

**UNIVERSIDAD DE CIENCIAS  
Y ARTES DE CHIAPAS**

**INSTITUTO DE CIENCIAS BIOLÓGICAS  
CENTRO DE INVESTIGACIONES COSTERAS**

**T E S I S**

**Selección de genes de referencia en  
distintos órganos de *Amphilophus  
trimaculatus*.**

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE**

**LICENCIADO EN BIOLOGÍA MARINA Y  
MANEJO INTEGRAL DE CUENCAS**

**PRESENTA**

**LAURA ALEJANDRA CIGARROA RUIZ**



**TONALÁ, CHIAPAS**

**SEPTIEMBRE DE 2019.**

# UNIVERSIDAD DE CIENCIAS Y ARTES DE CHIAPAS

INSTITUTO DE CIENCIAS BIOLÓGICAS  
CENTRO DE INVESTIGACIONES COSTERAS

## TESIS

**Selección de genes de referencia en  
distintos órganos de *Amphilophus  
trimaculatus*.**

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

PRESENTA

**LAURA ALEJANDRA CIGARROA RUIZ**

**DIRECTOR**

DR. FRANCISCO JAVIER TOLEDO SOLÍS  
LABORATORIO DE NUTRICIÓN Y SANIDAD ACUÍCOLA  
UNICACH

**ASESORES**

DR. LUIS DANIEL JIMÉNEZ MARTÍNEZ  
LABORATORIO DE BIOLOGÍA MOLECULAR  
DAMJ-UJAT

DR. CARLOS ALFONSO ÁLVAREZ GONZÁLEZ  
LABORATORIO DE ACUICULTURA TROPICAL  
DACBioI-UJAT

TONALÁ, CHIAPAS

SEPTIEMBRE DE 2019.





Universidad de Ciencias y Artes de Chiapas  
Dirección de Servicios Escolares  
Departamento de Certificación Escolar  
Autorización de impresión



Tonalá, Chiapas  
08 de septiembre de 2019

C. Laura Alejandra Cigarroa Ruíz

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:

Selección de genes de referencia en distintos órganos de *Amphilophus trimaculatus*

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

M. en C. Carlos Alberto Gellida Esquinca

M. en C. Delmar Cancino Hernández

Dr. Francisco Javier Toledo Solís

Firmas:

# *Agradecimientos*

Al centro de Investigaciones costeras 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 el apoyo y autorización de la realización del presente trabajo, específicamente al laboratorio de acuicultura tropical DACBIOL-UJAT, donde tuve la oportunidad reafirmar mis deseos y formar las bases con investigación y seguir en un futuro, gracias.

A la Academia Mexicana de Ciencias por permitir experimentar una estancia de verano de investigación científica.

A mi director de tesis el M en C. Francisco Javier Toledo Solís por su valiosa asesoría y orientación en este trabajo.

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

A mi maestro, el Dr. Miguel Sáenz de Rodrigáñez, por sus asesorías, confianza y gran paciencia, gracias.

Al Dr. Luís Daniel Jiménez Martínez por su colaboración y compartir los conocimientos, para realizar este trabajo, gracias.

A mi asesora externa Andrea Hilero Ruiz por compartir su conocimiento, tiempo, paciencia y las aventuras de este proceso, gracias.

A mi Maestro Gilberto Trinidad de Paz, que también contribuyó de gran amigo, apoyo y contribución económica, gracias.

A Jehová, mi familia espiritual y Madre que se preocuparon y aconsejaron durante esta travesía y lo siguen haciendo, que de algún modo también contribuyeron a que este proyecto fuese posible, Muchas gracias.

# ÍNDICE

Índice .....	i
Resumen.....	iii
I. INTRODUCCIÓN.....	1
II. MARCO TEÓRICO .....	4
2.1 Expresión génica .....	4
2.2 Expresión relativa .....	4
2.3 Genes de referencia.....	5
2.4 Normalización.....	6
III. ANTECEDENTES .....	8
3.1 Expresión de genes en peces.....	8
3.2 Estudios en <i>Amphilophus trimaculatus</i> .....	9
IV. OBJETIVOS .....	11
4.1 Objetivo General: .....	11
4.2 Objetivos específicos: .....	11
V. MÉTODOS.....	12
5.1 Obtención de organismos.....	12
5.2 Obtención de muestras de órganos y preparación de muestras .....	12
5.3 Extracción de ARN .....	12
5.4 Síntesis del ADNc.....	13
5.5 Diseño de primers para qPCR.....	13
5.6 Cuantificación de la expresión relativa.....	14
5.7 Análisis estadístico .....	15
VI. RESULTADOS.....	17
VII. DISCUSIÓN .....	23
VIII. CONCLUSIONES.....	29
IX. PROPUESTAS Y RECOMENDACIONES .....	30
X. BIBLIOGRAFÍA .....	31
XI.- ANEXOS.....	43
ANEXO 1. - Glosario.....	43
ANEXO 2.- Protocolo de extracción de ARN .....	47

ANEXO 3.- Protocolo de Síntesis de ADNc .....	49
ANEXO 4.- Protocolo de RT-PCR de ADNc .....	51
ANEXO 5.- Constancia verano de investigación.....	53

## RESUMEN

En los últimos años, la aplicación de las técnicas (RT-qPCR) para medir la expresión génica en diferentes áreas de investigación se ha incrementado debido al abaratamiento de las metodologías y al uso de los paquetes informáticos. Esto ha permitido la aplicación de estos estudios en diferentes campos de la ciencia, y por tanto también en la acuicultura. Para obtener un correcto análisis de los datos en los estudios de expresión génica, uno de los primeros trabajos que se debe realizarse es la identificación y la caracterización de los genes de referencia, los cuales son utilizados como calibradores en la cuantificación de la expresión de los genes de interés. Este tipo de estudios debe ser prioritario en las especies con potencial acuícola, que se encuentran en el desarrollo de los paquetes tecnológicos para su cultivo. Un ejemplo de ello es la mojarra Tahuina (*Amphilophus trimaculatus*), cíclido nativo de la región sur en México que presenta un gran interés por su consumo local de la zona costa del Estado de Chiapas. Es por ello, que en el presente trabajo se evaluó la estabilidad relativa de la expresión de seis potenciales genes de referencia (B2M, RPL, ACTB, GAPDH, FAC, 18S) mediante análisis de qPCR, en diferentes órganos (intestino, músculo, branquias, estómago, cerebro y páncreas) de juveniles de Tahuina. La estabilidad relativa de los seis genes de referencia varía en los distintos órganos; en intestino y tejido muscular los genes de referencia que presentaron una mejor estabilidad fueron B2M y 18S. Para branquias y páncreas, los más estables resultaron GAPDH y B2M. En el estómago los genes de referencia que presentaron una mejor estabilidad son ACTB, FAC y 18S. Mientras que en el cerebro, el gen de referencia que resultó con una mejor estabilidad es el FAC, en donde también se podría utilizar el RPL. La comparación de la estabilidad de la expresión de los genes de referencia estudiados entre los distintos tejidos de *A. trimaculatus*, indican que todos los genes de referencia presentaron diferentes variaciones de la transcripción, por lo que no debería utilizarse un solo gen transversal para el análisis de expresión génica en esta especie; sino, la combinación de dos o tres genes de referencia.

## I. INTRODUCCIÓN

La ciencia y el desarrollo, han ido de la mano con el objetivo fundamental de generar conocimiento que pueda tener aplicaciones funcionales para la vida. En este contexto, la ciencia se ha diversificado constantemente ejemplo de ello es la creación de herramientas biotecnológicas y bioinformáticas, las cuales han permitido generar gran cantidad de datos estructurales a nivel molecular de los distintos sistemas biológicos (Da Silva & Canduri, 2017). Gracias a dichas técnicas, se han desarrollado estudios que profundizan en la comprensión de los distintos procesos fisiológicos existentes en diferentes sistemas naturales. Dentro de estos estudios están los ensayos de expresión génica, una de las herramientas fundamentales, que incluye el estudio de genes o proteínas individuales hasta su interacción de las distintas rutas biológicas en las que participan (Díaz-Fernández *et al.*, 2016).

Desde esta perspectiva, los estudios en expresión de genes son cada vez más frecuentes y de una escala superior, debido a su utilidad a la hora de revelar procesos biológicos y sus interacciones con factores medioambientales (Díaz-Fernández *et al.*, 2016). Añadido a esto, dichas técnicas han sufrido un abaratamiento considerable en los últimos años que ha facilitado su utilización por un número cada vez mayor de grupos de investigación en los diferentes campos de la ciencia (Comisión Interministerial de Ciencia y Tecnología, 2003).

La aplicación de la herramienta PCR en distintos estudios de expresión génica, como es el caso de medicina utilizada para diagnóstico de enfermedades infecciosas o hereditarias además de identificar bacterias, virus y hongos causantes de las patologías (Acuña, 2007; García-Lugo, 2013). Así mismo, también sirve para medir los niveles de expresión de genes mutados, lo cual puede ayudar a determinar la susceptibilidad o predisposición a sufrir patologías cancerígenas (Mandal, 2008). Por otro lado, también se ha aplicado en otros campos tales como ciencias forestales, para estudiar los mecanismos que controlan la expresión génica de las enzimas implicadas para la asimilación de

amonio en coníferas, utilizando dichos estudios para evaluar posibles cambios en el metabolismo nitrogenado (Ávila, 2010). En el caso de peces, también ha sido aplicada esta metodología para analizar perfiles de expresión diferencial en peces cebras (*Danio rerio*) infectados con la bacteria *Listonella anguillarum*, lo cual contribuyó al diseño de nuevas estrategias para la selección de individuos resistentes en la industria piscícola (Rojo *et al.*, 2005).

Esta herramienta, es un conjunto de técnicas que se fundamentan en la biología molecular y usualmente es conocida como PCR por sus siglas en inglés; Polymerase Reaction Chain. El estudio de la estructura y la expresión de genes a nivel de células, se basa en la multiplicación de fragmentos específicos de la cadena de ADN para la obtención de cientos o miles de copias (Cortazar-Martínez A. & Silva-Rincón, 2004). Por tanto, la determinación del número de copias obtenidos se precisaría de una curva estándar de las cantidades incógnitas, por una cantidad conocida y la cuantificación del ácido nucleico mediante la normalización de éste con respecto a un gen de referencia, donde los resultados se documentan como un cambio en el número de veces en que un ARNm se expresa en cada muestra (Ibarra *et al.*, 2013).

Este método es considerado el más apropiado para la normalización de los datos, ya que evita la necesidad de una cuantificación de las muestras a estudiar y es especialmente útil en experimentos que se ven limitados por la cantidad de muestra inicial. No obstante, el inconveniente de utilizar este método cae en la necesidad de un gen de referencia (Pfaffl, 2001). Estos genes se usan a modo de calibradores, los cuales se expresan de forma constante e independiente del estado fisiológico de la célula. Existen distintos genes en cada organismo, órgano y en cada periodo de desarrollo de los mismos (Zheng *et al.*, 2011). Por lo tanto, uno de los primeros pasos para desarrollar estudios de expresión génica para una especie en concreto, es la identificación y caracterización de estos genes de referencia (Almudena-Pérez, 2015).

Estudios en peces, para *Ictalurus punctatus* (bragre de canal) enfatizan el requisito absoluto para validación de los procedimientos de normalización de datos de PCR en tiempo real a través de una variedad de tejidos sirviendo así, como una guía

para la selección del gen de referencia (Small *et al.*, 2008; Figueras & Novoa, 2014). En cíclidos, también se han realizado estudios para identificar genes de referencia potenciales para qPCR; un ejemplo es lo encontrado en Tilapia de Nilo (*Oreochromis niloticus*), para estudiar la expresión génica relacionada con la inmunología de peces (Geng-Yang *et al.*, 2013).

La especie utilizada para este estudio *Amphilophus trimaculatus*, es un cíclido nativo, distribuido de México hasta el Salvador apreciado debido a su consumo (Gómez-González *et al.*, 2005), y habita en cuerpos de agua como ríos, esteros y lagunas (Orellana-Amador, 1992; Miller *et al.*, 2009). Con anterioridad se ha descrito que esta especie presenta unas características que facilitan su cultivo a nivel experimental, como es su fácil manejo y aceptación de alimento balanceado (Violante-Gonzales, 1995). Lo cual, permite la disponibilidad de material biológico para realizar los distintos bio-ensayos en el área de acuicultura.

Es por ello que, en el presente trabajo se evaluó la eficiencia de distintos genes de referencia mediante análisis de qPCR, en los diferentes órganos de *Amphilophus trimaculatus*. En el área de acuicultura, la información generada será de gran importancia en futuros trabajos de nutrición que prueben nuevas materias primas, probióticos, prebióticos y en el sistema inmune, que integren análisis de biología molecular y de expresión génica. Sin embargo, como se han evaluado varios genes de referencia en órganos principales de esta especie, esta información podría utilizarse no solo en el área de acuicultura, sino en otras áreas como toxicología y neuroendocrinología.

## II. MARCO TEÓRICO

### 2.1 Expresión génica

Los organismos regulan sus actividades activando o desactivando la expresión de sus genes, siendo este proceso el medio que los organismos usan para codificar su ADN a ARN y así sintetizar las proteínas (Castanera-Andrés, 2011). Los genes que responden a mecanismos de regulación son llamados inducibles. Los genes cuya expresión se mantienen constante independientemente del estado fisiológico del organismo, son denominados constitutivos (Shapiro *et al.*, 1969; Scaltritti-Bentancur, 2016).

La expresión génica de la célula consta de tres etapas: Replicación, transcripción y traducción; la primera fase comienza en el núcleo de la célula para llegar al ribosoma creando copias secuencia a partir de un molde de ADN a una de ARN de cadena sencilla; el término engloba la activación de la proteína y se sitúa en regiones de acción (M-Bodine, 2016). La segunda etapa consta: de la transcripción, donde se genera una molécula llamada ARNm (Mensajero) el cual lleva la información para generar la proteína mientras que por otra parte, el ARNt (Transferencia) que se encuentra disperso en todo el citoplasma está asociado a diferentes tipos de aminoácidos. Por consiguiente, la última etapa consiste, en que ambas unidades se enlazan creando una unión que facilita el contacto de los aminoácidos de forma ordenada y secuencial dependiendo del ARNm acoplado al ribosoma. Este conjunto de aminoácidos finalmente origina las proteínas (Cavagnari, 2012; Hernández, 1994).

### 2.2 Expresión relativa

Los ensayos de expresión relativa tienen el objetivo de detectar diferencias cuantitativas en la expresión de genes en distintas situaciones (Pfaffl, 2001). Determina los cambios en los niveles de ARNm de un gen, en comparación de un gen o a varios genes de referencia esto se basa en los niveles de expresión de un gen de interés frente a la expresión basal de un gen de referencia lo cual puede

ser útil en muchos experimentos para conocer los cambios fisiológicos en los niveles de expresión génica (Pfaffl, 2004).

Las metodologías para cuantificar la expresión génica se basan en la reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real qPCR. Mediante esta técnica es posible amplificar un segmento de ADN de manera exponencial a partir de la síntesis de ARNm a ADNc (Rodríguez *et al.*, 2006). Se caracteriza por ser una técnica de alta sensibilidad, reproducibilidad y eficiencia, que genera resultados confiables en poco tiempo fáciles de analizar (Velasquillo *et al.*, 2013).

La herramienta consiste en la extracción de la ARN seguida de la síntesis del ADNc, finalmente la amplificación y cuantificación del producto debido a la fluorescencia incorporada en los nucleótidos utilizados. Para este proceso se utilizan tres etapas que forman un ciclo, siendo el número usual utilizado en los ensayos de entre 30 y 40 ciclos (García-Lugo *et al.*, 2013).

Cada ciclo está compuesto por;

- Desnaturalización: la primera etapa de los ciclos en una temperatura de 94° y 95° las hebras de ADN se separan.
- Alineación: los primers (cebadores u oligonucleótidos) reconocen a su temperatura de alineamiento sus posiciones formando enlaces de hidrogeno con la muestra de ADN.
- Elongación: La enzima polimerasa va añadiendo los dNTPs a la ADN molde (Asuar, 2007).

### **2.3 Genes de referencia**

En los estudios de expresión génica, es necesario contar con un control interno estable y de normalización un gen de referencia ideal se expresa en todo tipo de célula y su expresión puede variar en cada tejido (Vande0somepele *et al.*, 2002). A estos genes se les denomina, genes de referencia también conocidos como *housekeeping* o *genes control endógenos*; que sirven como calibradores, que se expresan de manera constante e invariable independiente del nivel fisiológico de la

célula (Almudena-Pérez, 2015) y con ello, eliminar la variación debida a posibles diferencias producidas por la degradación parcial del ARN (Castanera-Andrés, 2011).

Una vez identificados los genes con mejor estabilidad, se realiza la media geométrica de estos a partir de la cual se normalizaran los datos (Jo Vandesompele *et al.*, 2003). De modo que se obtiene un ranking con los genes más estables, permitiendo el uso de más de un gen de referencia recomendándose utilizar mínimo dos genes de referencia para la normalización.

## **2.4 Normalización**

La normalización es un proceso que permite identificar y eliminar errores sistemáticos no relacionados con el nivel de expresión de ARN en diferentes tejidos (Moreno, 2004).

El método de cuantificación relativa normalizada se basa en el modelo “Delta Delta Ct” desarrollado por PE Applied Biosystems (Perkin Elmer, Forster City, CA) (Castanera-Andrés, 2011). Los valores obtenidos para cada gen son normalizados con los niveles de Ct obtenidos para un gen calibrador, luego procedemos al cálculo del  $\Delta\Delta Ct$  (Schmittgen, 2001): Cuantificación  $2^{-\Delta\Delta Ct}$ , derivación del método anterior en este método que elimina la ecuación para calibrador y permita apreciar la expresión en verdadera magnitud, en lugar de normalizada a un valor constante de 1. Este modelo obtiene valores de expresión directamente proporcionales a la cantidad absoluta transcritos (Castanera-Andrés, 2011). El fin de realizar una adecuada normalización es permitir controlar la cantidad de material de partida, las variaciones en la eficiencia de amplificación y las diferencias entre muestras facilitándonos apreciar los datos cualitativos sin embargo, hay que tomar en cuenta que se debe tener cuidado a la hora de obtener datos cuantitativos (Rodríguez *et al.*, 2006).

El método  $\Delta\Delta\text{ct}$  se basa en el modelo Delta Ct desarrollado por PE Applied Biosystems (Perkin Elmer, Foster City, CA), comúnmente caracterizado por obtener cuantificaciones rápidas de muchos genes, al no tener en cuenta la eficiencia de la reacción. Los valores obtenidos para cada gen (gen de interés) son normalizados con los niveles de CT obtenidos para un gen calibrador (Castanera-Andrés, 2011; Cubillos-Rey *et al.*, 2012).

### III. ANTECEDENTES

#### 3.1 Expresión de genes en peces

Dentro de los trabajos involucrados en estudios de qPCR en peces, podremos mencionar algunos que son sobresalientes en genes de referencia como el Salmón atlántico (*Salmo salar*); donde se evaluaron seis genes de referencia potenciales (18s,  $\beta$ -actina, S20, GAPDH, EF1AA y EF1AB) en órganos como branquias, hígado, riñón de cabeza, bazo, timo, cerebro, músculo e intestino, con lo cual se pudo crear un ranking de los más estables y apropiados para ser considerados en cada órgano (EF1AB > EF1AA > S20 >  $\beta$ -actina > 18S ARNr > GAPDH) (Olsvik *et al.*, 2005). Otro ejemplo es el que se da en Pez Cebra (*Danio rerio*), caracterizando la expresión de ocho genes de referencia (TUBA1, GAPDH, G6PD, TBP, B2M, FA1 y 18S), con el fin de determinar la estabilidad de estos genes, una vez expuestos a la toxicidad por hormonas de cada uno de los tejidos examinados mostrándose que los genes más estables 18S, B2M y EF1 durante el desarrollo, sin embargo, después del tratamiento hormonal figuraron TUBA1, B2M y EF1, siendo notable la variable de diferentes genes en los diferentes tratamientos (McCurley & Callard, 2008).

También se han realizado algunos trabajos para analizar la estabilidad de los genes de referencia cuando los peces son expuestos a un agente infeccioso. En Lenguado japonés florida (*Paralichthys olivaceus*) se evaluó la expresión de los genes 18S ARNr, RPL17, ODC, GAPDH, eIF5A, ACTB, UBCE, TUBA, B2M, EF1A en diferentes tejidos (hígado, bazo, riñón, corazón, músculo, cerebro, Branquias, e intestino), en condiciones fisiológicas normales y tras una infección bacteriana (*Edwardsiella tarda*, vibriones; *Pseudomonas sp. Florida uorescens*, y *Streptococcus iniae*). La expresión se analizó bajo dos algoritmos de normalización, es decir geNorm y NormFinder resultando en condiciones fisiológicas normales, ACTB y UBCE como genes más estable y tras la infección bacteriana TUB analizado y normalizado con geNorm y NormFinder (Zheng *et al.*, 2011). Estudios similares se ha realizado en un cíclido como es Tilapia del Nilo

(*Oreochromis niloticus*), utilizando como agente infeccioso *S. agalactiae* y *S. iniae*, evaluándose los genes de referencia GAPDH, ACTB, UBCE, tuba, EF1A, B2M, y 18S ARNr. En este ensayo, los genes UBCE y 18S ARNr son los más expresados de forma estable a través de los diferentes tejidos en condiciones normales, mientras que el gen EF1A es el gen más adecuado para estudios en el corazón y músculo después de la infección con *Streptococcus iniae* y *Streptococcus agalactiae*, mientras GAPDH es el más adecuado para estudios en el intestino y el cerebro después de dicha infección. (Yang *et al.*, 2013). En ambos trabajos, la cuantificación de la expresión se realizó por qPCR, y los autores manifestando la importancia de estos trabajos para posteriores estudios relacionados con las patologías en el sector acuícola.

Otra aplicación de esta técnica se muestra en el trabajo de Llamas-Navarro, (2016) con el lenguado senegalés (*Solea senegalensis*) donde es utilizada para la búsqueda de formulaciones en las dietas con el fin de mejorar el crecimiento en algunas especies. La expresión de genes de crecimiento (Myod1, Myod2, MyLC2), examinada en 3 tejidos (músculo, páncreas y cerebro), permite observar que para el uso correcto de la técnica qPCR, es imprescindible disponer de los adecuados genes de referencia.

### **3.2 Estudios en *Amphilophus trimaculatus***

La mojarra Tahuina, anteriormente nombrada como *Cichlasoma trimaculatum*, actualmente nombrada como *Amphilophus trimaculatus* de acuerdo a lo descrito por Říčan *et al.*, (2016); es uno de los cíclidos nativos apreciados en la región sureste de México debido a su consumo local y su factibilidad para cultivo (Violante, *et al.*, 2008). Los pocos estudios sobre esta especie se han centrado en la descripción morfológica, hábitos alimenticios, requerimientos nutricionales, tolerancia a las salinidades, etapa de reproducción, parasitológicos, filogenéticos, acuícolas, entre otros (Gunther, 1867; Orellana-Amador, 1992. Por otra parte, Gómez-González *et al.*; (2005) quien realizó un estudio de la distribución y

abundancia de la especie, quien está distribuida en varias zonas del país, pero es en el estado de Chiapas donde se encuentra la mayor concentración de la especie, además, se sabe que la especie pertenece al grupo dulce acuícola, no obstante, de acuerdo a lo descrito por Miller *et al.*, (2009) la especie es capaz de tolerar cierta salinidades.

Algunos trabajos en el área de fisiología digestiva, describiendo la presencia de enzimas digestivas durante la ontogenia inicial y la caracterización de las mismas en la etapa juvenil, mostrando que las enzimas alcalinas y acidas están presentes en el sistema digestivo de la especie, en base a lo cual, se pudo concluir que esta especie parece tener hábitos omnívoros con tendencia carnívora (Toledo-Solís *et al.*, 2016). También se indica que el sistema digestivo es completamente funcional a partir del día 15 después de eclosión, encontrándose la presencia de algunas enzimas desde el 3 y 6 después de eclosión (Toledo-Solís *et al.*, 2015).

Se ha realizado dos trabajos en el área de biología molecular en esta especie. Uno de ellos, realizó la identificación parcialmente y cuantificación de la expresión del gen tripsinógeno precursor de la enzima tripsina, durante la ontogenia inicial de *A. trimaculatus*, utilizando como genes de referencia GAPDH y 18s (Hilero-Ruiz, 2017), detectándose niveles de expresión de este gen desde el día 3 dde, presentándose la máxima expresión el día 15 dde, justo cuando se suministraba alimento balanceado. Posteriormente, se logró la identificación parcial y cuantificación durante la ontogenia inicial de los genes pepsinógeno, quimotripsinógeno y  $\alpha$ -amilasa, en donde se encontró baja expresión durante los primeros días, pero este aumento con diferencias significativas para el día 6 dde ( $5.82 \pm 0.32$  mm); indicando la posible funcionalidad de algunos órganos del sistema digestivo. Los niveles de máxima expresión se obtienen próximos al día 15 dde ( $7.28 \pm 0.26$  mm), justo cuando el digestivo se encuentra desarrollado y la alimentación es exclusivamente con pienso comercial (Toledo-Solís, 2019).

## IV. OBJETIVOS

### 4.1 Objetivo General:

Evaluar la eficiencia de distintos genes referencia mediante qPCR, en diferentes órganos de juveniles de *Amphilophus trimaculatus*.

### 4.2 Objetivos específicos:

4.2.1 Cuantificar la expresión relativa de los genes de referencia 18S, GAPDH, FAC, ACTB, B2M, RPL18, en distintos órganos (Cerebro, Músculo, Páncreas, Estómago, Intestino y Branquias) de juveniles de *A. trimaculatus*.

4.2.2 Determinar la estabilidad de expresión los genes de referencia (18S, GAPDH, FAC, ACTB, B2M, RPL18), en Cerebro, Músculo, Páncreas, Estómago, Intestino y Branquias de juveniles de *A. trimaculatus*, mediante la plataforma de análisis Normfinder.

## V. MÉTODOS

### 5.1 Obtención de organismos

Los juveniles de *A. trimaculatus* ( $42.21 \pm 15.18$  g) se obtuvieron de un lote en cautiverio en el Laboratorio de Nutrición y Producción Acuícola del Centro de Investigaciones Costeras de la Universidad de Ciencias y Artes de Chiapas (UNICACH). Los organismos se mantuvieron en un tanque de cultivo de fibra de vidrio de 3 m de diámetro y 1 m de alto con sistema de recirculación y oxigenación constante, al cual se le realizó de forma diaria, recambios de agua de un 20%. Los organismos se alimentaron tres veces al día a saciedad aparente en los horarios de 09:00, 13:30 y 18:00 hrs. con alimento balanceado de la marca SilverCup® (32% de proteína y 5% de lípidos).

### 5.2 Obtención de muestras de órganos y preparación de muestras

Se tomaron cinco juveniles para la extracción de órganos, utilizándose un estuche de disección previamente esterilizado. La toma de tejido consistió en 350 mg de estómago, intestino, branquias, cerebro, hígado y músculo que, posteriormente, se preservaron en tubos Eppendorf® con 1.5 ml de solución estabilizadora (Invitrogen™ RNAlater™). Las muestras se mantuvieron 24 horas a temperatura ambiente y posteriormente se preservaron a  $-80^{\circ}\text{C}$  en un ultracongelador Thermo scientific® modelo Ultima plus hasta su posterior análisis.

### 5.3 Extracción de ARN

Los análisis moleculares, para determinar la expresión relativa de los genes de interés, se llevó a cabo en el Laboratorio de Bioquímica, de la División de Académica de Ciencias Biológicas, de la Universidad Juárez Autónoma de Tabasco (UJAT), Villahermosa, Tabasco, México.

El proceso de extracción de ARN de los tejidos a analizar, se realizó por pool siguiendo las indicaciones del kit PureLink® RNA Mini Kit código #12183018<sup>a</sup>.

Para la separación del ARN de los componentes celulares, se utilizó una centrífuga Eppendorf® modelo 5810-R a 12,000 RCF y temperatura de 4°C. Posteriormente el producto obtenido se cuantificó por Espectrofotometría, mediante un nanodrop Jenway® modelo Genova nano. Finalmente, el producto se conservó a -80°C en un ultracongelador Thermo scientific® modelo Ultima plus hasta posterior uso.

#### **5.4 Síntesis del ADNc**

El ADNc se sintetizó a partir de ARN total, siguiendo las especificaciones del kit de síntesis iScript™ cDNA Synthesis código #205310. Se realizaron reacciones de 20 µl para cada muestra con las cantidades correspondientes según la cuantificación del ARN obtenida. Para el proceso de síntesis de ADNc se usó un termociclador Eppendorf® modelo ag22331, bajo las siguientes condiciones descritas en el kit. El producto obtenido de ADNc se conservó a -80°C hasta posterior utilización.

#### **5.5 Diseño de primers para qPCR**

Se diseñaron primers específicos con una temperatura de alineamiento de 60°C y mediante el uso de softwares de libre acceso (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>). Posteriormente, gracias al programa Oligoanalyzer versión 3.1, BLAST y Primer3, se determinaron las temperaturas de alineamiento, contenido de C-G y por último la verificación de formación de dímeros (<https://www.idtdna.com/calc/analyzer>) (Hilerio-Ruiz, 2017).

La selección de los genes de referencia se realizó de acuerdo a los más utilizados en este tipo de investigaciones, así como aquellos genes de referencia que sean probado en cíclidos (Huggett *et al.*, 2005; Yang *et al.*, 2013). Los genes de referencia que se analizaron en los distintos tejidos de *A. trimaculatus* se muestran en la tabla 1.

Tabla 1.- Genes de referencia para qPCR evaluados en distintos órganos de juveniles de *Amphilophus trimaculatus*.

Símbolo	Nombre	Función	Temperatura	Secuencia
18s	ARN ribosómico 18S	Subunidad ribosomal	60°C	GGAGCCTGCGGCTTAATTTG AGCATGTCGGAGTCTCGTTC
FAC	Factor de elongación-1-a	Síntesis de proteínas	60°C	TCAAGGAAATCCGTCGTGGA ACGACGGTTCGATCTTCTCAAC
GAPDH	Gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa	Enzimas glicolíticas	60°C	ATTGCCCTCAACGACCACTT AAGAATGTGGGCAATGCGAC
B2M	segundo- 2-microglobulina	Subunidad pequeña de la MHC1	60°C	TGGACTTCCATGGCCTCAGA AGTAAGCTGGGCACGTTTCA
ACTB	segundo- actina	Proteína del citoesqueleto	60°C	GAGCTATGAGCTGCCTGATGG GTGGTCTCATGAATGCCACAGG
RPL18	Proteína Ribosomal 18	Componente estructural de la gran subunidad	60°C	AAATTGCTGTGTCGTGGGA GTGCCTTGTCTTTGGGAGA

## 5.6 Cuantificación de la expresión relativa

La cuantificación de la expresión relativa de los genes por qPCR se realizó a partir de ADNc de los diferentes órganos de *Amphilophus trimaculatus*. Las reacciones se llevaron a cabo en un termociclador BioRad® CFX96 Touch™ Real-Time con el fluoróforo de Bio-Rad® SsoFast™ SYBR® Green Supermix código #172-5271 mediante la preparación de una mezcla con un volumen total de reacción de 10 µl. Las condiciones estandarizadas para la programación del termociclador fueron: 1 ciclo de 95°C por 3 minutos, seguidos por una desnaturalización de 40 ciclos por 10 segundos a 95°C, posteriormente un alineamiento de 40 ciclos por 30 segundos a 64°C y finalizando con una lectura de la curva melting de 60 ciclos por .05 segundos en un rango de 60-95°C. Todo el proceso se realizó por triplicado.

Tabla 2.- Reacción para qPCR en distintos órganos de juveniles de *A. trimaculatus*

Solución 1x	Volumen ( $\mu$ l)
SYBR® Green Supermix	5.00
Oligonucleótidos SE	0.4
Oligonucleótidos AS	0.4
ADNc	1.00
H <sub>2</sub> O (libre de nucleasas)	3.2
Total	10.00

### 5.7 Análisis estadístico

El análisis se llevó a cabo tomando como referencia los lineamientos establecidos en la guía MIQE (Minimum information for publication of quantitative Real-Time PCR experiments) (Bustin *et al.*, 2009). La eficiencia de los genes de referencia se determinó mediante el análisis en la plataforma RefFinder: <http://leonxie.esy.es/RefFinder/?type=reference>; la cual realiza una evaluación integrando programas computacionales como geNorm, Normfinder y BestKeeper, para comparar y determinar la eficiencia de los genes de referencia analizados, ver tabla 3 (Xie *et al.*, 2012). NormFinder, software gratuito que analiza los datos de expresión obtenidos mediante cualquier método cuantitativo, por ejemplo, RT-PCR en tiempo real y expresión basada en microarrays introduce los datos Ct en una escala lineal, mediante el uso de una curva estándar 2-Ct (Andersen *et al.*, 2004).

Tabla 3. Principios de los métodos de análisis para la normalización de la expresión relativa.

<b>SOFTWARES</b>	
Normfinder	<ul style="list-style-type: none"> <li>✓ El método de NormFinder tiene la fuerza para diferenciar en la variación intra-grupal de la variación intergrupal y por lo tanto, una herramienta adecuada para identificar genes candidatos cuando son diferentes.</li> <li>✓ Es una herramienta adecuada para identificar genes candidatos cuando son diferentes grupos de muestra deben evaluarse. Pero requiere tamaños de muestra más grandes en comparación con geNorm.</li> <li>✓ Requiere que la entrada de datos sea de manera lineal, por lo tanto, los valores de Ct de una ejecución de RT-PCR en tiempo real no deben usarse directamente. Los valores de Ct se transforman en cantidades de expresión de escala lineal</li> </ul>
Genorm	<ul style="list-style-type: none"> <li>✓ Correlaciona por pares del algoritmo para muestras de tamaño pequeño, pero sesga la selección de salas de genes correlacionados.</li> <li>✓ La correlación por pares del algoritmo geNorm se sabe que es un algoritmo fuerte para tamaños de muestra pequeños, pero está sesgado hacia la selección de genes que están correlacionados entre sí (por ejemplo, expresados en la misma vía).</li> <li>✓ GeNorm proporciona un método basado en datos para definir este número óptimo basado en la variación por pares obtenida al comparar n versus n + 1 genes de referencia.</li> </ul>
BestKeeper	<ul style="list-style-type: none"> <li>✓ Es una aplicación de hoja de cálculo de Excel, calcula la media geométrica de los "mejores" adecuados de los Genes de referencia "óptimos" a utilizar con un análisis de correlación por pares de datos de entrada sin procesar en el BestKeeper.</li> <li>✓ Todos los datos de CP se trazan en figuras adjuntas a la tabla de Excel.</li> <li>✓ El índice ponderado se correlaciona con hasta diez genes diana utilizando la misma correlación por pares análisis.</li> </ul>

(Vandesompele *et al.*, 2002; Andersen, Jensen, y Ørntoft, 2004; De Spiegelaere *et al.*, 2015; Ohl *et al.*, 2005 & Pfaffl *et al.*, 2003).

## VI. RESULTADOS

Los seis genes de referencia analizados con NORMFINDER, presentaron diferentes niveles de expresión en los distintos órganos de juveniles de *A. trimaculatus*. Tanto los niveles de expresión como la estabilidad de los genes referencia, cambian de acuerdo al órgano analizado. A continuación se describe por órgano la estabilidad de los genes de referencia:

En el intestino los genes de referencia que presentaron una mayor estabilidad son B2M y 18s, seguido de ACTB. En este órgano, el gen GAPDH resulto ser el menos estable, con cinco unidades más de inestabilidad (Fig. 1).

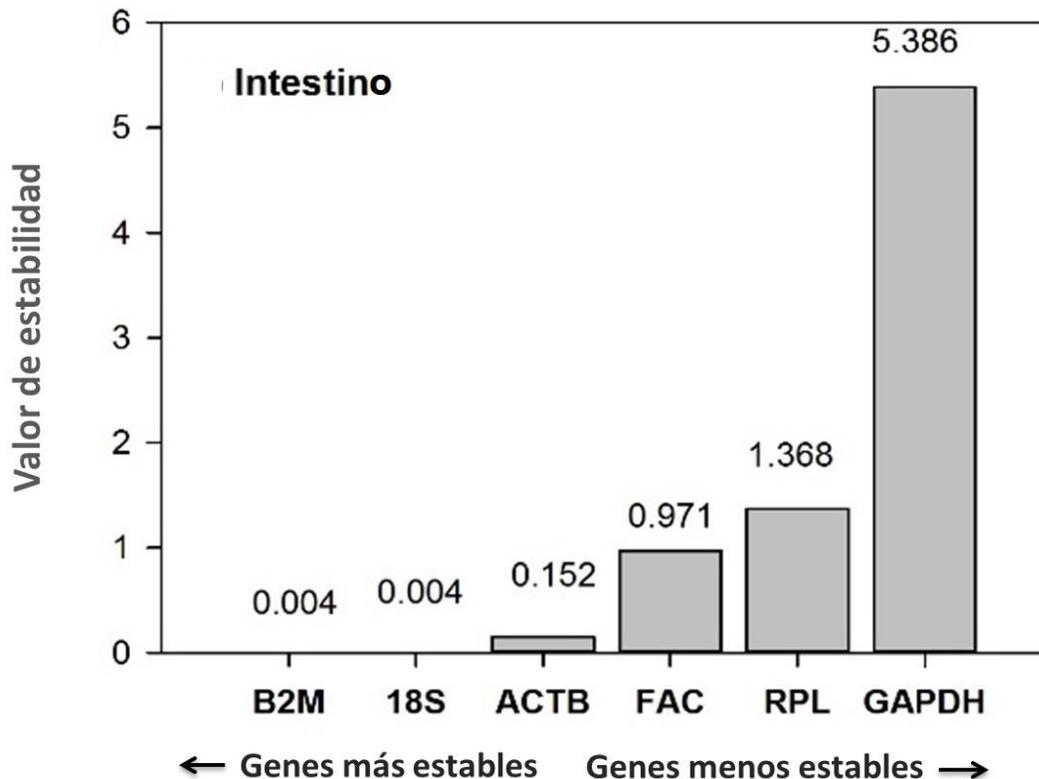


Figura 1. Promedio de la estabilidad de la expresión relativa de seis genes de referencia en intestino de juveniles de *A. trimaculatus* analizados en la plataforma de Normfinder (n=5).

En el tejido muscular los genes de referencia que presentaron una mayor estabilidad son B2M y RPL, seguido de 18s. En donde, el gen ACTB es el menos estable con una elevada variable de dos unidades en este órgano (Fig. 2).

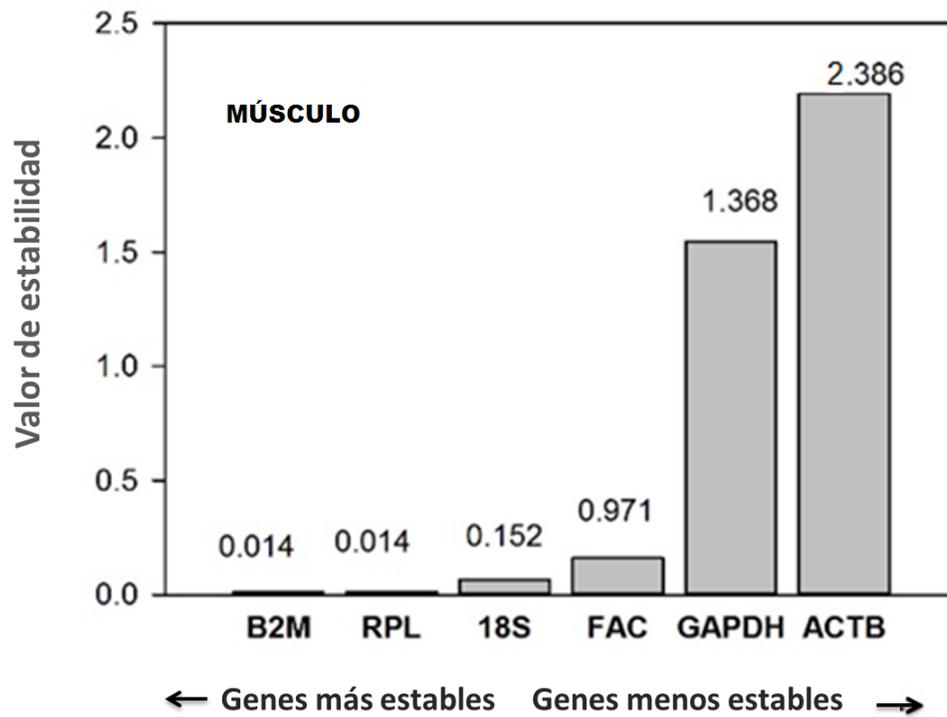


Figura 2. Promedio de la estabilidad de la expresión relativa de seis genes de referencia en musculo de juveniles de *A. trimaculatus* analizados en la plataforma de Normfinder (n=5).

En branquias los genes de referencia que presentaron una mayor estabilidad son GAPDH y B2M. El resto de los genes presentaron una inestabilidad considerable, asumiendo que todavía se encuentran en 0, volviendo así al RPL como el gen menos estable en este tejido (Fig. 3).

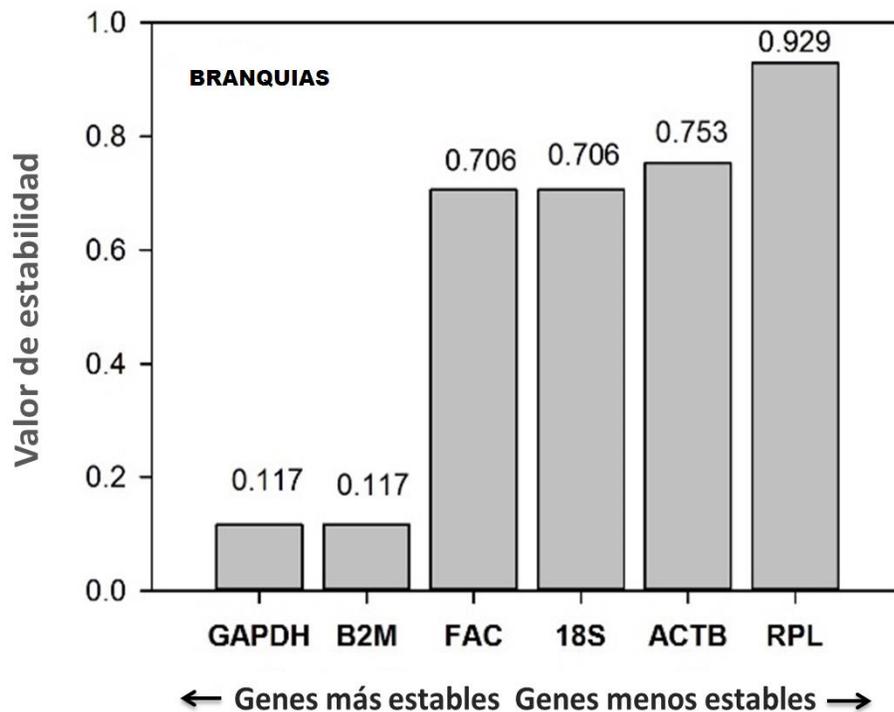


Figura 3. Promedio de la estabilidad de la expresión relativa de seis genes de referencia en branquias de juveniles de *A. trimaculatus* analizados en la plataforma de Normfinder (n=5).

En estómago los genes de referencia con mayor estabilidad son ACTB, FAC seguido de 18s. En este caso, el gen RPL resulto ser el menos estable con una variación por encima de una unidad, respecto a la plataforma (Fig. 4).

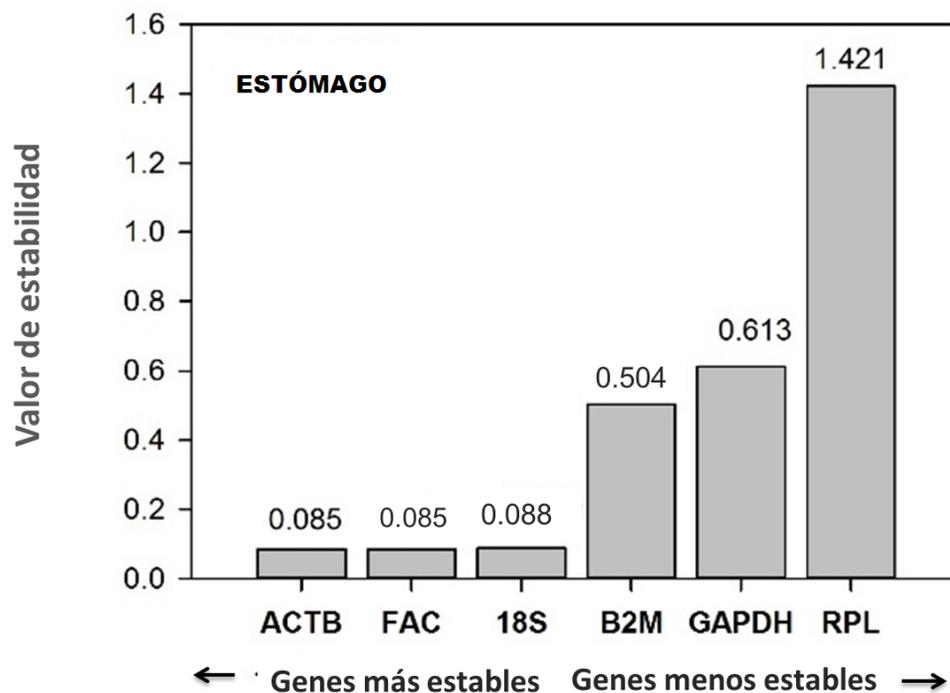


Figura 4. Promedio de la estabilidad de la expresión relativa de seis genes de referencia en estómago de juveniles de *A. trimaculatus*, analizados en la plataforma de Normfinder (n=5).

En cerebro se ve una variación respecto a estos genes el gen de referencia con mayor estabilidad resulto FAC. Mientras que en este caso, el gen 18S resulto ser el menos estable, con una variación notable considerando el resultado del gen más estable (Fig. 5).

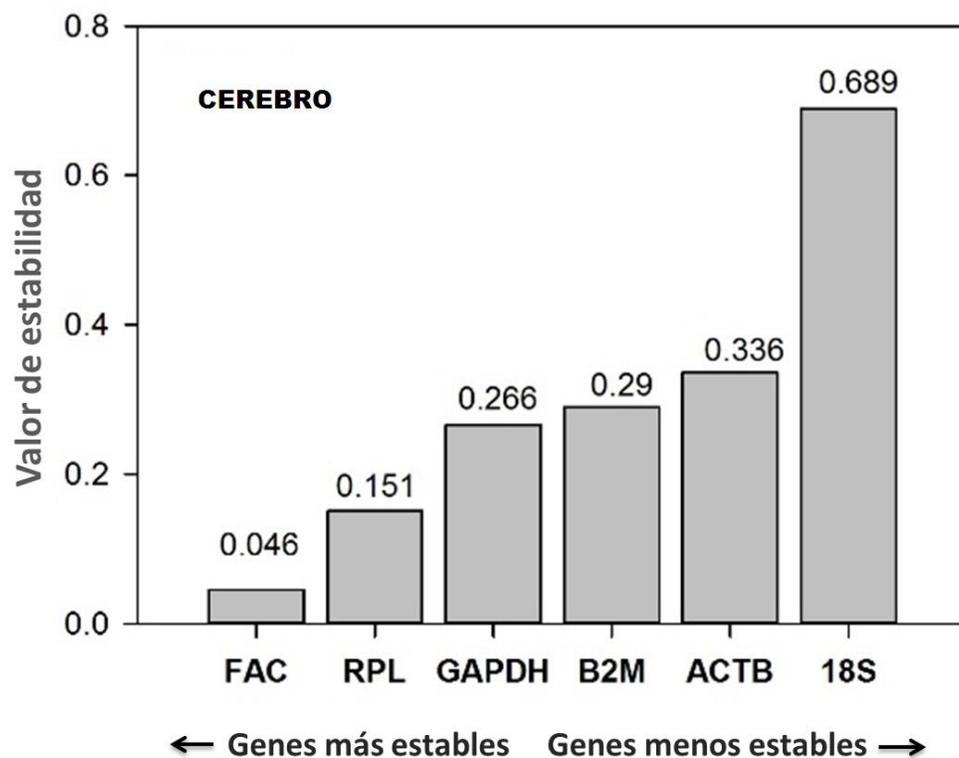


Figura 5. Promedio de la estabilidad de la expresión relativa de seis genes de referencia en cerebro de juveniles de *A. trimaculatus* analizados en la plataforma de Normfinder (n=5).

En páncreas los resultados señalan que los genes GAPDH y B2M son los más estables, seguido de ACTB. En este caso se puede apreciar que la variación de estabilidad entre cada uno de los genes es mínima y que incluso los genes menos estables como 18s y RPL podría ser utilizados en este órgano (Fig. 6).

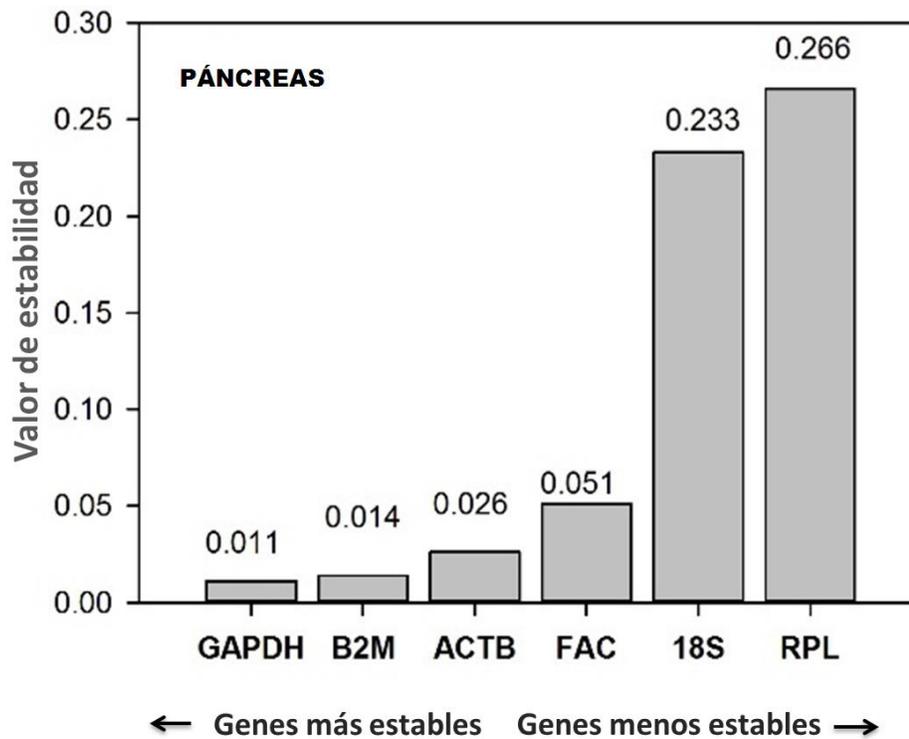


Figura 6. Promedio de la estabilidad de la expresión relativa de seis genes de referencia en páncreas de juveniles de *A. trimaculatus* analizados en la plataforma de Normfinder (n=5).

## VII. DISCUSIÓN

Actualmente existen varios programas informáticos para realizar el análisis de la idoneidad de genes de referencia, catalogados como softwares de libre acceso tales como, GeNorm, BestKeeper, NormFinder, Método  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  (Loss-Morais *et al.*, 2015). Gracias a estos programas, se puede identificar y evaluar la estabilidad de los genes de referencia candidatos para la correcta normalización, y por lo tanto, una herramienta imprescindible para la selección de genes de referencia. Sin embargo, debido a las características que presentan cada una de estas plataformas es necesario seleccionar aquella que cumpla con los requerimientos del trabajo de investigación (De Spiegelaere *et al.*, 2015). Debido a que cada una ofrece diferentes criterios para determinar los mejores genes de referencia en estudios y valorar la estabilidad de estos con diferente valor en Ct ó Cq calculado por la aplicación; tal es el caso de GENORM la literatura menciona que geNorm propuso un valor  $<0.15$  como valor de corte en el umbral, el método Normfinder, establece que el gen de referencia con valor más cercano a 0 será el más apropiado. Para el método para BestKeeper establecido por defecto por el programa como umbral de inestabilidad  $<0.05$  (Vandesompele *et al.*, 2002, Ohl *et al.*, 2005; Andersen, Jensen, y Ørntoft, 2004).

En el caso de BestKeeper, el análisis se realiza en una hoja de cálculo Excel, la cual, determina los mejores genes de referencia correlacionados que se combinan en un índice, describiendo la relación entre el índice y el candidato contribuyente con un máximo de 10 genes (Pfaffl *et al.*, 2004; Meng & Zheng *et al.*, 2011). Para el algoritmo GeNorm, comúnmente utilizado en los análisis de expresión en genes, se realiza básicamente dos análisis: uno de evaluación de la estabilidad en la expresión de los genes seleccionados y otro que valora la conveniencia de emplear múltiples genes normalizadores (Vandesompele *et al.*, 2003; Etschmann *et al.*, 2006).

En esta investigación se seleccionó NormFinder, debido a que es una herramienta completa, gracias a que integra características de otros softwares a la hora de

seleccionar genes de referencia, ya sea en un conjunto de muestras o método dado. También combina el análisis de variaciones de expresión intra e intergrupales de los genes estudiados para calcular un factor de normalización, basado en la media geométrica de los genes de referencia más estables. Además agrega la tecnología de microarrays de ADN que permite realizar análisis genéticos sobre miles de genes simultáneamente. Marchiori *et al.*, (2017) seleccionó esta herramienta entre los distintos algoritmos que presenta la plataforma RefFinder, en ensayos de qPCR para plantas de caña de azúcar con déficit de agua, ya que los resultados son arrojados de manera estable. Deloffre *et al.* (2012), también se inclinó hacia este algoritmo y la describió como una herramienta confiable para el proceso de normalización en la expresión génica durante la ovogénesis en un pez Teleosteo dorado (*Seriola lalandi*); por lo que se puede determinar como la mejor herramienta para realizar este tipo de trabajo al integrar los diferentes algoritmos en una sola plataforma (Andersen *et al.*, 2004; Bonfeld *et al.*, 2008; Ståhlberg *et al.*, 2008).

Por otra parte, en los resultados obtenidos en nuestro trabajo podemos observar que ningún gen de referencia se puede usar de forma general en los distintos tejidos, debido a que estos varían según las condiciones experimentales en el organismo o tejido analizado, lo cual se muestra con anterioridad y coincide en diferentes trabajos (Vandesompele *et al.*, 2003, Mallona-González, 2008; Bustin & Nolan, 2004). Los mismos genes utilizados en este trabajo, se han analizado al observar la validez de los genes B2M, 18S, RPL, GAPDH, FAC y ACTB; estos han sido reportados en otros estudios donde se aplican análisis de Q-PCR para peces como en Lengüado (*Paralichthys olivaceus*) y la Tilapia del Nilo (*Oreochromis niloticus*) (Yang *et al.*, 2013; Wen-Jiang & Li Sun, 2011). Esta posible variabilidad se ha adjudicado a las distintas células de los tejidos, en donde se encuentran diferentes tipos de ARN con diferentes funciones en el organismo; y con ello una expresión de genes específica según sea el caso (Mattick & Makunin, 2006).

En el caso del páncreas, podemos apreciar que el gen con una mejor estabilidad es el GAPDH, esto podría ser debido a que en este órgano se lleva a cabo la

secreción de hormonas que regulan el nivel de glucosa en la sangre (insulina y glucagón) y dicho gen es el precursor de una de las enzimas involucradas en el proceso de glucólisis, específicamente en un importante paso energético en el metabolismo de los carbohidratos (Murphy *et al*, 2006 & Olvera *et al.*, 2008). Sin embargo, se ha considerado que este gen (GAPDH, Glicer aldehído-3-fosfato deshidrogenasa), es un gen multifuncional ya que no solo está relacionado con la enzima glucolítica doméstica de mantenimiento, sino que contribuye a la fusión de la membrana y desempeña un papel en la transcripción de genes, la replicación y reparación del ADN, la exportación de ARN nuclear, y además se ha asociado genéticamente con la aparición tardía de la enfermedad de Alzheimer (Hara *et al.*, 2006).

En otro estudio realizado por Zhong *et al.* (2018), donde se menciona que el aumento de la de la glucólisis aeróbica es un detonante en el aumento del metabolismo del cáncer, así que usaron la metilación de GAPDH para regular el metabolismo de la glucosa y así suprimir la actividad en células de cáncer de hígado. Por otro lado, este gen ha sido utilizado para evaluar el potencial probiótico de levaduras en el desarrollo del tracto digestivo en dos especies importantes de peces: Lubina europea (*Dicentrarchus labrax*) y Cabrilla arenera (*Paralabrax maculatofasciatus*). Los autores agrega que cualquier normalización en relación a GAPDH tendrá resultados reproducibles y comparativos en la expresión de genes a nivel de ARNm (Tovar-Ramírez *et al.*, 2000).

En el cerebro el gen que presento una mayor estabilidad es (Factor de elongación 1-a) FAC, en conjunto con otros genes, el uso de este gen coincide en el trabajo en la estabilidad el pez cebra (*Danio rerio*) mediante los efectos de diferentes dosis de herbicida con base de glifosato sobre el encéfalo, siendo los niveles de transcripciones de dichos genes, los que codificaron las proteínas constituyentes (Pereira, 2018). También un estudio realizado en huachinango del Pacífico (*Lutjanus peru*) y dorada (*Sparus aurata*) llevó a cabo un análisis de  $\beta$ -glucano sobre la respuesta inmune, expresión de genes y actividad enzimática y a partir de la cuantificación relativa se observó el incremento de FAC y GAPDH aludiendo dichos resultados a procesos biológicos de digestión o inmunidad (Guzmán-

Villanueva, 2014). Esto es posible debido a una de las funciones principales del cerebro, la red de comunicación que representa el sistema nervioso (RefSeq, 2008). La corteza cerebral incorpora las células nerviosas (Neuronas) y células de apoyo (Gliales) las cuales realizan funciones auxiliares de dichas neuronas. Es en estas últimas, donde se registra la actividad del gen, relacionado con la codificación de proteínas (Ezkurdia *et al.*, 2014).

En el intestino, los genes B2M y 18s son los que presentaron los niveles de expresión más estables. Estudios realizados en la especie amazónica «Paiche» (*Arapaima gigas*) coincide en el uso del gen 18s en este órgano (ARNr Ribosomal) mediante el uso de PCR, con el objetivo de demostrar la presencia del parásito monogeneo (*Dawestrema cycloancistrum*) y poder desarrollar una técnica de diagnóstico molecular para su aplicación como medida de control en el manejo de la biodiversidad del paiche (Ariza *et al.*, 1998). Esto podría estar sucediendo debido a la presencia de ambos genes en las células glandulares epiteliales del intestino. En el caso de B2M, que sirven como proteínas citoplasmática y membranosa en la mayoría de estas células, teniendo con ello una participación importante en funciones relacionadas con estructura celular (RefSeq, 2008). Mientras que el gen 18S es también forman proteínas de retículo endoplasmático y citosol; en donde es una parte importante de la estructura de los ribosomas, los cuales catalizan la síntesis de proteínas (Uhlén *et al.*, 2015).

En el músculo la expresión más estable corresponde a los genes B2M y RPL18, los cuales son expresados preferentemente en los miocitos; células que constituyen el tejido celular básico que está especializadas en la contracción de los músculos, siendo después de las neuronas, las células que presentan mayor actividad (Thul *et al.*, 2017). La función de los miocitos es la contracción y como resultado la producción de movimiento, la proteínas que derivan de estos genes se encuentran en los filamentos delgados y forman parte importante en proceso de formación de estructura celular (Hall *et al.*, 2011). Estos dos genes (B2M y RPL18), En otro tipo de estudios, el gen RPL 18 se ha utilizado en la evaluación del Virus dengue (*Arbovirus dengue*). Para este caso el gen RPL18 se usó como

silenciador o inhibición de la traducción y replicación de DENV-1 hasta DENV-4 (Cervantes-Salazar *et al.*, 2015; Velandia & Castellanos, 2011).

En el caso del estómago la mayor estabilidad en la expresión, la presentaron los genes ACTB y FAC, seguidos de forma cercana por 18S. Esto, probablemente se deba a las funciones y procesos en los que se encuentran involucrados estos genes, en las células glandulares estomacales las cuales son células cilíndricas y altas que forman pliegues compactados, productoras principalmente de moco (en este caso sería el epitelio mucoso, el cual libera moco, bicarbonato “neutralización de HCl” y agua), cuya función es lubricar y proteger al estómago de posibles lesiones (Megías *et al.*, 2016; Toledo-Cuevas, 2010). El Gen ACTB tiene una alta expresión mioepitelial en todos los tejidos; en la células glandulares del estómago este gen codifica seis proteínas que participan en la motilidad celular, la estructura, la integridad y la señalización (Murphy *et al.*, 2006). Mientras que el gen FAC es responsable del suministro enzimático de los ARNt hasta al ribosoma.

Por último, en Branquias los genes notables fueron GAPDH y B2M esto a consecuencia de las actividades desde donde estos se expresan, puesto que están relacionados con la respuesta innata del sistema inmune. Así, como en el trabajo donde fueron tomadas las muestras de camarón (*Litopenaeus vannamei*) para determinar el estado inmunitario del camarón, en este estudio se realizó un banco de ADNc, con el propósito de revisar los transcritos relacionados con la función del sistema (Muñoz-Naranjo, 2015). Como lo son las células epiteliales, neumocitos, estas células basan su función en la regulación de la respuesta de defensa del sistema respiratorio frente a los agentes externos (Fernández *et al.*, 2016), y las células macrófagos localizadas en todos los tejidos, habitualmente en reposo pero se activan por estímulo del sistema inmune son capaces de reconocer patrones moleculares asociado a patógenos (Echeverri, 2004)

Con anterioridad se han realizado diferentes estudios con selección de genes para especies en peces para la inmunidad del congrio colorado (*Genypterus chilensis*) (Valdés & Manuel, 2017), en el desarrollo embrionario del pez dorado (*Seriola lalandi*) (Herrera Pizarro, 2013) o la respuesta inmunitaria en la trucha

(*Oncorhynchus mykiss*) (Balasch-Aleman, 2008). En todos los casos, al igual que en el presente trabajo, se ha puesto de manifiesto que la estabilidad de los genes de referencia cambia de acuerdo a los órganos analizados. Por tanto, es relevante la selección minuciosa de los genes en cuanto a las características de dicha especie, ya que puede comprometer la exactitud de los resultados debido a que el uso de inapropiados genes de referencia, puede cambiar radicalmente la interpretación del patrón de expresión de un gen de interés.

## VIII. CONCLUSIONES

1. Al cuantificar la expresión relativa de los genes de referencia, B2M y 18s presentaron una mejor estabilidad para en los órganos de intestino y tejido muscular. En el caso del tejido muscular, también se podría utilizar el gen de referencia RPL.
2. La cuantificación relativa de los genes de referencia GAPDH y B2M, presentaron una mejor estabilidad para en los órganos de branquias y páncreas. En el caso de páncreas también podría ser utilizado el gen de referencia ACTB.
3. En la cuantificación relativa de los genes de referencia, los genes que presentaron una mejor estabilidad en el estómago son, ACTB, FAC y 18s. En el cerebro, el gen de referencia que resulto con una mejor estabilidad es el FAC, en donde también se podría utilizar el RPL.
4. Al evaluar la eficiencia de la estabilidad, en la expresión de los genes de referencia estudiados entre los distintos tejidos de *A. trimaculatus*, indican que todos los genes de referencia presentaron diferentes variaciones en la transcripción, por lo que deber considerarse el órgano de acción y no utilizarse un solo gen transversal para el análisis de expresión génica

## IX. PROPUESTAS Y RECOMENDACIONES

- Los estudios de biología molecular que integren los análisis de expresión relativa, deberán tener en cuenta la variabilidad de los genes de referencia bajo las condiciones en que se realizan los experimentos.
- Los estudios de biología molecular que integren los análisis de expresión relativa, deberán tener en cuenta la variabilidad de los genes de referencia en los distintos tejidos de la especie.
- Se recomienda extender este tipos de estudios en otros estadios de desarrollo de *A. trimaculatus* para determinar qué genes de referencia podrían ser los más indicados.
- También es recomendable realizar este tipo de estudios para machos y hembras con el fin de determinar los genes de referencia apropiados para cada sexo, esto permitirá enfocar investigaciones de manera individualizada, principalmente en los estudios relacionados con la reproducción.

## X. BIBLIOGRAFÍA

Acuña, C. 2007. Biotecnología aplicada a la acuicultura y Desarrollo de la biotecnología. En Consejo Argentino de información (6). Argentina: INTA - CONICET.

Almudena-Pérez, R. 2015. Selección de genes de referencia y análisis de expresión diferencial en semen equino crio-preserved. Tesis Doctoral. En UNIVERSIDAD DE CORDOVA. Campus rabanales. Córdoba España.

Álvarez, J. 1970. Peces mexicanos (claves), Inst, Nac, Inv. Biología Pesquera Com.Na.Consul.Pesq, 166pp

Andersen, C.L., Jensen, J.L., Ørntoft, T.F., 2004. Normalization of realtime quantitative reverse transcription-PCR data: a model-based variance estimation approach to identify genes suited for normalization, applied to bladder and colon cancer data sets. Cancer Res. 64, 5245–5250, <http://dx.doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-04-0496>.

Andrés-Cabrerizo, D.M. 2016. Ciencias aplicadas a la actividad profesional. S.A. Editex: 288 págs.

Ávila, C. 2010. (Dpto. Biología Molecular y Bioquímica. Facultad de Ciencias.) ESTUDIOS DE EXPRESIÓN GÉNICA Y REGULACIÓN. Málaga: Universidad de Málaga.

Asuar, L. E. (2007). Guía práctica sobre la técnica de PCR. Ecología molecular. Instituto Nacional de Ecología, 574p.

Balash-Aleman, J.C. 2008. Análisis transcriptómico de la respuesta inmunitaria temprana en la trucha (*Oncorhynchus mykiss*, W.): una interpretación ontológica de la infección.

García-Lugo, P., Bolivar, A., Rojas, A. y 2013. PCR y PCR-Múltiple: parámetros críticos y protocolo de estandarización. En Avances en Biomedicina Mérida-Venezuela: Publicación Oficial del Instituto de Inmunología Clínica. (Volumen 3(1), p 25-33).

Bonefeld, B. E., Elfving, B. and Wegener, G. 2008. Reference genes for normalization: A study of rat brain tissue. *Synapse*, 62: 302-309. doi:[10.1002/syn.20496](https://doi.org/10.1002/syn.20496)

Bustin, S. A., y Nolan, T. 2004. «Analysis of mRNA Expression by Real-Time PCR.» En *Real-Time PCR; An Essential Guide.*, Edwards, K.J. et al., 125-184. Wymondham: Horizon Bioscience.

Bustin, S. A., Benes, V., Garson, J. A., Hellemans, J., Huggett, J., Kubista, M., & Vandesompele, J. 2009. The MIQE guidelines: minimum information for publication of quantitative real-time PCR experiments. *Clinical chemistry*, 55(4), 611-622.

Castanera-Andrés, R. 2011. Estudio de la variación en los niveles de transcripción de genes de enzimas degradadoras de lignina en cultivos sólidos y sumergidos de *pleurotus ostreatus*.

Cavagnari, Brian M. (2012). Regulación de la expresión génica: cómo operan los mecanismos epigenéticos. *Archivos argentinos de pediatría*, 110(2), 132-136. <https://dx.doi.org/10.5546/aap.2012.132>

Cervantes-Salazar, M., Angel-Ambrocio, A. H., Soto-Acosta, R., Bautista-Carbajal, P., Hurtado-Monzon, A. M., Alcaraz-Estrada, S. L., Del Angel, R. M. 2015. Dengue virus NS1 protein interacts with the ribosomal protein RPL18: This interaction is required for viral translation and replication in Huh-7 cells. *Virology*, 484, 113–126. doi:10.1016/j.virol.2015.05.017

Comisión Interministerial de Ciencia y Tecnología. 2003. Plan Nacional de Investigación Científica, Desarrollo e Innovación Desarrollo e Innovación Tecnológica Volumen II: Areas Prioritarias. España: Madrid: Ministerio de Ciencia y Tecnología.

Cortazar-Martínez A. y Silva-Rincón E.P. junio, 2004. Métodos físico-químicos en biotecnología: Pcr. En universidad nacional autónoma de México (43). México: instituto de biotecnología.

Cubillos-Rey, J. A., Corredor-Pereira, C., Godoy-Correa, M., Perdomo-Lara S. y Ospino, B. 2012. Carga mecánica como regulador de la osteogénesis en células madre mesenquimales humanas. En Dialnet (8). Nueva Granada: Universidad Militar Nueva Granada. Pontificia Universidad Javeriana, Universidad Simón Bolívar. Universidad el Bosque y Co-investigador. Universidad Nacional de Colombia. Hospital Militar Central.

Da Silva Diniz, W. J. Y Canduri, F. 2017. Bioinformática: una visión general y sus aplicaciones. En Research (21). São Carlos, SP, Brasil: Departamento de Genética y Evolução, Universidad Federal de São Carlos, São Carlos, SP, Brasil.

De Andrade, L. M., dos Santos-Brito, M., Fávero-Peixoto J. R., Marchiori, P. E. R., Nóbile, P. M., Martins, A. P. B., y Creste, S. 2017. *Reference genes for normalization of qPCR assays in sugarcane plants under water deficit. Plant Methods*, 13(1).doi:10.1186/s13007-017-0178-2

De Spiegelaere W., Dern-Wieloch J., Weigel R., Schumacher V., Schorle H., et al. 2015. Reference Gene Validation for RT-qPCR, a Note on Different Available Software Packages. PLOS ONE 10(3): e0122515. Ghent University, Department of Internal Medicine, Ghent, Belgium, 2 Justus-Liebig-University, Department of Veterinary Anatomy, Histology and Embryology, Giessen, Germany, Harvard Medical School, Department of Pediatrics, Boston, Massachusetts, United States of America, 4 University of Bonn Medical School, Department of Developmental Pathology, Bonn, Germany, 5 University of Veterinary Medicine Hannover, Institute of Anatomy, Hannover, Germany, 6 University of Münster, Center of Andrology and Reproductive Medicine, Münster, Germany  
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0122515>

Deloffre, L. A. M., Andrade, A., Filipe, A. I., & Canario, A. V. M. 2012. *Reference genes to quantify gene expression during oogenesis in a teleost fish. Gene*, 506(1), 69–75. doi:10.1016/j.gene.2012.06.047

Díaz-Fernández, N. y Rodríguez-ferreiro, A. 2016. Aplicaciones de la biotecnología en el desarrollo de la medicina personalizada. MEDISAN, Santiago de Cuba, v. 20, n. 5, p. 678-687.

Echeverri, D., Fontanilla, M., & Buitrago, L. 2004. El macrófago en enfermedad vascular ¿El enemigo oculto? Revista Colombiana Cardiología, 11(3), 164-73.

Etschmann, B., Wilcken, B., Stoevesand, K., von der, A., & Sterner-Kock, A. 2006. Selection of Reference Genes for Quantitative Real-time PCR Analysis in Canine Mammary Tumors Using the GeNorm Algorithm. Veterinary Pathology, 43(6), 934–942. <https://doi.org/10.1354/vp.43-6-934>

Ezkurdia, I., Rodriguez, D., Frankish, J.M., Diekhans, M., Harrow, J., Vazquez, J., Valencia, A., Tress, M. L., & Hum Mol Genet. 2014. Multiple evidence of chains suggests that there may be only 19,000 genes coding for human proteins; 23 (22): 5866-78. doi: 10.1093 / hmg / ddu309. Epub. 2014 16 de June.

Fernández, A. B., De Blas, I., & Ruiz, I. 2016. El sistema inmune de los teleósteos (I): Células y órganos. Revista AquaTIC, (16).

Figueras, A. y Novoa, B. 2014. BIOTECNOLOGÍA MARINA Y ACUICULTURA. En Instituto de Investigaciones Marinas Consejo Superior de Investigaciones Científicas (Arbor, 190 (768). España: Creative Commons Attribution-Non Commercial (by-nc). <http://dx.doi.org/10.3989/arbor.2014.768n4007>

Geng-Yang C., Li-Wang, X., Tian, W. J., Liu, F., Wu, M. J. y H. Wen. 2013. Evaluation of reference genes for quantitative real-time RT-PCR analysis of gene expression in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). En Laboratory of Freshwater Biodiversity Conservation and Utilization of Ministry of Agriculture, Yangtze River Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences,(-). Shanghai 200120, China: Sarite Center for Stem Cell Engineering Translational Medicine, East Hospital, Stem Cell Research Center, Tongji University School of Medicine.

Gómez-González, A., Velázquez-Velázquez, E., y Rivera-Velázquez, G. 2005. Distribución, abundancia y estimación de la relación talla-peso de las mojarras. '*Cichlasoma trimaculatus* Y *Amphilophus macracanthus* (PERCIFORMES: CICHLIDAE) en un sistema lagunar estuario, de Chiapas, México.

Gunther, A. 1867. On the fishes of the states of Central America, founded upon specimens collected in fresh and marine waters of various parts of that country by Messrs. Salvin, Godman and Capt. J.M. Dow., Proc. Zool. Soc. Lond. 3: 600-604

Guyton, A. C., & Hall, J. E. 2011. [Textbook of Medical Physiology \[Tratado de fisiología médica\]](#) (12.<sup>a</sup> edición). Barcelona: Elsevier/GEA Consultoría Editorial. [ISBN 9788480868198](#). 30 ago. 2011. 1112 páginas.

Guzmán-Villanueva, L. T. 2014. Efecto del-glucano 1, 3/1, 6 sobre la respuesta inmune, la actividad enzimática digestiva y la expresión de genes de *Lutjanus peru* y *Sparus aurata*.

Hara, M. R., Cascio, M. B., y Sawa, A. 2006. *GAPDH as a sensor of NO stress. Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease, 1762(5), 502–509*.doi:10.1016/j.bbadis.2006.01.012

Hernández, A. P., Martín vasallo, a. Torres, e. Salido. 1994. Análisis del RNA: Estudio de la expresión génica. En Nefrología (14:145-62). Vol. 14 N° 2.

Herrera-Pizarro, G. A. 2013. Expresión de catepsinas durante el desarrollo embrionario temprano en el pez dorado (*Seriola lalandi Valenciennes 1833*).

Hilero-Ruiz, G.A. 2017. Expresión del gen tripsinógeno durante la ontogenia inicial de *Cichlasoma trimaculatum (Amphilophus trimaculatus)*. Universidad de Ciencias y artes de Chiapas. Centro de investigaciones costeras. Laboratorio de acuicultura tropical. Universidad Autónoma de Tabasco.

Shapiro, J., Machattie, L., Eron, L., Ihler, G., Ippen, K., & Beckwith, J. 1969. Isolation of pure lac operon DNA. *Nature, 224 ( 5221), 768*.

Scaltritti-Bentancur, J. P. 2016. Búsqueda de genes candidatos asociados con la diferenciación de raíces adventicias en *Acca sellowiana* (Berg.) Burret.

Kenneth, K.J. y Schmittgen, T.D. 2001. Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real-Time Quantitative PCR and the  $2^{-\Delta\Delta C_T}$  Methods 25, 402-408.

Machado, R.D., Christoff, A.P., Loss-Morais, G. et al. 2015. Plant Cell Rep 34: 1139. <https://doi.org/10.1007/s00299-015-1773-1>

Mallona-González I. 2008. Selección de genes de normalización para RT-PCR cuantitativa en *Petunia hybrida*. Proyecto de máster en técnicas avanzadas en investigación y desarrollo agrario y alimentario.

Mandal, A: 2018. Medición de la expresión génica. News-Medical.net An AZoNetwork Site

Mattick, S., y Makunin, V. 2006. Non-coding RNA. En Human Molecular Genetics (pp. R17-R29.). St Lucia, QLD 4072, Australia: Australian Research Council Centre for Functional and Applied Genomics, Institute for Molecular Bioscience, University of Queensland. Vol. 15. núm. 1

M-Bodine, D., y P.h. D. 2016. Institutos Nacionales de la Salud, Instituto Nacional de Investigación del Genoma Humano " Glosario Hablado de Términos Genéticos". desde <https://www.genome.gov/glossaryS/>  
<https://www.genome.gov/glossaryS/?id=76>

Megías, M., Molist, P., y Pombal. M. 2016. Epitelios glandulares. en atlas de histología animal y vegetal(17). Departamento de biología funcional y ciencias de la salud. Facultad de biología: Vigo, España.

Meng, Xu. & Zhang, B. S. 2011. Reference gene selection for quantitative real-time polymerase chain reaction *Populus in* [Analitic Biochem Volume 408, Number 2](#) , page 337-339 Xiaohua, S.

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 pp.

Moreno, X. 2004. Uso de chips de ADN (microarrays) en medicina: fundamentos técnicos y procedimientos básicos para el análisis estadístico de resultados. En Microarrays (7). Barcelona. España: Unidad de Bioestadística y Bioinformática. Servicio de Epidemiología y Registro del Cáncer. Instituto Catalán de Oncología. Hospital Duran i Reynals. L'Hospitalet de Llobregat.

Muñoz-Naranjo, D. I. 2015. Diversidad de transcritos asociados en la respuesta inmunitaria del camarón *Litopenaeus vannamei* (Master's thesis). Pp.18

Murphy, M., Brown, G., Wallin C., Tatusova, T., Pruitt, K., Murphy, T., & Maglott D. 2006. Gene Help: Integrated Access to Genes of Genomes in the Reference Sequence Collection. In: Gene Help [Internet]. Bethesda (MD): National Center for Biotechnology Information (US); 2005-. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK3841/>

Llamas-Navarro, C. 2016. Determinación de la expresión de genes relacionados con el crecimiento en el Lengado Senegalés ("*Solea senegalensis*" Kaup, 1858). Universidade da Coruña. Facultade de Ciencias, (22).

Ohl, Falk, Jung M., Xu, C. Carsten S., Rabien, A., Burkhardt, M., Nitsche, A. et al. 2005. «Gene expression studies in prostate cancer tissue: which reference gene should be selected for normalization?» Journal of Molecular Medicine (Berlin, Germany) 83 (12) (diciembre): 1014-1024. doi:10.1007/s00109-005-0703-z.

Olvera-Granados, C.P., Leo-Amador, G.E., y Hernández-Montiel, H.L., 2008. Páncreas y células beta: mecanismos de diferenciación, morfogénesis y especificación celular endocrina. ¿Regeneración? En Medigraphic (Vol. 65). Querétaro, Querétaro, México: Laboratorio de Neurobiología y Bioingeniería Celular, Facultad de Medicina, Universidad Autónoma de Querétaro.

Olsvik, P., Lie, K., Jordal, A.E., Nilsen, T., y Hordvik. I. 2005. Evaluation of potential reference genes in real-time RT-PCR studies of Atlantic salmon. En BMC

Molecular Biology (9). Bergen, Norway: 1National Institute of Nutrition and Seafood Research, Nordnesboder.

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.

Pereira, A. G. 2018. Efeitos do herbicida a base de glifosato sobre o encéfalo de peixe-zebra (*Danio rerio*).

Pfaffl, M. 2001. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR Nucleic Acids Research, Institute of Physiology, FML-Weihenstephan, Center for Life and Food Sciences, Technical University of Munich, Germany.29.

Pfaffl, M. W. , Tichopad, A., Prgomet, C. & Tanja P. Neuvians. 2003. Determination of stable housekeeping genes, differentially regulated target genes and sample integrity: BestKeeper – Excel-based tool using pair-wise correlations Physiology, FML-Weihenstephan, Centre of Life and Food Science, Technical University of Munich, Germany.

Pfaffl, M.W. 2004. Quantification Strategies in Real-Time PCR. A-Z of Quantitative PCR 87- 120.

Pruitt, K. D., Tatusova, T., Klimke, W., & Maglott, D. R. 2008. NCBI Reference Sequences: current status, policy and new initiatives. Nucleic acids research, 37 (Database issue), D32-6.

RefSeq. 2008 National Center for Biotechnology Information National Library of Medicine 8600 Rockville Pike Bethesda, MD USA 20894

Říčan, 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, M. y Rodríguez, W. 2006. PCR en tiempo real. En IBT-UNAM (55). México DF.

Rojo, I., Castel Ruiz, A. Estonba, M. A. Pardo. (2005). Identificación de genes asociados con la resistencia a *Listonella anguillarum* en el modelo animal pez cebra *Danio rerio* (Hamilton, 1822) mediante el análisis de perfiles de expresión diferencial. En Instituto Español de Oceanografía (1-4). ESPAÑA: Instituto Español de Oceanografía.

Small, B. C., Murdock, C. A., Bilodeau-Bourgeois, A. L., Peterson, B. C., & Waldbieser, G. C. 2008. *Stability of reference genes for real-time PCR analyses in channel catfish (Ictalurus punctatus) tissues under varying physiological conditions. Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology*, 151(3), 296–304. doi:10.1016/j.cbpb.2008.07.010

Spiegelaere, W., Dern-Wieloch, J., Weigel, R., Schumacher, V., Schorle, H., Nettersheim, D., Fink, C. 2015. Validación de genes de referencia para RT-qPCR, una nota sobre diferentes paquetes de software disponibles. *PloS uno*, 10 (3), e0122515. doi: 10.1371 / journal.pone.0122515

Ståhlberg, A., Elbing, K., Andrade-Garda, J.M., Björn Sjögren, Amin Forootan and Mikael Kubista. 2008. Multiway real-time PCR gene expression profiling in yeast *Saccharomyces cerevisiae* reveals altered transcriptional response of *ADH*-genes to glucose stimuli. *BMC Genomics* 2008;9:170. © Ståhlberg et al; licensee BioMed Central Ltd. 2008. <https://doi.org/10.1186/1471-2164-9-170>

Velasquillo, C., Tamay, L. C., Ibarra, C. 2013. Fundamentos de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y de la PCR en tiempo real. En Laboratorio de Biotecnología, Centro Nacional de Investigación y Atención a Quemados. Instituto Nacional de Rehabilitación (INR) (PP. 70-78. Vol. 2, Núm. 2). México, D.F: Unidad de Ingeniería de Tejidos, Terapia Celular y Medicina Regenerativa. INR.

T-McCurley, A. y V-Callard, G. 2008. Characterization of housekeeping genes in zebrafish: male-female differences and effects of tissue type, developmental stage

and chemical treatment. En Characterization of housekeeping genes in zebrafish: male-female differences and effects of tissue type, developmental stage and chemical treatment (12). Boston, USA: BMC Molecular Biology.

Tovar-Ramírez, D., Zambonino-Infante, J. L., Cahu, C., Gatesoupe, F. J., & Vázquez-Juárez, R. 2000. Efecto de la administración de levaduras en el proceso de maduración del tracto digestivo de peces. *Avances en nutrición acuícola V. Memorias del V Simposium Internacional de Nutrición Acuícola*, 19-22.

Thul, P. J., Åkesson, L., Wiking, M., Mahdessian, D., Geladaki, A., Ait Blal, H., Lundberg, E. 2017. *A subcellular map of the human proteome*. *Science*, 356(6340), eaal3321. doi:10.1126/science.aal3321

Toledo-Cuevas, E. M. 2010. Estudios sobre la Fisiología digestiva de peces blancos (*Menidia estor* y *M. Promelas*, y pejerreyes (*Odonthestes bonariensis* y *O. Hatcheri*) para optimizar su crecimiento. *Semana Nacional de Bioinformática NNB-2010*.

Toledo-Solís F. J., Márquez-Couturier G., Uscanga-Martínez A., Guerrero-Zárate R., Perales-García N., Martínez-García R., Álvarez-González C. A. 2016. Partial characterization of digestive proteases of the three-spot cichlid *Cichlasoma trimaculatum* (Günther 1867). *Aquaculture Nutrition*. Vol. 22:1230-1238.

Toledo-Solís, F.J. 2019. Fisiología digestiva y requerimientos nutricionales de la mojarra Tahuina (*Amphilophus trimaculatus*). Tesis de doctorado. División académica de ciencias biológicas. Laboratorio de Acuicultura Tropical. Universidad Juárez autónoma de tabasco. Pag. 168.

Uhlén, M., Fagerberg, L., Björn, M., Hallström, Lindskog, C., Oksvold, P., Mardinoglu, A., Sivertsson, A., Kampf, C., Sjöstedt, E., & Asplund, A. 2015. The proteomics. Map of the human proteome based on tissues. *Science*. ; 347 (6220): 1260419. doi: 10.1126 / science.1260419.

Valdés, A., & Manuel, V. 2017. Evaluación del efecto del estrés por manejo en la expresión de genes asociados a la inmunidad del congrio colorado (*Genypterus chilensis*) mediante RNA-seq (Doctoral dissertation, Universidad Andrés Bello).

Velandia, M. L., & Castellanos, J. E. 2011. Virus del dengue: estructura y ciclo viral. *Infectio*, 15 (1), 33-43.

Vandesompele, J., De Preter, K., Pattyn, F., Poppe, B., Van Roy, N., De Paepe, A., Speleman, F., 2002. Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. *Genome Biol.* 3, RESEARCH0034.

Vandesompele, J., K. De-Preter, F., Pattyn, B., [Poppe](#), N., [Van-Roy](#), A. & [DePaepe](#), F. 2003. Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes *Genome biology*.

Violante-Gonzales, J. 1995. Contribución al conocimiento de la biología de la mojarra nativa *Cichlasoma trimaculatus* en la laguna de tres palos Guerrero, México 43 y determinación del desarrollo larvario y requerimientos proteicos. Tesis de maestría. Universidad de Colima. Manzanillo Colima. 70 p.

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.

Wen-Jiang Zheng un & Li Sun un. 2011. Evaluation of housekeeping genes as references for quantitative real time RT-PCR analysis of gene expression in Japanese flounder (*Paralichthys olivaceus*). En *Fish & Shellfish Immunologic sh.* Beijing 100049, PR China: Key Laboratory of Experimental Marine Biology, Institute of Oceanology, Chinese Academy of Sciences.

Zhong, X.-Y., Yuan, X.-M., Xu, Y.-Y., Yin, M., Yan, W.-W., Zou, S.-W., Lei, Q.-Y.  
2018. *CARM1 Methylates GAPDH to Regulate Glucose Metabolism and Is Suppressed in Liver Cancer*. *Cell Reports*, 24(12), 3207–3223.doi:10.1016/j.celrep.2018.08.066

## XI. - ANEXOS

### ANEXO 1. - Glosario

**ADN:** Siglas de ácido desoxirribonucleico, proteína compleja que se encuentra en el núcleo de las células y constituye el principal material genético de los seres vivos.

**ADNc:** Ácido desoxirribonucleico complementario, es una molécula de ADN y se obtiene mediante la enzima transcriptasa inversa a partir de las moléculas de ADN de la célula.

**ADN polimerasa:** Principal enzima de la replicación, que interviene en el proceso de replicación de ADN, llevando a cabo la síntesis de la nueva cadena de ADN emparejando los desoxirribonucleótidos trifosfato, con los de sus desoxirribonucleótidos complementarios correspondientes al ADN molde.

**ARNm:** ARN mensajero procedente del ADN del núcleo celular, determina el orden en que se unirán los aminoácidos de una proteína y actúa como plantilla o patrón para la síntesis de dicha proteína, en el cual la enzima ARN polimerasa sintetiza ARN usando al ADN como molde.

**Valor Ct ó Cq:** Valor de cuantificación del ciclo, es el número del ciclo de la PCR en la curva de reacción de la muestra, que se cruza con la línea de umbral.

**Valor Estabilidad:** Es la detección del valor de los genes expresados de forma más estable en la serie de tejidos estudiados. Se calcula un factor de normalización para cada muestra empleando la media geométrica de los valores relativos estimados para todos los genes candidatos.

**Expresión génica:** Es el proceso que permite obtener proteínas a partir de genes, que se transcribe de un ARN ribosomal, de transferencia o mensajero, para traducirse a proteínas.

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

**Mg:** Miligramos. Unidad de medida de peso.

**ml:** Mililitros. Unidad de medida de volumen.

**Normalización:** Es la corrección de la variación no específica; como las diferencias en cantidad y calidad del ARN empleado, que pueden afectar a la eficiencia de la retrotranscripción y de PCR.

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

**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 usada para crear un gran número de copias de un segmento de ADN *in vitro*. Basada en una reacción enzimática catalizada por una ADN polimerasa.

**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 o Forward. Para que el ADN polimerasa comience a la replicación necesita un punto de partida, está representado por una cadena de nucleótidos que se unirán a las dos cadenas de ADN: 3'5'

**Primer Rw:** El que une la hebra 5' 3', se le llama Primer anti sentido o Reverse

**Q-PCR:** Técnica cinética que permite el análisis continuo de la amplificación del ADN. Detecta la acumulación de ADN en base a la fluorescencia emitida por la muestra.

**Retrotranscriptasa:** Componente de reacción PCR que convierte el ARN en ADNc.

**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.

**SYBR-Green:** Es un compuesto marcado como un fluorocromo, que permite en un termociclador, con la capacidad de excitarlo convenientemente, la emisión de la fluorescencia detectable.

**Síntesis de proteínas:** Proceso por el cual se componen nuevas proteínas a partir de los aminoácidos esenciales. En este proceso, se transcribe el ADN en ARN.7y 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.

**µg:** Microgramos. Unidad de medida de peso.

**µl:** Microlitros. Unidad de medida de volumen.

**µM:** Micromolar. Unidad de medida de peso molecular

## ANEXO 2.- Protocolo de extracción de ARN

(PureLink® ARN Mini Kit Código 12183018A)

1. Preparación de buffer de lysis
  - Por un volumen de 1 ml del buffer de lysis se agregan 10 µl de 2-mercaptoetanol.
2. 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).

3. Colocar el tejido en un tubo ependorf y agregar 350 µl de buffer de lysis con 2-mercaptoetanol.
4. 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.
5. Centrifugar la mezcla lisada a 13,000 rpm por 5 minutos a 4°C (puede centrifugarse a temperatura ambiente).
6. Transferir los 350 µl del sobrenadante a un tubo limpio.
7. Agregar un volumen (350 µl 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.
8. Transferir los 700 µl de muestra a la columna (colocar en el centro de la columna el volumen).
9. Centrifugar a 12,000 rpm 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)

10. Colocar 700 µl de buffer de lavado I al centro de la columna.
11. Centrifugar a 12,000 rpm 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).
12. Añadir 500 µl de buffer de lavado II (colocar al centro el volumen de lavado II).
13. Centrifugar a 12,000 rpm 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.
14. Insertar la columna a un tubo limpio y agregar 40 µl de agua libre de RNAsas (RNase-free water).
15. Dejar incubar por 1 minuto a temperatura ambiente.
16. Centrifugar a 12,000 rpm por 2 minutos a 4 °C.
17. 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 3.- 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.

Datos del Genomic DNA elimination reaction para 1X

Componentes			Volumen
gDNA Buffer, 7x			4 µl (valor establecido)
RNA (Muestra)			- µl (valor Variable)
RNase-free water			- µl (valor Variable)
Volumen total por reacción			20 µl

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

Reacciones de cada órgano para la síntesis de ADNc de Tahuina

	Estómago	Músculo	Intestino	Branquias	Páncreas	Cerebro
gDNA Buffer 7x	4µl	4 µl	4 µl	4 µl	4 µl	4 µl
ARN (muestra)	15 µl	15 µl	14 µl	14 µl	15 µl	15 µl
RNase-free water	1 µl	1µl	2 µl	2 µl	1 µl	1 µl
Volumen total	20 µl	20 µl	20 µl	20 µl	20 µl	20 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.

Datos de Reverse-transcription reaction para 1X

Componentes	Volumen
Reverse-transcription master mix	1 $\mu$ l
Quantiscript RT Buffer, 5x	4 $\mu$ l
Primer Mix	1 $\mu$ l
Total reaction volume	6 $\mu$ l

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

Entire genomic DNA elimination reaction	14 $\mu$ l
Reverse-transcription reaction	6 $\mu$ l
Volumen total	20 $\mu$ l

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

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 4.- 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

<b>Master mix</b>		
<b>Componentes</b>	<b>Volumen/reacción 1x</b>	<b>Concentración final</b>
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 *A. trimaculatus*.

<b>Master mix</b>	
<b>Componentes</b>	<b>Volumen 1X</b>
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 <sub>2</sub> (25 mM)	0.4 µl
RNase-free water	5.9 µl
HotStarTaq Plus DNA Polymerase	0.5 µl
<b>Volumen total</b>	<b>10 µl</b>

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

3.- 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
H2O (libre de ADNasas)	8 µl	10 µl
<b>Volumen total</b>	<b>10 µl</b>	<b>10 µl</b>

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

4.- 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 los genes de referencia en *A. trimaculatus*.

Set 1	Set 2		Set 3		Set 4	
<b>Temperatura</b>	95 °C	95 °C	64 °C	60 °C	95 °C	4 °C
<b>Tiempo</b>	3 min	10 seg	30 seg	30 seg	05 Seg	∞
<b>Ciclos</b>	1		30		1	1

## **ANEXO 5.- Constancia verano de investigación**

Agradecimiento a La Académica Mexicana de Ciencias, por proporcionar una beca de verano de investigación científica en la Universidad de Juárez Autónoma de Tabasco (UJAT) en Laboratorio de acuicultura tropical, y realizar el presente trabajo de investigación.

