se transcribe el ADN en ARN. La síntesis de proteínas se realiza en los ribosomas situados en el citoplasma celular.

Taq polimerasa: ADN polimerasa obtenida de *Thermophilus aquaticus*. Enzima encargada de construir nuevas cadenas de ADN

Traducción: Síntesis de proteínas cuyas secuencias aminoacídicas son codificadas por las secuencias de nucleótidos de las moléculas de ARNm correspondientes. La traducción ocurre sobre los ribosomas.

Transcripción: Proceso por el cual una cadena de ADN es usada como molde para la síntesis de un ARN complementario por acción de la enzima ARN polimerasa.

Transcriptasa reversa: Enzima que sintetiza ADN a partir de un molde de ARN, el cual se duplica posteriormente para dar la doble cadena de ADN. Frecuente en retrovirus y también empleado en ingeniería genética para generar ADN complementario.

UV: Radiación ultravioleta. Se denomina radiación ultravioleta a la energía electromagnética emitida a longitudes de onda menores que la correspondiente a la visible por el ojo humano, pero mayor que la que caracteriza a los rayos X, esto es, entre 100 y 360 nm.

µg/ml: Microgramos por mililitro

µl: Microlitros

µM: Micromolar

RESUMEN

En la actualidad, la acuicultura aporta casi el 50% del pescado destinado a la alimentación a nivel mundial y ha sido visualizada como una alternativa ante problemas de seguridad alimentaria. Así mismo, es una herramienta útil para mitigar el efecto de la sobreexplotación de especies. En este sentido, se continúa trabajando en el desarrollo tecnológico del cultivo de especies nativas, como son la generación de información de aspectos básicos en el área de nutrición, fisiología digestiva del organismo en diferentes etapas de crecimiento y el uso de análisis bioquímicos y moleculares, que cada vez son más utilizados en las distintas áreas de estudios. Una de ellas es la identificación de genes relacionados con el desarrollo de las especies, información que puede ser utilizada en la etapa larvaria para estudios de expresión génica durante la ontogenia inicial, pudiendo ser complementaria al momento de elaborar protocolos de alimentación al realizar el destete de larvas. Por tanto, el objetivo del presente trabajo fue determinar los cambios en la expresión del gen precursor de la proteasa alcalina tripsina, durante la ontogenia inicial de *C. trimaculatum*.

El estudio consta de dos etapas experimentales, la primer etapa fue la identificación del gen tripsinógeno en juveniles de *C. trimaculatum*; para ello, se diseñaron oligonucleótidos para RT-PCR, a partir de secuencias homologas de otros peces. Se realizó extracción de ARN total de los tejidos: estómago, intestino y páncreas de juveniles de la especie en estudio, posteriormente se realizó la síntesis de ADNc y se amplificó mediante PCR punto final. El producto obtenido se visualizó en geles de agarosa con exposición a luz UV, siendo extraído y purificado para su secuenciación. Como resultado se obtuvo una secuencia parcial de 414 pb la cual codifica para 137 aminoácidos. La secuencia fue analizada mediante software libres y se encuentra registrada en la base de datos GenBank con el código KX697033. La segunda etapa experimental, fue la cuantificación relativa del gen tripsinógeno en la ontogenia inicial de *C. trimaculatum*, para ello se diseñaron oligonucleótidos específicos para qPCR a partir de la secuencia obtenida en la primer etapa experimental. Así mismo, se realizó extracción de ARN total y posteriormente síntesis de ADNc de las larvas obtenidas del muestreo (H-30 dde). Posteriormente se hizo qPCR para relacionar los cambios de la expresión del gen tripsinógeno durante la ontogenia inicial de *C. trimaculatum* y se realizaron curvas de estandarización del gen de interés (tripsinógeno) y de los genes de referencia (GAPDH y 18S) para evaluar la eficiencia de amplificación de dichos genes. Como resultado, La expresión relativa del tripsinógeno, con respecto a los genes de referencia GAPDH y 18S, se detectó cerca del día 3 dde. Los niveles de expresión aumentan paulatinamente hasta el día 11 dde en el cual comienza a elevarse su expresión hasta un máximo obtenido el día 15 dde, posteriormente se observa una disminución significativa en la expresión génica que continuó hasta el día 24 dde; a partir del cual, la expresión permaneció relativamente constante hasta el final del experimento.

I.- INTRODUCCIÓN

El incremento en la población humana puede acarrear diferentes problemas relacionados con la seguridad alimentaria ya que, se dificulta el acceso al alimento en diferentes zonas del mundo (López-González, 2009). En este sentido, la acuicultura podría ser una alternativa por ser el sector productivo de mayor crecimiento en los últimos años, cuya producción a representa el 50% del pescado que se comercializa a nivel mundial (FAO, 2014).

En el caso de México, muchas de las especies nativas son representadas por la familia Cichlidae (Velázquez, 2013), dentro de las cuales, un elevado número de ellas poseen potencial para ser incorporadas a la acuicultura en el país. Sin embargo, en la actualidad la mayoría de especies de agua dulce cultivadas son especies exóticas como la tilapia y la carpa. Esto es reflejo del desconocimiento de la biología y potencial del cultivo de las especies nativas (Uscanga Martínez, 2010) Una de estas especies es *Cichlasoma trimaculatum* (*Amphilophus trimaculatum* Rican *et al.*, 2016), conocida comúnmente como mojarra prieta o tahuina; la cual se caracteriza por ser dulceacuícola, de hábitos omnívoros (Orellana-Amador, 1992), su carne es muy apreciada por las poblaciones locales, presenta un buen crecimiento en cautiverio, resistencia al manejo y aceptan con facilidad alimentos balanceados. En la actualidad, la población de esta especie está disminuyendo en su hábitat natural, como lo demuestran estudios realizados (Violante, 1995; Ortiz Cruz, 2011). En este sentido y con fines tanto productivos como ecológicos, es recomendable implementar alternativas de producción en el cultivo de esta especie nativa.

Con este fin, es importante conocer aspectos biológicos ya que permiten desarrollar y realizar el manejo adecuado durante el cultivo de un organismo, con la finalidad de poder garantizar su correcta producción y rentabilidad (Guerrero-Zarate, 2010). De igual forma, abordando los vacíos de conocimientos en las diferentes áreas de cultivo (nutrición, reproducción, sanidad, fisiología digestiva, etc.) se podrá lograr el completo desarrollo del mismo (Uscanga Martínez, *et al.*, 2011; Vidal-López, 2009).

Uno de los principales problemas en la incorporación de cualquier especie a la acuicultura es el larvicultivo, fundamental para la obtención de semilla en gran cantidad para su posterior engorda y así, a largo plazo, asegurar un aporte constante de juveniles (Sáenz De Rodrigáñez, *et al.*, 2005). Para ello y en una etapa tan crucial, un punto de suma importancia es conocer, a nivel fisiológico el desarrollo de su organismo y específicamente el de su aparato digestivo ya que, dependiendo del desarrollo de su funcionalidad, el individuo, a partir del alimento suministrado, podrá degradar y obtener los materiales necesarios para realizar sus funciones fisiológicas (Gisbert, *et al.*, 2008). Por ello, el conocimiento del momento exacto en el cual el organismos disponen de las enzimas digestivas necesarias para llevar a cabo el proceso completo de digestión, es fundamental para saber el instante adecuado de la incorporación del alimento balanceado (Juárez, 2014). Con este fin, se han realizado estudios enfocados en la descripción de las enzimas digestivas, debido a que reflejan parte de la capacidad digestiva de los organismos acuáticos (Lorca, 2014). El aporte de estos trabajos está relacionado al diseño de alimentos específicos que facilitara la optimización del proceso de larvicultivo (Álvarez-González, 2003).

Los estudios sobre la actividad de las enzimas digestivas se han centrado en la aplicación de técnicas bioquímicas usando sustratos específicos y determinando su actividad. Sin embargo, en los últimos años los estudios bioquímicos han sido complementados por ensayos moleculares, con el fin de comprender los cambios más importantes en la síntesis de enzimas digestivas durante la ontogenia de los organismos (Manríquez, *et al.*, 2011). La síntesis de proteínas consta de fases como la transcripción y la traducción, las cuales se realizan a través de un proceso a nivel celular, cuyo producto final es la obtención de proteínas a partir de los aminoácidos existentes. En este sentido, la mayoría de los eventos concernientes a sobrevivencia, crecimiento y diferenciación celular, son reflejados en los patrones de expresión génica, en donde la habilidad para detectar y cuantificar a nivel de genes específicos, es una parte central dentro del área de investigación básica y aplicada, (Solomon, *et al.*, 1998). El manual “introducción a la PCR en tiempo real” del sistema StepOne-life technologies, describe la cuantificación

relativa de la expresión génica como la comparación cuantitativa del ácido nucleico con respecto a una muestra de referencia denominada calibrador, donde los resultados se expresan como un cambio en el número de veces que un ARNm se expresa en una muestra. Por ello se considera, que la expresión génica de las enzimas, pueden ser utilizada como un indicador en el proceso de desarrollo y funcionalidad del sistema digestivo (Martínez-Burguete, 2012), permitiendo un mayor conocimiento que facilitaría considerablemente el manejo del larvicultivo (Arévalo, 2009).

Los estudios de genes precursores de enzimas digestivas han sido aplicados para especies de importancia comercial tales como el robalo blanco (*Centropomus undecimalis*) y la tenguayaca (*Petenia splendida*). Estos trabajos permitieron comprender la respuesta en relación crianza-alimento al estudiar la expresión de los genes tripsina y lipasa en el páncreas durante la ontogenia temprana (Martínez, 2012) y también para optimizar el manejo del cultivo de la especie, al localizar el momento de máxima expresión del gen de tripsinógeno (Arévalo, 2009).

Por tanto, el objetivo del presente trabajo fue determinar la expresión del gen precursor de la enzima digestiva tripsina, durante la ontogenia inicial de *C. trimaculatum*. Esta información podría beneficiar la elaboración de protocolos de alimentación en primeras edades para esta especie, de importancia local en la región sur-oeste del país.

II.- ANTECEDENTES

2.1.- Estudios de *Cichlasoma trimaculatum*

Al realizar una búsqueda de los estudios en *C. trimaculatum*, encontramos que son pocos y la mayoría abarcan campos de estudios en aspectos biológicos, ecológicos y algunos acuícolas. Orellana-Amador (1992), coloca a *C. trimaculatum* en la categoría de peces dulce-acuícolas. Sin embargo, en posteriores estudios se observó que esta especie es capaz de tolerar ciertas salinidades (Miller, *et al.*, 2009). Esta especie prefiere aguas de flujo lento, con rangos de temperatura entre 21 y 30°C, así como sustratos de arena, limo, lodo, grava, cantos rodados y detritus; dicha especie tiene una distribución neotropical de transición (Corona-Santoyo, 2005) localizándose preferentemente, en zonas con raíces y plantas acuáticas.

Años más tarde Violante (1995) aborda información acerca de su reproducción reportando que los índices gonadosomáticos y hepatosomáticos muestran la existencia de una temporada reproductiva que comprende de junio a septiembre en la laguna de tres palos Guerrero, México. Desde esta perspectiva, se han realizado estudios en aspectos de crecimiento y madurez gonadal como el realizado por Ortiz Cruz (2011), en el cual asegura que la reproducción se lleva a cabo en temporadas de secas para la subcuenca del río Atoyac (Oaxaca), reportando un crecimiento alométrico positivo para ambos sexos en la población estudiada. Además afirma que *C. trimaculatum* es un individuo con preferencia a desovar sobre sustrato y que presenta huevos adhesivos con un número promedio por hembra de 3,082; cantidad que se modifica según el tamaño de la hembra. También informa que es una especie monogámica que presenta cuidado biparental de huevos, larvas y alevines.

Por otra parte, se ha realizado la descripción anatómica de *C. trimaculatum* (fig. 1); la cual indica que la especie presenta XVI-XVIII espinas dorsales, usualmente XVII; anales por lo general VII; tiene tres manchas redondas características de la especie, una mancha grande en la nuca, sobre el origen de la línea lateral; otra a la mitad del costado, cerca de la punta de la pectoral; y una en la mitad superior

del pedúnculo caudal (puede haber barras verticales y series de manchas laterales en desarrollo variable o ausentes) (Miller, *et al.*, 2009).

Violante, *et al.*, 2008 realizó un estudio en el que indica que *C. trimaculatum* presenta hábitos alimenticios omnívoros durante algunos meses del año, pero tiene cierta tendencia a la carnivoría. También define que en la naturaleza, sus principales problemas son los parásitos, los cuales se centran en nematodos del género *Contracaecum* y en trematodos (*Clinostomum sp*), finalizando el estudio con una evaluación de los requerimientos nutricionales de proteína, para determinar, a mediano plazo, su factibilidad para el cultivo.

Por otro lado, se realizaron estudios de fisiología digestiva (Toledo-Solís, *et al.*, 2013) cuyo objetivo fue analizar el comportamiento de las enzimas digestivas durante la ontogenia de *C. trimaculatum*, mediante técnicas bioquímicas y electroforéticas. En este trabajo se concluyó que la digestión del organismo en estudio es llevada a cabo tanto por proteasas ácidas como alcalinas y que la especie, desde el punto de vista de su capacidad digestiva, apunta a ser considerada como omnívoros con tendencia a la carnivoría.



Fig. 1. Ejemplar de *Cichlasoma trimaculatum* donde se observan las características morfológicas representativas de la especie.

2.2.-Fisiología digestiva en peces

La producción de animales acuáticos, como cualquier otra actividad orientada a producción tanto animal como vegetal, se puede describir de forma sencilla como un proceso de transformación energética. Desde ésta perspectiva, el desarrollo y la rentabilidad del cultivo, depende de la eficacia en que las necesidades nutricionales de los organismos son cubiertas mediante programas adecuados de alimentación (Moyano, 2006). De no ser así, las afectaciones dependerían del rol que el nutriente tenga en el desarrollo del organismo, ya que, una mala nutrición en los organismos pueden llegar a tener un efecto directo en el crecimiento, supervivencia y morfología (deformaciones esqueléticas y despigmentación) (Gisbert, *et al.*, 2008), aumentando los costos de producción y la comercialización del producto.

Desde esta perspectiva, uno de los grandes retos para la acuicultura, son aquellos relacionados con la sobrevivencia larval, lo cual se debe principalmente a la baja capacidad digestiva y en general, al desconocimiento de los requerimientos nutritivos que se observan en esta etapa (Paz Raymundo, 2014; Sáenz de Rodrigáñez, *et al.*, 2005). Para favorecer este campo, se requiere profundizar más en estudios de fisiología digestiva, área que permite el desarrollo de avances en la investigación de nuevas alternativas alimenticias para la nutrición de nuevas especies acuicultivables, evaluando su digestibilidad, grado de inhibición, y la evaluación de enzimas digestivas a través del estudio del desarrollo del tracto digestivo (Uscanga Martínez, *et al.*, 2011).

En este contexto, Zambonino y Cahu (2001) realizaron un trabajo de investigación cuyo objetivo fue dar una visión general del proceso de desarrollo gastrointestinal en larvas de peces marinos, con especial atención a tres especies: lubina (*Dicentrarchus labrax*), corvina roja (*Sciaenops ocellatus*) y lenguado senegalés (*Solea senegalensis*). Los autores reportan que durante las primeras etapas, las larvas de peces marinos exhiben características digestivas particulares, por lo cual, las enzimas digestivas presentan diversos comportamientos por lo que están directamente influenciado con el desarrollo del tracto digestivo y la funcionalidad

de cada órgano que lo conforma. Por ejemplo, la actividad enzimática amilasa disminuye con la edad a partir de la tercer semana después de la eclosión en lubina y la corvina roja, mientras que la expresión de otras enzimas (tripsina, lipasa, y fosfolipasa) aumenta hasta el final del período larvario.

En la actualidad, existen diversos estudios de fisiología digestiva realizados mediante ensayos bioquímicos y moleculares en peces marinos y dulceacuícolas. Un ejemplo de dichos estudios fue el realizado por Jiménez-Martínez, *et al.* (2012) al estudiar el desarrollo de enzimas digestivas durante la ontogenia inicial del robalo blanco (*Centropomus undecimalis*). En este trabajo se evaluaron diversas actividades enzimáticas de la maquinaria digestiva durante el larvicultivo de esta especie, lo cual proporcionó información básica sobre la fisiología digestiva de este pez marino, aspirando a desarrollar un alimento artificial que pueda ser utilizado durante esta etapa del cultivo.

Así mismo, Álvarez González, *et al.* (2010) resaltaron la importancia de los estudios relacionados con la determinación de los requerimientos nutricionales y la evaluación de la capacidad digestiva en los periodos de vida de un cíclido nativo del sureste mexicano, la tenguayaca (*Petenia splendida*). Mediante técnicas histológicas y bioquímicas, aumentó considerablemente el conocimiento de la fisiología digestiva del organismo. Los resultados encontrados mostraron una gran similitud con otros cíclidos, en los patrones de desarrollo precoz del sistema digestivo y la aparición temprana de enzimas digestivas.

Desde esta perspectiva, se han venido realizando estudios de enzimas digestivas que permitan estudiar los cambios morfológicos de las especies y con ello conocer la funcionalidad del sistema digestivo; todo esto con el objetivo de incorporar protocolos de alimentación adecuados que permitan mejorar el cultivo de la especie en estudio. Ejemplo de ello fue lo realizado por López-Ramírez, *et al.* (2011) quien identificó los cambios morfofuncionales en *Cichlasoma urophthalmus* a lo largo de su ontogenia inicial, y confirmó que es una especie de amplio espectro trófico, con atributos de una especie omnívora, con cierta tendencia a la carnivoría oportunista, ya que presenta actividad importante en una amplia gama de enzimas digestivas como amilasa, lipasa, fosfatasa y tripsina. Cabe mencionar

que todo esto pudo realizarse mediante la aplicación de técnicas bioquímicas, histológicas y moleculares.

Por lo tanto, todas las proteasas son esenciales en el proceso digestivo de los organismos, por las funciones que desempeñan. Sin embargo, entre las proteasas digestivas más estudiadas se encuentra la tripsina, perteneciente a la familia de las serín-proteasas que juega un papel importante en la activación de endopeptidasas digestivas en animales y lleva a cabo la catálisis de reacciones de hidrólisis de enlaces peptídicos que contienen residuos de aminoácidos básicos, tales como lisina y arginina (Devlin, 2004). En este sentido, Arévalo (2009) detectó la expresión de la tripsina durante la ontogenia inicial de la mojarra tenguayaca (*Petenia splendida*) y relacionó la síntesis de enzimas digestivas con el desarrollo de los órganos del sistema digestivo, con la finalidad de generar información para el desarrollo de su cultivo. Los resultados mostraron que la expresión del ADNc de tripsina fue detectada un día antes de la eclosión, mientras que la expresión máxima del gen, se detectó 3 y 23 días dde, disminuyendo en el 28 dde. Por otra parte, el análisis de similitud mostró que el gen de tripsina de *P. splendida* es muy conservativo con relación a una amplia cantidad de especies, ubicándolo dentro del grupo de los cíclidos.

En general, la mayoría de los trabajos de fisiología digestiva se han realizado, principalmente, en especies de importancia comercial, con la finalidad de obtener conocimiento que permita el diseño de alimentos específicos y con ello optimizar el cultivo de la especie en estudio. Todo lo anterior se ha logrado con la integración de técnicas histológicas, bioquímicas y moleculares (Álvarez-Gonzalez, *et al.*, 2010).

2.3.- Estudios moleculares en genes precursores de enzimas digestivas

La genómica funcional ha sido utilizada en diversos campos de estudio y también ha impactado en el estudio de los peces, tanto en su investigación básica como aplicada (Martínez Portela y Figueras Huerta, 2007). Un ejemplo de ello es el realizado por Chen, *et al.* (2016), quienes reportaron para Argus verde

(*Scatophagus argus*) un aumento significativo en los niveles de expresión del gen WNT4 (proteína crucial en la diferenciación y desarrollo ovárico) durante el desarrollo gonadal de la especie en estudio. Los resultados obtenidos señalan que dicho gen podría estar involucrado en el desarrollo de gónadas y el proceso de espermatogénesis. También, estas técnicas moleculares se han utilizado en especies acuícolas con el fin de aumentar la eficiencia de sus cultivos, debido a que tienden a complementarse con los ensayos bioquímicos, permitiendo comprender cambios importantes en la síntesis de enzimas digestivas durante la ontogenia de los organismos estudiados. La expresión génica de las enzimas podría reflejar la capacidad digestiva y ser utilizada como un indicativo en proceso de desarrollo y funcionalidad del sistema digestivo (Larsen, 2011; Martínez-Burguete, 2012), permitiendo la posibilidad de mejorar mediante los protocolos de alimentación, el crecimiento y supervivencia de los organismos (Arévalo, 2009).

Un claro ejemplo de estos estudios es el de Galaviz, *et al.* (2013) el cual consistió en medir la expresión génica y la actividad enzimática de tres proteasas digestivas: tripsina, quimotripsina y pepsina en Totoaba (*Totoaba macdonaldi*), con el objetivo de relacionar la información obtenida y desentrañar los mecanismos que desencadenan la producción de enzimas digestivas y la digestión de los alimentos. Al observar los resultados obtenidos mediante los datos moleculares y bioquímicos, se puede concluir que las larvas de Totoaba, tienen el sistema digestivo completamente desarrollado y funcional entre 20-24 dde. Gracias a los resultados obtenidos en este estudio se puede sugerir el adelanto en el inicio del período de destete a estos días, dado que hasta la fecha, el protocolo de actuación vino siendo alimentar entre los días 28 y 32 dde.

Así mismo, Murray *et al.* (2003) realizaron la clonación y el análisis de la expresión de tres enzimas digestivas en el Fletán (*Hippoglossus hippoglossus*) durante su desarrollo temprano. El uso de secuencias nucleotídicas de los genes precursores de las enzimas digestivas en estudio, permitieron obtener como resultados la amplificación de las secuencias parciales de lipasa, tripsinógeno y pepsinógeno a partir de ARN_m extraído de larvas enteras y juveniles utilizando la reacción en cadena de la polimerasa con transcripción inversa (RT-PCR). Los productos

fueron secuenciados y utilizados para el diseño de cebadores específicos de los genes de interés. Los resultados arrojaron que la expresión de los genes lipasa y tripsinógeno fueron evidentes desde el momento de la primera alimentación, pero la expresión génica del pepsinógeno no fue detectable hasta 80 dde. La hibridación *in situ*, utilizando sondas moleculares, localizó la expresión de lipasa y tripsinógeno en el páncreas exocrino, mientras que pepsina sólo se localizó en las regiones glandulares del estómago. Estos datos proporcionan un primer paso para la comprensión de los eventos moleculares que rigen la ontogenia de la capacidad digestiva del organismo en estudio.

Algunos de los genes precursores de enzimas digestivas en *C. undecimalis*; se expresan desde el periodo embrionario en el caso de peces y la expresión depende, en gran medida, de condiciones como el estadios de desarrollo, la nutrición del organismo y tipo de alimentación (Martínez-Burguete, 2012). Por ello, un gran número de estudios se han centrado en la proteasa tripsina, debido a que es una enzima clave en el proceso de digestión proteica y por tanto, asimilación y utilización de los nutrientes. Así mismo, el tripsinógeno es un precursor esencial secretado por el páncreas y podría utilizarse como un indicador en la funcionalidad del páncreas.

En el pargo lunarejo (*Lutjanus guttatus*), se estudió la expresión génica y actividad enzimática de tripsina y pepsina durante el desarrollo larvario. El objetivo de este trabajo fue conocer la fisiología digestiva del organismo mediante la transcripción de genes, la actividad enzimática de dos de sus principales proteasas digestivas y su posible relación tanto con el desarrollo del tracto digestivo, como con la alimentación de las larvas. Los resultados obtenidos sugieren que, en esta especie, el destete podría iniciarse a una edad más temprana de la que se practica actualmente (entre 28 y 30 dde), ya que las larvas de dicho pez, tienden a desarrollar un estómago funcional entre los días 20 y 25 dde (Galaviz, *et al.*, 2012). Así mismo, en el lenguado de invierno (*Pleuronectes americanus*) se ha estudiado la expresión del tripsinógeno durante el desarrollo del páncreas, encontrando que a medida que las larvas se acercaban a la metamorfosis, el páncreas se difundió, extendiéndose por todo el mesenterio que rodeaba el

estómago. Por otro lado se presentaron patrones de expresión tisular, debido probablemente a la naturaleza difusa del páncreas. La expresión del tripsinógeno fue evidente a partir del día 5 dde (Murray, *et al.*, 2004).

Cada uno de estos aspectos señala, que las técnicas de expresión de genes precursores de enzimas digestivas, complementadas con información de fisiología digestiva, podrían utilizarse como base del conocimiento en su aplicación para la elaboración de dietas inertes y también para indicar el momento adecuado en su empleo, lo cual es adaptable para todo tipo de organismos acuicultivables (Moguel-Hernández, 2016).

III.- Objetivos

3.1.- Objetivo general:

3.1.- Determinar los cambios en la expresión del gen precursor de la proteasa alcalina tripsina, durante la ontogenia inicial de *C. trimaculatum*.

3.2.- Objetivos específicos:

3.2.1.- Identificar el gen codificante de la proteasa digestiva tripsina/tripsinógeno en el sistema digestivo de juveniles de la mojarra *C. trimaculatum*.

3.2.2 Relacionar los cambios de la expresión del gen de la proteasa digestiva tripsina/tripsinógeno durante la ontogenia inicial de *C. trimaculatum*.

4.- MATERIALES Y MÉTODOS

4.1.- Identificación de genes en juveniles de *C. trimaculatum*

4.1.1- Obtención de juveniles

La identificación del gen tripsinógeno se realizó en juveniles (42.21 ± 15.18 g) de *C. trimaculatum* los cuáles, fueron obtenidos de un lote en cautiverio del Laboratorio de Nutrición y Producción Acuícola del Centro de Investigaciones Costeras de la Universidad de Ciencias y Artes de Chiapas (UNICACH). Los juveniles se mantuvieron en un sistema de circulación en estanques de fibra de vidrio de 3 m de diámetro y 1 m de alto, con oxigenación continua y recambios de agua diario del 2% del volumen total. Los juveniles se alimentaron con alimento balanceado Silver Cup® (pellets con un contenido de 32% de proteína y 5% de lípidos) tres veces al día (08:00, 13:00 y 18:00 hrs) a saciedad aparente.

4.1.2.- Diseño de oligonucleótidos

En el diseño de los oligonucleótidos para la identificación del gen tripsinógeno mediante la reacción en cadena de la polimerasa con transcriptasa inversa (RT-PCR) de *C. trimaculatum* se utilizaron las secuencias homologas de peces reportadas de la página de GenBank; como *Paranotothenia magellanica* (X82223.1), *Pleurogrammus azonus* (AB441709.2), *Lutjanus fulvus* (AB738891.1), *Gadus chalcogrammus* (AB506710.3), *Ctenopharyngodon idella* (AB698820.1) y *Boreogadus saida* (AB530319.1).

Para el diseño de oligonucleótidos se utilizaron software de libre acceso. La identificación de regiones conservadas de las diferentes secuencias se realizó mediante un alineamiento múltiple realizado con el programa ClustalW2 (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalw2/>). La especificidad de la secuencia se determinó mediante el alineamiento específico con el algoritmo de búsqueda de secuencias con alta similitud BLAST (Basic Local Alignment Search Tool; <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>). Por último, con el programa Oligoanalyzer versión 3.1, se determinaron las temperaturas de alineamiento, contenido de C-G y la verificación de formación de dímeros (<https://www.idtdna.com/calc/analyzer>).

Los oligonucleótidos diseñados se enviaron al Integrated DNA Technologies (IDT) para ser sintetizados y su composición se muestra en la Tabla 1.

Tabla 1.- Diseño de oligonucleótidos para la identificación parcial del tripsinógeno en juveniles de *C. trimaculatum*.

Dirección	Oligonucleótidos	Tm (°C)	Producto esperado
Tryp SE	5'- CTGGGTGGTGTCTGCTGC -3'	59.0	500 pb
Tryp AS	5'- GCACATCCGTAGCCCCAG -3'	58.6	

4.1.3.- Extracción de órganos

La identificación de gen tripsinógeno se realizó en el estómago, intestino e hígado-páncreas. La extracción de los órganos se llevó a cabo en frío y con ayuda de un estuche de disección previamente esterilizado. Se pesó en una balanza analítica una fracción de 500 mg de cada uno de los tejidos, se colocaron en tubos Eppendorf® y fueron congelados a -80°C en un ultracongelador Thermo scientific® modelo Ultima plus hasta su posterior análisis.

4.1.4.- Extracción de ARN total

La extracción de ARN total para cada una de las muestras (estómago, intestino e hígado-páncreas) se realizó mediante el kit PureLink® RNA Mini Kit código 12183018^a (Anexo 1). Para separar el ARN del tejido se centrifugo a 12,000 rcf ocupando una centrifuga Eppendorf® modelo 5810-R). Por último, el producto obtenido se cuantificó por espectrofotometría con un nanodrop Jenway® modelo Genova nano (Tabla 2); y se conservó a -80°C en un ultracongelador Thermo scientific® modelo Ultima plus hasta su utilización.

Tabla 2.- Cuantificación del ARN total en diferentes tejidos de juveniles de *C. trimaculatum*.

Unidades/Tejidos	Estómago	Intestino	Páncreas
ng/μl	249.3	550.3	197.4
ABS	0.312	0.688	0.247
Nm	260	260	260

4.1.5.- Síntesis de ADNc

El ADNc se sintetizó a partir de ARN total de acuerdo a las especificaciones del kit de síntesis QUIAGEN QUALITY® QuantiTect Reverse Transcription Kit código 205310) (Anexo 2). Se realizaron reacciones de 40 μl para cada muestra con las cantidades descritas en la Tabla 3.

Tabla 3.- Volúmenes utilizados para síntesis de ADNc en diferentes tejidos de juveniles de *C. trimaculatum*.

	Estómago	Intestino	Hígado-Páncreas
ARN total	8 μl	4 μl	10 μl
ADNg	4 μl	4 μl	4 μl
Master mix	2 μl	2 μl	2 μl
Buffer 5x	8 μl	8 μl	8 μl
Primer mix	2 μl	2 μl	2 μl
H ₂ O	16 μl	20 μl	14 μl
Total	40 μl	40 μl	40 μl

El proceso de síntesis de ADNc se llevó a cabo en un termociclador Eppendorf® modelo ag22331, bajo las siguientes condiciones descritas en la Tabla 4. El producto obtenido de ADNc se conservó a -80°C.

Tabla 4.- Protocolo de condiciones para la síntesis de ADNc.

Ciclos	1er	2do	3er	4to	5to
Tiempo	2 min	5 min	15 min	3 min	∞
Temperatura	42°C	4°C	42°C	95°C	4°C

4.1.6.- RT-PCR de ADNc

La amplificación del gen tripsinógeno se efectuó en las condiciones del kit HotStarTaq® DNA Polymerase código 203203 (Anexo 3). Se realizó una reacción final por cada muestra de 20 µl con las cantidades correspondientes de los componentes y de los oligonucleótidos diseñados (Tabla 5). En el proceso de RT-PCR se utilizó un termociclador eppendorf® modelo ag22331; este proceso se desarrolló en las condiciones descritas en la tabla 6 y 7 con un sistema de gradiente de temperatura, optimizándose en términos de temperatura de alineamiento y concentración de Mg²⁺.

Tabla 5.- Preparación del master mix para la identificación del tripsinógeno en *C. trimaculatum*.

Master mix	
Componentes	Volumen 1X
10x PCR Buffer	2.0 µl
dNTP mix	0.4 µl
Primer Fw (10 µM)	0.4 µl
Primer Rw (10 µM)	0.4 µl
MgCl ₂ (25 mM)	0.4 µl
RNase-free water	5.9 µl
HotStarTaq Plus DNA Polymerase	0.5 µl
Volumen total	10 µl

Tabla 6.- Condiciones de ADNc para cada muestra en la identificación del tripsinógeno en *C. trimaculatum*.

	Muestra	Control negativo
ADNc	2 µl	-- µl
H ₂ O(libre de ADNasas)	8 µl	10 µl
Volumen total	10 µl	10 µl

Tabla 7.- Programación de la RT-PCR para la amplificación del gen tripsinógeno.

	Desnaturalización inicial	Desnaturalización- alineamiento			Extensión	Almacenamiento
Temperatura	95 °C	95°C	58°C	72°C	72 °C	4°C
Tiempo	15 min	35 s	35 s	50 s	5 min	∞
Ciclos	1	38			1	1

4.1.7- Electroforesis en gel de agarosa (visualización de bandas)

Los productos amplificados de RT-PCR se visualizaron en un gel de agarosa al 1.5%, utilizando 3 µl de SYBR Safe DNA gel stain INVITROGEN® código S33102 (Anexo 4). Se empleó un marcador molecular de 100 pb de QIAGEN® (código 239045). Cada una de las muestras se inyectaron con buffer de carga Loading Buffer (10x) INVITROGEN® (código 10816-015). La electroforesis se corrió en una cámara Mini Sub Cell GT (Bio-Rad, Hercules, CA, USA) durante 40 minutos a 100 volts, utilizando como buffer de corrimiento TAE al 1x. La visualización de las bandas se realizó mediante la exposición de rayos UV con ayuda de un fotodocumentador Bio-rad® Modelo Universal Hood II.

4.1.8- Purificación del transcrito parcial de tripsinógeno

La banda con el producto esperado visualizaron en el gel de agarosa se extrajeron para ser purificados de acuerdo a las especificaciones del protocolo kit PureLink® PCR Purification Kit código k3100-01 (Anexo 5). El producto ADNc purificado fue

cuantificado por espectrofotometría con un nanodrop Jenway® modelo Genova nano y se verificó su integridad mediante una electroforesis al 1.5% a 100 volts por 40 minutos.

4.1.9 Secuenciación del ADNc purificado

El producto purificado fue enviado a secuenciar a la Unidad de Síntesis y Secuenciación del Instituto de Biotecnología de la UNAM. Las muestras enviadas para secuenciar se realizaron de acuerdo a lo solicitado por el laboratorio (Tabla 8).

Tabla 8.- Condiciones de envío para secuenciación del fragmento del tripsinógeno de juveniles de *C. trimaculatum*.

	Tubo 1 (C3 TT)	Tubo 2 (C4 TT)
ADN purificado	3.66 µl	3.66 µl
Oligonucleótido SE	1 µl	
Oligonucleótido AS		1 µl
H₂O	11.34 µl	11.34 µl
Total	16 µl	16 µl

4.1.10- Análisis de secuencia e identificación del gen

La secuencia obtenida por el Instituto de Biotecnología de la UNAM se visualizó con en el programa Chromas Lite y se realizó un BLAST (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) para encontrar la identidad de la secuencia y la homología con otras especies (análisis de similitud). La traducción de nucleótidos a aminoácidos se adquirió mediante el software Expassy Translate (<http://web.expasy.org/translate/>). La ubicación de los exones se obtuvo mediante la base de datos de Ensembl (<http://www.ensembl.org/index.html>) donde la secuencia parcial obtenida se comparó con el gen completo (tripsinógeno) de tilapia ENSONIT00000020695.1 (try-201).

4.2- Expresión de genes durante la ontogenia inicial de *C. trimaculatum*

4.2.1- Obtención de larvas

Las larvas de *C. trimaculatum* se obtuvieron de un lote de reproductores en cautiverio. Las larvas, al momento de la eclosión, se transfirieron a un sistema de recirculación con tanques de fibra de vidrio circulares de 100 L de capacidad; los cuales están conectados a una bomba de recirculación tipo Jacuzzi 1 Hp, filtros de arena sílica, un biofiltro de concreto y condiciones controladas. Aun así, diariamente se midieron los parámetros de la calidad del agua, temperatura, oxígeno disuelto, pH, amonio y nitritos, con un equipo multiparámetro YSI® modelo 556 profesional plus; para mantenerlos dentro de las condiciones óptimas del cultivo larvario.

4.2.2- Alimentación de larvas

Las larvas en los primeros tres días dde fueron alimentadas con alimento vivo (*Artemia sp.*) entre los días 4 y 10 después de la eclosión (dde). Posteriormente, se inició una coalimentación de alimento vivo (*Artemia sp.*) y alimento balanceado Silver Cup® (45% de proteína y 16% de lípidos) para los días 11 y 12 dde. Fue a partir del día 13 dde cuando únicamente se proporcionó alimento balanceado. La alimentación se proporcionó tres veces al día a saciedad aparente, en los horarios 08:00, 13:00 y 18:00 h hasta finalizar el muestreo.

4.2.3- Colecta de muestras

Las muestras colectadas se enjuagaron con agua ultra pura y fueron transferidas a tubos Eppendorf de 2 ml que contenían 1.5 ml de solución de estabilización de (Invitrogen™ RNA/later™). Las muestras se dejaron por 24 horas a temperatura ambiente y posteriormente fueron almacenadas a -80°C en un ultracongelador Thermo scientific® modelo Ultima plus hasta su posterior análisis.

Tabla 9.- Cronograma de muestreo de larvas durante la ontogenia inicial *C. trimaculatum*.

Numero de larvas	Días después de eclosión (dde)
10 larvas	0, 1, 3, 6, 9, 11, 13, 15, 17, 19, 21, 24, 27, 30

4.2.4- Diseño de oligonucleótidos para qPCR

A partir de la secuencia parcial obtenida del tripsinógeno se diseñaron oligonucleótidos específicos para cuantificar la expresión relativa del gen durante la ontogenia inicial. Para el diseño se utilizó software de libre acceso Primer3 (<http://bioinfo.ut.ee/primer3-0.4.0> y se validaron mediante OligoCalc (<http://biotools.nubic.northwestern.edu/OligoCalc.html>), OligoAnalyzer 3.1 (<https://www.idtdna.com/calc/analyzer>) y BLAST (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>). En la tabla 10 se muestran los oligonucleótidos diseñados.

Tabla 10.- Secuencia de oligonucleótidos para la cuantificación de la expresión del tripsinógeno en larvas durante la ontogenia inicial *C. trimaculatum*.

Dirección	Oligonucleótidos	Tm (°C)	Producto esperado
Sentido	5'- TGCCACCCTCAACAGTTATG - 3'	59.57	113 pb
Antisentido	5'- CTATCAGCAGTGGGGCTCAT - 3'	60.24	

4.2.5- Extracción de ARN total y síntesis de ADNc

La extracción de ARN total para cada uno de los días muestreados se realizó de mediante el kit PureLink® RNA Mini Kit (Código 12183018A) de acuerdo al protocolo descrito en el apartado 4.1.4. Del mismo modo, la síntesis de ADNc a partir de ARN total se realizó mediante el kit de síntesis QUIAGEN QUALITY® QuantiTect Reverse Transcription Kit (código 205310) bajo el mismo protocolo descrito en el apartado 4.1.5.

4.2.6- Cuantificación de la expresión del tripsinógeno por qPCR (Tiempo real)

La cuantificación de la expresión del tripsinógeno por qPCR se realizó partir de ADNc en la ontogenia inicial de *C. trimaculatum* desde el día 0 hasta el día 30 dde. Las reacciones se llevaron a cabo en un termociclador BioRad® CFX96 Touch™ Real-Time con el fluoróforo de Bio-Rad® SsoAdvanced™ Universal SYBR Green Supermix mediante la preparación de una mezcla con un volumen total de reacción de 10 µl (Tabla 11). La tabla 12 define las condiciones estandarizados de tiempos, temperatura y ciclos para este ensayo.

Tabla 11.- Reacción para qPCR de la ontogenia inicial de *C. trimaculatum*.

Solución 1x	Volumen (µl)
SYBR® Green Supermix	5.00
Oligonucleótidos SE	0.25
Oligonucleótidos AS	0.25
ADNc	1.00
H ₂ O (libre de nucleasas)	3.50
Total	10.00

Tabla 12.- Condiciones estandarizadas en el termociclador para la cuantificación de la expresión del gen tripsinógeno.

	Desnaturalización inicial	Desnaturalización	Alineamiento	Lectura Curva melting
Temperatura	95 °C	95°C	60 °C	65-95°C
Tiempo	30 seg	15 s	30 seg	0.05 seg
Ciclos	1	40	40	60

4.2.7- Curva de estandarización de oligonucleótidos

Se realizaron curvas de estandarización del gen de interés (tripsinógeno) y de los genes de referencia (GAPDH y 18S). Primeramente se preparó un homogenizado tomando 3 µl de ADNc de cada día muestreado y después se hizo un conjunto de diluciones seriadas con dicho material (1:10, 1:100, 1:1000, 1:10000 y 1:100000). Las reacciones se llevaron a cabo en un termociclador BioRad® CFX96 Touch™ Real-Time con el fluoróforo de Bio-Rad® SsoAdvanced™ Universal SYBR Green Supermix mediante la preparación de una mezcla con un volumen de 15 µl para cada dilución (Tabla 13); donde los oligonucleótidos tenían una concentración de 10 µM. Todos los puntos de las diluciones para cada gen, se realizaron por triplicado; todo esto con la finalidad de relacionar el valor del ciclo umbral (Cq) en la corrida de PCR-tiempo real, con el número de copias en la muestra (ADNc) para el cálculo de la eficiencia de amplificación.

Tabla 13.- Reacción para la validación de oligonucleótidos de qPCR.

Componentes	Volumen (µl)
SYBR® Green Supermix	7.5
Oligonucleótidos SE	0.25
Oligonucleótidos AS	0.25
ADNc	5
H ₂ O	2
Total	15

4.3-Análisis estadísticos.

El análisis se llevó a cabo considerando los lineamientos establecidos en la guía MIQE (Minimum information for publication of quantitative Real-Time PCR experiments) (Bustin, *et al.*, 2009). Los cálculos correspondientes se realizaron con base en el método comparativo ($2^{-\Delta\Delta CT}$) de acuerdo con Livak y Schmittgen (2001). Las curvas estándar fueron calculadas por medio de un análisis de regresión lineal utilizando la fórmula: $E = (10^{(-1/pendiente)} - 1)$, publicada por

Bustin, *et al.*, (2009) usando los valores de Ct (Threshold cycle) y el número logarítmico de copias ($\log C_0$) que fueron obtenidos en el análisis de las diluciones seriadas.

El número de copias (C_0) de muestras desconocidas fue calculado mediante la siguiente fórmula: $[(\text{Valor de CT} - b) / m - 1]$ donde $b =$ intercepto de Y y $m =$ la pendiente de las curvas estándar. Los números de copias normalizadas de tripsina para cada muestra, fueron determinadas dividiendo el número de copias de los genes entre el número de copias de GAPDH y 18S, y cada muestra normalizada fue dividida entre el calibrador (la muestra externa).

V.- Resultados

5.1 Identificación de la secuencia parcial del gen tripsinógeno

La amplificación del ARN total de las muestras, utilizando los oligonucleótidos diseñados de tripsinógeno, dio como resultado productos de amplificación del tamaño esperado de 500 pb (Figura 2). Los productos obtenidos fueron fácilmente observados tanto en estómago, intestino e hígado-páncreas; siendo la del intestino la de mayor intensidad.

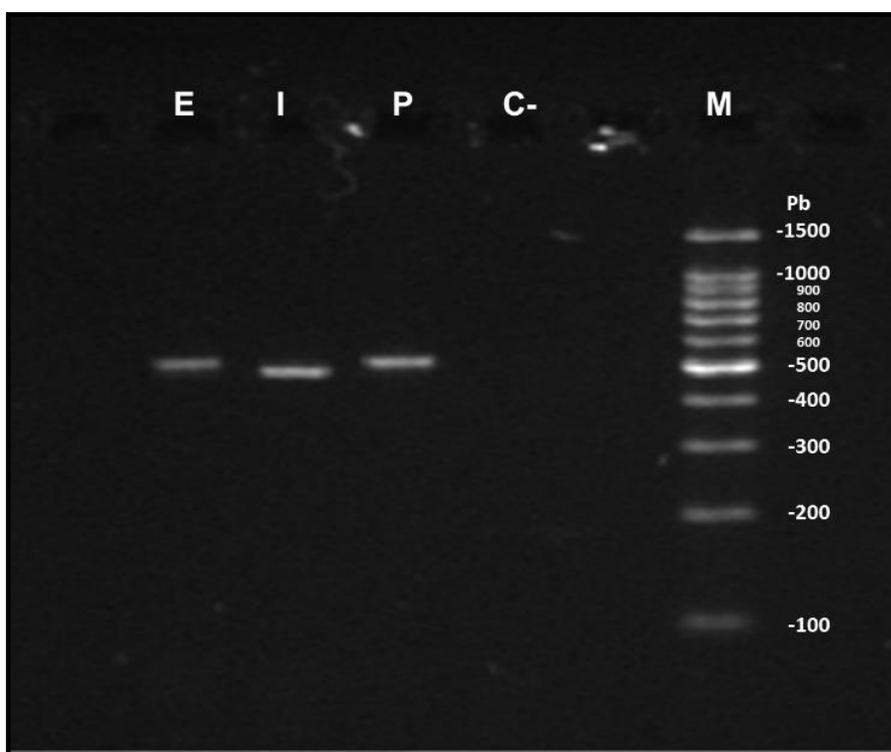


Fig. 2. Electroforesis de agarosa al 1.5% del fragmento del gen tripsinógeno en juveniles de *C. trimaculatum* en los tejidos de E= estómago, I = intestino, P = Hígado-páncreas; C- = Control negativo y M = Marcador molecular.

5.2 Análisis de la secuencia obtenida

Se obtuvo una secuencia parcial de 414 pb del gen tripsinógeno, la cual codifica para 137 aminoácidos; registrándose en el GenBank con la clave de acceso KX697033 (Fig. 3). Dentro de los aminoácidos que codifican esta sección podemos observar que aparecen todos los aminoácidos que conforman el código genético, siendo el más numeroso la glicina, seguida de la serina y la prolina. Por el contrario, los aminoácidos que menos aparecen son la histidina, seguido de la treonina y el triptófano. En el caso de los aminoácidos alifáticos, representan el 33.5 % de la secuencia, seguido de los azufrados con el 23.4 %, posteriormente vienen los ácidos que representan el 21.9 %, los aromáticos con un 13.9 % y finalmente los básicos que representan el 7.3 %.

1	tt	cag	gtg	cgc	ctg	gga	gag	cac	aac	atc	ggg	gtc	aac	gag	gga	44
1		Q	V	R	L	G	E	H	N	I	G	V	N	E	G	14
45	act	gag	cag	ttc	atc	gac	tcc	tcc	cgt	gtc	atc	cca	aat	cct	86	
15		T	E	Q	F	I	D	S	S	R	V	I	P	N	P	28
87	ggg	tac	gac	tcc	tgg	acc	att	gac	aat	gac	atc	atg	ctg	atc	128	
29		G	Y	D	S	W	T	I	D	N	D	I	M	L	I	42
129	aag	ctg	agc	cag	cct	gcc	acc	ctc	aac	agt	tat	gtg	cag	cct	170	
43		K	L	S	Q	P	A	T	L	N	S	Y	V	Q	P	56
171	gtg	cct	ctg	ccc	agg	agc	tgt	gct	ccc	gct	ggc	acc	atg	tgc	212	
57		V	P	L	P	R	S	C	A	P	A	G	T	M	C	70
213	agg	gtc	tct	gga	tgg	ggc	aac	acc	atg	agc	ccc	act	get	gat	254	
71		R	V	S	G	W	G	N	T	M	S	P	T	A	D	84
255	agg	aac	aag	ctg	cag	tgc	ctg	aac	atc	ccc	atc	ctg	tct	gac	296	
85		R	N	K	L	Q	C	L	N	I	P	I	L	S	D	98
297	agt	gac	tgt	agg	aac	gcc	tat	cct	ggc	atg	atc	act	gac	tcc	338	
99		S	D	C	R	N	A	Y	P	G	M	I	T	D	S	112
339	atg	ttc	tgt	gct	gga	tac	ctg	gag	gga	ggc	aag	gac	tct	tgc	380	
113		M	F	C	A	G	Y	L	E	G	G	K	D	S	C	126
381	cag	ggt	gac	tct	ggt	ggc	cct	gtt	gtg	tgc	aat	g			414	
127		Q	G	D	S	G	G	P	V	V	C	N			137	

Fig. 3. Secuencia parcial de nucleótidos y aminoácidos del gen tripsinógeno en juveniles de *C. trimaculatum*.

5.3 Ubicación de los exones en la secuencia obtenida

Al comparar la secuencia parcial del gen tripsinógeno obtenido en *C. trimaculatum* (código KX697033) se observa que se ubica en el 3 exón y abarca hasta el comienzo del exón 5 en la secuencia de ENSONIT00000020695.1 (try-201) (Fig. 4).

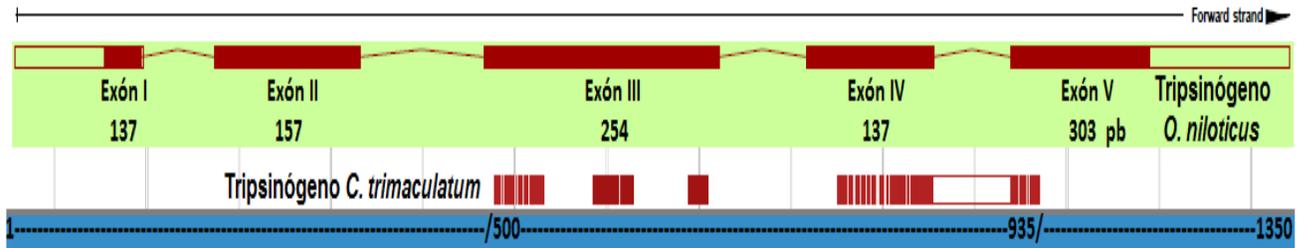


Fig. 4. Ubicación de los exones de la secuencia parcial del gen tripsinógeno en juveniles de *C. trimaculatum* con respecto a la secuencia del gen completo de ENSONIT00000020695.1 (try-201).

5.4 Análisis de similitud

La comparación de nucleótidos (pares de bases) de la fracción del tripsinógeno de 414 pb, nos reveló que tiene un 99% de similitud con *Petenia splendida* y guarda una similitud del 90% con otras especies de la familia Cichlidae; siendo el pez mandarín (*Siniperca chuatsi*), el robalo prieto (*Centropomus poeyi*), el robalo blanco (*Centropomus undecimalis*) y lenguado senegalés (*Solea Senegalensis*) las primeras especie que se salen de esta familia las que poseen un porcentaje de similitud del 87% (Tabla 14).

Tabla 14.- Análisis de similitud de la secuencia parcial del tripsinógeno en juveniles de *C. trimaculatum*.

#	Especie	Código de acceso en GenBank	Porcentaje de similitud
1	<i>Petenia splendida</i>	FJ859997.1	99%
2	<i>Symphysodon aequifasciatus</i>	AY690664.1	95%
3	<i>Pundamilia nyererei</i>	XM_005736166.1	92%
4	<i>Haplochromis burtoni</i>	XM_014338719.1	92%
5	<i>Maylandia zebra</i>	XM_014408230.1	91%
6	<i>Oreochromis niloticus</i>	XM_019365054.1	90%
7	<i>Oreochromis aureus</i>	AY737395.1	90%
8	<i>Siniperca chuatsi</i>	EU688996.1	87%
9	<i>Centropomus poeyi</i>	KR349663.1	87%
10	<i>Centropomus undecimalis</i>	JX128261.1	87%
11	<i>Solea senegalensis</i>	AB359191.1	87%

5.5 Peso y longitud o de los organismos cultivados.

Las larvas de *C. trimaculatum* mostraron un crecimiento exponencial en peso húmedo y longitud total durante la eclosión, desde y hasta el final del estudio a 30 dde (Fig. 5 y 6).

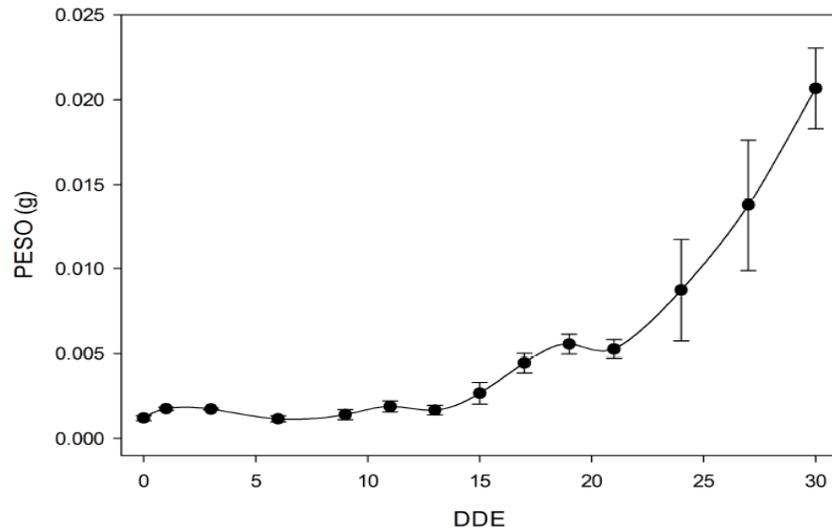


Fig. 5.- Peso húmedo promedio de larvas de *C. Trimaculatum* cultivadas en condiciones experimentales (media \pm DS) n=5.

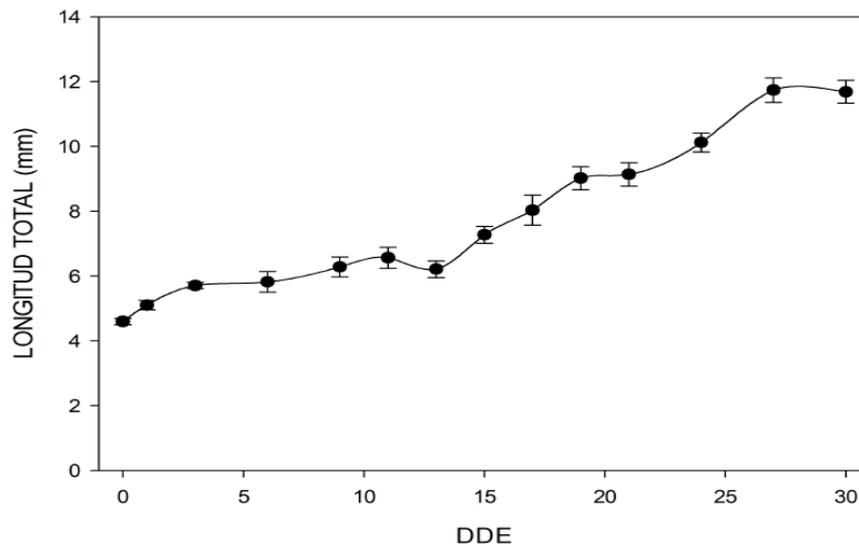


Fig. 6.- Longitud total promedio de larvas de *C. trimaculatum* cultivadas en condiciones experimentales (media \pm DS) n =5.

5.6 Cuantificación relativa para la expresión del gen tripsinógeno.

La expresión relativa del tripsinógeno, con respecto a los genes de referencia GAPDH y 18S, se detectó cerca del día 3 dde, donde comienza la alimentación exógena (nauplios de *Artemia sp.*) (Fig. 6). Los niveles de expresión aumentan paulatinamente hasta el día 11 dde en el cual comienza a elevarse su expresión hasta un máximo obtenido el día 15 dde, coincidiendo nuevamente con el cambio de alimentación. Primero en el periodo de coalimentación de alimento vivo y balanceado y finalmente con la eliminación del alimento vivo en la dieta (día 13 dde). Posteriormente se observa una disminución significativa en la expresión génica que continuó hasta el día 24 dde, a partir del cual la expresión permaneció relativamente constante hasta el final del experimento.

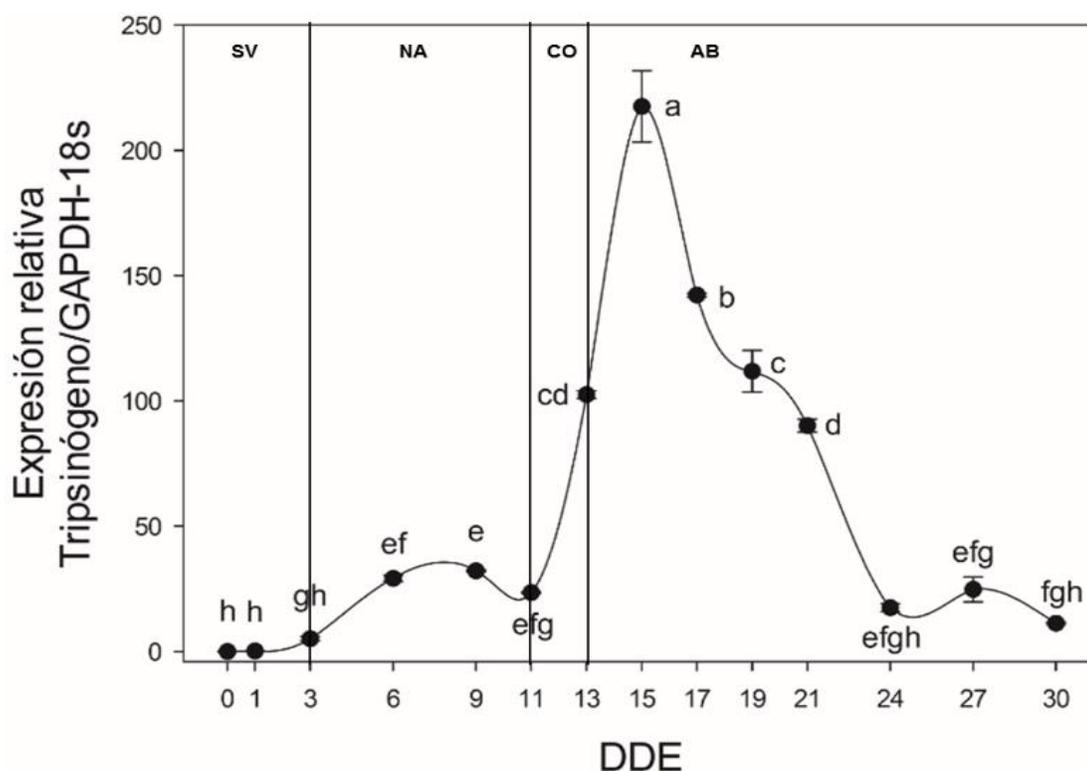


Fig. 7.- Medias \pm E.E. de la expresión relativa del gen tripsinógeno durante la ontogenia inicial de *C. trimaculatum*. Letras diferentes en minúsculas indican diferencias estadísticas significativas ($p < 0.05$) $n=3$. Letras en mayúsculas indican pautas de alimentación SV = Saco vitelino, NA= Nauplios de *Artemia sp.* CO= Coalimentación de Nauplios de *Artemia sp.* y alimento balanceado y AB= Alimento balanceado.

VI.- Discusión

El primer avance a destacar en este trabajo es la secuenciación del fragmento de 414 pb del gen del tripsinógeno en juveniles de *C. trimaculatum*. El tamaño de dicho fragmento identificado se encuentra cercano a lo obtenido en diferentes estudios de tripsinógeno en peces, como lo descrito para *Petenia splendida* con 535 pb, *Xiphister atropurpureus* con 535 pb, *Anoplarchus purpureus* con 528 pb, *Cebidichthys violaceus* con 521 pb, *Xiphister mucosus* con 535 pb y *Centropomus undecimalis* con 519 pb (Arévalo, 2009; Gawlicka *et al.*, 2005; Martínez-Burguete, 2012). En la actualidad, se han realizado pocos estudios en esta área para *C. trimaculatum*, enfocándose principalmente en las áreas de filogenética, taxonomía y estudios biogeográficos (Rican, *et al.*, 2016). Sin embargo, las posibles aplicaciones de dicha secuenciación es amplia y no solamente en estudios de este tipo, más recientemente, la aplicación de dichas herramientas se ha incrementado notablemente.

Al realizar el análisis de similitud de la secuencia parcial de tripsinógeno con otros cíclidos dulceacuícolas, podemos observar elevada coincidencia y en todos los casos presenta similitud superior al 90 % obteniéndose el valor más alto en *Petenia splendida* (FJ859997.1) una especie cercana filogenéticamente (Müller, 2008). Esta elevada similitud en secuencias de nucleótidos indica que el gen de tripsina de esta especie de peces, podría ser utilizada para el uso de sonda en ensayos de hibridación *in situ* y para determinar los niveles relativos de expresión de tripsina para otras especies en estudio, ya que nos indica que este gen es de carácter conservativo (Sainz, 2004; Rodríguez-Casariago, 2012). Esto también, se ve reforzado al comparar la secuencia obtenida con el gen completo de tripsinógeno de *Oreochromis niloticus* (Base de dato ENSEMBL código ENSONIT00000020695.1; try-201), donde se observa una identidad del 95.45 % iniciando a principios del exón 3 y finalizando al inicio del exón 5 (Müller, 2008; Arévalo, 2009). Müller (2008) describe que el grupo de las sarín-proteasas presenta una zona conservada denominada triada catalítica, la cual se ubica al final del exón 2 con pares de bases que codifican para el aminoácido histidina, seguido del exón 3 donde se codifica el aminoácido aspartato y finaliza al inicio del

exón 5 donde se codifica el aminoácido serina; considerando que la fracción del gen tripsinógeno obtenida en *C. trimaculatum* corresponde a los exones 3, 4 y 5, podría indicarse que esta fracción obtenida se encuentra dentro de la región catalítica y por tanto, en la zona conservativa del gen tripsinógeno (Devlin, 2004) con lo que con mayor peso, esta sonda puede usarse con el fin que fue diseñada.

Tras observar el ensayo de expresión relativa del gen tripsinógeno en lavas de *C. trimaculatum*, podemos ver un patrón de comportamiento parecido a la expresión del mismo gen descrito en ontogenia inicial de otras especies como *Hipoglossus hipoglossus* (Murray, et al., 2004) *Lutjanus guttatus* (Galaviz, et al., 2011), *Sphoeroides annulatus* (Gasca, et al., 2005), *Totoaba macdonaldi* (Galaviz, et al., 2015) y *Petenia splendida* (Arévalo, 2009). Si bien la expresión génica es específica en cada especie, puede estar influenciada por diversos factores como el desarrollo del sistema digestivo, la composición de los alimentos suministrados y los protocolos de alimentación (Péres, et al., 1998; Zambonino and Cahu, 2001; Gawlicka, et al., 2006). Esta coincidencia que presenta el patrón de expresión, es el que nos permite adjudicar el origen pancreático del gen (Young, et al., 2017; Srivastava, et al., 2002); el cual, será funcional en las primeras etapas de desarrollo, comenzaría la secreción de zimógenos (Murray, et al., 2004) bajo las mismas condiciones que en el resto de especies.

Al comparar los datos obtenidos de la expresión relativa del tripsinógeno, con el comportamiento de la actividad enzimática de tripsina en la ontogenia inicial de *C. trimaculatum* descrita por Toledo-Solís et al., (2013), podemos observar un patrón similar. En ambos casos, se observa una expresión y actividad enzimática casi nula en los primeros días de siendo, a partir del día 6, cuando se detecta la expresión (tripsinógeno) y paralelamente la elevación de la actividad enzimática (tripsina), coincidiendo todo ellos con el comienzo de la alimentación exógena (nauplios de *Artemia sp.*). Finalmente, el gen encuentra su máxima expresión en el día 15 de después de suministrar alimento balanceado, coincidiendo nuevamente con el máximo de actividad enzimática obtenida en el experimento de Toledo-Solís et al., (2013). Por su parte, Karp (2009), menciona que primero tienen que haber una expresión de la proenzima (zimógeno) para que pueda existir una actividad

enzimática, por tanto, los resultados obtenidos en este trabajo muestran, que el proceso de digestión es llevado a cabo, en primer instancia, por las enzimas de origen pancreático como en otros estudios previamente realizados (Zambonino-Infante & Cahu 2001; Toledo-Solís *et al.*, 2013). Por otro lado, el patrón observado en la expresión en los primeros días dde tiene un comportamiento basal o casi nulo. Sin embargo, esas pequeñas variaciones pueden ser debidas a la carga genética que es transmita por los progenitores (García-Gasca *et al.*, 2006), posteriormente se produce un incremento asociado a la funcionalidad del páncreas y por último un descenso en la expresión para mantenerse constante o fluctuante durante el crecimiento (Galaviz, *et al.*, 2012; Lucero, 2016).

Para que las larvas puedan realizar sus funciones vitales una vez eliminado el saco vitelino, es imprescindible una maquinaria que se encargue de la digestión de los alimentos. En el caso de la proteína, las larvas necesitan las proteasas y peptidasas para realizar esta función (Zambonino-Infante & Cahu, 2001). Algunos ejemplos de estos tipos de enzimas es la tripsina, la cual es una enzima digestiva perteneciente a las endopeptidasas, cuya función es la ruptura de enlaces peptídicos de proteínas mediante hidrólisis, para formar péptidos de menor tamaño o aminoácidos. Dicha enzima es sintetizada en el páncreas en forma de tripsinógeno, (enzima inactiva) y secretada en el duodeno (parte del intestino), donde es una parte fundamental para la digestión, ya que es una de las primeras enzimas digestivas capaces de hidrolizar las proteínas provenientes del alimento. Además, tanto su actividad enzimática como su expresión genómica, pueden ser utilizadas como un indicativo del proceso de desarrollo y funcionalidad del sistema digestivo (Cao, *et al.*, 2000; Moyano, *et al.*, 2005).

Añadido a esto, en estas etapas larvarias, la capacidad de degradación de las macromoléculas es limitada y en general se procede a la degradación de los nutrientes mediante absorción por pinocitosis en los enterocitos y posterior degradación mediada por enzimas intracelulares; pero en este caso su eficiencia es generalmente escasa para desenvolverse con un alimento externo. Por ello, este análisis molecular podría servir de herramienta para describir y determinar el momento adecuado en que los peces cuentan con su sistema digestivo completo y

funcional (Chen, 2016; Guerrero-Olazarán, 2004) para facilitar que en el cultivo larvario, se puedan realizar protocolos de alimentación y dietas que permitan su producción masiva en mayor cantidad de individuos para las próximas etapas del cultivo.

VII.- Conclusión

En el presente trabajo de investigación se concluye lo siguiente:

- 1) Se obtuvo una secuencia parcial de 414 pares de bases del gen tripsinógeno en juveniles de *C. trimaculatum*, la cual codifica para 137 aminoácidos de la enzima tripsina.
- 2) La fracción del gen tripsinógeno en *C. trimaculatum* presenta una similitud mayor al 90% con otros peces de la familia Cichlidae, lo cual refleja lo conservativo que es el gen en estas especies.
- 3) Se encontró una relación entre la expresión relativa del gen tripsinógeno y la actividad enzimática de tripsina en la ontogenia inicial de *C. trimaculatum*. Al mismo tiempo, se observaron cambios en los niveles de expresión cuando se realizan las pautas de alimentación en el larvicultivo, lo cual indica que existe una inducción a la síntesis de tripsinógeno debido a factores como el desarrollo digestivo y el suministro de alimento; de igual forma se concluye que tripsina es una enzima de gran importancia en esta especie, debido a su funcionalidad en la degradación de alimento en las primeras etapas de vida.

VIII.- REFERENCIAS

Álvarez González, C.A. (2003). Actividad enzimática digestiva y evaluación de dietas para el destete de larvas de la cabrilla arenera *Paralabrax maculatofasciatus* (Percoidei: serranidae). Tesis doctoral. Centro interdisciplinario de ciencias marinas, Instituto Politécnico Nacional, México. 180 p.

Álvarez González, C.A., Gaxiola Cortés, G., Jiménez Martínez, L.D., Sánchez Zamora, A., Arena Ortiz, L., Martínez Bruguete, T., Tovar Ramírez, D., Concha Frías, B., Márquez Couturier, G., Perales García, N., Asencio Alcuía, G.G., Jesús Ramírez, F. (2010). Avances en la fisiología digestiva del robalo blanco (*Centropomus undecimalis*) en Tabasco, México. Memorias del Décimo Simposio Internacional de Nutrición Acuícola, 8-10 de Noviembre, San Nicolás de los Garza, N. L., Universidad Autónoma de Nuevo León, Monterrey, México, pp. 98-231.

Álvarez González, C.A., Márquez Couturier, G., Arias Rodríguez, L., Contreras Sánchez, W. M. Uscanga Martínez, A., Perales García, N., Moyano López, F. J., Hernández Jiménez, R., Civera Cerecedo, R., Goytura Bores, E., Isidro Olán, L., Almeida Madrigal, J. A., Tovar Ramírez, D., Gutiérrez Ribera, J.N., Arévalo Galán, L., Enric, G., Treviño, L. y Morales Sánchez, B. (2010). Avances en la fisiología digestiva y nutrición de la mojarra tenguayaca *Petenia splendida*. IX Simposio Internacional de Nutrición Acuícola. Universidad Autónoma de Nuevo León. Monterrey, México.

Arévalo Galán, L.M. (2009). Expresión del gen de tripsina durante la ontogenia inicial de la mojarra tenguayaca *Petenia splendida*. Tesis de Licenciatura. Universidad Juárez Autónoma de Tabasco, División Académica de Ciencias Biológicas. México. 52 p.

Avalos Sánchez, A.M. (2006). Digestibilidad in vitro de dietas con diferentes combinaciones de ligantes diseñadas para larvas juveniles de pescado blanco del lago Pátzcuaro *chirostoma estor estor* (Jordan 1879). Tesis de licenciatura. Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo. Morelia, Michoacán, México. 53 p.

Bustin, S, A., Benes, V., Garson, J., Hellemans, J., Huggett, J., Kubista, M., Mueller, R., Nolan, T., Pfaffl, M., Shipley, G., Vandesompele, J. and Wittwer, C. (2009). The MIQE Guidelines: Minimum Information for Publication of Quantitative Real-Time PCR Experiments. *Clinical Chemistry*. DOI: 10.1373/clinchem.2008.112797

Cao, M.J., Osatomi, K., Suzuki, M., Hara, K., Tachibana, K. and Ishihara, T. (2000). Purification and characterization of two anionic trypsin from the hepatopáncreas of carp. *Fisheries Science*. 66, 1172-1179.

Chen J., Yinglei L., Junbin Z., Huifen L. and Yongqi L. (2016). Identification and expression analysis of two Wnt4 genes in the spotted scat (*Scatophagus argus*). *Electronic Journal of Biotechnology*. China.

Corona Santoyo, G.A. (2005). Diversidad íctica en ríos de la vertiente del pacífico de Chiapas. Laboratorio de Ictiología, Depto. Zoología, ENC, IPN. México. Volumen 6. Número 8. ISSN: 1067-6079.

Darias, M.J., Murray, H.M., Martínez Rodríguez, G., and Cárdenas Yúfera, M. (2005). Gene expression of pepsinogen during the larval development of red porgy (*Pagrus pagrus*). *Aquaculture* 248, 245–252 p.

Devlin T. M. (2004). *Bioquímica: libro de texto con aplicaciones clínicas*. MCP Hahnemann University. Editorial Reverté. Filadelfia, Pennsylvania. ISBN 8429172084. 1216 p.

Douglas, S.E., Mandla, S. and Gallant, J.W. (2000). Molecular analysis of the amylase gene and its expression during development in the winter flounder, *Pleuronectes americanus*. *Aquaculture* 190, 247-260 p.

FAO. (2014). El estado mundial de la pesca y la acuicultura: oportunidades y desafíos. Organización de las naciones unidas para la alimentación y la agricultura. Roma. 274 p. Disponible en: <http://www.fao.org/3/a-i3720s.pdf> (consultado el día 30 de Enero del 2016).

FAO. (2015). Panorama de la Inseguridad Alimentaria en América Latina y el Caribe. *Panorama de la Inseguridad Alimentaria en América Latina y el Caribe*. 78

p. Disponible en: <http://www.fao.org/3/a-i3720s.pdf> (consultado el día 27 de Septiembre del 2016).

Galaviz, M. A., García-Ortega, A., Gisbert, E., López, L.M. y García Gasca, A. (2012). Expression and activity of trypsin and pepsin during larval development of the spotted rose snapper *Lutjanus guttatus*. Facultad de Ciencias Marinas, Universidad Autónoma de Baja California. Ensenada B.C. México. Comparative Biochemistry and Physiology, Part B 161 9–16.

Galaviz, M. A., López, L.M. García Gasca, A., Álvarez González C.A. and Gisbert, E. (2015). Digestive system development and study of acid and alkaline protease digestive capacities using biochemical and molecular approaches in totoaba (*Totoaba macdonaldi*) larvae. Fish Physiol Biochem. DOI 10.1007/s10695-015-0073-6.

Galaviz, M.A., López, L.M., Sandoval, G., García Gasca, A., Gisbert, E. and Álvarez C.A. (2013). Expression and activity of three digestive proteases in larvae of the totoaba (*Totoaba macdonaldi*). larvi '13 – fish & shellfish larviculture symposium. European Aquaculture Society, Special Publication No. XX, Oostende, Belgium.

García Gasca, A., Galaviz, M.A, Gutiérrez, J.N. and García, O.A. (2006) Development of the digestive tract, trypsin activity and gene expression in eggs and larvae of the bullseye puffer fish *Sphoeroides annulatus*. Aquaculture 251: 366-376.

Gawlicka, A.K. and Horn, M.H. (2005). Trypsin Gene Expression by Quantitative In Situ Hybridization in Carnivorous and Herbivorous Prickleback Fishes (Teleostei: Stichaeidae): Ontogenetic, Dietary, and Phylogenetic Effects. Physiological and Biochemical Zoology. 79(1):120–132.

Gawlicka, A.K., Leggiadro, C.T., Gallant, J.W., Douglas, S.E. (2001). Cellular expression of the pepsinogen and gastric proton pump genes in the stomach of winter flounders determined by in situ hybridization. J. Fish Biol. 58, 529–536 p.

Gisbert, E., Fernández I., y A. Estévez. (2008). Nutrición y morfogénesis: Efecto de la dieta en la calidad larvaria en peces. IX Simposio internacional de nutrición acuícola. Universidad autónoma de Nuevo León. Monterrey, México.

Guerrero Zarate R. (2010) Evaluación de la capacidad digestiva del pejelagarto (*Atractosteus tropicus*). Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional. Mérida, Yucatán. 112 p.

Jiménez Martínez, L. D., Álvarez González, C. A., Tovar Ramírez, D., Gaxiola, G., Sánchez Zamora, A., Moyano, F. J., Alarcón, F. J., Márquez Couturier, G. (2012). Digestive enzyme activities during early ontogeny in Common snook (*Centropomus undecimalis*). *Fish Physiol Biochem* (2012) 38:441–454. DOI 10.1007/s10695-011-9525-9.

Karp, G. (2009). Quinta edición: Biología Celular y Molecular, conceptos y experimentos. Editorial Mc Graw-Hill interamericana. México 869 p.

Larsen, P. F., Schultes, P.M., and Nielsen, E.E. (2011). Gene expression analysis for the identification of selection and local adaptation in fishes. *Journal of Fish Biology* 78, 1–22. Doi:10.1111/j.1095-8649.2010.02834.

Lehninger, A.L., (1984). Bioquímica. Omega, Barcelona, España. 1198 pp.

López Gonzales, B.A. (2009). Evaluación de la digestibilidad de subproductos de Cártamo *Carthamus tinctorius* como componente proteínico para la alimentación de juveniles de tilapia *Oreochromis niloticus*. Tesis de licenciatura. Universidad Juárez Autónoma de Tabasco, División Académica de Ciencias Biológicas. Villahermosa, Tabasco. 88 p.

López Ramírez, G., Cuenca Soria, C.A., Álvarez González, C.A., Tovar Ramírez, D., Ortiz Galindo, J.L., Perales García, N., Márquez Couturier, G., Arias Rodríguez, L., Indy, J.R., Contreras Sánchez, W.M., Gisbert, E. and Moyano, F.J. (2011). Development of digestive enzymes in larvae of mayan cichlid *Cichlasoma urophthalmus*. *Fish Physiol Biochem* 37:197-208 p.or

Lorca Domínguez, A. (2014). Evaluación de alimentos microparticulados para el larvicultivo de la mojarra tenguayaca (*Petenia splendida*). Tesis de licenciatura.

Universidad Autónoma de Tabasco, División Académica de Ciencias Biológicas. Villahermosa, Tabasco. 52 p.

Lucero Rivera, Y.E. (2016). Estimulación temprana de la maduración digestiva en larvas de *Lutjanus guttatus*, (Steindachner, 1869). Centro de investigaciones biológicas del noroeste. Baja California Sur, México.

Manríquez Santos, T. Cruz Suárez, L.E., Ricque Marie, D., Tapia Salazar, M., Nieto López, M.G., Villarreal Cavazos, D. A., Gamboa Delgado, J. y Hernández Hernández, L. (2011). Caracterización de enzimas digestivas, digestibilidad in vitro y síntesis de ADNc del gen de tripsina en adultos de la pigua *Macrobrachium carcinus*. Avances en Nutrición Acuícola XI - Memorias del Décimo Primer Simposio Internacional de Nutrición Acuícola, 23-25 de Noviembre, San Nicolás de los Garza, N. L., México. ISBN 978-607-433-775-4.

Martínez Burguete, T. (2012). Expresión de enzimas digestivas durante la ontogenia inicial del robalo blanco (*Centropomus undecimalis*). Tesis de licenciatura. Universidad Autónoma de Chiapas, Centro de Biociencias. Tapachula, Chiapas. 46 p.

Martínez Portela, P. y Figueras Huerta, A. (2007). Genética y Genómica en Acuicultura. Ministerio de agricultura, pesca y alimentación. Madrid, España. ISBN: 978-84-00-08553-7. 889 p.

Mathews, C.K., y Van Holde, K.E. (2001). Bioquímica. Mc Graw-Hill Interamericana. Madrid, España. 1283 p.

Miller, R.R., Minckley, W.L. y Norris, S.M. (2009). Peces Dulceacuícolas de México. Comisión Nacional para el conocimiento y Uso de la Biodiversidad. El Colegio de la Frontera Sur. Sociedad Ictiológica Mexicana, A.C. Desert Fishes Council. México. 559 p.

Müller, E. W. (2008). Bioquímica: Fundamentos para la medicina y ciencias de la vida. Editorial Reverté. Barcelona, España. ISBN: 9788429173932. 658 p.

Moguel Hernández, I., Peña, R. Andree K.B. Tovar Ramírez, D., Bonacic K. Dumas S. Gisbert, E. (2016). Ontogeny changes and weaning effects in gene

expression patterns of digestive enzymes and regulatory digestive factors in spotted rose snapper (*Lutjanus guttatus*) larvae. Fish Physiol Biochem. DOI 10.1007/s10695-016-0220-8.

Moyano, F.J., Barros, A.M., Prieto, A., Cañabate, J.P. y Cárdenas, S. (2005). Evaluación de la ontogenia de enzimas digestivas en larvas de hurta, *Pagrus auriga*. AquaTIC 22, 39-47.

Moyano L.F.J. (2006). Bioquímica Digestiva en Especies Acuicultivadas: Aplicaciones en Nutrición. En editores: Cruz S.E., Ricque M.R., Tapia S.M., Nieto L.M.G., Villareal C.D., Puello, C.A.C., y García, O.A. Avances en Nutrición Acuícola VII. VIII Simposium Internacional de Nutrición Acuícola. 15-17 Noviembre. Universidad Autónoma de Nuevo León, Monterrey, Nuevo León, México. ISBN 970-694-333-5. 14 p.

Murray, H.M., Gallant, J.W., Pérez-Casanova, J.C., Johnson, S.C., Douglas, S.E., (2003). Ontogeny of lipase expression in winter flounder. Journal of Fish Biology 62, 816–833.

Murray H.M., Pérez-Casanova J.C., J.W. Gallant, S.C. Johnson, and S.E. Douglas. (2004). Trypsinogen expression during the development of the exocrine pancreas in winter flounder (*Pleuronectes americanus*). Comparative Biochemistry and Physiology. doi:10.1016/j.cbpb.2004.02.020.

Murray H.M., Gallant J.W., Johnson S.C. and Douglas S.E. (2005). Cloning and expression analysis of three digestive enzymes from Atlantic halibut (*Hippoglossus hippoglossus*) during early development: Predicting gastrointestinal functionality. Aquaculture. Doi:10.1016/j.aquaculture.2005.03.030.

Orellana Amador, J.J. (1992). Inventario preliminar de los peces de agua dulce y marinos de El Salvador, América Central. Secretaría Ejecutiva del Medio Ambiente.

Ortiz Cruz, V.M. (2001). Análisis del crecimiento y madurez sexual de *Cichlasoma trimaculatum* (günther, 1867) de la subcuenca río Atoyac-paso de la reina de la

cuenca río Atoyac, Oaxaca. Centro interdisciplinario de investigación. IPN. Santa Cruz Xoxocotlán, Oaxaca.

Paz, R. (2014). Efecto del DHA sobre la expresión de la desaturasa durante del desarrollo larvario del pargo amarillo *Lutjanus argentiventris*. CIBNOR. Baja California Sur, México.

Perales García, N. (2009). Ontogenia enzimática de la mojarra tenguayaca *Petenia splendida*. Tesis de maestría. Universidad Juárez Autónoma de Tabasco, División de Académica de Ciencias Biológicas. Villahermosa, Tabasco, México. 94 pp.

Péres, A, Zambonino, J.L. and Cahu, C. (1998) Dietary regulation of activities and mRNA levels of trypsin and amylase in sea bass (*Dicentrarchus labrax*) larvae. Fish Physiol Biochem 19: 145-152.

Pérez, C.J.C., Murray, H.M., Gallant, J.W., Ross, N.W., Douglas, S.E., Johnson S.C., 2006. Development of the digestive capacity in larvae of haddock (*Melanogrammus aeglefinus*) and Atlantic Cod (*Gadus morhua*). Aquaculture 251, 377-401.

Rican, O., Piálek, L., Dragová, K. & Novák, J. (2016). Diversity and evolution of the Middle American cichlid fishes (Teleostei: Cichlidae) with revised classification. Department of Zoology, Faculty of Science, University of South Bohemia. Vertebrate zoology. ISSN 1864-5755.

Rodríguez Casariego, J., Perdomo Morales, R. y Perera, E. (2012) Purificación de isoformas de proteasas tipo tripsina de crustáceos. Centro de Investigaciones Marinas, Universidad de la Habana. La Habana, Cuba. ISSN: 1991-6086.

Sáenz de Rodrigáñez, M., Alarcón, F.J., Martínez, M.I., Ruiz, F., Díaz, M. y Moyano, F.J. (2005). Caracterización de las proteasas digestivas del lenguado senegalés *Solea senegalensis* Kaup, 1858. Boletín del instituto español de oceanografía. ISSN: 0074-0195.

Sainz Hernández, J.P. (2004). Tripsina en crustáceos: caracterización y modulación. Centro de investigaciones biológicas del noroeste. Baja California, México.

Solomon, E.P., Berg, L.R., Martin, D.W. y Villé, C. (1998). Biología de Villé. Editorial Mc. Graw-Hill Interamericana. 4ª Edición.

Toledo Solís, F.J. (2013). Ontogenia y caracterización de las enzimas digestivas de *Cichlasoma trimaculatum* (mojarra tahuina). Tesis de maestría. Universidad Juárez Autónoma de Tabasco, División Académica de Ciencias Biológicas. Villahermosa Tabasco. 105 p.

Uscanga Martínez, A. (2010). Resumen: situación actual del cultivo de especies nativas en Chiapas. Primer foro de la red Chiapas en pesca y Acuicultura. Universidad de Ciencias y Artes de Chiapas. Chiapas, México.

Uscanga Martínez, A., Perales García, N., Álvarez González, C.A., Moyano, F.J., Tovar Ramírez, D., Gisbert, G.E., Márquez Couturier, G., Contreras Sánchez, W.M., Arias Rodríguez, L. and Indy, J.R. (2011). Changes in digestive enzyme activity during initial ontogeny of bay snook *Petenia splendida*. Fish Physiol Biochem 37:667–680 p.

Velázquez Velázquez, E. (2013). Resumen: Estado actual de la pesca y acuicultura en Chiapas. Universidad de Ciencias y artes de Chiapas. Chiapas, México. 41 p.

Vidal López, J. M., Contreras Sánchez, W. M., Álvarez Gonzalez, C. A. y Hernández, U. (2009). Técnicas de reversión sexual aplicadas a la acuicultura. Universidad Juárez Autónoma de Tabasco. Villahermosa, Tabasco.

Violante González, J., Aguirre Macedo, M.L. y Rojas Herrera, A. (2008). Comunidad de parásitos metazoarios de la charra *Cichlasoma trimaculatum* en la laguna de Tres Palos, Guerrero, México. Revista Mexicana de Biodiversidad 79: 405-412.

Violante Gonzales, J. (1995). Contribución al conocimiento de la biología de la mojarra nativa *Cichlasoma trimaculatum* en la laguna de tres palos Guerrero,

México y determinación del desarrollo larvario y requerimientos proteicos. Tesis de maestría. Universidad de Colima. Manzanillo Colima. 70 p.

Young, M. L., Jeon, H. L., Jae, K. N., Hyun, C. K., Choul-J, P., Jong, W., Gyeong E. N. & Kyung, K. K. (2017). Temporal expression analyses of pancreatic and gastric digestive enzymes during early development of the olive flounder (*Paralichthys olivaceus*). *Aquaculture Research*. 48, 979–989. Doi:10.1111/are.12940.

Zambonino Infante, JL, and Cahu, C.L. (2001) Ontogeny of the gastrointestinal tract of marine fish larvae. *Comp. Biochem. Physiol C130*: 477-487.

Zambonino Infante, JL, Gisbert, E., Sarasquete, S., Navarro, I., Gutiérrez, J. and Cahu, C.L. (2008). Ontogeny and physiology of the digestive system of marine fish larvae. In: Cyrino J. E. P., D. Bureau, B. G. Kapoor (eds.) *Feeding and Digestive Functions in Fishes*, pp. 281-348. Science Publishers, Enfield, NH.

VIII-. ANEXOS

Anexo 1.- Protocolo de extracción de ARN

(PureLink® RNA Mini Kit Código 12183018A)

1. Preparación de buffer de lysis

- Por un volumen de 1 ml del buffer de lysis se agregan 10 μ l de 2-mercaptoetanol.

Tabla 1.- Proporción del volumen de buffer de lysis por la cantidad en muestra del tejido.

Tejido	Buffer de lysis
Menor a 10 mg	0.3 ml de Buffer de lysis.
De 10 a 30 mg	0.6 ml de Buffer de lysis.
De 30 a 200 mg	0.6 ml de Buffer de lysis (por cada 30 mg de tejido).

2. Colocar el tejido en un tubo eppendorf y agregar 350 μ l de buffer de lysis con 2-mercaptoetanol.
3. Lisar la muestra hasta homogenizarla, utilizando la puntilla de la micropipeta (hasta que la mezcla pase 10 veces por puntilla) o utilizar un micropistilo para disgregar por completo la muestra.
4. Centrifugar la mezcla lisada a 12,000 rcf por 5 minutos a 4°C (puede centrifugarse a temperatura ambiente).
5. Transferir los 350 μ l del sobrenadante a un tubo limpio.
6. Agregar un volumen (350 μ l para ésta reacción) de etanol al 70% (de preferencia mantener el frío el etanol) y agitar con la mano de arriba hacia abajo de 3 a 5 veces.
7. Transferir los 700 μ l de muestra a la columna (colocar en el centro de la columna el volumen).
8. Centrifugar a 12,000 rcf por 1 minuto a 4 °C y decantar el filtrado (golpear de 2 a 3 veces la columna sobre un papel para sacar la mayor parte del filtrado)
9. Colocar 700 μ l de buffer de lavado I al centro de la columna.
10. Centrifugar a 12,000 rcf por 1 minuto a 4 °C y decantar el filtrado (golpear de 2 a 3 veces la columna sobre un papel para sacar la mayor parte del filtrado).

11. Añadir 500 μ l de buffer de lavado II (colocar al centro el volumen de lavado II).
12. Centrifugar a 12,000 rcf por 1 minuto a 4 °C y decantar el filtrado (golpear de 2 a 3 veces la columna sobre un papel para sacar la mayor parte del filtrado). Repetir 2 veces el paso 12 y el paso 13.
13. Insertar la columna a un tubo limpio y agregar 40 μ l de agua libre de RNasas (RNase-free water).
14. Dejar incubar por 1 minuto a temperatura ambiente.
15. Centrifugar a 12,000 rcf por 2 minutos a 4 °C.
16. Descartar la columna y guardar el producto de ARN a -80 °C para uso posterior. En caso de ocuparse en el momento mantener el frío.

Anexo 2.- Protocolo de Síntesis de ADNc

(QuantiTect® Reverse Transcription Kit código 205310)

1. Cuantificar el ARN y realizar las conversiones correspondientes para agregar entre 1ng y 1µg de la muestra de ARN. En este caso se utiliza 1µg por reacción.
2. Preparar la siguiente reacción (Entire genomic DNA elimination reaction). Esta reacción se prepara por cada muestra de ARN a realizar la síntesis.

Tabla 1-. Datos del Genomic DNA elimination reaction para 1X

Componentes		Volumen
gDNA Buffer, 7x		2 µl (valor establecido)
ARN (Muestra)		- µl (valor Variable)
RNase-free water		- µl (valor Variable)
Volumen total por reacción		14 µl

- Se recomienda aplicar los componentes en el orden de Agua-Buffer-ARN.

Tabla 2.- Reacciones de cada órgano para la síntesis de cDNA de tahuina

	Estómago	Intestino	Páncreas
gDNA Buffer 7x	2 µl	2 µl	2 µl
ARN (muestra)	4 µl	2 µl	5 µl
RNase-free water	8 µl	10 µl	7 µl
Volumen total	14 µl	14 µl	14 µl

- 3.- Incubar las reacciones por 2 minutos a 42°C y posteriormente colocar en hielo o bien mantener las reacciones por 5 minutos a 4°C.
- 4.- Preparar las reacciones de Reverse-transcription reaction, esto se prepara para cada una de las muestras.

Tabla 3.- Datos de Reverse-transcription reaction para 1X

Componentes	Volumen
Reverse-transcription master mix	1 μ l
Quantiscript RT Buffer, 5x	4 μ l
Primer Mix	1 μ l
Total reaction volumen	6 μ l

Mezclar los volúmenes totales de las dos reacciones preparadas para obtener un volumen total de 20 μ l por reacción.

Tabla 4.- Master mix para la Reverse-transcription reaction para 1X

Entire genomic DNA elimination reaction	14 μ l
Reverse-transcription reaction	6 μ l
Volumen total	20 μ l

5.- Incubar la reacción por 15 minutos a 42°C, para llevar a cabo el proceso de síntesis ADNc.

6.- Incubar la reacción por 3 minutos a 95°C, para inactivar la enzima (Reverse-transcription).

7.- Almacenar a -20 °C, se recomienda alícuotas del producto obtenido para ser almacenado por largo tiempo. Si se usara en el momento mantener en hielo.

Anexo 3.- Protocolo de RT-PCR de ADNc

(HotStarTaq® DNA Polymerase código 203203)

1.- Desinfectar el área de trabajo con alcohol al 70% y los materiales deben estar esterilizados.

2.- Preparar el mix para las reacciones a realizar. En la tabla 1 muestra las condiciones con respecto al instructivo del kit.

Tabla 1. Indicaciones de concentraciones del instructivo.

Master mix		
Componentes	Volumen/reacción 1x	Concentración final
10x PCR Buffer	10 µl	1 X
dNTP mix (10 mM)	2 µl	200 µM
Primer Fw	Variable	0.1 – 0.5 µM
Primer Rw	Variable	0.1 – 0.5 µM
HotStarTaq Plus DNA Polymerase	0.5 µl	2.5 unidades/reacción
RNase-free water	Variable	-
ADNc	Variable	≤ 1 µg/reacción
Total volumen	100 µl	

Tabla 2. Preparación del master mix para las condiciones de *C. trimaculatum*.

Master mix	
Componentes	Volumen 1X
10x PCR Buffer	2.0 µl
dNTP mix	0.4 µl
Primer Fw (10 µM)	0.4 µl
Primer Rw (10 µM)	0.4 µl
MgCl ₂ (25 mM)	0.4 µl
RNase-free water	5.9 µl
HotStarTaq Plus DNA Polymerase	0.5 µl
Volumen total	10 µl

Nota: Se recomienda tener los reactivos en frío durante la preparación de la reacción.

4.- Preparas las muestras de ADN para la identificación de genes.

Tabla 3.- Condiciones de ADN para cada muestra.

	Muestra	Control negativo
ADNc	2 µl	- µl
H ₂ O	8 µl	10 µl
(libre de ADNasas)		
Volumen total	10 µl	10 µl

Nota: Se recomienda tener las muestras en frío durante su preparación.

5.- La reacción final por cada muestra es de 20 µl, conjunto de la mezcla de 10 µl del master mix más 10 µl de la muestra preparada. La cual se ingresó al termociclador bajo las siguientes condiciones.

Tabla 4.- Condiciones de la RT-PCR para del gen tripsinógeno en *C. trimaculatum*.

	Set 1		Set 2		Set 3	Set 4
Temperatura	95 °C	95 °C	58 °C	72 °C	72 °C	4 °C
Tiempo	15 min	30 seg	30 seg	30 seg	5 min	∞
Ciclos	1		38		1	1

6.- Los productos obtenidos son visualizados en un gel de agarosa.

Anexo 4.- Electroforesis para visualizar fragmentos de ADNc

(Gel de agarosa al 1.5%)

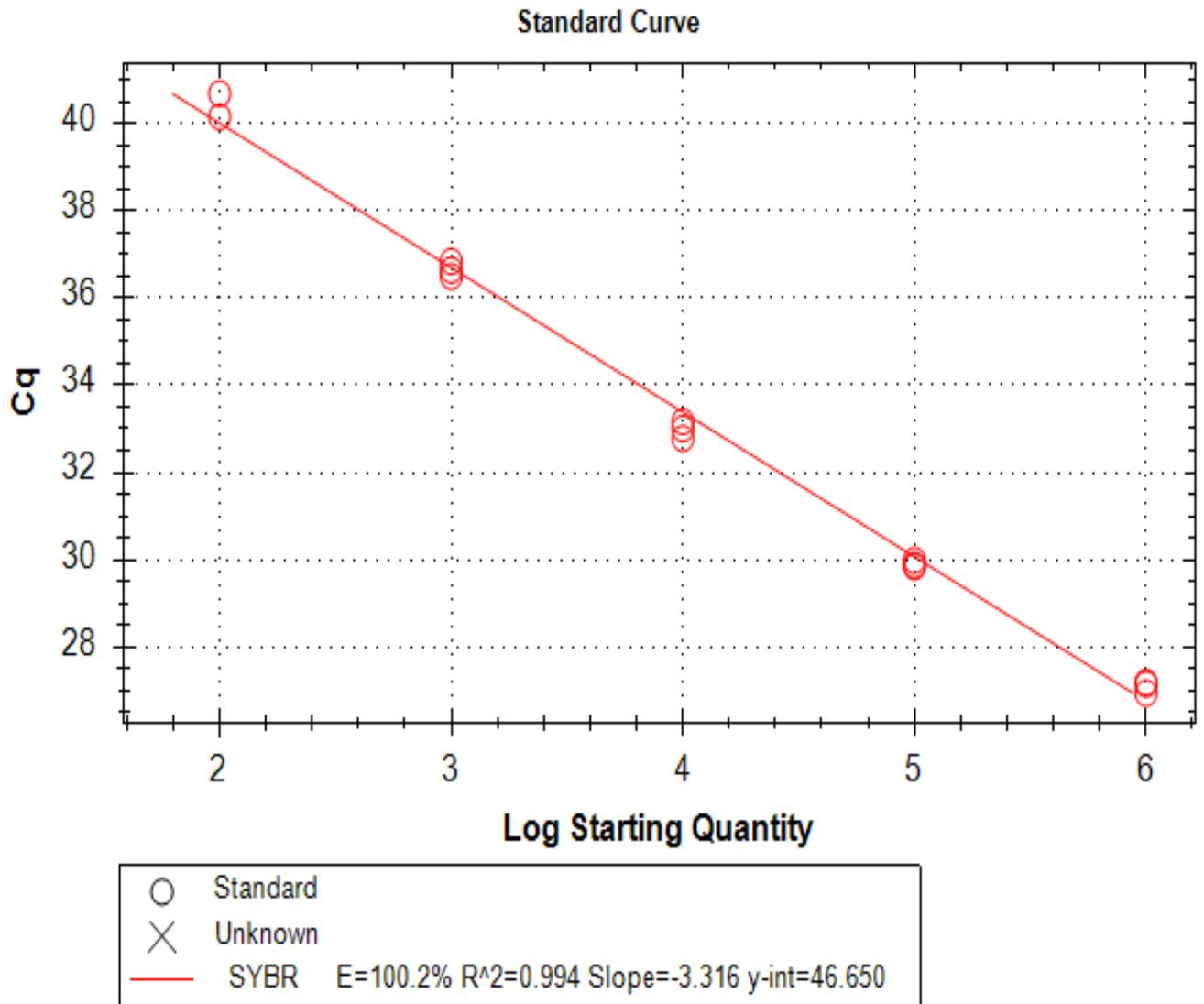
- 1.- Pesar 0.6 gr de agarosa y disolver en 40 ml de buffer TAE al 1X.
- 2.- Calentar hasta disolver la agarosa, la solución queda completamente transparente. (Si se calienta en microondas con 2 minutos es suficiente, se recomienda supervisar al 1er minuto que no se hayan formado grumos).
- 3.- Agregar 3 μ l de sybr safe para visualizar del ADNc (se recomienda dejar que se enfríe un poco la solución de agarosa para agregar el syber safe).
- 4.- Agitar hasta obtener una mezcla homogénea.
- 5.- Verter la mezcla a la cámara de electroforesis y colocar el peine.
- 6.- Cubrir de la luz el gel hasta que se solidifique.
- 7.- Colocar el gel en la cámara de electroforesis y agregar el buffer TAE 1X hasta cubrir por completo el gel.
- 8.- Colocar 3 μ l de buffer de carga a los 20 μ l de cada uno de los productos obtenidos en la RT-PCR (muestra).
- 9.- Inyectar 10 μ l de cada muestra por pocillos del gel (El volumen de inyección puede ser variable dependiendo del tamaño del pocillo).
- 10.- Inyectar 5 μ l del marcador molecular.
- 11.- Configurar la fuente de poder para el corrimiento del gel. En este caso se corrió a 100 volts por 35 min. (Las condiciones pueden variar dependiendo del producto esperado).
- 12.- Visualizar el gel de agarosa en un fotodocumentador con luz UV.

ANEXO 5.- Protocolo de extracción y purificación de ADNc del gel de agarosa

(PureLink® PCR Purification Kit Código: k3100-01)

1. 1.- Visualizar y ubicar las bandas de interés en el gel de agarosa.
2. Cortar las bandas de interés y colocarla en un tubo eppendorf de 0.6 ml con fibra de vidrio esterilizada (Este tubo debe estar perforado con un agujero pequeño en la punta del tubo).
3. Colocar el tubo de 0.6 ml dentro de un tubo de 1.5 ml y centrifugar la muestra a 14,000 rpm por 20 minutos a 5 °C.
4. Al producto filtrado se agregan 500 µl de buffer B2 (Blinding Buffer) y agitar unas 10 veces de arriba hacia abajo.
5. Transferir el volumen final a una columna del kit y centrifugar a 10,000 rpm por 1 minuto a 5 °C o temperatura ambiente.
6. Decantar el filtrado y reinsertar la columna dentro del mismo tubo.
7. Agregar 650 µl de buffer de lavado WI (buffer con etanol) y se centrifugar dentro de la columna a 10,000 rpm por 1 minuto a 5 °C o temperatura ambiente.
8. Decantar el filtrado y reinserta la columna en el mismo tubo.
9. Centrifugar a 14,000 rpm por 2 minutos a 10 °C.
10. Descartar el tubo con el filtrado y colocar la columna en un tubo limpio.
11. Agregar 50 µl de solución buffer e incubar por 1 minuto a temperatura ambiente.
12. Centrifugar a 14,000 rpm por 2 minutos a 10 °C.
13. Se obtendrán aproximadamente un volumen de 48 µl del producto de ADN y se recomienda almacenar -20 °C.

ANEXO 6.- Curva estándar de amplificaciones a partir de diluciones seriadas de cDNA de larvas de *C. trimaculatum* con concentración conocida. n=4



ANEXO 7.- Melting curve de q-PCR: oligonucleótidos de tripsinógeno durante la ontogenia inicial de *C. trimaculatum*

