



CENTRO DE INVESTIGACIONES BIOLÓGICAS  
DEL NOROESTE, S.C.

---

---

Programa de Estudios de Posgrado

CARACTERIZACIÓN DEL TRANSCRITO DEL GEN  
*fem-1* EN *Litopenaeus vannamei* (Boone, 1931) Y  
ANÁLISIS DE SU FUNCIÓN EN LA REPRODUCCIÓN  
MEDIANTE RNA DE INTERFERENCIA

TESIS

Que para obtener el grado de

**Maestro en Ciencias**

Uso, Manejo y Preservación de los Recursos Naturales  
(Orientación en acuicultura)

Presenta

Pavel Eduardo Galindo Torres

La Paz, Baja California Sur, Febrero 2014

## ACTA DE LIBERACIÓN DE TESIS

En la Ciudad de La Paz, B. C. S., siendo las 8 horas del día 06 del Mes de Febrero del 2014, se procedió por los abajo firmantes, miembros de la Comisión Revisora de Tesis avalada por la Dirección de Estudios de Posgrado del Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, S. C., a liberar la Tesis de Grado titulada:

**“Caracterización del transcrito del gen *fem-1* en *Litopenaeus vannamei* (Boone, 1931) y análisis de su función en la reproducción mediante RNA de interferencia”**

Presentada por el alumno:

**Pavel Eduardo Galindo Torres**

Aspirante al Grado de MAESTRO EN CIENCIAS EN EL USO, MANEJO Y PRESERVACIÓN DE LOS RECURSOS NATURALES CON ORIENTACIÓN EN **Acuicultura**

Después de intercambiar opiniones los miembros de la Comisión manifestaron su **APROBACIÓN DE LA TESIS**, en virtud de que satisface los requisitos señalados por las disposiciones reglamentarias vigentes.

### LA COMISIÓN REVISORA



Dra. Ana María Ibarra Humphries  
DIRECTOR DE TESIS



Dra. Gracia Alicia Gómez Anduro  
CO-TUTOR



Dra. Fabiola Guadalupe Arcos Ortega  
CO-TUTOR



Dra. Clara Elizabeth Galindo Sánchez  
CO-TUTOR



DRA. ELISA SERVIERE ZARAGOZA,  
DIRECTORA DE ESTUDIOS DE POSGRADO

**COMITÉ TUTORIAL****Directora:**

Dra. Ana María Ibarra Humphries

CIBNOR, La Paz, B. C. S.

**Co-tutores:**

Dra. Fabiola Arcos Ortega

CIBNOR, La Paz, B.C.S.

Dra. Gracia Gómez Anduro

CIBNOR, La Paz, B.C.S

Dra. Clara Elizabeth Galindo Sánchez

CICESE, ensenada, B.C.S.

**COMITÉ REVISOR DE TESIS**

Dra. Ana María Ibarra Humphries

Dra. Fabiola Arcos Ortega

Dra. Gracia Gómez Anduro

Dra. Clara Elizabeth Galindo Sánchez

**JURADO DE EXAMEN DE GRADO**

Dr. Pedro Cruz Hernández

Dra. Gracia Alicia Gómez Anduro

Dra. Clara Elizabeth Galindo Sánchez

(Suplente) Dr. Ricardo Pérez Enriquez

## RESUMEN

*Litopenaeus vannamei* es uno de los peneidos más importantes a nivel mundial dado que presenta características de importancia para su cultivo, entre las que destaca su dimorfismo sexual en talla y peso durante su desarrollo, en el cual las hembras adquieren mayor tamaño que los machos. Lo anterior perfila a *L. vannamei* como un modelo para el estudio de los mecanismos involucrados en la determinación/diferenciación sexual como una aproximación a la posible ventaja para el cultivo de camarones a través del monocultivo de hembras. Para ello es necesario profundizar en el estudio de las variables genéticas durante este proceso, principalmente para entender los mecanismos de regulación involucrados durante la diferenciación sexual, analizando los diferentes genes conocidos e identificados previamente en otras especies de invertebrados. Particularmente en *Caenorhabditis elegans* el proceso de determinación sexual ha sido bien estudiado, el cual inicia con una señal primaria constituida por genes sensibles a la dosis cromosómica, resultando en una cascada de señalización genética que da lugar a la diferenciación sexual tanto de la línea somática como germinal. Entre los genes involucrados en esta vía se encuentra *fem-1*, un gen que se ha conservado desde los invertebrados hasta los vertebrados; su función ha sido establecida a partir del silenciamiento genético, mostrando perfiles de feminización en ambas líneas celulares cuando éste es bloqueado. Así mismo la proteína FEM-1 regula mediante interacciones del tipo proteína-proteína los genes requeridos para la diferenciación sexual. Entre los genes regulados indirectamente se encuentra el de la *vitelogenina* el cual es mediado negativamente en machos. Por lo que el objetivo principal de este trabajo fue caracterizar el transcrito del gen *feminization of XX and XO animals (fem-1)* expresado en hembras y machos de *L. vannamei*, y establecer su papel en la diferenciación sexual. Se logró aislar y caracterizar cinco transcritos completos del gen, el cual presentó variación de longitud en dirección 5'; todos los transcritos contenían el dominio conservado de repeticiones ankyrin. Un transcrito de 3778 pb fue aislado de todos los tejidos evaluados (gónada masculina y femenina, embrión y pedúnculo ocular de hembras juveniles) y su predicción proteica presentó alta similitud estructural con la región *D34 of human ANKYRIN-R* la cual ha sido asociada con función en la periferia de la membrana celular así como de unión a factores de transcripción. Los análisis de ubicuidad mostraron que el gen se encuentra en todos los tejidos evaluados y no parece existir una tendencia de expresión tejido específico, además el gen *fem-1* fue localizado mediante hibridación *in situ* en los túbulos seminíferos de la región testicular así como en los vasos deferentes en espermátidas avanzadas, en la región ovárica, fue localizado en el citoplasma de ovocitos en pre-maduración así como en ovocitos en peri-nucléolos temprano. El silenciamiento genético de *fem-1* en la región de la gónada de ambos sexos y en pedúnculo ocular de machos no pudo ser establecido después de los cinco días de que los organismos fueron tratados; no obstante en pedúnculo ocular de hembras el silenciamiento perduró. Finalmente, los niveles de expresión del gen de *vitelogenina* no mostraron cambios significativos tanto en la región testicular como ovárica, sin embargo un efecto “*off target*” pudo ser apreciado. Si bien estos resultados no muestran evidencia suficiente de la participación de *fem-1* en la diferenciación sexual, el análisis *in silico* de las secuencias obtenidas permiten colocar al gen dentro de un posible amplio rango de funciones entre las que destaca su unión a

proteínas de membrana así como a factores de transcripción como ha sido observado en *C. elegans*.

Palabras clave: *Litopenaeus vannamei*, *fem-1*, Ankyrin repeats, expresión genética, diferenciación sexual.

## ABSTRACT

*Litopenaeus vannamei* is one of the most important Penaeidae at world level because it has important characteristics for its farming, as its sexual dimorphism in size and weight during development when females acquire a larger size than males. Thus *L. vannamei* is a model for the study of the mechanisms involved in sexual determination/differentiation as an approximation to the possible advantage for shrimp farming through female monoculture. As a result, it is necessary to go more in depth in the study of genetic variables during this process, principally in understanding the regulation mechanism involved during sexual differentiation, analyzing the different genes previously known and indentified in other invertebrate species. The process of sexual determination has been well studied, particularly in *Caenorhabditis elegans*, which begins with a primary signal constituted by a chromosomal sensitive gene dose, resulting in a cascade of genetic signaling and giving place to sexual differentiation in both somatic and germ lines. Among the genes involved in this pathway is *fem-1*, a gene that has been conserved from vertebrates to invertebrates, whose function has been established from gene silencing showing feminization profiles in both cell lines when it is blocked. Similarly, the FEM-1 protein is regulated by protein-protein interactions, the gene types required for sexual differentiation. Vitellogenin, which is negatively mediated into male, is indirectly found among the regulated genes,. Whereby the principal objective of this work was to characterize the transcript of the *feminization XX X0 animal (fem-1)* genes expressed in both *L. vannamei* females and males to establish their role in sexual differentiation. The isolation and characteristics of the five full-length transcripts of the gene were achieved, showing a length variation in the 5' directions. All of the transcripts contained the conserved domain of the Ankyrin repetitions. A transcript of 3378 pb was isolated from all the evaluated tissues (male and female gonad, embryo, and the juvenile female eyestalk); its proteic prediction showed high structural similarity with region D34 of human ANKYRIN-R that has been associated with the function in the cellular membrane periphery as well as a link to transcription factors. The ubiquity analysis showed the gene is present in all evaluated tissues, and a specific tissue expression tendency did not seem to exist. Moreover, the gene *fem-1* was located in seminiferous tubules of the testicular region, as well as in the vas deferens in advanced spermatids by *in situ* hybridization; in the ovary region it was located in the pre-maturation cytoplasm and in early peri-nucleoli oocytes. Genetic silencing of *fem-1* in the gonad region in both genders and in the male eyestalk could not be established five days after the organisms had been treated; nevertheless, it was detected in the female eyestalk. Finally, the vitellogenin expression level did not show significant changes both in the testicular and ovarian region, but an "off target" effect could be noted. Although this result did not show sufficient participation evidence of *fem-1* in sexual differentiation, the *in silico* analysis of the sequences obtained permitted the gene to be positioned inside a wide range of functions, highlighting the link of membrane proteins such as transcription factors as it has been observed in *C.elegans*.

Key words: *Litopenaeus vannamei*, *fem-1*, Ankyrin repeats, genetic expression, sexual differentiation.

**DEDICATORIA**

*A mis dos grandes acompañantes, Vero y Alan....*

## AGRADECIMIENTOS

Al CONACYT por la beca de maestría otorgada (No.260432) y al Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste (CIBNOR) por las instalaciones prestadas para el desarrollo de la presente investigación. Al personal de posgrado: Dra. Elisa Serviere Zaragoza, Lic. Osvelia Ibarra Morales, Lic. Leticia González Rubio, Claudia Elizabeth Olachea, Tania Veronica Nuñez Valdez por la ayuda brindada durante mi formación académica y por las facilidades prestadas.

Agradezco de manera especial a mi directora de tesis la Dra. Ana María Ibarra Humphries por la formación académica y confianza manifestada. Gracias por los comentarios siempre con el objetivo de mejorar el trabajo, por las exigencias, apoyo, paciencia, atención, enseñanzas y consejos. Como investigadora la admiro mucho por su trayectoria de calidad. A nivel personal la considero un gran ser humano y buena amiga con la cual siempre pude confiar y externar mi sentir durante mi estancia en el laboratorio.

A la Dra. Clara Elizabeth Galindo Sánchez quien además de la cotutoría en el presente trabajo también ayudó a mi formación inicial cuando decidí incursionar en el laboratorio de genética. Gracias por la asesoría, comentarios, revisiones, enseñanzas y paciencia.

A la Dra. Fabiola Arcos Ortega y Dra. Gracia Gómez Anduro por sus comentarios en cada reunión de comité, por la ayuda en la corrección y enriquecimiento del documento de tesis. ¡Gracias!

Al laboratorio de Genética y Mejoramiento Animal Acuícola particularmente a los técnicos: M. en C. Susana Ávila Álvarez por la disposición y facilidad brindada para que el trabajo de laboratorio se desarrollará sin interrupciones, contando siempre con los materiales necesarios, así como al M. en C. José Luis Ramírez Arce por sus consejos y ayuda en los muestreos y en el experimento de interferencia.

Al Dr. Ilie Sava Racotta Dimitrov por su ayuda en la obtención de organismos e instalaciones para que se llevara a cabo el experimento de RNA de interferencia.

Al M. en C. Carlos Ernesto Ceseña por su ayuda en el mantenimiento de los organismos utilizados en el experimento de RNA de interferencia.

Al Dr. Pedro Cruz Hernández y Dr. Ricardo Pérez Enríquez por los consejos y comentarios para enriquecer las presentaciones.

Al Dr. Francisco Javier Magallón Barajas por su ayuda para la obtención de embriones de *L. vannamei*.

A los compañeros del laboratorio: Claudia por su ayuda en los muestreos y consejos, a Itzia López por su apoyo y consejos durante los cursos de maestría así como su gran asistencia



en relación a la técnica de Hibridación *in situ*, Armando, Susana, José Luis, Sara, Pedro Cruz, Betsa, Mayra y Víctor.

A Rosa María Morelos por sus observaciones y ayuda en el laboratorio, así como para el manejo de algunos programas.

A Raúl Llera Herrera por su ayuda y consejos en cuestiones técnicas del laboratorio, edición del documento de tesis, enriquecimiento de presentaciones, las cuales me ayudaron de gran forma.

A mis compañeros de Maestría por su retroalimentación en presentaciones durante los cursos.

Al personal de la biblioteca; Susana Luna García, Ana María Talamantes, María Esther Ojeda Castro y Elizabeth Guadalupe Sánchez Vázquez.

A M. en C. Diana Leticia Dorantes Salas por las sesiones de inglés brindadas, consejos para la edición de materiales en inglés y por su ayuda para la edición del Abstract.

Al laboratorio de Histología e Histoquímica: M. en C. María del Carmen Rodríguez Jaramillo y a María Eulalia Meza Chávez por su disponibilidad para el desarrollo de cortes histológicos.

Agradezco a los responsables de Laboratorio de cómputo Horacio Sandoval Gómez y José Manuel Melero Astorga por su gran apoyo en la instalación de software y soporte técnico.

## ÍNDICE DE CONTENIDO

<b>COMITÉ TUTORIAL.....</b>	<b>I</b>
<b>RESUMEN.....</b>	<b>I</b>
<b>ABSTRACT.....</b>	<b>IV</b>
<b>DEDICATORIA.....</b>	<b>V</b>
<b>AGRADECIMIENTOS.....</b>	<b>VI</b>
<b>ÍNDICE DE CONTENIDO.....</b>	<b>VIII</b>
<b>LISTA DE FIGURAS.....</b>	<b>XI</b>
<b>LISTA DE TABLAS.....</b>	<b>XIV</b>
<b>1. INTRODUCCIÓN.....</b>	<b>1</b>
<b>2. ANTECEDENTES.....</b>	<b>2</b>
<b>2.1 DETERMINACIÓN Y DIFERENCIACIÓN SEXUAL.....</b>	<b>2</b>
2.2 Determinación y diferenciación sexual en el nematodo <i>Caenorhabditis elegans</i> .....	3
2.2.1 Diferenciación sexual somática.....	3
2.2.2 Diferenciación sexual en células germinales de hermafroditas.....	6
2.2.3 Diferenciación sexual en células germinales de macho.....	8
<b>2.3 GENES RELEVANTES EN LA DIFERENCIACIÓN SEXUAL.....</b>	<b>9</b>
2.3.1 Hermafroditización (Her-1).....	9
2.3.2 Transformer 2 (tra-2).....	10
2.3.3 Transformer 3 (tra-3).....	11
2.3.4 Transformer 1 (tra-1).....	12
2.3.5 Los genes <i>fog-1</i> y <i>fog-3</i> .....	14
2.3.6 Los genes <i>fem-1</i> , <i>fem-2</i> y <i>fem-3</i> .....	15
2.3.7 El gen <i>fem-1</i> .....	15
2.3.7.1 <i>fem-1</i> en la reproducción.....	17
<b>2.4 DIFERENCIACIÓN SEXUAL EN <i>Litopenaeus vannamei</i>.....</b>	<b>20</b>
<b>3. JUSTIFICACIÓN.....</b>	<b>22</b>
<b>4. OBJETIVOS.....</b>	<b>23</b>
4.1 OBJETIVO GENERAL.....	23
4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	23
<b>5. HIPÓTESIS.....</b>	<b>24</b>
<b>6. MATERIALES Y MÉTODOS.....</b>	<b>25</b>
<b>6.1 CARACTERIZACIÓN DEL O LOS TRANSCRITOS DEL GEN DE INTERÉS <i>fem-1</i> ..</b>	<b>25</b>
6.1.1 Material biológico.....	25
6.1.2 Diseño de oligonucleótidos para amplificar la región conocida de <i>fem-1</i> así como para la obtención del transcrito.....	26

6.1.3 Extracción de ARN y síntesis de ADNc para la amplificación parcial de <i>fem-1</i> .....	27
6.1.4 Síntesis de ADNc para amplificación de transcritos completos ( <i>full length</i> ) por RACE	29
6.1.5 Amplificación por RACE-PCR de extremos 5' y 3' en gónada de macho y hembra de <i>L. vannamei</i> y PCR 5'-3' anidado .....	29
6.1.6 Amplificación por RACE-PCR de extremos 5' y 3' en pedúnculo de hembras juveniles y embriones de <i>L. vannamei</i> y PCR 5'-3' anidado.....	31
6.1.7 Secuenciación de fragmentos obtenidos RACE-PCR .....	32
6.1.8 Análisis bioinformáticos de secuencias obtenidas.....	33
<b>6.2 ESTABLECER POR PCR- SEMI-CUANTITATIVO SI EL GEN <i>fem-1</i> SE EXPRESA UBICUA O ESPECÍFICAMENTE EN OTROS TEJIDOS .....</b>	<b>34</b>
6.2.1 Material biológico .....	34
6.2.2 Amplificación por PCR semi-cuantitativo en los tejidos de interés .....	34
<b>6.3 LOCALIZACIÓN DEL TRANSCRITO <i>fem-1</i> EN GÓNADA MASCULINA Y FEMENINA DE <i>L. vannamei</i> POR HIBRIDACIÓN <i>in situ</i> .....</b>	<b>35</b>
6.3.1 Transcripción <i>in vitro</i> de sonda de hibridación para <i>fem-1</i> .....	35
6.3.2 Hibridación y detección.....	35
6.3.2.1 Material Biológico .....	35
6.3.2.2 Cortes histológicos .....	35
6.3.2.3 Hibridación <i>in situ</i> .....	36
<b>6.4 BLOQUEO ESPECÍFICO DEL GEN <i>fem-1</i> A TRAVÉS DE RNA DE INTERFERENCIA EN HEMBRAS Y MACHOS ADULTOS.....</b>	<b>36</b>
6.4.1 Diseño de oligonucleótidos para amplificar el ARN de doble cadena <i>fem-1</i> así como al control negativo eGFP (Enhanced Green Fluorescence protein) .....	36
6.4.2 Generación de moldes de transcripción para <i>fem-1</i> y eGFP para síntesis de ARN de doble cadena (dsRNA) .....	37
6.4.3 Transcripción <i>in vitro</i> de ARN de doble cadena .....	38
6.4.4. Material biológico y diseño de experimento de silenciamiento por RNAi .....	40
6.4.5 Validación del silenciamiento por análisis de expresión génica .....	41
6.4.5.1 Extracción de ARN total y síntesis de ADNc .....	41
6.4.5.2 Cuantificación de expresión de genes de interés por qPCR.....	41
6.4.5.3 Análisis de estabilidad de genes de referencia entre tratamientos por tejidos (gónada y pedúnculo ocular).....	42
<b>7. RESULTADOS.....</b>	<b>44</b>
<b>7.1 CARACTERIZACIÓN DEL O LOS TRANSCRITOS DEL GEN <i>fem-1</i> EN <i>L. vannamei</i></b>	<b>44</b>
<b>7.2 ANÁLISIS POR PCR SEMI-CUANTITATIVO PARA ESTABLECER SI EL GEN <i>fem-1</i> SE EXPRESA UBICUA O ESPECÍFICAMENTE EN OTROS TEJIDOS .....</b>	<b>53</b>
7.2.1 PCR semi-cuantitativa en los tejidos de interés.....	53

<b>7.3 LOCALIZACIÓN DEL TRANSCRITO <i>fem-1</i> EN GÓNADA MASCULINA Y FEMENINA DE <i>L. vannamei</i> POR HIBRIDACIÓN <i>in situ</i> .....</b>	<b>54</b>
7.3.1 Localización de <i>fem-1</i> en gónada masculina y femenina. ....	54
<b>7.4 BLOQUEO ESPECÍFICO DEL GEN <i>fem-1</i> A TRAVÉS DE ARN DE INTERFERENCIA EN HEMBRAS Y MACHOS ADULTOS.....</b>	<b>57</b>
7.4.1 Evaluación del silenciamiento de <i>fem-1</i> mediante análisis de expresión génica.....	57
7.4.1.1 Estabilidad de genes de referencia .....	57
7.4.1.2 Expresión relativa de <i>fem-1</i> en gónada y pedúnculo de camarones tratados con dsRNA- <i>fem-1</i> .....	60
7.4.1.3 Expresión relativa de <i>vitelogenina</i> en gónada de camarones tratados con dsRNA- <i>fem-1</i> .....	60
<b>8. DISCUSIÓN .....</b>	<b>62</b>
<b>8.1 CARACTERIZACIÓN DEL O LOS TRANSCRITOS DEL GEN <i>fem-1</i> EN <i>L. vannamei</i></b>	<b>62</b>
<b>8.2 LOCALIZACIÓN POR HIBRIDACIÓN <i>in situ</i> EN GÓNADA DE MACHO Y HEMBRA, Y ANÁLISIS POR PCR SEMI-CUANTITATIVA PARA ESTABLECER SI EL GEN <i>fem-1</i> SE EXPRESA UBICUA O ESPECÍFICAMENTE EN OTROS TEJIDOS .....</b>	<b>65</b>
<b>8.3 BLOQUEO ESPECÍFICO DEL GEN <i>fem-1</i> A TRAVÉS DE ARN DE INTERFERENCIA EN HEMBRAS Y MACHOS ADULTOS.....</b>	<b>68</b>
<b>9. CONCLUSIONES.....</b>	<b>74</b>
<b>10. RECOMENDACIONES.....</b>	<b>75</b>
<b>11. LITERATURA CITADA .....</b>	<b>76</b>
<b>12. ANEXOS.....</b>	<b>87</b>

## LISTA DE FIGURAS

- Fig. 1.** Genes involucrados en la regulación sexual somática de *C.elegans*. Proteínas son mostradas en letras mayúsculas; los nombres de los genes son mostrados en itálica. Interacciones positivas son indicadas con flecha “→”, e interacciones negativas por “-|”. Genes en azul promueven espermatogénesis y en rojo la ovogénesis (Tomado de Zarkower, 2007). ..... 4
- Fig. 2.** Interacciones involucradas en la determinación del sexo somático. El círculo más grande representa una célula somática, mientras que el círculo blanco representa el núcleo. En animales machos XO (Izquierda), HER-1 está unido a TRA-2, y esta inactivación permite que las proteínas FEM actúen en la represión de TRA-1, y que la célula tome el destino de macho. En Hembras XX (derecha), HER-1 no está presente por que TRA-2 inhibe a las proteínas FEM, y esto permite que TRA-1 ejerza su función feminizante (Tomado de Hansen y Pilgrim, 1999) ..... 6
- Fig. 3.** Genes involucrados en la regulación de línea germinal. Proteínas son mostradas en letras mayúsculas; los nombres de los genes son mostrados en itálica. Interacciones positivas son indicadas con una flecha “→”, e interacciones negativas por “-|”. Genes en azul promueven la espermatogénesis y en rojo la ovogénesis (Tomado de Ellis, 2007) ..... 8
- Fig. 4.** FOG-1, FOG-3 y las proteínas FEM promueven la espermatogenesis. Rectángulo con línea punteada son reguladores de la determinación sexual en todos los tejidos; rectángulo con línea solida son reguladores línea germinal-específicos. Proteínas son mostradas en letras mayúsculas; los nombres de los genes son mostrados en itálica. Interacciones positivas son indicadas con una flecha “→”, e interacciones negativas por “-|”. Genes en azul promueven la espermatogénesis y en rojo la ovogénesis (Modificado de Ellis, 2007) ..... 9
- Fig. 5.** *Caenorhabditis elegans* TRA-1 interactúa con *C.elegans* TRA-2ic. (A) *tra-2* codifica dos productos: TRA-2A la cual es una proteína transmembranal y TRA-2ic corresponde a la región citoplasmática de TRA-2A. La región que une a FEM-3 de 1133 a 1273 aa, y MX representa el dominio de reconocimiento por parte de TRA-1. (B) el gen *tra-1* codifica un producto largo TRA-1A mostrando cinco dedos de zinc (Tomado de Wang y Kimble, 2001) ..... 12
- Fig. 6.** (A).Estructura mostrando el arreglo de  $\alpha$ -helices (cilindros) y  $\beta$ -harpin (flechas), las cuales son características de una arquitectura (ANK)-repeat vista de arriba del dominio.(B) consenso de ANK-repeat. Dominios AKN-repeat son ensamblados de múltiples copias de un ~33 residuos motivo. La estructura define el ANK repeat como  $\beta 2\alpha 2$  motivo subrayado en rojo (Tomado de Sedgwick y Smerdon, 1999)..... 16

- Fig. 7.** Expresión de *fem1b* en el desarrollo de la próstata y testículo. B: Expresión de *fem1b* en el seno urogenital en el día postnatal 2. Abreviaciones: ap, próstata anterior; bl, vesícula; dd, conducto deferente. D-H expresión de *fem1b* usando hibridación in situ. D: expresión de *fem1b* en células epiteliales en conductos de la próstata anterior en el día postnatal 9. F-H: expresión de *fem1b* en tubos seminíferos del testículo en el día postnatal 0. F: Mostrado en bajo poder, H: mostrado en alto poder. Notar que la expresión es limitada a células germinales (punta de flecha en H) y no es detectable en los alrededores de las células de Sertoli (Flechas) (Tomado y modificado de Wang *et al.*, 2008)..... 19
- Fig. 8.** Esquema de amplificación de extremos 5' y 3' mediante RACE-PCR mostrando ligeras modificaciones a la forma convencional de traslape para la obtención del transcrito completo ..... 31
- Fig. 9.** Alineamiento múltiple en aminoácidos de las secuencias obtenidas de *fem-1* en *L.vannamei* mostrando las diferencias en longitud en el extremo 5' ..... 46
- Fig. 10.** (A). Alineamiento múltiple en aminoácidos de la secuencia de la proteína de 638aa obtenida para FEM-1 en *Litopenaeus vannamei* contra las secuencias de la proteína FEM-1-like protein de *Daphnia pulex* (GenBank EFX74179), proteína FEM-1 isoforma A de *Caenorhabditis elegans* (GenBank NP\_500824.1) y FEM-1 isoforma B para *Homo sapiens* (GenBank NP\_056137.1) indicando en rectángulos repeticiones conservadas para el dominio ankyrin repeat presente en las secuencias, cada corchete representa una repetición ANK. La tonalidad azul fuerte muestra identidades conservadas y azul claro semiconservadas (B). Muestra la secuencia consenso utilizada para la identificación de ankyrin repeat la cual fue derivada de análisis estadísticos de ~4400 ankyrin repeat usado por Mosavi *et al.* (2002a), representando el nivel conservado para cada posición con diferente color. Elementos correspondientes a estructura secundaria son mostrados en la parte inferior (Tomado de Mosavi *et al.*, 2004) ..... 48
- Fig. 11.** Árbol filogenético de secuencias de proteínas FEM-1B, FEM-1C y FEM-1 en diversas especies, incluyendo la secuencia caracterizada en el presente estudio para *L. vannamei*. .... 50
- Fig.12.** Predicción estructural de la proteína L. vFEM-1 de *L.vannamei* .....51
- Fig.13.** Predicción estructural de la proteína FEM-1a (656aa) de *C. elegans* ..... 51
- Fig.14.** Alineamientos estructurales del modelo proteico L.vFEM-1 contra el modelo de “D34 of human ANKYRIN-R” y FEM-1a de *C. elegans*. ..... 52

- Fig. 15.** Presencia del transcrito *fem-1* en *L.vannamei*. Neg: Negativo. .... 53
- Fig.16.** Expresión de *fem-1* en ovario de adultas de *L. vannamei* determinado por hibridación *in situ*. (A) Ovocitos en pre-maduración, señal de hibridación “antisentido”. La hibridación con sonda “sentido” (B) no mostró señal. Barra escala= A, B) 50µm, N=Núcleo. EP= ovocitos en peri-nucleolos temprano. CC= Criptas corticales. YG= Gránulos de vitelo..... 54
- Fig.17.** Expresión de *fem-1* en testículos de adultos de *L. vannamei* determinado por hibridación *in situ*. (A, E, C, G) señal de hibridación “antisentido” dentro de los túbulos seminíferos (flechas oscuras) y en la periferia de los mismos. La hibridación con sonda “sentido” (B, F, D, H) no mostró señal. Barra escala= A, B, C, D) 50µm, E, F, G,H) 10µm. E.SPMT: Espermátida temprana. N=Núcleo. SP0= Espermatogonia. .... 55
- Fig.18.** Expresión de *fem-1* en vaso deferente de *L. vannamei* determinado por hibridación *in situ*. (A, C) señal de hibridación “antisentido”. La hibridación con sonda “sentido” (B, D) no mostró señal. Barra escala= A, B) 50µm, C, D) 10µm. A.SPMT: Espermátida avanzada. N=Núcleo. AC= Acrosoma. S= Spike. .... 56
- Fig. 19.** Estabilidad evaluada como la media geométrica de los valores obtenidos con los algoritmos que integran RefFinder ..... 58
- Fig. 20.** Expresión relativa de *fem-1* en gónada y pedúnculo de camarones tratados con dsRNA*fem-1* y sin tratamiento control eGFP y salino. Diferentes letras indican diferencias significativas ( $p < 0.05$ ; prueba post-hoc de Fisher para diferencias entre grupos). Las barras de dispersión representan el error estándar. Se utilizaron los genes *ubiquitina* y *L8* para normalizar en gónada y *ubiquitina* y *ef* para pedúnculo. .... 61
- Fig. 21.** Expresión relativa de *vitelogenina* en gónada de ambos sexos de camarones tratados con dsRNA*fem-1* y sin tratamiento control eGFP y salino. Diferentes letras indican diferencias significativas ( $p < 0.05$ ; prueba post-hoc de Fisher para diferencias entre grupos). Las barras de dispersión representan el error estándar. .... 62
- Fig. 22.** Expresión relativa de *L.vfem-1* en gónada y pedúnculo ocular de camarones control salino. Las barras de dispersión muestran el error estándar. .... 67
- Fig. 23.** Vía clásica de interferencia (RNAi) en *Drosophila* (Tomado y modificado de Dykxhoorn y Lieberman, (2005) ..... 69

**Fig.24.** Vías de regulación del gen de la *vitelogenina* en *C. elegans*. La proteína HER-1 en animales machos XO está unido a TRA-2, y esta inactivación permite que las proteínas FEM actúen en la represión de TRA-1, lo que a su vez permita la expresión del gen *mab-3*, codificando un factor de transcripción que inhibe al gen de la *vitelogenina* y por lo tanto que la célula tome el destino de macho. En Hembras XX HER-1 no está presente por lo que TRA-2 inhibe a las proteínas FEM, y esto permite que TRA-1 ejerza su función feminizante bloqueando la expresión del gen *mab-3* y subsecuentemente que la expresión de *vitelogenina* sea llevada. Interesantemente, un fragmento intracelular de TRA-2 (TRA-2ic) también puede interactuar directamente con TRA-1. Cuadros mostrados en azul promueven el destino de macho, y en rosa a hembras. Interacciones positivas son indicadas con una flecha “→”, e interacciones negativas por “-|” ..... 71

## LISTA DE TABLAS

**Tabla I.** Cebadores utilizados para el aislamiento de *fem-1*. T: temperatura de alineamiento ..... 27

**Tabla II.** Cebadores utilizados para sonda RNAi. T: temperatura de alineamiento..... 37

**Tabla III.** Secuencias de oligonucleótidos-cebadores de los genes de referencia y genes blancos. T: temperatura de alineamiento; pb: pares de bases; Cq: Cq mínimo de la curva estándar; E: eficiencia..... 59



## 1. INTRODUCCIÓN

Los camarones de la familia Penaeidae, comúnmente conocidos como peneidos, son considerados entre los más importantes a nivel mundial, tanto para las pesquerías como para el cultivo, existiendo más de 20 especies de camarones que presentan ciertas características atractivas para su cultivo. En México el cultivo del camarón representa la actividad acuícola más importante, en particular por la contribución que hace al valor de la producción y por el dinamismo de su crecimiento en los últimos años en el país (Magallón *et al.*, 2007). Por lo anterior, se encuentra posicionado con respecto al volumen en el segundo lugar de la producción nacional; sin embargo, por su valor lo encontramos en el primer lugar, teniendo una tasa de crecimiento anual en los últimos diez años de 6.24 %. Tan solo en 2011 se produjeron 184,123 toneladas en peso vivo de camarón cultivado (SAGARPA, 2011).

Dentro de las especies de mayor importancia se encuentra *Litopenaeus vannamei* (Boone 1931), conocido comúnmente como camarón blanco del Pacífico, la cual es una especie nativa de la costa Este del Océano Pacífico con una distribución que va desde Sonora, en el Golfo de California, México, hasta las costas del Perú (Martínez Córdova, 1994), y que ha sido diseminado alrededor del mundo para su cultivo.

Una de las características de potencial importancia en los Peneidos es su dimorfismo sexual en talla y peso durante su desarrollo, en donde las hembras crecen más rápido que los machos; tal es el caso del camarón blanco del Pacífico, *Litopenaeus vannamei*, en el cual el dimorfismo sexual comienza alrededor de los 10g de peso (Chow y Sandifer, 1999) y se vuelve más significativo alrededor de los 17g (Pérez-Rostro *et al.*, 1999). Por lo que ésta característica perfila a *L. vannamei* como un modelo para el estudio de los mecanismos involucrados en la determinación /diferenciación sexual como una aproximación a la posible ventaja para el cultivo de camarones a través del monocultivo de hembras. Para ello es necesario profundizar en el estudio de las variables genéticas durante éste proceso, principalmente en entender los mecanismos de regulación involucrados durante la

diferenciación sexual, analizando a diferentes genes conocidos e identificados previamente en otras especies de invertebrados.

## **2. ANTECEDENTES**

### **2.1 Determinación y diferenciación sexual**

La determinación del sexo forma parte integral de la reproducción y es un proceso esencial para la evolución y el enriquecimiento del genoma. Éste tema ha sido objeto de muchos estudios en referencia a especies a través del reino animal (Manolakou *et al.*, 2006).

El reino animal posee diversos mecanismos mediante los cuales se define el género del organismo (Bull, 1983), pero es en los insectos donde se encuentran representados casi todos los tipos de determinación sexual conocidos. Estos mecanismos son clasificados de acuerdo al origen de la señal primaria que determina el sexo tales como: arreglo cromosómico o genes sexo específicos del cigoto, herencia materna y condiciones ambientales (Sánchez, 2008).

El arreglo cromosómico implica diferencias en el mismo, de modo que un sexo es homomórfico y otro heteromórfico para los cromosomas sexuales. Un ejemplo claro tiene lugar en *Drosophila melanogaster*, donde las hembras poseen un par de cromosomas sexuales XX y los machos XY. En otras especies, el sexo heteromórfico posee un factor determinante de macho, el cual puede estar localizado en el cromosoma Y como es el caso de *Musca domestica*, *Ceratitis capitata*, entre otros (Gempe y Beye, 2010). Por otra parte, en lepidópteros ocurre lo contrario, siendo homomórfico en machos (ZZ) y en hembras heteromórfico (ZW). En otras situaciones, las diferencias en los cromosomas son debidas a la existencia de un sistema haplo-diploide como ocurre en *Apis mellifera*, donde las hembras son diploides y los machos haploides (Sánchez, 2008). A nivel genético, el sexo puede estar controlado por un locus o distintos loci (Bull, 1983), en este caso el sexo es determinado por heterocigocidad u homo-/hemicigocidad del gen *csd* (*complementary sex determination*) en la especie *Apis mellifera*. Las hembras son heterocigotas para éste gen

mientras que los machos fértiles son hemicigotos y los machos estériles son homocigotos (diploides) (Gempe y Beye, 2010).

## 2.2 Determinación y diferenciación sexual en el nematodo *Caenorhabditis elegans*.

*C. elegans* y *D. melanogaster* dependen de distintos grupos de proteínas e interacciones moleculares para llevar a cabo la diferenciación sexual. En *C. elegans* el hermafroditismo funcional se determina por un balance genético-cromosómico, resultando en dos condiciones, hermafrodita y macho (los hermafroditas son en realidad “hembras modificadas”, porque es solamente durante el cuarto estadio larvario que producen y almacenan esperma en un soma femenino, el cual es utilizado posteriormente para autofertilización) (Herman, 2005). El proceso de determinación sexual en *C. elegans* inicia con una señal primaria constituida por genes sensibles a la dosis cromosómica (Hansen y Pilgrim, 1999; Hodgkin, 2002; Meyer, 2005). Organismos con dos cromosomas X (XX) y dos conjuntos de autosomas presentan características somáticas de hembra y hermafroditismo en la línea germinal, y por lo tanto son llamados hermafroditas. Por el contrario organismos con un solo cromosoma X (X0) y dos conjuntos de autosomas tienen características de macho tanto en el soma como en la línea germinal.

### 2.2.1 Diferenciación sexual somática.

La regulación sexual somática forma parte de la vía principal que controla la línea germinal (Goodwin y Ellis, 2002). Ésta regulación está constituida principalmente por genes que funcionan como un control jerárquico de regulación negativa para controlar la actividad de TRA-1A (Hodkin, 1987) (Fig 1). La cascada de la determinación del sexo inicia temprano en el embrión, el cual es regulado por la relación del cromosoma X y el juego de autosomas (X:A; Nigon, 1951). La dosis cromosómica determina el nivel de expresión de genes al inicio de la cascada genética que da lugar a la diferenciación sexual, uno de esos genes de regulación es *xol-1* (X0 lethal 1) el cual es reprimido cuando el organismo presenta una dosis cromosómica XX y en una baja dosis X0 su expresión es permitida. La proteína que produce este gen XOL-1 está estructuralmente relacionada a pequeñas moléculas quinasas GHMP, sin embargo, su actividad regulatoria es aun desconocida (Luz *et al.*, 2003). A

traves de estudios geneticos se han identificado genes ligados al cromosoma X denominados X-signal components, entre estos *fox-1* y *sex-1*. FOX-1 es una proteina de union a ARN (Hodgkin *et al.*, 1994; Nicolle *et al.*, 1997; Skipper *et al.*, 1999) que puede reprimir post-transcripcionalmente al gen *xol-1* cuando este último es sobre expresado (Nicolle *et al.*, 1997). SEX-1 está relacionado a receptores nucleares hormonales y reprime la transcripción de *xol-1*, actuando probablemente con union directa al promotor de éste gen. (Carmi y Meyer, 1999). Por otra parte, contrario a estos últimos elementos se encuentran genes ligados a autosomas. Tres genes candidatos fueron identificados en un ensayo para supresores de *fox-1* y *sex-1*. Dos de esos genes han sido encontrados por participar como reguladores transcripcionales: *sea-1* (*Autosomal signal elements*) el cual codifica una proteina T-box y *sea-2* una proteína que presenta un dominio dedo de zinc y un dominio de metaloproteasa (Fig.1).

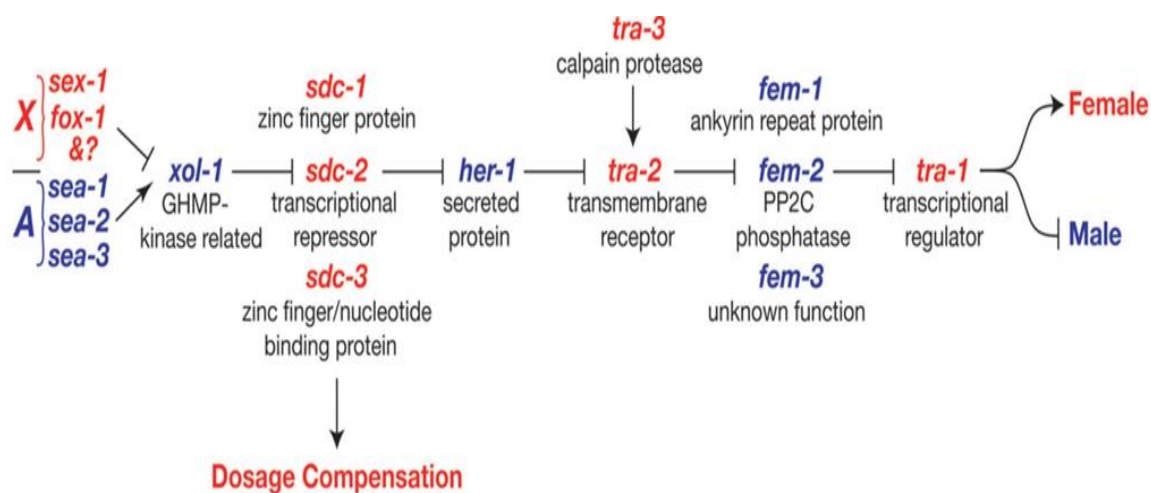


Fig. 1. Genes involucrados en la regulación sexual somática de *C.elegans*. Proteínas son mostradas en letras mayúsculas; los nombres de los genes son mostrados en itálica. Interacciones positivas son indicadas con flecha “→”, e interacciones negativas por “-|”. Genes en azul promueven espermatogénesis y en rojo la ovogénesis (Tomado de Zarkower, 2007).

*Xol-1* a su vez actúa en la supresión de SDC (*Sex determination and dosage compensation*). Las proteínas SDC son componentes de un gran complejo proteico que se localiza en el cromosoma X de hermafroditas en embriogénesis temprana y reducen su transcripción por la mitad. Componentes del complejo de compensación de dosis de proteínas SDC también

controla la determinación de sexo por la unión específica al promotor del gen *her-1*. Sin embargo existen claras evidencias que el proceso de compensación y regulación de *her-1* conllevan procesos mecánicamente distintos. En machos XO el gen *Her-1* (*Hermaphroditization*) promueve la espermatogénesis por la unión e inactivación de la proteína transmembranal TRA-2A (Kuwabara y Kimble, 1995; Kuwabara *et al.*, 1992; Okkema y Kimble, 1991). En hembras XX el gen *Her-1* es reprimido por los genes *sdc* (*sex determination and dosage compensation*) (Schauer y Wood, 1990; Trend *et al.*, 1991). Estudios genéticos han mostrado que la proteína HER-1 puede actuar en distintas células para promover que éstas tomen un destino masculino (Hunder y Wood, 1992), por lo que la no autonomía podría ayudar en asegurar que células adyacentes adopten el mismo destino sexual. Si una célula XO es erróneamente interpretada en su contenido genético, ocasionará una cascada de señalización promoviendo el destino sexual de hembra, pero HER-1 de células vecinas, podrían parar la señal y originar que la célula adopte las características de macho.

Posteriormente, la proteína TRA-2A, a través de su dominio citoplasmático (Mehra *et al.*, 1999), inactiva a la proteína FEM-3 (los genes *fem* fueron denominados por el fenotipo resultante en mutantes: *feminization of XX and XO animals*) (Hodgkin, 1986), la cual se encuentra formando un complejo con otras dos proteínas FEM-1 y FEM-2, por lo tanto, cuando HER-1 se une al dominio extracelular de TRA-2A afecta la capacidad de unión del dominio intracelular en TRA-2A lo que le imposibilita el inactivar a las proteínas FEM, específicamente FEM-3 (Fig. 2).

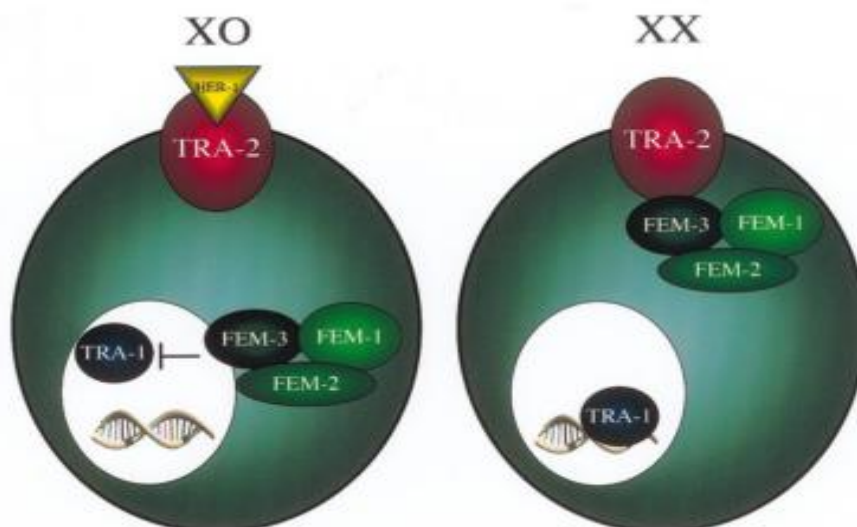


Fig. 2. Interacciones involucradas en la determinación del sexo somático. El círculo más grande representa una célula somática, mientras que el círculo blanco representa el núcleo. En animales machos XO (Izquierda), HER-1 está unido a TRA-2, y esta inactivación permite que las proteínas FEM actúen en la represión de TRA-1, y que la célula tome el destino de macho. En Hembras XX (derecha), HER-1 no está presente por que TRA-2 inhibe a las proteínas FEM, y esto permite que TRA-1 ejerza su función feminizante (Tomado de Hansen y Pilgrim, 1999).

Asimismo las proteínas FEM (FEM-1, FEM-2, FEM-3) van a inactivar a la proteína TRA-1 la cual es un factor de transcripción similar al de *Drosophila melanogaster* y a las proteínas de la familia GLI de tipo *zinc-finger*, mismas que actúan como factores de transcripción en vertebrados (Koebernick y Pieler, 2002). El mecanismo por el cual las proteínas FEM regulan a TRA-1 es mediado por un complejo ubiquitin ligasa CUL-2, en donde FEM-1 es reconocido como el sustrato, y FEM-2 - FEM-3 actúan como cofactores (Starostina *et al.*, 2007).

### 2.2.2 Diferenciación sexual en células germinales de hermafroditas.

La esencia en las vías de regulación sexual somática forma parte central de la vía que controla el destino sexual en la línea germinal. Ésta se encuentra principalmente compuesta por siete genes que son necesarios para dar lugar a la identidad sexual en células germinales y somáticas.

La producción de gametos en organismos XX es dividida dentro de dos fases temporales: espermatogénesis y ovogénesis. En este caso el regulador final del sexo difiere que en el soma, donde *tra-1* es el regulador terminal y funciona promoviendo que las características que dan lugar a la hembra sean completadas cuando está activo y permitiendo el desarrollo de macho cuando éste está inactivo molecularmente (Hodgking, 1987b). En la línea germinal *tra-1* no indica ser el regulador terminal, sin embargo es necesario para el proceso de ovogénesis. Los tres genes *fem* son aparentemente reguladores terminales actuando paralelamente con los genes *fog-1* y *fog-3* (denominados por el fenotipo del mutante: (*feminization of germline*)) (Fig.3), donde la pérdida de función de estos últimos resulta en la producción exclusiva de ovocitos.

El inicio de la fase temporal de espermatogénesis, a diferencia de la línea somática y germinal en machos, no parece ser resultado de la expresión del gen *her-1*, dado que, estudios han observado que el transcrito del gen *her-1* en hermafroditas es bajo o muy poco detectable, por lo que la relación de la producción de gametos debe estar regulada por otros genes adyacentes que permitan ésta condición. Entre los genes identificados se encuentran *gld-1* y *fog-2*, donde las proteínas resultantes involucran un posible mecanismo de inactivación para el transcrito *tra-2*. Mutaciones en el gen *fog-2* feminizan la línea germinal, donde a diferencia de *fog-1* y *fog-3*, la feminización ocurre sólo en organismo XX (Schedl y Kimble, 1988). Además el dominio F-box identificado en la proteína FOG-2 ha sido relacionado por interactuar directamente con la proteína GLD-1 formando un complejo proteico donde este último se une a la región UTR 3' del transcrito de *tra-2* y es capaz de reprimir su traducción (Clifford *et al.*, 2000). La acción de regulación sobre *tra-2* permite el breve periodo de espermatogénesis, y después, la activación de la maquinaria génica para la producción de ovocitos es puesta en marcha. Esta activación requiere que uno o más genes que promueven la producción de esperma sean silenciados, y a su vez sean activados los promotores de ovocitos. Al menos en parte, este mecanismo podría estar reprimiendo la traducción del gen *fem-3* a través de su UTR 3' (Ahringer y Kimble, 1991). Entre los genes identificados se encuentra el gen *fbf-1* y *fbf-2* (*fem-3 binding factor*). Experimentos por genética reversa (Fire *et al.*, 1998), en el cual silenciaron la expresión de

los genes *fbf*, causó la ausencia en la producción de ovocitos y la mayoría de los organismos produjeron esperma (Zhang *et al.*, 1997). Lo anterior es consistente en el sentido que FBF sirve como un regulador negativo de *fem-3*, dado que fenotipos similares son adquiridos en mutantes de *fem-3*. Por consiguiente, la regulación directa sobre *fem-3* parece estar involucrada en la transición de espermatogénesis a ovogénesis. Otros seis genes llamados *mog-1-6* (*M*asculinization *o*f *g*erm *l*ine) parecen estar involucrados de igual forma en la producción de ovocitos (Graham y Kimble, 1993; Graham *et al.*, 1993). A diferencia de los genes *fog*, una pérdida de función por mutación en cualquiera de los genes *mog*, resulta en la masculinización la cual es restringida a la línea germinal.

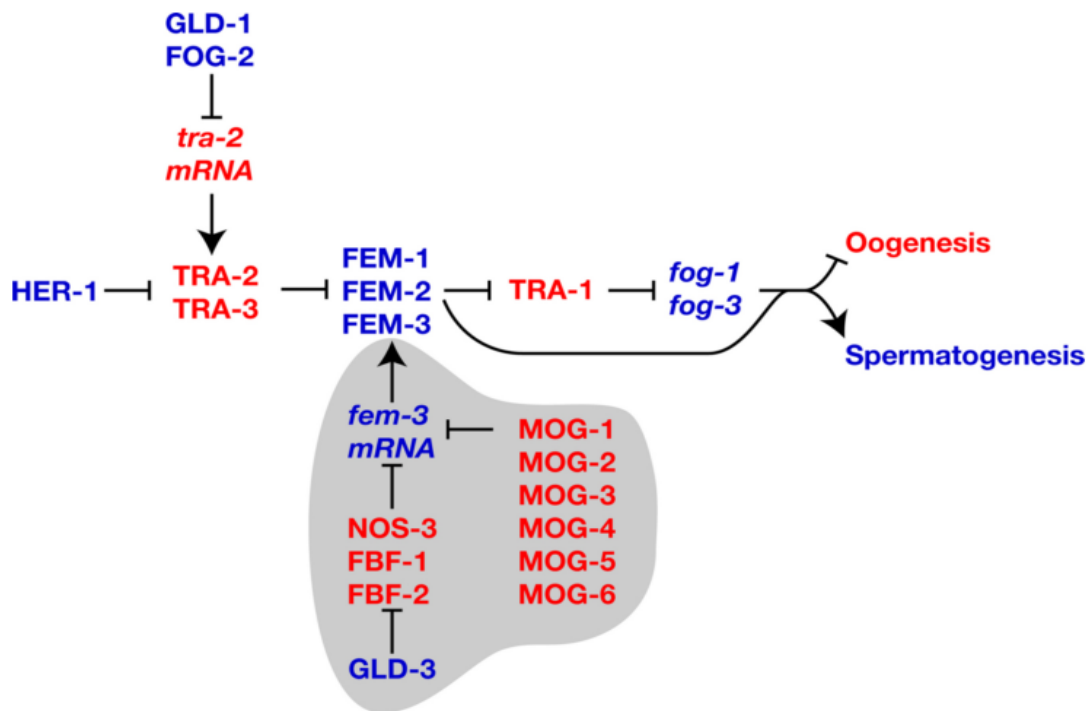


Fig. 3. Genes involucrados en la regulación de línea germinal. Proteínas son mostradas en letras mayúsculas; los nombres de los genes son mostrados en itálica. Interacciones positivas son indicadas con una flecha “→”, e interacciones negativas por “-|”. Genes en azul promueven la espermatogénesis y en rojo la ovogénesis (Tomado de Ellis, 2007).

### 2.2.3 Diferenciación sexual en células germinales de macho.

En machos, la espermatogénesis requiere de la actividad de *her-1*, lo cual contrasta con la etapa temporal de espermatogénesis en organismos hermafroditas, donde la actividad de



*her-1* no es requerida. Estudios genéticos han mostrado que la actividad continua de *her-1* es necesaria para mantener la espermatogénesis en la línea germinal de los machos. De igual forma que en el tejido somático del macho, un modelo ha sido propuesto en el cual HER-1 inactiva TRA-2A, el cual posteriormente es incapaz de inhibir la función de los genes *fem*. Mutaciones realizadas sobre los genes *fem* resultan en la feminización tanto en el soma como en la línea germinal del organismo X0 (Doniach y Hodgking, 1984; Kimble *et al.*, 1984; Hodgking, 1986), mientras que la pérdida en la función de *fog-1* y *fog-3* ocasiona feminización únicamente de la línea germinal. (Barton y Kimble, 1990; Ellis y Kimble, 1995).

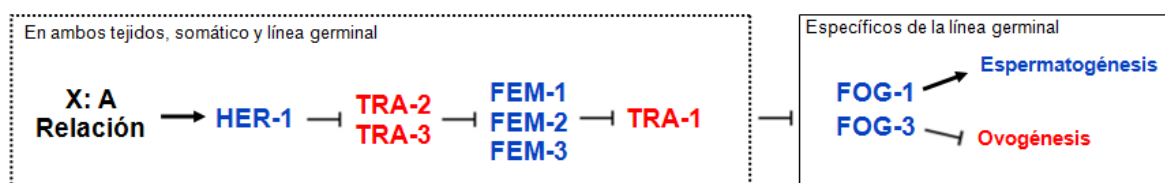


Fig. 4. FOG-1, FOG-3 y las proteínas FEM promueven la espermatogénesis. Rectángulo con línea punteada son reguladores de la determinación sexual en todos los tejidos; rectángulo con línea sólida son reguladores línea germinal-específicos. Proteínas son mostradas en letras mayúsculas; los nombres de los genes son mostrados en itálica. Interacciones positivas son indicadas con una flecha “→”, e interacciones negativas por “-|”. Genes en azul promueven la espermatogénesis y en rojo la ovogénesis (Modificado de Ellis, 2007).

## 2.3 Genes relevantes en la diferenciación sexual.

### 2.3.1 Hermafroditización (*Her-1*).

En organismos X0, *her-1* actúa para promover el desarrollo de los machos, su actividad es limitada para el desarrollo de los mismos; mutaciones en *her-1* transforman organismo X0 en hermafroditas (Hodgking, 1986). El gen *her-1* codifica dos productos, un transcrito de 1.2 kb (HER-1A) relativamente raro el cual es expresado exclusivamente en organismos X0 y es el producto funcional de *her-1*. Un segundo transcrito de 0.8 kb con mayor abundancia y función aun desconocida, sin embargo en organismos hermafroditas esta variante muestra bajos niveles en embriones y en los inicios del desarrollo larval (L1) de *C.elegans* (Perry *et al.*, 1993; Trent *et al.*, 1991). HER-1A referido únicamente como HER-1, es una proteína

de 175 aminoácidos que es rica en residuos de cisteína y posee una secuencia señal amino-terminal así como un sitio de escisión, asimismo los análisis de cristalografía definen la estructura de HER-1, la cual consiste de dos dominios helicoidales y no es estrechamente homóloga a cualquier estructura conocida (Hamaoka *et al.*, 2004).

### 2.3.2 Transformer 2 (*tra-2*).

Su actividad es necesaria para adoptar todas las características que dan lugar a las hembras. Mutantes nulas en *tra-2* transforman a organismos hermafroditas XX en machos (Hodgking y Brenner, 1977).

El gen *tra-2* codifica transcritos de tres tamaños, 5kb, 1.8 Kb y 1.9 Kb (Okkema y Kimble 1991). El transcrito de mayor tamaño 5kb es encontrado a través del desarrollo y es expresado tanto en línea somática como germinal. La función (s) de los transcritos de 1.8kb y 1.9 son inciertas. Sin embargo, han sido encontrados distintos patrones de detección en diferentes etapas del desarrollo para estos dos transcritos. El transcrito de 1.8 kb es primero detectado justo antes del inicio de la ovogénesis, y no es encontrado en mutantes que carecen de línea germinal. Lo anterior coloca a este transcrito como un posible interruptor para la transición de espermatogenesis a ovogénesis, la cual es llevada en la línea germinal de organismos hermafroditas (Okkema y Kimble, 1991). Análisis genéticos han sugerido que la espermatogenesis en hermafroditas depende sobre la inhibición de la actividad de *tra-2* (Doniach, 1986; Shedl y kimble, 1988). Por lo tanto, el producto del transcrito podría mitigar esta inhibición por la unión a un inhibidor o codificando un producto resistente a dicho bloqueo transcripcional. Alternativamente su producto podría inhibir genes *fem* incorporados como un efecto maternal (Rosenquist y Kimble, 1988).

Comparaciones realizadas en organismos adultos hermafroditas y machos en los diversos transcritos producidos por el gen *tra-2* revelan diferencias en cantidad y tipo. Machos adultos acumulan menos *tra-2* que hermafroditas, además, machos expresan la variante de 1.9 kb, mientras que adultos hermafroditas presentan la variante de 1.8 kb. Aunque hermafroditas también expresan la variante pequeña durante el desarrollo larval, se cree que

ésta última pueda estar asociada a la primera fase temporal (espermatogenesis), lo que podría estar representando un funcionamiento específico de macho (Okkema y Kimble, 1991).

### 2.3.3 Transformer 3 (*tra-3*).

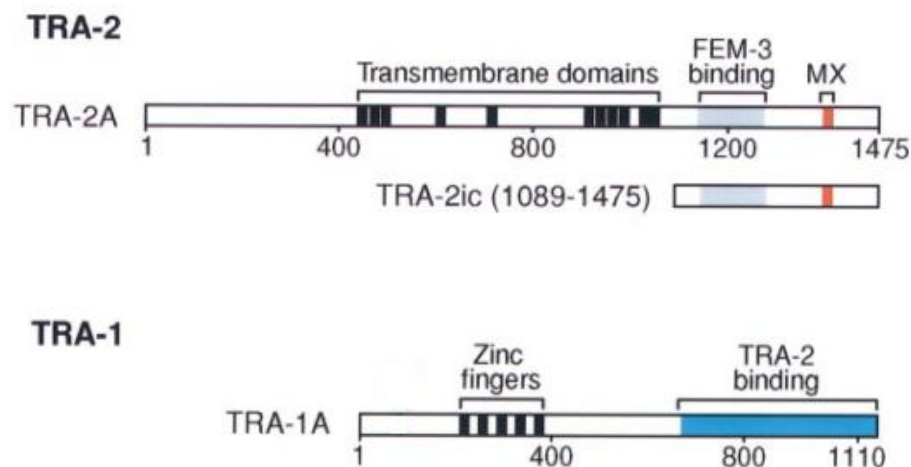
El gen *tra-3* actúa a un mismo nivel genético como lo hace *tra-2* y está estrechamente relacionado en el desarrollo temporal femenino en animales XX. La dosis génica de *tra-3* requerida para el desarrollo de hembras es mucho más bajo que la dosis requerida para la actividad de *tra-2* (Hodgkin y Brenner, 1997). Al parecer este gen es de funcional importancia solo en organismos hermafroditas, dado que mutantes nulas en organismos machos X0 se desarrollan perfectamente (Hodgkin, 1986). Sin embargo mutantes en animales XX resultan en anomalías tanto en el soma como en la línea germinal, y estos organismos se desarrollan en una condición de intersexo y son estériles (Hodgkin y Brenner, 1997; Hodgkin, 1985).

Análisis genéticos de *tra-3* han sugerido que su producto podría actuar como un potenciador de *tra-2*. Asimismo, análisis moleculares sitúan a la proteína TRA-3 como un miembro de la familia de la calpaína. Estas últimas fungen como proteasas en procesos regulatorios. Posibles sustratos incluyen proteínas transmembranal y receptores nucleares hormonales, componentes del citoesqueleto, etc. (Goll *et al.*, 1992) Dada la gran diversidad, los requerimientos de TRA-3 son consistentes con una función catalítica y de acción sobre una de las otras proteínas reguladoras en la cascada de determinación del sexo. TRA-2 y FEM-1 poseen características de los sustratos conocidos de calpaína. Específicamente, el dominio carboxi-terminal de la proteína TRA-2A, es rico en secuencias de degradación de proteínas (Kuwabara *et al.*, 1992), las cuales se cree son un objetivo de calpains (Rechsteiner, 1990), mientras que FEM-1 contiene repeticiones ANK (Spence *et al.*, 1990). En un modelo, TRA-3 podría activar TRA-2A, y por lo tanto promover el secuestro o inactivación de las proteínas FEM, mientras por el otro lado TRA-3 podría inactivar a las proteínas FEM (Barnes y Hodgkin, 1996).

### 2.3.4 Transformer 1 (*tra-1*).

El gen *tra-1* controla el destino de las células germinales regulando la transcripción de los genes *fog-1* y *fog-3*. Cada gen *fog* tiene de 3 a 6 sitios potenciales de unión para TRA-1 (Chen y Ellis, 2000; Jin *et al.*, 2001a). Por otro lado, la interacción de TRA-1 con el dominio de la región intracelular de TRA-2A ha sido evidenciada, donde el gen *tra-2* codifica múltiples transcritos para generar la proteína antes mencionada y TRA-2B, el cual corresponde al dominio intracelular (ic) de TRA-2A de su propia membrana, alternativamente la obtención de éste fragmento es dada por una ruptura directa en TRA-2A el cual es fragmentado por una proteasa TRA-3 para liberar el fragmento TRA-2ic de su membrana (Fig.4).

(A)



(B)

Fig. 5. *Caenorhabditis elegans* TRA-1 interactúa con *C.elegans* TRA-2ic. (A) *tra-2* codifica dos productos: TRA-2A la cual es una proteína transmembranal y TRA-2ic corresponde a la región citoplasmática de TRA-2A. La región que une a FEM-3 de 1133 a 1273 aa, y MX representa el dominio de reconocimiento por parte de TRA-1. (B) el gen *tra-1* codifica un producto largo TRA-1A mostrando cinco dedos de zinc (Tomado de Wang y Kimble, 2001).

La unión de estas dos proteínas depende de la región regulatoria de TRA-2(MX) misma que provee un nuevo mecanismo por el cual TRA-1 y TRA-2 actúan juntos para influenciar en la determinación sexual. Análisis moleculares con mutaciones puntuales en la región MX de *tra-2*, la cual es crítica para la diferenciación sexual, trajo consigo la idea de la existencia de que un represor podría estar uniendo la región TRA-2(MX) y por lo tanto inhibiendo la actividad feminizante de TRA-2 para en su lugar promover la espermatogénesis. Una posibilidad es que ese represor sea TRA-1 y por consecuencia la posibilidad inversa donde TRA-2 podría reprimir TRA-1 también es considerada. Lo anterior coloca a la proteína TRA-1 en un contexto de no solo ser un gen que promueve la ovogénesis. Un mecanismo por el cual TRA-1 controla la línea germinal parece ser transcripcional, donde el gen *fog-3* es requerido para producción de esperma (Ellis y Kimble, 1995), el cual contiene una serie de sitios de unión TRA-1 en su promotor (Chen y Ellis, 2000). Interesantemente estos sitios de TRA-1 pueden mediar la activación o reprimir la activación del promotor de *fog-3*. Lo anterior sugiere a que TRA-1 active la expresión del gen *fog-3* a un nivel de expresión o en un estado crítico por machos y larvas hermafroditas, y un segundo caso donde reprime al gen *fog-3* durante la ovogénesis. La unión de TRA-2 a TRA-1 podría promover espermatogénesis, donde por ejemplo, el secuestro de TRA-1 por TRA-2 podría disminuir la disponibilidad de TRA-1 y mantener a este último en un nivel apropiado para la activación del gen *fog-3*. Un escenario alternativo involucra a la proteína FEM-3, que es requerida para el desarrollo de macho. La región N-terminal de TRA-2<sup>ic</sup> une a FEM-3 e inhibe su habilidad para el desarrollo correcto del macho (Mehra *et al.*, 1999), por lo que la unión de TRA-1 a la región C-terminal de TRA-2<sup>ic</sup> podría activar a FEM-3. Posibles mecanismos para tales activaciones incluyen modificaciones espaciales necesarias para la actividad, promoviendo el ensamble dentro de un complejo activo, o compitiendo con FEM-3 y consecuentemente dejando libre a FEM-3 para el desarrollo masculino (Wang y Kimble, 2001).

Por otra parte, *tra-1* también es encargado de regular al gen *mab-3*, un homólogo funcional de éste gen es encontrado en *Drosophila melanogaster* como *dsx* (*Doublesex*), el cual es uno de los más conservados evolutivamente desde vertebrados (*dmrt-1*, *doublesex* and

*mab-3 related transcription factor 1*) hasta invertebrados (Gempe y Beye, 2010). El gen *dsx* ocupa una posición clave en la parte inferior de la jerarquía regulatoria, sus productos protéicos son parte de la familia con el dominio DM (dominio de unión al ADN), que contienen un grupo estructural y funcional del tipo *zinc-finger* de unión al ADN.

Homólogos de *tra-1* han sido directamente identificados en *C. briggsae* mediante hibridación de baja astringencia (Bono y Hodgkin, 1996). En el caso de *C. briggsae*, *tra-1* también genera dos transcritos, y aunque ambos son aproximadamente de 5 kb, éstos codifican proteínas que difieren en la región amino terminal. Estudios realizados han establecido que el homólogo *tra-1* de *C. briggsae* comparte algunas, pero no todas las propiedades de *tra-1* de *C. elegans*. Por ejemplo, la masculinización somática provocada en animales XX por una mutación del gen *tra-1* en *C. elegans* puede ser revertida por la expresión de TRA-1 de *C. briggsae*, sin embargo, la masculinización de la gónada no es afectada o revertida (Bono y Hodgkin, 1996).

### 2.3.5 Los genes *fog-1* y *fog-3*.

El gen *fog-1* produce dos transcritos (Jin *et al.*, 2001a; Liutjens *et al.*, 2000). El transcrito más grande es el producto activo, el producto pequeño no tiene actividad detectable (Jin *et al.*, 2001a; Jin *et al.*, 2001b). FOG-1 contiene dos sitios de reconocimiento de ARN (RRMs) y un dominio C-H que liga zinc e interactúa con ARN (Mendez y Richter, 2001). Además, FOG-1 puede unirse al mensajero *fog-1* (Jin *et al.*, 2001a), formando probablemente un mecanismo de autorregulación. El gen *fog-3* expresa un solo transcrito de 1.2 kb que es dependiente de la línea germinal. Su proteína se encuentra clasificada dentro de la familia de proteínas Tob de unión a poli-A (Chen *et al.*, 2000). Estas proteínas están presentes en todos los animales, y comparten un dominio amino-terminal de 115 aminoácidos, y diferentes proteínas de la familia Tob han sido involucradas como participantes en el control de la diferenciación y división celular (Ellis, 2007).

### 2.3.6 Los genes *fem-1*, *fem-2* y *fem-3*.

Al igual que en células somáticas, los genes *fem* (nombrados originalmente por el fenotipo resultante en mutantes: *feminization of XX and XO animals*) regulan la actividad de *tra-1* en células germinales, y son esenciales para la espermatogénesis tanto en machos como en hermafroditas (Doniach y Hodgkin, 1984). Las tres proteínas FEM (*fem-1*, *fem-2*, y *fem-3*) son un grupo diverso, cuya bioquímica no es muy clara. FEM-1 posee repeticiones de tipo *ankyrin*, lo que le confiere la característica de mediar interacciones de tipo proteína-proteína (Spence *et al.*, 1990). FEM-2 es una proteína fosfatasa serina/treonina, y FEM-3 es una nueva proteína que no presenta dominios conservados (Ahringer *et al.*, 1992). Cada proteína integrada al complejo protéico FEM desempeña funciones clave para la diferenciación del sexo en machos. Por ejemplo, en hembras, FEM-3 interactúa directamente con la región C-terminal citoplasmática de TRA-2 para mediar la inhibición de las proteínas FEM (Mehra *et al.*, 1999). FEM-2 interactúa con FEM-3 mediante su dominio PP2C, sin embargo no se ha establecido una función puntual. FEM-1 es una proteína altamente conservada desde invertebrados hasta vertebrados, lo cual implica que su función es clave en la diferenciación sexual, y su importancia en *C. elegans* es evidente, dado que es un regulador negativo de TRA-1.

### 2.3.7 El gen *fem-1*.

FEM-1 es una proteína soluble e intracelular, la cual contiene 6 repeticiones de tipo *ankyrin*. Los dominios “*ankyrin repeat*” (ANK) son una de las secuencias más conservadas y abundantes. En 1987, dicha secuencia fue descubierta por Breidden y Nasmyht donde identificaron una secuencia de ~ 33 residuos, la cual participa en la regulación del ciclo celular en levaduras. Proteínas ANK llevan a cabo una amplia variedad de interacciones biológicas con proteínas membranales estructuralmente diversas a través de su dominio con repeticiones ANK, incluyendo reguladores del ciclo celular, enzimas mitocondriales, proteínas que intervienen en el intercambio iónico y canales de calcio. Esta clase de moléculas han sido detectadas desde virus hasta humanos. A pesar de las múltiples funciones reportadas, el papel de éste tipo de proteínas en mediar interacciones proteína-

proteína ha sido bien documentado, la cual es atribuida a su característica estructural, formando configuraciones  $\beta$ -harpin-helice-loop-helice ( $\beta 2\alpha 2$ ) (Sedgwick y Smerdon, 1999) dadas por su secuencia conservada (fig.6).

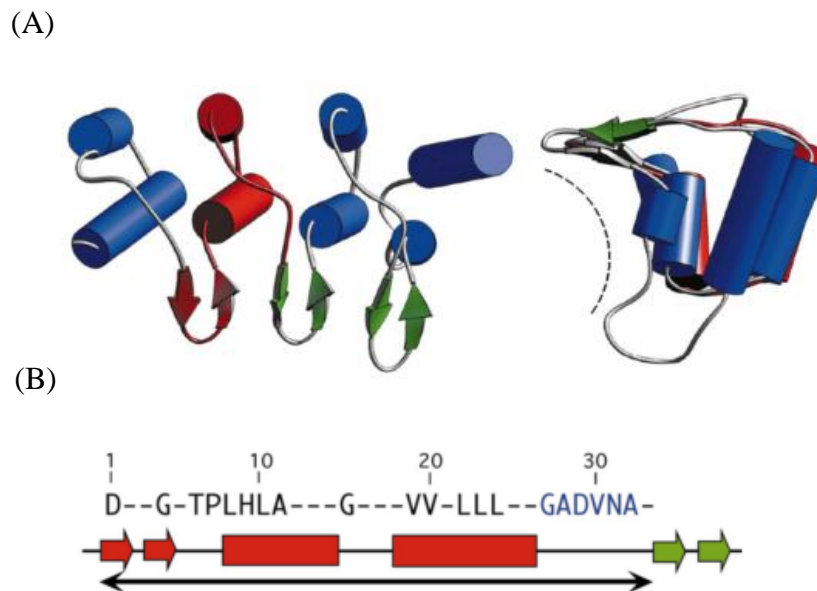


Fig. 6. (A).Estructura mostrando el arreglo de  $\alpha$ -helices (cilindros) y  $\beta$ -harpin (flechas), las cuales son características de una arquitectura (ANK)-repeat vista de arriba del dominio.(B) consenso de ANK-repeat. Dominios AKN-repeat son ensamblados de múltiples copias de un  $\sim 33$  residuos motivo. La estructura define el ANK repeat como  $\beta 2\alpha 2$  motivo subrayado en rojo (Tomado de Sedgwick y Smerdon, 1999).

Estudios han observado que a diferencia de FEM-2 y FEM-3, FEM-1 es altamente conservado a lo largo de la evolución. En mamíferos tres genes *fem1a*, *fem1b* y *fem1c* han sido identificados, los cuales codifican proteínas que muestran alrededor de 30% de similitud en aminoácido con el FEM-1 de *C. elegans* (Ventura-Holman *et al.*, 1998). Homólogos de *fem-1* también han sido clonados de *C. briggsae*, así como en ratón, presentando de 30% a 36% de similitud con *fem-1* de *C. elegans* (Ventura-Holman *et al.*, 1998). Otro homólogo, *fem1-C* ha sido encontrado en el ave pinzón cebra *Taeniopygia guttata* (Ventura-Holman *et al.*, 2005), donde la expresión en testículo resultó ligeramente



más alta que en ovario, además de encontrar que la proteína se localiza en el citoplasma en células de fibroblastos, al igual que en *C. elegans* (Itoh *et al.*, 2009).

Cuando una pérdida de la función es inducida en cualquiera de los tres genes *fem* en *C. elegans* mediante ARN de interferencia (ARNi) tanto en machos como hermafroditas, resulta en hembras fértiles para ambos sexos, esto es, el sexo macho es eliminado. Dado lo anterior, se han realizado pruebas utilizando ARNi para explorar la función de estos genes en otros nematodos. Esta metodología de genética reversa ha sido realizada contra varios genes ortólogos de *C. briggsae* y *C. remanei* involucrados en la determinación del sexo, y con excepción de los genes *fem*, los fenotipos observados en estos experimentos son idénticos o similares a los vistos en *C. elegans* (Stothard y pilgrim, 2003). En el caso de estudios con ARN de interferencia de los genes *fem* en otras especies de nematodos han fracasado, ya que no muestran ninguna anomalía esperada en la línea germinal comparado con resultados en *C. elegans*, mientras que el bloqueo de la expresión mediante ARNi contra cualquiera de los genes *fem* en *C. elegans* causa una feminización en hermafroditas (Stothard *et al.*, 2002; Haag *et al.*, 2002; Fire *et al.*, 1998). Por ejemplo, en *C. briggsae*, hermafroditas no muestran señales de feminización en la línea germinal cuando sus genes *fem* son bloqueados (Stothard *et al.*, 2002; Haag *et al.*, 2002). En machos de *C. remanei*, los cuales han sido tratados para inhibir *fem-3* por dsRNA tampoco mostraron efectos en su línea germinal (Haag *et al.*, 2002). Lo anterior ha llevado a concluir que los genes *fem* podrían no estar regulando el sexo en la línea germinal de otros nematodos como lo realizan en *C. elegans* (Stothard y pilgrim, 2003), ya que en el caso de inhibición de otros genes involucrados en la diferenciación sexual, como *glp-1*, *tra-2* y *fog-3* sí ha resultado en los fenotipos esperados. En forma general, la interferencia por ARN de doble cadena puede eventualmente revelar que muchos ortólogos de los genes que regulan la determinación en *C. elegans* pueden o no regular el destino del sexo en otras especies.

#### 2.3.7.1 *fem-1* en la reproducción.

En ratones, el producto del gen *fem1b*, homólogo del gen *fem-1* en *C. elegans*, ha sido estudiado por presentar interacción con la proteína NKX3.1, la cual es requerida para el

correcto desarrollo sexual secundario (Wang *et al.*, 2008). NKX3.1 es un factor de transcripción que puede unir secuencias específicas de ADN y mostrar activación e inhibición transcripcional *in vitro* e *in vivo* (Shen y Abate, 2003). Esta proteína ha sido identificada mediante estudios en relación al crecimiento de células epiteliales y diferenciación en la próstata, actuando como un regulador del desarrollo de la próstata y carcinogénesis. Mediante hibridación *in situ* se observó que *fem1b* y *Nkx3.1* son co-expresados durante la organogénesis en células epiteliales de la próstata, así como en células germinales de testículos neonatales (Fig. 7B-D). En éste estudio también se observó que *fem1b* es expresado específicamente en células germinales localizadas dentro de los tubos seminíferos del testículo, mientras que no se detectó expresión en células de Sertoli (Fig. 7D). En testículos de adultos, *fem1b* fue altamente expresado en espermatogonias (Wang *et al.*, 2008). Además, mutantes para *fem1b* y *Nkx3.1* muestran efectos en la morfogénesis ductal y en la expresión de las proteínas secretoras prostáticas, lo que sugiere que *Nkx3.1* y *fem1b* interactúan en la regulación del crecimiento epitelial de la próstata y su diferenciación (Wang *et al.*, 2008).

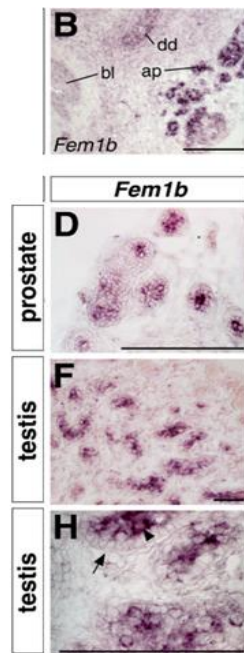


Fig. 7. Expresión de *fem1b* en el desarrollo de la próstata y testículo. B: Expresión de *fem1b* en el seno urogenital en el día postnatal 2. Abreviaciones: ap, próstata anterior; bl, vesícula; dd, conducto deferente. D-H expresión de *fem1b* usando hibridación *in situ*. D: expresión de *fem1b* en células epiteliales en conductos de la próstata anterior en el día postnatal 9. F-H: expresión de *fem1b* en tubos seminíferos del testículo en el día postnatal 0. F: Mostrado en bajo poder, H: mostrado en alto poder. Notar que la expresión es limitada a células germinales (punta de flecha en H) y no es detectable en los alrededores de las células de Sertoli (Flechas) (Tomado y modificado de Wang *et al.*, 2008).

Otros estudios han mostrado que la proteína FEM1 no es exclusiva de la diferenciación sexual en distintos grupos taxonómicos. Por ejemplo, el producto protéico de *fem-1* de *C. elegans* y *fem1b* de humano han sido asociados a una función de inducción de apoptosis cuando resultan sobreexpresados en células de neuroblastoma y fibrosarcoma, lo cual es consistente con la interacción de *fem1b* de ratón con la proteína FAS y *tumor necrosis factor receptor 1*, dos miembros de la familia de los *death receptors* (Chan *et al.*, 1999; Chang *et al.*, 2000). Adicionalmente se ha establecido que *fem1b* se expresa en islotes pancreáticos y tiene una función en la secreción de insulina y por tanto en los niveles de glucosa en el plasma, lo cual sugiere un posible vínculo entre genes que determinan el sexo y vías de regulación de insulina (Lu *et al.*, 2005).

Recientemente algunos SNPs (*Single Nucleotide polymorphisms*) en homólogos a *fem-1* en humanos (*fem1a-fem1b*) han sido asociados al síndrome de ovario poliquístico (PCOS). Una de las bases para considerar que *fem1a* es un gen candidato para PCOS es su homología con el gen *fem-1* de *C.elegans*, el cual como ha sido mencionado antes, funciona en la masculinización en el nematodo, es el hiper-androgenismo presentado en PCOS, el cual puede ser considerado una forma de masculinización débil (Goodaezi *et al.*, 2008).

#### **2.4 Diferenciación sexual en *Litopenaeus vannamei*.**

Los estudios genéticos encaminados hacia el entendimiento de los mecanismos involucrados en la determinación/diferenciación sexual en camarones han ido en aumento. Particularmente en *L. vannamei* se ha establecido un sistema genético estable en la determinación sexual donde las variables medioambientales (temperatura, fotoperiodo, densidades de cultivo, disponibilidad de alimento) no muestran señales de tener un efecto en la proporción de sexos (Campos-Ramos *et al.*, 2006). A nivel molecular, recientemente se aisló un fragmento parcial de la secuencia de la hormona de la glándula androgénica (GA) presentando la estructura proteica característica de la familia tipo-insulinas (Garza-Torres *et al.*, 2009). Esta hormona ha sido colocada en otras especies como la responsable de regular la expresión de genes involucrados en mecanismos de diferenciación sexual, en donde hembras implantadas con la GAs presentaban una disminución en el proceso de vitelogénesis, por otro lado en machos a los cuales se les removió la GA, se observaron transcritos del gen que codifica para *vitelogenina*. Otro caso sucede en hembra de langosta de *C. quadricarinatus*, donde lograron inhibir la vitelogénesis como el desarrollo de los ovarios mediante la implantación de la glándula androgénica, además de observar características secundarias de macho. Sin embargo las observaciones en la organogénesis realizada en *L. vannamei* muestran que las células que dan lugar a la glándula androgénica aparecen una vez que el sexo ha sido definido, por lo que la glándula parece más bien fungir como un componente endocrino de mantenimiento de la condición sexual masculina.

Otro gen de importancia en el mecanismo de diferenciación sexual es *tra-2*, aislado en *Penaeus monodon* (*PMtra-2*) mediante el análisis de secuencias obtenidas a partir de

librerías SSH (*Supressive Subtractive Hibrydization*) de la región testicular (Leelatanawit *et al.*, 2009). Asimismo sus patrones de expresión mediante PCR en tiempo real han sido observados tanto en la región masculina como femenina de la gónada. El papel de este gen ha sido determinado en distintas especies de insectos como *Drosophila melanogaster*, donde la determinación sexual es llevada bajo el control del gen *sex lethal (Sxl)* el cual participa en el corte alternativo (*splicing*) de su propio pre-ARNm. La localización de *tra* bajo de este último, se encuentra el gen transformer (*tra*) el cual codifica una proteína no funcional en macho. Sin embargo, *tra* - en cooperación con el gen *tra-2* - induce un corte alternativo específico del pre-ARNm del gen *doublesex (dsx)* promoviendo el desarrollo sexual en las hembras (Salz y Erickson, 2010). Por lo tanto el descubrimiento de PMtra-2 sugiere que la diferenciación sexual en *P. monodon* podría estar siendo influenciada por la vía de regulación *sxl-dsx-tra*.

### 3. JUSTIFICACIÓN

La producción de camarón blanco se coloca entre las más importantes a nivel mundial y, en México, representa una actividad que se está desarrollando rápidamente, teniendo una contribución significativa al valor de la producción total de la actividad acuícola, por lo que se requiere desarrollar herramientas biotecnológicas capaces de ayudar en el sustento y crecimiento de la producción camaronícola. Aunque se ha sugerido la ventaja del cultivo monosexual en términos de mejor crecimiento de las hembras, esto no se ha realizado como una práctica tecnológica de producción debido a que se carece de herramientas biotecnológicas prácticas para la manipulación del sexo en poblaciones de cultivo. Por esta razón, el estudio de los mecanismos que rigen la diferenciación sexual en *Litopenaeus vannamei* a nivel genético-molecular permitiría detectar algún proceso potencial y técnicamente manipulable. Uno de los genes más conservados desde invertebrados hasta vertebrados es *fem-1* que, de manera conjunta con varios genes presentes dentro de una cascada de regulación, se encuentran involucrados en la diferenciación sexual en el nematodo *C. elegans*. Ortólogos de éste gen en vertebrados han sido asociados más recientemente a procesos reproductivos. Por lo que la caracterización del gen *fem-1* en *Litopenaeus vannamei*, así como el bloqueo específico de *fem-1* a través de ARN de interferencia, aportará información para inferir los mecanismos de diferenciación sexual y/o desarrollo gonadal, permitiendo en un futuro el desarrollo de herramientas para el mejoramiento del cultivo.

## 4. OBJETIVOS

### 4.1 Objetivo general.

Caracterizar el transcrito del gen *feminization of XX and XO animals (fem-1)* expresado en hembras y machos de *L. vannamei*, y establecer su papel en la diferenciación sexual.

### 4.2 Objetivos específicos.

1. Caracterizar el o los transcritos del gen *fem-1* en camarón blanco *L. vannamei* en gónada de macho y hembra, en pedúnculo de juveniles y en embrión, realizando RACE-PCR por tejido.
2. Establecer por PCR punto final si el gen *fem-1* se expresa ubicua o específicamente en otros tejidos.
3. Localización del transcrito *fem-1* en gónada masculina y femenina de *L. vannamei* por hibridación *in situ*.
4. Determinar el efecto fenotípico en el desarrollo gonádico por el bloqueo específico del gen *fem-1* a través de ARN de interferencia en hembras y machos adultos.

## **5. HIPÓTESIS**

Si el gen *fem-1* está implicado en la diferenciación sexual de la gónada en *Litopenaeus vannamei*, entonces éste estará involucrado en la espermatogénesis, por lo que su inhibición por ARN de interferencia repercutirá negativamente en el desarrollo gonadal-sexual del macho pero no de la hembra.



## 6. MATERIALES Y MÉTODOS

### 6.1 Caracterización del o los transcritos del gen de interés *fem-1*.

#### 6.1.1 Material biológico.

Como fuente de material biológico, se utilizaron organismos machos adultos con peso promedio de 30-35g, así como hembras adultas con peso promedio de 35-40g, ambos organismos mantenidos como reproductores en la empresa Fitmar. Adicionalmente, se colectaron hembras juveniles de los estanques intermareales del CIBNOR, las cuales no presentaban desarrollo gonádico. De todos los organismos mencionados se colectaron porciones de tejido gonadal para análisis en ARN y para análisis histológicos, así como de pedúnculo ocular para análisis en ARN.

Adicionalmente, se realizó un muestreo de embriones de *L. vannamei* el mes de junio del 2012 en la empresa Acuicultura Mahr. Diez tanques fueron muestreados cada 30 min después del desove por las primeras dos horas y posteriormente se tomaron muestras cada hora por las siguientes 10 horas, colectando embriones para histología y análisis de expresión. Las muestras destinadas a histología se fijaron tanto en solución Davidson (4% formaldehído, 10% etanol en agua de mar filtrada), como en paraformaldehído 4% en PBS 1X. De los diez tanques analizados se seleccionaron 3, los cuales presentaban mayor homogeneidad cuando fue tomada la muestra cada 30 min después de haberse producido el desove por las primeras dos horas y subsecuentemente cada hora por las siguientes diez horas.

Los tejidos destinados para el aislamiento de ARN total fueron preservados en solución fijadora de ácidos nucleicos (sulfato de amonio a una proporción 700g en 1000ml de citrato de sodio 25mM, EDTA 10mM; pH 5.2 ajustado con H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>), similar al reactivo comercial RNAlater (Life Technologies, CA), con dimensiones del tejido no mayor a 0.5 cm por 2.5 ml de solución fijadora. Los tejidos fueron mantenidos a 4°C las primeras 12 horas y posteriormente almacenados a -20°C. En los organismos adultos y juveniles se realizó el

procesamiento histológico y evaluación microscópica de la condición gametogénica utilizando la clasificación realizada por Tan-Fermin y Puradera, (1989).

6.1.2 Diseño de oligonucleótidos para amplificar la región conocida de *fem-1* así como para la obtención del transcrito.

Empleando bases de datos de distintas genotecas de hibridación sustractiva (SSH) y de cDNA generadas y secuenciadas (Laboratorio de Genética y Mejoramiento Animal Acuícola, datos no publicados) se realizó una exploración bioinformática con los resultados de anotación funcional de los transcritos de pedúnculo ocular y ovario. Un fragmento EST anotado como *fem-1*, el cual mostró una similitud del 45% con la proteína codificada por el gen *fem-1-like* de *Daphnia pulex*. A partir de dicha secuencia de 450 pb de longitud, se procedió al diseño de oligonucleótidos para verificar la presencia del transcrito en tejidos distintos al pedúnculo ocular, y para el aislamiento completo del transcrito por RACE (*Rapid Amplification of cDNA ends*) (Frohman *et al.*, 1988). Se diseñaron dos pares de oligonucleótidos (Tabla I) a partir de la secuencia encontrada en pedúnculo de hembras juveniles. La estrategia empleada para la obtención del transcrito completo con los oligonucleótidos diseñados y mediante el sistema *SMARTer RACE cDNA Amplification kit* (Clontech) fue la siguiente: el par de oligonucleótidos específicos Lv9057-F, Lv9057-R (GSP1), fueron utilizados para la amplificación de la región conocida, los cuales generan un fragmento de 234 pb. Para la obtención de los extremos de los transcritos, los mismos oligonucleótidos fueron utilizados en combinación con una mezcla de oligonucleótidos universales (*Universal Primer Mix*) y en reacciones separadas, empleando ADNc cuyos extremos contenían adaptadores SMART. Así mismo, a partir de los oligonucleótidos anidados específicos R5'-Lv9057-R y R3'-Lv9057-F se realizó PCR-RACE anidado para descartar fragmentos resultantes de la amplificación inespecífica (Fig. 8).

Tabla I. Cebadores utilizados para el aislamiento de *fem-1*. T: temperatura de alineamiento.

<b>Oligonucleótido</b>	<b>Secuencia 5'-3'</b>	<b>T(°C)</b>
R5'-Lv9057-R	GCAGTAAGACCTGGCCCTAATT	64.2
R3'-Lv9057-F	GCTACTGATCAGCAGGGCAA	65.4
Lv9057-F	AATTAGGGCCAGGTCTTACTGC	64.2
Lv9057-R	TTGCCCTGCTGATCAGTAGC	65.4

### 6.1.3 Extracción de ARN y síntesis de ADNc para la amplificación parcial de *fem-1*.

Como caso particular, las muestras de pedúnculo destinadas a la extracción de ARN fueron disectadas como se describe a continuación. Empleando material de microcirugía, se retiró la cutícula del tallo ocular para liberar el tejido muscular y se removió el tejido pigmentario de la retina evitando eliminar el tejido medular del tallo ocular, el cual fue posteriormente colocado en solución fijadora de ácidos nucleicos a  $-20^{\circ}\text{C}$  hasta su procesamiento. Para la técnica RACE en gónada masculina, se emplearon 4 organismos adultos (30-35g), en el caso de gónada femenina, se eligieron 4 muestras de ARN de hembras en estadios de desarrollo gonadal desde vitelogénesis primaria y madurez (dos de cada una). 40 pedúnculos oculares de hembras juveniles fueron colectados. En el caso de las muestras de embriones, se tomaron 70 muestras dentro de las cuales estaba representado el desarrollo embrionario (Primera división, Mórula, blastula, gastrula). La extracción de ARN total para todos los tejidos inició con  $\sim 100\text{mg}$  de tejido en 1 mL de TriPure Isolation Reagent (Roche Applied Science) siguiendo el protocolo con modificaciones descrito en el anexo (ANEXO IIA) y con las siguientes consideraciones generales. La homogenización del tejido se efectuó agregando  $\sim 100\text{mg}$  de perlas de vidrio de 425-600  $\mu\text{m}$  (SIGMA) para posteriormente homogenizar por 30 segundos en un disruptor Fast-Prep (MoBio). Una vez recuperada la fase acuosa, el ARN fue obtenido por precipitación con isopropanol, y resuspendido en 50-100  $\mu\text{L}$  de agua MilliQ, dependiendo del tamaño del pellet. La

concentración se evaluó en un espectrofotómetro de microvolúmenes (Thermo Scientific NanoDrop 1000) por absorbancia a 280 nm (1 Uabs = 40 ug/ul).

Previo a la síntesis de ADNc, el ARN total aislado fue tratado con *DNAsa I*. 5 µg de ARN fueron resuspendidos en 10 µl de mezcla de reacción con 5 U de DNAsa RQ1 (Promega), la mezcla de reacción se incubó a 37°C por 60 min, seguido de la inactivación de la enzima a 65°C por 10 min.

La síntesis de ADNc para la amplificación parcial del transcrito de *fem-1* fue realizada con el kit comercial ImProm-II<sup>TM</sup> Reverse Transcription System (Promega) a partir de 1 µg de ARN tratado con DNAsa adicionando 0.5µg de oligo(dT) como iniciador de la transcripción, e incubando a 70°C por 5 min y colocado inmediatamente en hielo por 5 min. Posteriormente la mezcla enzimática para la transcripción reversa fue adicionada; 1 µL de transcriptasa reversa, 3 mM de MgCl<sub>2</sub>, 0.5 mM de dNTP's, 40 U de RNAsin, con un volumen final de 20 µl. Las condiciones de reacción fueron las siguientes: desnaturalización inicial a 65°C por 5 mins (sólo ARN y oligo(dT)), mezclada con el resto de componentes en hielo y 42°C por 60 min seguido de 75°C por 5 min para inactivar a la enzima. El ADNc obtenido fue almacenado a -20°C hasta su posterior uso en la obtención del fragmento parcial por PCR semi-cuantitativo. Se empleó PCR utilizando como gen control al factor de elongación 2 (*ef2*) para verificar la adecuada síntesis de ADNc bajo las siguientes condiciones: 1 U de GoTaqR Flexi DNA Polymerasa (Promega), 1X Colorless GoTaqR Flexi Buffer, 0.2 mM de dNTPs, 2 mM de MgCl<sub>2</sub>, 0.2 µM de cebadores qLvan\_ef2 F (5'-CTG TGG TCT GGT TGG TGT TG-3') y qLvan\_ef2 R (5'-TCG GAT GAG TTC TTG GGT TC-3') combinación que genera un producto de 141pb y 0.5µl de ADNc, con un volumen final de reacción de 12.5µl. La amplificación del fragmento *fem-1* se efectuó con las condiciones de PCR que se describen a continuación: 0.5 U de GoTaq<sup>R</sup> Flexi DNA Polymerasa (Promega), 1X Colorless GoTaq<sup>R</sup> Flexi Buffer, 0.2 mM de dNTP's, 2.5 mM de MgCl<sub>2</sub>, 0.2 µM de Lv9057-F', Lv9057-R' y 1 µL de ADNc, en un volumen final de reacción de 12 µL. Las amplificaciones se realizaron en un termociclador C1000<sup>TM</sup> Bio-Rad con el programa mostrado a continuación: 94°C-3min, 80°C-1min seguida de

94°C-30s, 63°C-30s, 72°C-30s por 35 ciclos, y una extensión final por 72°C-10min. El producto de amplificación se visualizó en gel de agarosa 1% en TBE.

#### 6.1.4 Síntesis de ADNc para amplificación de transcritos completos (*full length*) por RACE.

Se empleó Poly(A) Purist™ Kit (Ambion) para la selección de ARNm partiendo de 1-2 mg de ARN total obtenido. La obtención de la secuencia completa del transcrito *fem-1* se realizó con la técnica RACE (*Rapid Amplification of cDNA Ends*) la cual permite la amplificación por separado de los extremos 5' y 3' a partir de un fragmento conocido.

Para la síntesis de ADNc-RACE en sentido 5' y 3' se empleó el sistema SMARTer RACE cDNA Amplification kit (Clontech). La síntesis de ADNc para la amplificación por RACE-3' fue sintetizado por la enzima *SmartScribe* (Clontech), y se utilizó un poly(T) modificado con una secuencia del adaptador SMART de Clontech la cual funciona como un oligonucleótido universal, 5'-AAGCAGTGGTATCAACGCAGAGTAC(T)<sub>30</sub> V N-3' (N = A, C, G, or T; V = A, G, or C), por otra parte el ADNc para la amplificación del extremo 5' fue llevado con el oligonucleótido 5'(T)<sub>25</sub> VN-3', y un adaptador SMARTer II 5' AAG CAG TGG TAT CAA CGC AGA GTA CXX XXX-3' (X= bases desconocidas propiedad de Clontech), el cual resulta ligado en el extremo 5' del ADNc, mismo que posteriormente funciona como secuencia complementaria a un oligonucleótido universal (UPM).

#### 6.1.5 Amplificación por RACE-PCR de extremos 5' y 3' en gónada de macho y hembra de *L. vannamei* y PCR 5'-3' anidado.

Se realizó RACE-PCR en sentido 5' y 3' empleando los cebadores Lv9057-F, Lv9057-R (Tabla I) los cuales amplifican el fragmento *fem-1* (~234pb), y están orientados hacia cada extremo del transcrito. En la figura 8 se presenta el esquema del uso y localización de los oligonucleótidos gen-específicos para la amplificación de los extremos por RACE-PCR. Las condiciones de reacción fueron: 1X de Advantage 2 PCR Buffer, 0.2mM dNTP Mix, 1X de Advantage Polymerase Mix, 1X de Universal Primer Mix (UPM) dirigidos a la secuencia de adaptador SMARTer agregado durante la síntesis del ADNc (5'-CTA ATA

CGA CTC ACT ATA GGG C-3 y 5'-CTA ATA CGA CTC ACT ATA GGG CAA GCA GTG GTA TCA ACG CAG AGT-3') y 0.2 $\mu$ M de cada uno de los cebadores específicos de la secuencia (para la amplificación hacia 5' se utilizó el cebador Lv9057-R y hacia 3' se utilizó el cebador Lv9057-F), empleando 1.5 $\mu$ L del *cDNA-RACE* en un volumen final de reacción de 15 $\mu$ L. La amplificación se realizó en un termociclador C1000<sup>TM</sup> Bio-Rad con las siguientes condiciones: 94°C-3min, 80°C-1 min (en éste paso se agregó Advantage Polymerase Mix) seguido de una fase de 30 ciclos a 94°C-30s, 63°C-30s, 72°C-3min (desnaturalización/alineación/extensión), con una extensión final a 72°C-20min. Para descartar productos inespecíficos, se llevaron a cabo reacciones de amplificación anidada en cada producto, 5' y 3', utilizando una dilución 1/5 del producto obtenido anteriormente mediante RACE-PCR utilizando *Nested Universal Primer* NUP (5'-AAG CAG TGG TAT CAA CGC AGA GT-3') con las mismas condiciones antes mencionadas, y los cebadores R5'-Lv9057-R hacia 5' y R3'-Lv9057-F hacia 3', con un volumen final de 25  $\mu$ L, con la finalidad de tomar 5  $\mu$ L a los 15, 20 y 25 ciclos para evaluar la eficiencia de la reacción.

## Flujo de amplificación RACE-PCR 5' y 3'

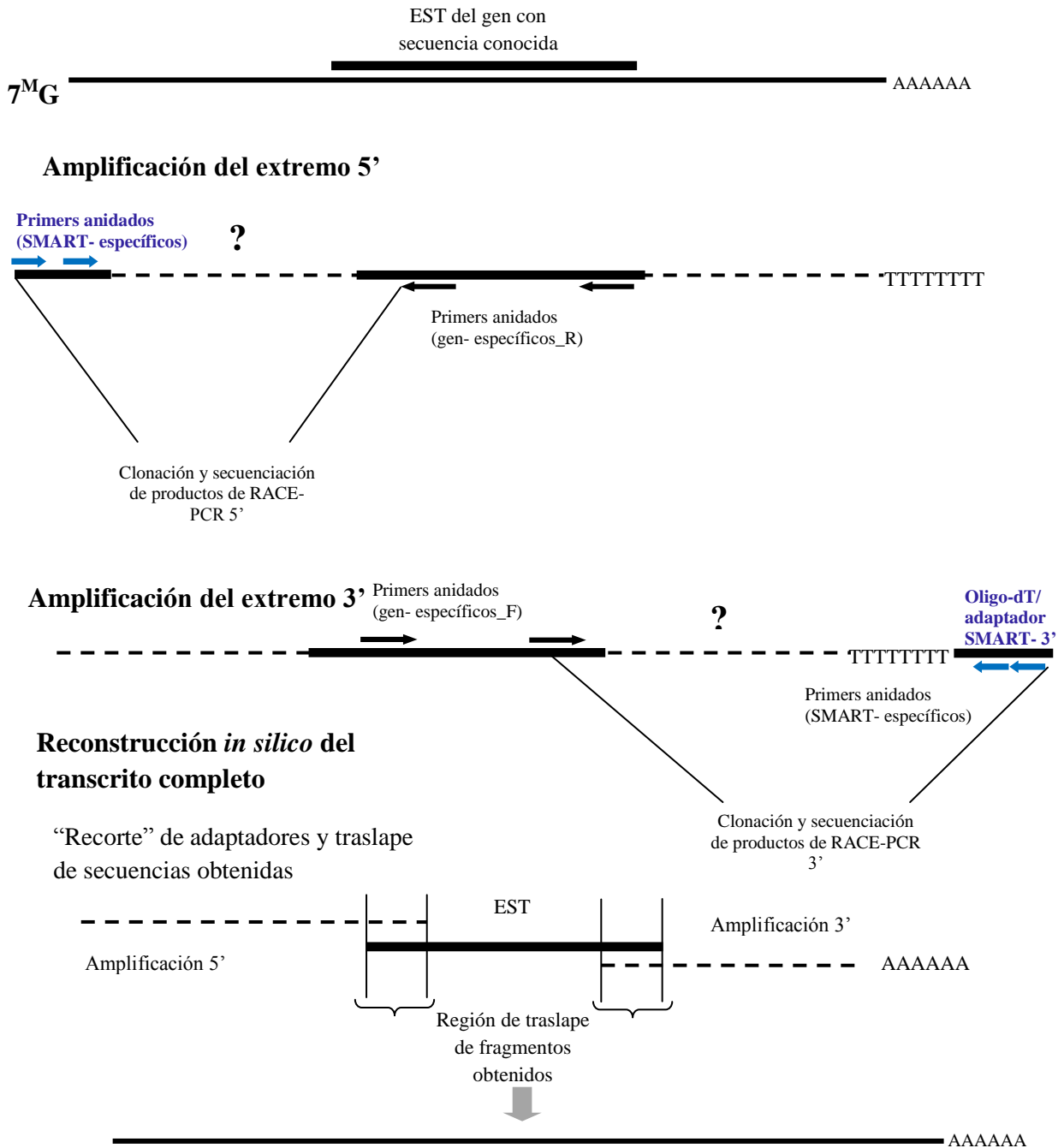


Fig. 8. Esquema de amplificación de extremos 5' y 3' mediante RACE-PCR mostrando ligeras modificaciones a la forma convencional de traslape para la obtención del transcrito completo.

#### 6.1.6 Amplificación por RACE-PCR de extremos 5' y 3' en pedúnculo de hembras juveniles y embriones de *L. vannamei* y PCR 5'-3' anidado.

En el caso de muestras de pedúnculo y embriones dada la poca eficiencia encontrada hacia la amplificación del extremo 5' por parte del primer Lv9057-R se modificó la estrategia en este sentido, donde en RACE-PCR se empleó el cebador R5'-Lv9057-R, posteriormente se llevó a cabo una reamplificación del producto de PCR 5' utilizando una dilución 1/5 del producto obtenido anteriormente mediante RACE-PCR con las mismas condiciones antes mencionadas, y el mismo cebador R5'-Lv9057-R.

#### 6.1.7 Secuenciación de fragmentos obtenidos RACE-PCR.

Los productos de amplificación se visualizaron como ha sido descrito antes. Las bandas obtenidas con el RACE dirección 3' así como 5' fueron cortadas con un bisturí estéril y eluidas en 20  $\mu$ L de H<sub>2</sub>O milliQ (La elusión de la banda dependió de la cantidad del producto observado en la electroforesis) y posteriormente amplificadas siguiendo las siguientes condiciones: 0.5 U de GoTaq<sup>R</sup> Flexi DNA Polimerasa (Promega), 1X Colorless GoTaq<sup>R</sup> Flexi Buffer, 0.2 mM de dNTP's, 1.5 mM de MgCl<sub>2</sub>, 1.5  $\mu$ L de UPM 10X, 0.2  $\mu$ M de Lv9057-F (para bandas cortadas en dirección 3'), Lv9057-R (para bandas cortadas en dirección 5') (Tabla I) y 1  $\mu$ L de producto de PCR diluido de 15-20  $\mu$ L de H<sub>2</sub>O milliQ, con un volumen final de reacción de 15  $\mu$ L. La amplificación se realizó en un termociclador C1000<sup>TM</sup> Bio-Rad como se indica a continuación: 94°C-3min, seguida de 94°C-30s, 63°C-30s, 72°C-30s (desnaturalización/alineación/extensión) por 18-20 ciclos, y una extensión final por 72°C-5min.

Los productos de PCR obtenidos fueron ligados al vector pGEM®-T-Easy (PROMEGA). El producto de ligación se insertó en bacterias JM109 (PROMEGA). Las bacterias transformadas se cultivaron en medio LB-Agar-Ampicilina por 18 horas a 37°C para la propagación de las colonias. Se seleccionaron colonias positivas, y se procedió a la recuperación del ADN plasmídico por medio de lisis alcalina (ANEXO III), posteriormente se verificó la presencia del inserto mediante una PCR semi-cuantitativa utilizando los oligonucleótidos universales M13 con las siguientes condiciones: 1 U de



GoTaqR Flexi DNA Polymerasa (Promega), 1X Colorless GoTaqR Flexi Buffer, 0.2 mM de dNTP's, 1.5 mM de MgCl<sub>2</sub>, 0.2 μM de M13F (5'-GTAAAACGACGGCCAGT-3') y M13R\_pUC (5'-CAGGAAACAGCTATGAC-3') y 1.5 μL de ADN plasmídico diluido 1/50, con un volumen final de reacción de 15 μL. La amplificación se realizó con el programa de PCR de 94°C-3min, 94°C-30s, 50°C-30s, 72°C-30s por 25 ciclos, y una extensión final por 72°C-5min. Se realizó una electroforesis en agarosa 1% para verificar los insertos de las clonas, y los productos de PCR de los insertos positivos fueron purificados por adsorción en sílica (UltraCleanR 15 DNA Purification Kit) y enviados a secuenciar (Macrogen, Korea).

#### 6.1.8 Análisis bioinformáticos de secuencias obtenidas.

Se utilizó el programa BioEdit v7.1.11 (Hall, 1999) para la edición de las secuencias resultantes. La eliminación de vector de las secuencias fue llevada a cabo mediante la herramienta VecScreen (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/vecsreen/>). El ensamble de los fragmentos obtenidos por RACE en ambas direcciones fue desarrollado con el programa CAP3 (<http://mobyli.pasteur.fr/cgi-bin/portal.py#forms::cap3>). Para análisis de similitud, se empleó el programa BLAST (Altschul *et al.*, 1997) contra bases de datos públicas de nucleótidos y de proteínas (blastn y blastp). La traducción del marco de lectura se realizó mediante el programa en línea ExpASy (<http://web.expasy.org/translate/>) y los alineamientos múltiples de las variantes encontradas se realizaron con el programa MUSCLE (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/muscle/>), MAFFT versión 7 (<http://mafft.cbrc.jp/alignment/server/index.html>), así como los programas MultiAlign (Corpet, 1988) (<http://multialin.toulouse.inra.fr/multalin/>) y PrettySeq (<http://mobyli.pasteur.fr/cgi-bin/portal.py#forms::prettyseq>). Para el análisis de búsqueda de familias proteicas, se consultó la base de datos de familias protéicas Pfam 24.04 (<http://pfam.sanger.ac.uk>) con base en la traducción conceptual de los transcritos. Predicción de sitios TATA box del transcrito más grande caracterizado fue hecho utilizando el programa en línea HCtata en el sitio WebGene (<http://www.itb.cnr.it/sun/webgene/>). La predicción de la proteína fue realizada con el programa en línea I-TASSER (Zhang, 2008) (<http://zhanglab.ccmb.med.umich.edu/I-TASSER/>). El análisis de comparación estructural

por superposición fue realizado con FATCAT ((Ye y Godzik, 2004) (<http://fatcat.burnham.org/>). El análisis filogenético mediante el programa phylogeny.Fr (<http://www.phylogeny.fr/>).

## **6.2 Establecer por PCR- semi-cuantitativo si el gen *fem-1* se expresa ubicua o específicamente en otros tejidos.**

### 6.2.1 Material biológico.

Se colectaron organismos adultos (hembras y machos) en el mes de Julio de 2012 en el estado de Sinaloa a los cuales se les disectó gónada, hepatopáncreas, músculo del segmento abdominal y pedúnculo ocular (n = 4 muestras/tejido), los cuales fueron preservados en solución fijadora de ácidos nucleicos para la obtención de ARN como se ha mencionado en la sección 6.1.3.

El aislamiento de ARN total y la síntesis de ADNc fue realizada igual a lo descrito en la sección 6.1.3 modificando la cantidad de inicio para la transcripción reversa. Partiendo de 0.5 µg de ARN tratado con DNAsa. De igual manera se empleó PCR en punto final utilizando como gen control al factor de elongación 2 (*ef2*) para verificar la obtención de ADNc.

### 6.2.2 Amplificación por PCR semi-cuantitativo en los tejidos de interés.

La concentración final de ADNc para todas las muestras de interés fue cuantificado mediante espectrofotometría (Thermo Scientific NanoDrop 2000), posteriormente cada muestra se equilibró a 750ng/ µl mediante diluciones. La reacción de PCR se realizó como se muestra a continuación: 0.5 U de GoTaq<sup>R</sup> Flexi DNA Polimerasa (Promega), 1X Colorless GoTaq<sup>R</sup> Flexi Buffer, 0.2 mM de dNTP' s, 2.5 mM de MgCl<sub>2</sub>, 0.2 µM de Lv9057-F y Lv9057-R (Tabla I) y 1 µL de ADNc, con un volumen final de reacción de 15 µL. La amplificación se realizó en un termociclador C1000<sup>TM</sup> Bio-Rad con el programa: 94°C-3min, seguida de 94°C-30s, 63°C-30s, 72°C-15s por 40 ciclos, y una extensión final por 72°C-5min. La visualización fue desarrollada igual a lo descrito en la sección 6.1.3.

### **6.3 Localización del transcrito *fem-1* en gónada masculina y femenina de *L.vannamei* por hibridación *in situ*.**

#### 6.3.1 Transcripción *in vitro* de sonda de hibridación para *fem-1*.

El fragmento seleccionado de 660pb para la síntesis de la ribosonda fue el mismo que el utilizado para el experimento de ARN de interferencia. Partiendo de un molde de ADN plasmídico (Una de las clonas obtenidas y secuenciadas para el experimento de interferencia) se realizó una reacción de PCR con el par de oligonucleótidos M13 para obtener fragmentos con sitios de iniciación de transcripción de la polimerasa SP6 y T7 respectivamente. La amplificación tuvo las siguientes condiciones: 1 U de GoTaq<sup>R</sup> Flexi DNA Polimerasa (Promega), 1X Colorless GoTaq<sup>R</sup> Flexi Buffer, 0.26 mM de dNTP's, 1.5 mM de MgCl<sub>2</sub>, 0.24 μM de M13 F y M13 R pUC y 0.5 μL de ADN plasmídico, con un volumen final de reacción de 15 μL. La amplificación se realizó en un termociclador C1000<sup>TM</sup> Bio-Rad con el programa: 94°C-5min, seguida de 94°C-30s, 51°C-30s, 72°C-50s por 25 ciclos, y una extensión final por 72°C-5min. El producto de amplificación se visualizó como se ha mencionado anteriormente. El producto de PCR fue purificado con UltraCleanR 15 DNA Purification Kit. Posteriormente se realizó el marcaje con Digoxigenina de las ribosondas por transcripción *in vitro* del producto de PCR lineal empleando DIG RNA Labeling Kit (SP6/T7).

#### 6.3.2 Hibridación y detección.

##### 6.3.2.1 Material Biológico.

Se realizó un muestreo el 25 de febrero del 2013 en la empresa GranMar de 10 hembras y 5 machos, ambos adultos 30-35g, las muestras de gónada fueron disectadas y colocadas en paraformaldehído al 4% en PBS y procesadas histológicamente.

##### 6.3.2.2 Cortes histológicos.

Se utilizó la porción longitudinal en gónadas de machos adultos y hembras adultas en pre-maduración. Se obtuvieron cortes de 4 μm con un micrótopo rotatorio (Leica RM 2155,

Leica Microsystems), montados en laminillas tratadas con Poly L-lisina (Sigma-Aldrich) y almacenadas a 4°C.

#### 6.3.2.3 Hibridación *in situ*.

Este proceso se efectuó siguiendo la metodología de Sifuentes-Romero *et al.* (2010). Las laminillas se desparafinaron mediante xilol y rehidrataron en una serie de alcoholes a concentraciones decrecientes hasta llegar a H<sub>2</sub>O miliQ, se sumergieron en PBS 1X preparado con H<sub>2</sub>O miliQ. Posteriormente fueron tratadas con *proteínasa-K* y pos-fijadas con paraformaldehído al 4% en PBS. Previo a la hibridación, las laminillas fueron deshidratadas en concentraciones de alcoholes crecientes hasta llegar a etanol al 100%.

La hibridación (ANEXO 2K) se realizó distribuyendo de manera homogénea a cada laminilla (tejido con su réplica, una laminilla por sonda) 2.5 µL (~50 ng) de cada ribosonda, sentido y antisentido, diluida en ~ 70 µL de solución de hibridación. Colocando las laminillas en una cámara húmeda con 2x SSC (Saline sodium citrate) a 42°C durante 12 horas. Posterior a la hibridación las laminillas fueron incubadas con solución de bloqueo a temperatura ambiente, se incubaron con el anticuerpo anti-DIG conjugado a la fosfatasa alcalina, seguido del substrato NBT/BCIP con solución de revelado y finalmente lavadas con H<sub>2</sub>O miliQ. La contrainsión se realizó con café de Bismark al 0.2%. Las laminillas fueron montadas y observadas al microscopio, y documentadas mediante fotografía digital con el software ImagePro-Plus (Media Cybernetics, Inc).

### **6.4 Bloqueo específico del gen *fem-1* a través de RNA de interferencia en hembras y machos adultos.**

6.4.1 Diseño de oligonucleótidos para amplificar el ARN de doble cadena *fem-1* así como al control negativo eGFP (Enhanced Green Fluorescence protein).

Los oligonucleótidos (Tabla II) para la sonda de dsRNA de *fem-1* flanquean parte de la región codificante que comparten todas las variantes encontradas.

Tabla II. Cebadores utilizados para sonda RNAi. T: temperatura de alineamiento.

CEBADOR	SECUENCIA 5'-3'	T (°C)	Tamaño	Tipo
FEM1sonda-F1	GAGGATCTTGGGACCAGCAC	68.2	660pb	Objetivo
FEM1sonda-R1	TTGCCCTGCTGATCAGTAGC	65.4		
eGFP_F	GACGTAAACGGCCACAAGTT	50	609pb	Control negativo
eGFP_R	GAACTCCAGCAGGACCATGT	55		

6.4.2 Generación de moldes de transcripción para *fem-1* y *eGFP* para síntesis de ARN de doble cadena (dsRNA).

La amplificación del fragmento *fem-1* para ser usado como molde inicial se efectuó con 1 U de GoTaq<sup>R</sup> Flexi DNA Polymerasa (Promega), 1X Colorless GoTaq<sup>R</sup> Flexi Buffer, 0.2 mM de dNTP' s, 1.5 mM de MgCl<sub>2</sub>, 0.2 μM de FEM1sonda-F1, FEM1sonda-R1 (Tabla II) y 1 μL de ADNc-RACE, con un volumen final de reacción de 15 μL. La amplificación se realizó en un termociclador C1000<sup>TM</sup> Bio-Rad con el programa: 94°C por 3min, seguida de 94°C por 30s, 63°C por 36s, 72°C por 30s (desnaturalización - alineación - extensión) por 30 ciclos, y una extensión final a 72°C por 10min. El producto de amplificación se visualizó en electroforesis de agarosa 1%.

Para la adición de la región promotora T7 para síntesis de doble cadena *fem-1* (gen de interés) y *eGFP* (control negativo de dsRNA), se empleó una estrategia de inserción bidireccional en un vector plasmídico con promotor de transcripción de T7 polimerasa. El vector pGEM®-T-Easy (PROMEGA) en el cual fue ligado el fragmento para la síntesis de doble cadena *fem-1* contiene la región promotora T7, por lo cual a las clonas obtenidas se les verificó la orientación del fragmento de acuerdo a la posición del promotor T7 para identificar clonas en 'sentido' y 'antisentido' mediante PCR en reacciones separadas empleando 1 U de GoTaq<sup>R</sup> Flexi DNA Polymerasa (Promega), 0.5X Colorless GoTaq<sup>R</sup> Flexi Buffer, 0.2 mM de dNTP' s, 1.5 mM de MgCl<sub>2</sub>, 0.2 μM del par de oligonucleótidos FEM1sonda-F1 y T7 (5'-TAATACGACTCACTA-3'), FEM1sonda-R1-T7 y 1 μL de ADN plasmídico. De forma que, si la orientación en la que se clonó el fragmento en

relación a la localización del promotor T7 del plásmido fue 5'-3', la amplificación con el par de cebadores FEM1sonda-R1 + T7 dará lugar al fragmento esperado (usado como molde para hebra sentido), mientras que si la clonación ocurrió en dirección 3'-5' la amplificación en combinación de cebadores FEM1sonda-R1 + T7 mostrará un fragmento del tamaño esperado (usado como molde para hebra antisentido).

El fragmento usado de ARN de doble cadena como control negativo para el experimento de ARN de interferencia fue *eGFP* (*enhanced Green Fluorescence Protein*), el cual fue obtenido mediante PCR usando 10 pg del vector pKGWFS7 como molde (<http://gateway.psb.ugent.be/vector/show/pKGWFS7/search/index/>) y un par de cebadores específicos para una región codificante para *eGFP* de 609 pb de longitud (eGFP\_F y eGFP\_R; Tabla II), y empleando el siguiente programa de amplificación: 94°C-3min, seguida de 94°C-30s, 50°C-36s, 72°C-30s por 30 ciclos, y una extensión final por 72°C-10 min. El producto de PCR obtenido fue ligado a adaptadores T7 mediante el uso del kit BLOCK-iT RNAi TOPO Transcription kit (Life Technologies, Carlsbad, CA) usando 1 µL del producto de PCR y 0.5 µL del T7-TOPO linkers, seguido de una incubación por 5 min a temperatura ambiente en ambas regiones flanqueantes 5'. El producto ligado fue usado en consecutivas amplificaciones por PCR asimétricas a través de la combinación de los primers eGFP\_F o eGFP\_R con un primer T7 utilizando 1 µL del producto de PCR ligado al TOPO-Linker.

#### 6.4.3 Transcripción *in vitro* de ARN de doble cadena.

Para el caso de *fem-1* una vez identificadas el sentido de las clonas se realizaron dos reacciones de PCR secundarias. Una reacción se realizó con el par de primer FEM1sonda-F-T7 (En la clona identificada previamente como antisentido con respecto al promotor T7) para generar por transcripción de la ARN polimerasa T7 la cadena de ARN en antisentido, y la otra con el par FEM1sonda-R1-T7 para generar el ARN en sentido. Para el gen control *eGFP* se utilizó como molde el producto de PCR ligado a la secuencia promotora T7 en los extremos 5' realizados en reacciones separadas como se describe en la sección anterior. Los productos de PCR fueron separados mediante una electroforesis con agarosa al 1% corrido

en paralelo con un marcador de masa (Low DNA Mass Ladder Cat.no. 10068-013) para evaluar la concentración de forma cualitativa y cuantitativa mediante espectrofotometría (Thermo Scientific NanoDrop 2000). Seguidamente la dsRNA se sintetizó utilizando el kit comercial MEGAscript<sup>R</sup> RNAi kit (Invitrogen) como se describe a continuación: 0.5µg del producto de PCR antes obtenido, sentido y antisentido para ambos genes (*fem-1* y *eGFP*), en reacciones independientes a los mismos fueron adicionados al siguiente Mix de transcripción, e incubados por 21 horas a 37°C.

NTPs (75mM)	8 µL
Templado (sentido y antisentido)	8 µL
10X T7 Buffer	2 µL
T7 Enzyme Mix	2 µL
<b>Total</b>	<b>20 µL</b>

Posteriormente se incubó a 75°C por 5 min para la disociación y ruptura de estructuras secundarias de las cadenas y se permitió la hibridación de hebras complementarias colocando el tubo en un contenedor de agua a 75°C y permitiendo que enfríe lentamente hasta temperatura ambiente (~1 h aprox). A continuación se realizó una digestión con nucleasas para remover ADN y ARN de cadena sencilla remanente. El volumen total de ARN de doble cadena fue adicionado al siguiente Mix e incubado 37°C por 1 hora.

ARNdoble cadena	20 µL
Agua libre de nucleasas	21 µL
10X buffer de digestión	5 µL
DNAsa I	2 µL
RNAsa	2 µL
<b>Total</b>	<b>50 µL</b>

Para evaluar la eficiencia de la generación de dsRNA se realizó una dilución 1/400 del producto híbrido y se cargaron 4 µL en un carril de electroforesis agarosa al 1%.

La purificación del ARN de doble cadena se realizó mediante una separación orgánica como se detalla a continuación: 400 µL de fenol cloroformo fueron agregados a los 50 µL de dsRNA, se homogenizó y centrifugó a 12 000 rpm por 5 min, se tomó y colocó en otro

tubo la fase superior, misma a la que se le agregó 300  $\mu\text{L}$  de cloroformo, homogenizó y centrifugó a 12000 rpm, se tomó la fase superior y el resto fue descartado. 80  $\mu\text{L}$  de acetato de amonio en paralelo con 500  $\mu\text{L}$  etanol al 100% fueron agregados a la fase superior anteriormente tomada con la finalidad de precipitar al ARN. La precipitación fue por un tiempo de 2 horas a  $-20^{\circ}\text{C}$ . Posteriormente se centrifugó 10 min a 12 000 rpm y se descartó el sobrenadante. El pellet fue lavado con 500  $\mu\text{L}$  de etanol al 75% para eliminar restos de solventes orgánicos, y se dejó secar por  $\sim 12$  min. Finalmente el pellet fue resuspendido en 20-40  $\mu\text{L}$  de  $\text{H}_2\text{O}$  milliQ.

#### 6.4.4. Material biológico y diseño de experimento de silenciamiento por RNAi.

Un total de 48 organismos adultos (24 hembras, 24 machos), con un peso promedio de 33g provenientes de estanques intermareales del CIBNOR fueron mantenidos en condiciones de maduración por 60 días en el laboratorio experimental del CIBNOR a temperatura promedio de  $27^{\circ}\text{C}$ , recambio de agua del 100% por seis días a la semana, dos líneas de aireación constante y fueron alimentados con BREED-S mostrando el siguiente contenido nutricional: proteína 40%, lípidos 9.5%, fibra 2%, humedad 31%.

El experimento con ARN de interferencia fue llevado con 7 hembras y 7 machos seleccionados al azar para ser inyectados con ARN de doble cadena para el gen de interés *fem-1* (fragmento de ARNdc 660pb), eGFP (609 pb) como control negativo de silenciamiento inespecífico, así como con solución salina (20mM Tris, 400 mM NaCl, pH 7.4) un total de 42 organismos fueron inyectados mismos que fueron marcados con anillos oculares para su identificación durante el experimento. 10  $\mu\text{g}$  de ARN de doble cadena fueron diluidos en 100  $\mu\text{L}$  en solución salina e inyectados entre el tercer y cuarto segmento abdominal. Al grupo control salino se les inyectó únicamente 100  $\mu\text{L}$  del mismo. Los organismos fueron mantenidos en condiciones de maduración durante 30 días para observar algún efecto, en el día 30 fueron reinyectados y 5 días después se sacrificaron para su disección. Se tomaron muestras de gónada y pedúnculo ocular para evaluar efectos del silenciamiento mediante la cuantificación del ARNm por qPCR. Los tejidos destinados para el aislamiento de ARN total fueron preservados en solución fijadora de ácidos



nucléicos. Adicionalmente, una porción de gónada se fijó en solución Davidson para su inspección histológica del desarrollo gametogénico. La determinación de los estadios de madurez en hembras (previtelogénico, vitelogénesis primaria, vitelogénesis secundaria, maduro), se realizó con base en la clasificación establecida por Tan-Fermin y Puradera (1989). En el caso de los machos, el desarrollo gonádico se clasificó como inmaduros, a aquellos individuos que no presenten desarrollo gonádico; y en espermatogénesis a los individuos cuya gónada presente los siguientes tipos celulares: espermatogonias, espermatocitos y espermátidas. Se seleccionaron los urópodos de cada organismo para la determinación del estadio de muda siguiendo la metodología empleada por Chan *et al.* (1988).

#### 6.4.5 Validación del silenciamiento por análisis de expresión génica.

##### 6.4.5.1 Extracción de ARN total y síntesis de ADNc.

La extracción de ARN total se desarrolló como lo descrito que en la sección 6.1.3, con menores modificaciones como se menciona a continuación: El ARN resuspendido fue precipitado durante 60 min con 0.2 volúmenes de LiCl<sub>2</sub> 4M, se centrifugó por 20 min a 14 000 rpm y se realizaron dos lavados con 500µl de etanol al 70% y el precipitado se dejó secar por 20 min. El pellet fue resuspendido en 50-100 µl de H<sub>2</sub>O milliQ dependiendo del tamaño del mismo. Previo a la síntesis de ADNc el ARN total aislado fue tratado con *DNAsa I* (RQ1 DNase, Promega), 2 µg de ARN fueron resuspendidos en 10 µl de mezcla de reacción con 2 U de DNAsa RQ1 (Promega), el mix de reacción se incubó a 37°C por 60 min, seguido de la inactivación de la enzima a 65°C por 10 min. La síntesis de ADNc fue realizada como se describió en la sección 6.1.3 a partir de 0.5 µg de ARN.

##### 6.4.5.2 Cuantificación de expresión de genes de interés por qPCR.

Para la amplificación por qPCR, se empleó el sistema de detección fluorescente con EvaGreen en una mezcla de reacción de PCR como se describe en Llera-Herrera *et al.* (2012). La reacción de PCR se desarrolló por triplicado para cada muestra. La expresión de los genes blanco se analizó de forma paralela con los genes de expresión constitutiva (genes

de referencia) como normalización entre muestras. Las reacciones de amplificación se realizaron en placas de 96 pozos con cubiertas plásticas, empleando el instrumento CFX96 C1000™ Thermal Cycler (Bio-Rad). La mezcla contuvo 2.5 mM de MgCl<sub>2</sub>, 0.2 μM de dNTP's, X de cada primer sentido y antidentido (Ver tabla III para concentración de cada primer utilizada), 0.45 U *Taq* polimerasa GoTaq (Promega) y compuesto intercalante fluorescente EvaGreen (Biotium, CA) a una concentración final 1X, en un volumen final de reacción de 15μl. Para cada análisis de expresión, se preparó mezcla de reacción suficiente para todas las reacciones, evitando así cualquier tipo de variación técnica en los resultados. Las condiciones de amplificación para la qPCR fueron en todos los casos: 94° C (10 seg), X°C (15 seg) (Ver tabla con las temperaturas de alineamiento de cada gen), 72°C (30seg), adquiriendo fluorescencia a 78°C (2 seg). Capturas de disociación de 60 a 94°C fue llevada durante un rampeo térmico de 1°C/seg, para obtener una curva de disociación de cada fragmento con la finalidad de verificar la amplificación específica de cada reacción. La eficiencia fue medida para cada gen de acuerdo al cálculo de la pendiente de la amplificación sobre diluciones seriadas (1:5), realizando un pool de ADNc de distintos tratamientos/sexos. Para aquellos genes de expresión baja (Ct ~ 28 o mayor), se empleó un producto de PCR obtenido previamente a 40 ciclos y diluído 1:100,000. Las eficiencias para cada gen (Tabla III) fueron obtenidas con la pendiente expresada como el cambio de la variable concentración (log) con respecto al *Ct* (lineal), usando la ecuación  $E = (10^{(-1/pendiente)} - 1)$ .

#### 6.4.5.3 Análisis de estabilidad de genes de referencia entre tratamientos por tejidos (gónada y pedúnculo ocular).

Las secuencia parciales de genes utilizados como referencia en *L.vannamei*, fueron *ef2-*, *L8*, *40S-24S*, *Ubiquitina* y *S12*. Los análisis de estabilidad se realizaron mediante la aplicación en línea RefFinder (<http://www.leonxie.com/referencegene.php>), la cual integra los algoritmos de estabilidad geNorm (Vandesompele *et al.*, 2002), Normfinder (Andersen *et al.*, 2004) Bestkeeper (Pfaffl *et al.*, 2004) y el método comparativo delta-*Ct* (Silver *et al.*, 2006). Una vez determinados los genes de referencia más estables, se calculó un factor de

normalización a partir de éstos. Se calculó la expresión relativa de los genes de interés *fem-1* y *vit* (*vitelogenina*; acceso GenBank AY321153.2).

La expresión relativa se calculó a partir de la transformación de valores de Cq a cantidades relativas (RQ) para cada gen (sea de gen de interés o gen de referencia) para cada muestra, mediante la fórmula  $RQ_{(ij)} = E^{Cq(min)-Cq(ij)}$ . Una vez transformados los valores de expresión en cantidades relativas, la expresión relativa (RE) para cada gen de interés fue calculada mediante la ecuación  $RE = RQ/NF$ , donde RQ es la cantidad relativa del gen de interés, y NF es el factor de normalización obtenido como la media geométrica de las cantidades relativas de los genes de referencia elegidos como los más estables. Determinados los valores de expresión relativa para cada gen y cada muestra, se realizó un ANOVA de un factor para la comparación de la expresión relativa de los genes de interés *fem-1* y *vit* entre grupos experimentales (controles, dsRNA de *fem-1*, dsRNA de *eGFP*). Las diferencias significativas en su caso son presentadas con un valor de significancia de  $P < 0.05$ .

## 7. RESULTADOS

### 7.1 Caracterización del o los transcritos del gen *fem-1* en *L. vannamei*.

La secuenciación de los extremos de ADNc 5' y 3' mediante RACE del gen *fem-1* permitió reconocer cinco ensamblajes con variación en longitud de la región 5' (Fig. 9). La variante más grande aislada en todos los tejidos (gónada masculina y femenina, embrión y pedúnculo ocular de hembra juvenil) consiste de 3778 pb misma que fue depositada en GenBank-NCBI bajo el acceso KF573432, la cual codifica de acuerdo al marco de lectura abierto +2 (+2) una proteína de 638 aminoácidos (aa), otro transcrito aislado fue en gónada femenina, presentando una longitud de 3066 pb, la cual codifica una proteína de 424 aa (+3), un transcrito de 3016 pb aislado en gónada de macho que codifica la proteína de 335 aa (+1), de 2900 pb aislado en gónada masculina, embrión y pedúnculo de hembras juveniles, mismo que codificó una proteína de 367 aa (+1). Por último se aisló el transcrito más pequeño, una secuencia de 2446 pb en embrión que codifica una proteína de 218 aa (+2) (Fig. 8).

Un análisis mediante sitios de inicio de transcripción a través de TATA-BOX en el transcrito de mayor tamaño mostró que no se encuentran sitios que expliquen los transcritos cortos aislados en el presente estudio, asimismo el análisis *in silico* en BLASTp-nr (secuencias proteicas no redundantes) indicó que la proteína de 638 aa muestra una similitud del 63% con la secuencia proteica de *fem-1 like protein* de 633 aa correspondiente a *Daphnia pulex* (GenBank EFX74179) presentando un valor de significancia  $E= 0.0$ , de 54% de similitud para la proteína de 335 aa y 367 aa con un valor  $E= 2^{-114}$  y  $9^{-197}$  respectivamente, 57% para proteína de 424 aa con un valor de significancia  $E= 7^{-152}$  y finalmente, 46 % para la proteína de 218 aa presentando un valor de significancia  $E= 3^{-52}$ . A través de un análisis de familias proteicas (pfam 24.0), se identificaron dos familias Pfam-A para la proteína de 638 aminoácidos mientras que para el resto solo una familia Pfam-A fue identificada, ambas relacionadas con repeticiones de la superfamilia del dominio altamente conservado *ankyrin repeats*. Adicionalmente se identificó en todos los transcritos la secuencia más prevalente en este tipo de dominios, el motivo TPLH (Treonina-

Prolina-Leucina-Histidina) mismo que confiere la estructura característica  $\beta$ -harpin-helice-loop-helice ( $\beta 2\alpha 2$ ).

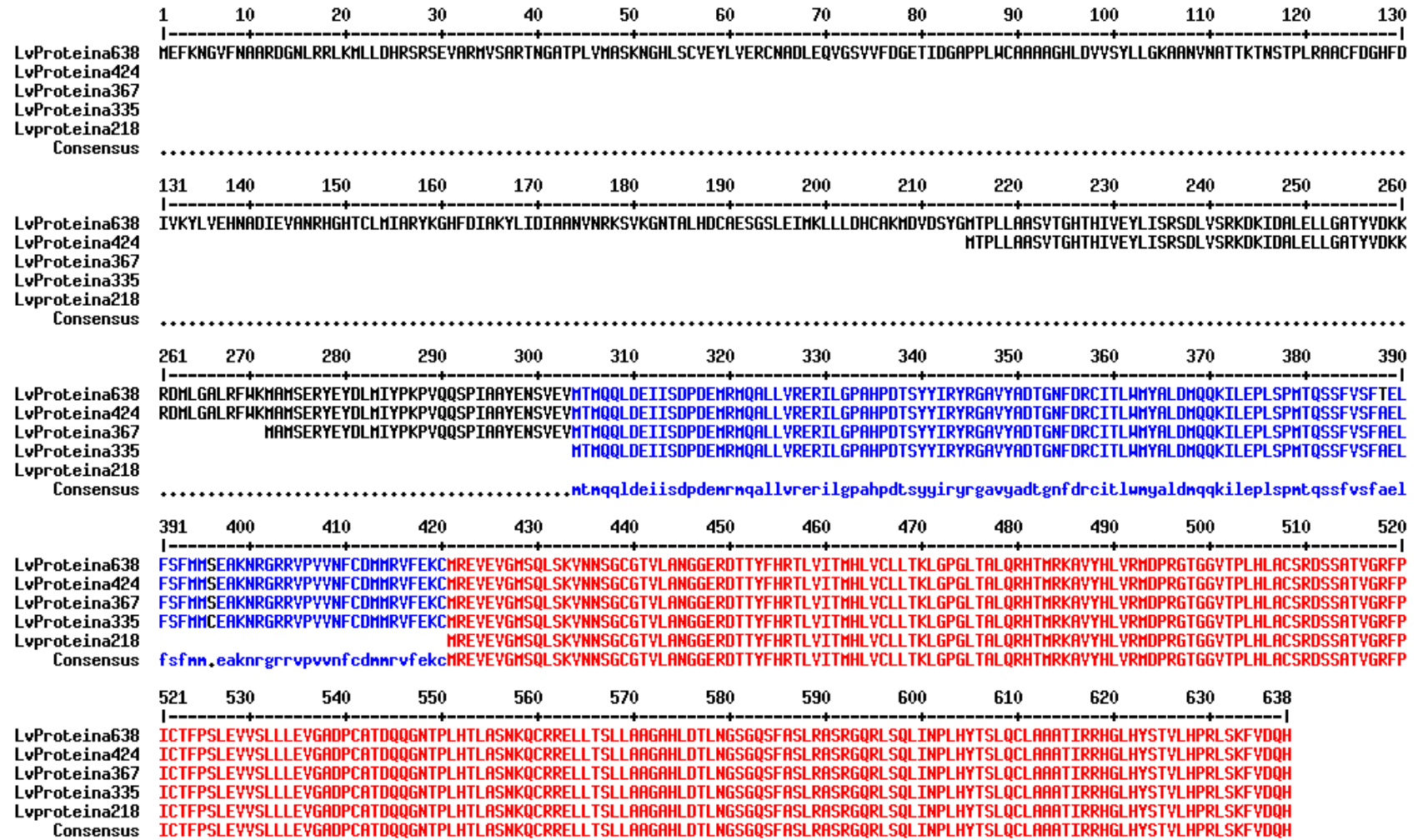
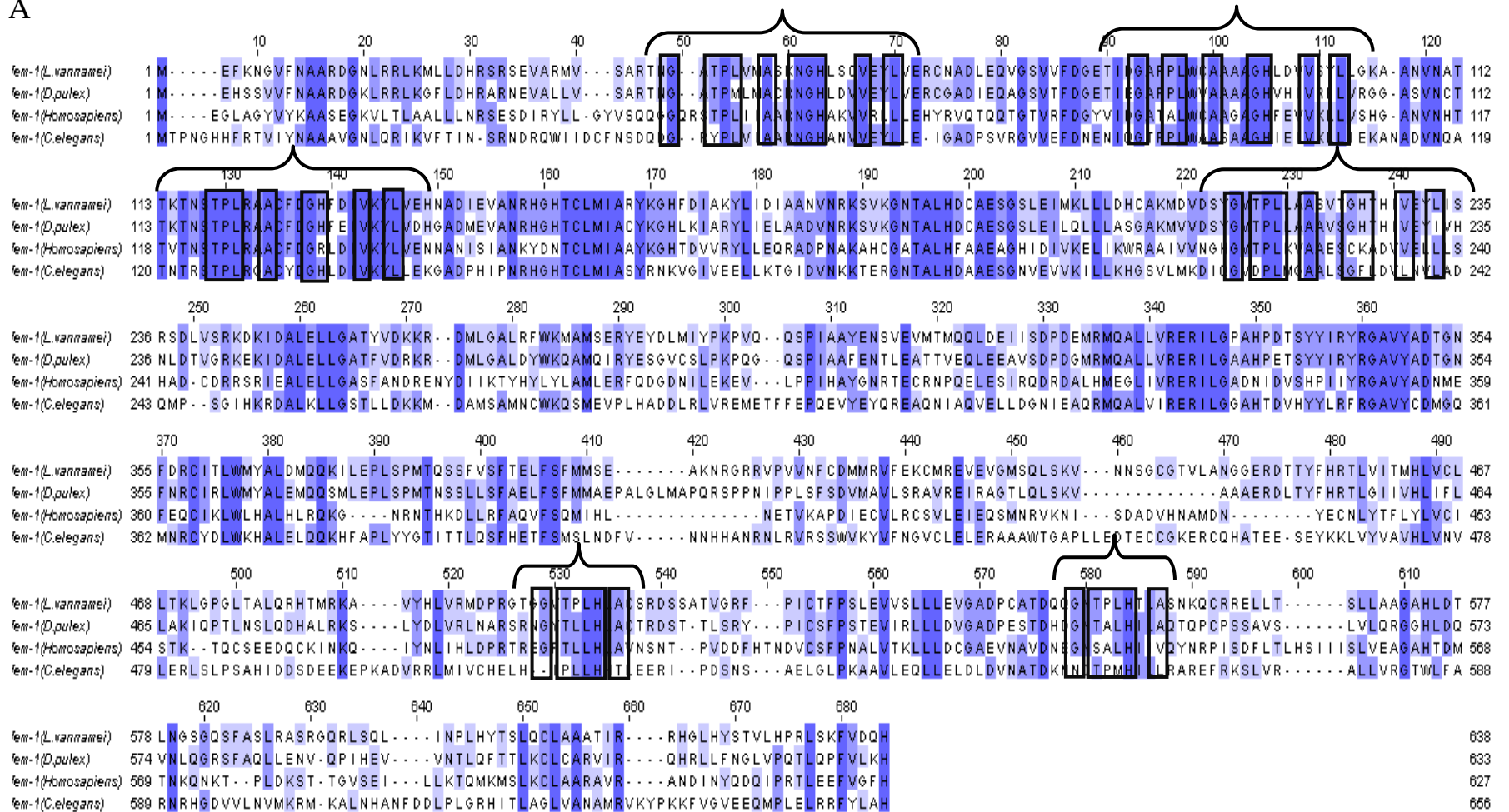


Fig.9. Alineamiento múltiple en aminoácidos de las secuencias obtenidas de *fem-1* en *L.vannamei* mostrando las diferencias en longitud en el extremo 5'.

A



B

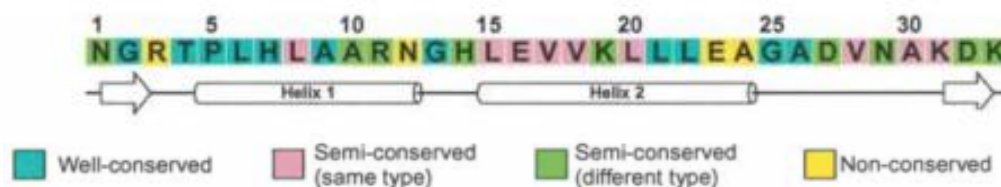


Fig. 10. (A). Alineamiento múltiple en aminoácidos de la secuencia de la proteína de 638aa obtenida para FEM-1 en *Litopenaeus vannamei* contra las secuencias de la proteína FEM-1-like protein de *Daphnia pulex* (GenBank EFX74179), proteína FEM-1 isoforma A de *Caenorhabditis elegans* (GenBank NP\_500824.1) y FEM-1 isoforma B para *Homo sapiens* (GenBank NP\_056137.1) indicando en rectángulos repeticiones conservadas para el dominio ankyrin repeat presente en las secuencias, cada corchete representa una repetición ANK. La tonalidad azul fuerte muestra identidades conservadas y azul claro semiconservadas (B). Muestra la secuencia consenso utilizada para la identificación de ankyrin repeat la cual fue derivada de análisis estadísticos de ~4400 ankyrin repeat usado por Mosavi *et al.* (2002a), representando el nivel conservado para cada posición con diferente color. Elementos correspondientes a estructura secundaria son mostrados en la parte inferior (Tomado de Mosavi *et al.*, 2004).

Un árbol filogenético a partir de un bloque conservado de diversas secuencias proteicas para FEM-1 permite ubicar al gen identificado en *L.vannamei* entre la secuencias de los artrópodos, además dentro de los diversos grupos de isoformas FEM-1B, FEM-1C y FEM-1. La secuencia aislada en *L. vannamei* se agrupa dentro de las proteínas catalogadas únicamente como FEM-1. Adicionalmente se realizó una predicción estructural de la proteína de 638aa-*fem-1*(L. vFEM-1) de *L.vannamei* (dado que ésta presentó un número de aminoácidos muy parecido a las proteínas *fem-1* reportadas en otras especies)(Fig.11) y de la proteína FEM-1A de *C. elegans* (Fig.12) mediante el software I-TASSER (Zhang, 2008) obteniendo un *C-score* de -2.16 y -2.18 respectivamente, paralelamente el software identificó una proteína denominada “D34 of human ANKYRIN-R” la cual es albergada en la base de datos PDB (Protein Data Bank) con alto grado de similitud estructural mediante el software TM-aling (Zhang y Skolnick, 2005) mostrando un *TM-score* de 0.618 con respecto a L. vFEM-1. Basado en los resultados previos se elaboró un análisis de comparación estructural por superposición: Flexible structure alignment by chaining AFPs (Aligned Fragment Pairs) con FATCAT (Ye y Godzik, 2004) de la proteína L. vFEM-1 contra la secuencia proteica de la región “D34 of human ANKYRIN-R” y con la proteína



generada para *C. elegans* (Fig.13) con la finalidad de detectar las regiones de identidad estructural que L. Vfem-1 comparte con ambas y si estas están dirigidas al dominio ANK. De este análisis se obtuvo una similitud estructural con la región “D34 of human ANKYRIN-R” mostrando un score de 776 con un valor significativo de 4.02e-09, asimismo el análisis de comparación estructural por superposición con la proteína FEM-1a de *C. elegans* mostró un mejor score de 956.23 y un valor significativo de 2.22e-12.

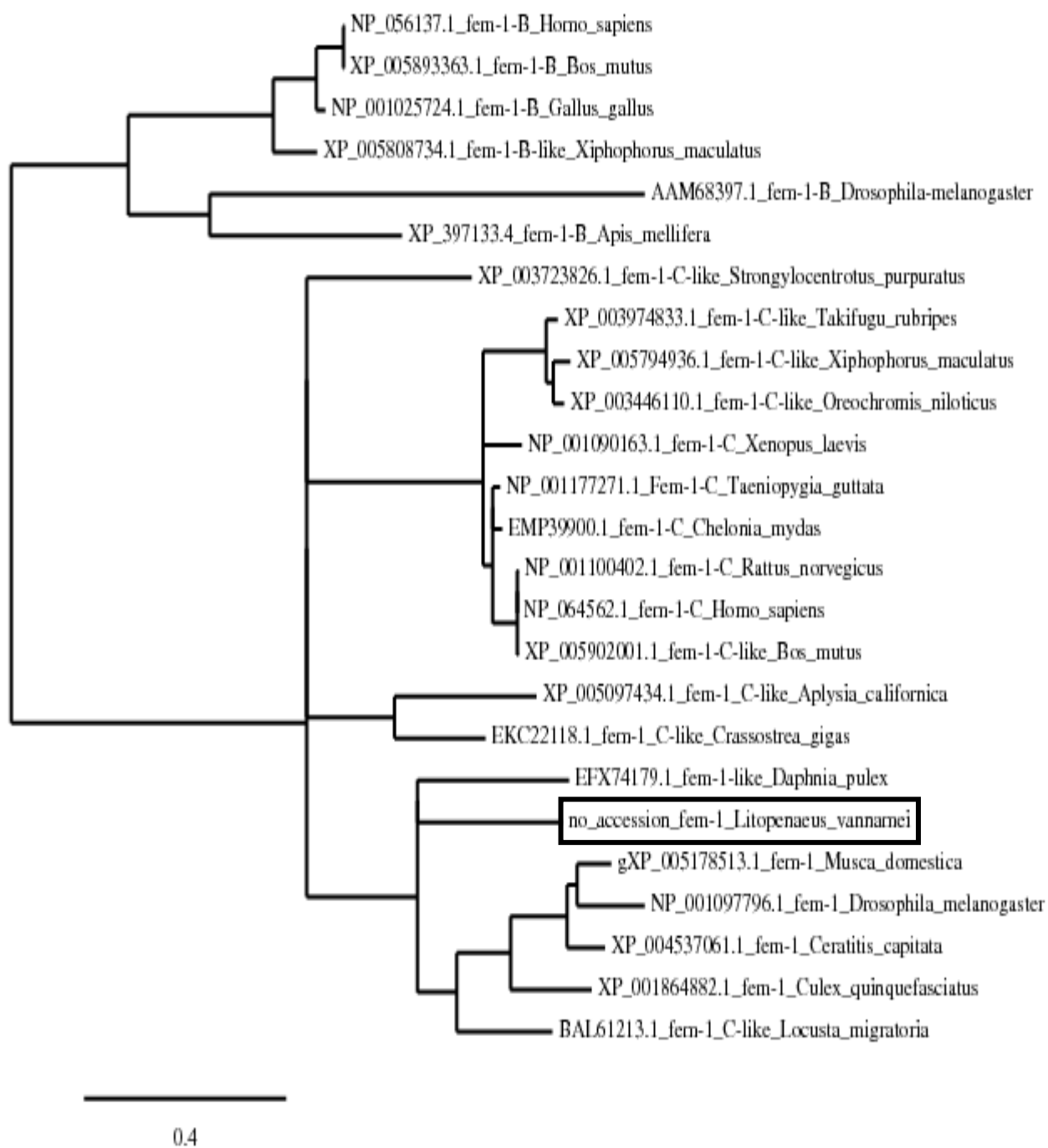


Fig. 11. Árbol filogenético de secuencias de proteínas FEM-1B, FEM-1C y FEM-1 en diversas especies, incluyendo la secuencia caracterizada en el presente estudio para *L.vannamei*.

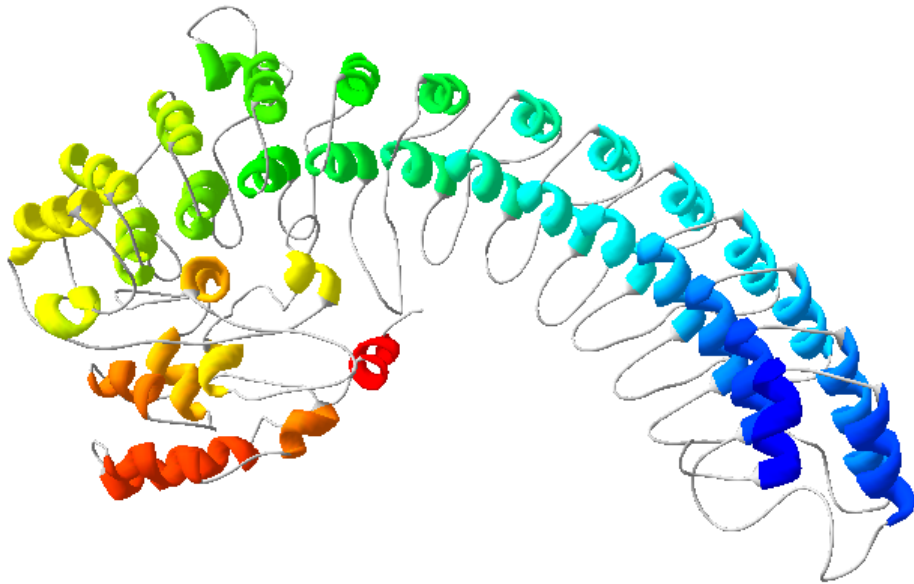


Fig.12. Predicción estructural de la proteína L. vFEM-1 de *L.vannamei*

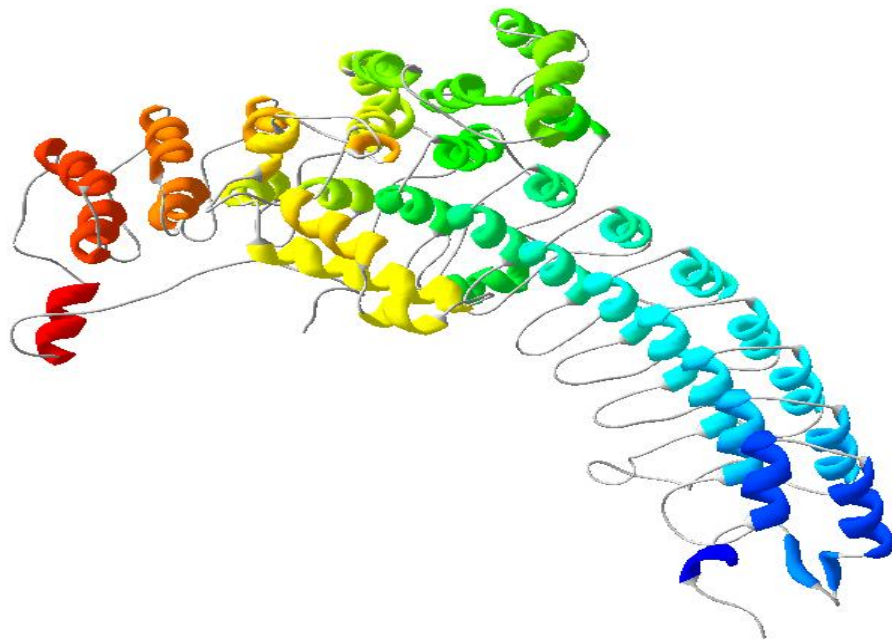


Fig.13. Predicción estructural de la proteína FEM-1a (656aa) de *C. elegans*

Alignment score: 776.05 (p-value 4.02e-09)  
**D34 of human ANKYRIN-R**



Alignment score: 956.23 (p-value 2.22e-12)  
**FEM-1a C. elegans**

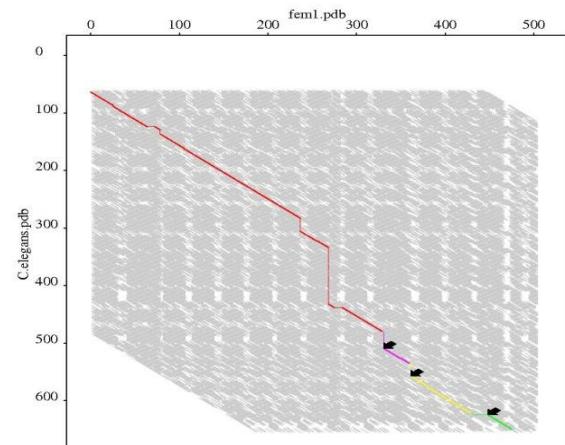
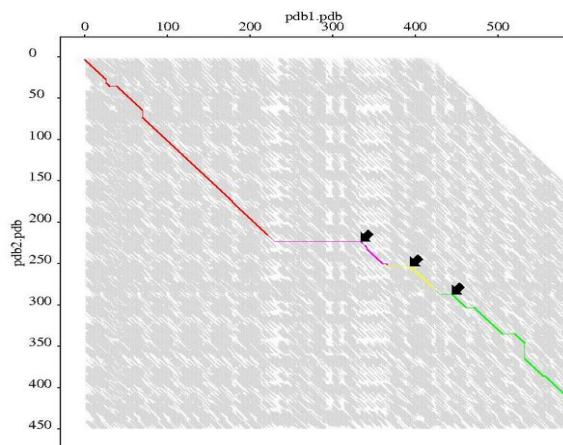
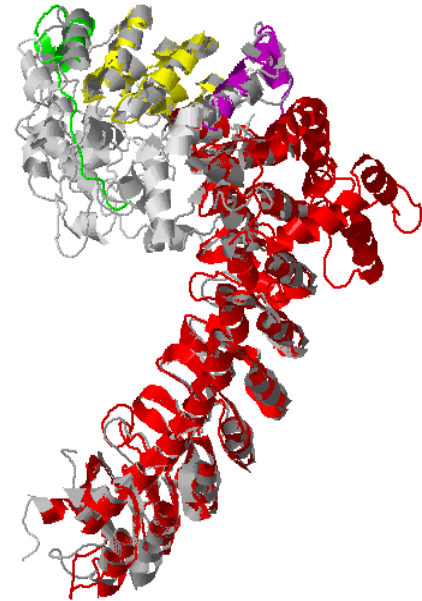


Fig.14. Alineamientos estructurales del modelo proteico L.vFEM-1 contra el modelo de “D34 of human ANKYRIN-R” y FEM-1a de *C. elegans*.

## 7.2 Análisis por PCR semi-cuantitativo para establecer si el gen *fem-1* se expresa ubicua o específicamente en otros tejidos.

### 7.2.1 PCR semi-cuantitativa en los tejidos de interés.

El par de oligonucleótidos Lv9057-F, Lv9057-R (Tabla I) mediante PCR semi-cuantitativa permitió establecer la expresión ubicua del gen *fem-1* amplificando un fragmento de ~234 pb. Encontrándose expresado en hepatopáncreas, gónada, pedúnculo y músculo (ambos sexos) de *L. vannamei*, tal y como ha sido reportada su expresión en línea somática así como germinal.

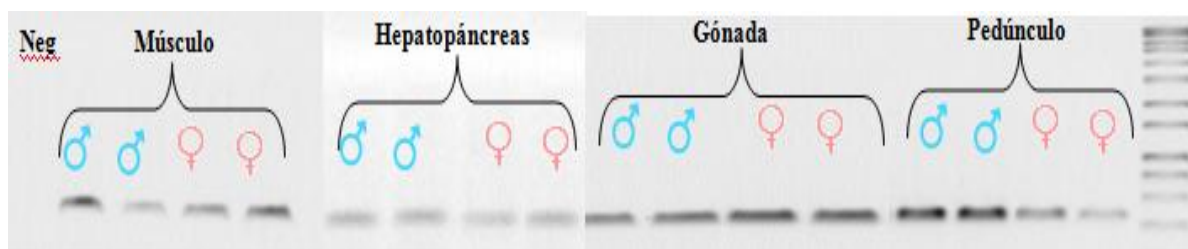


Fig. 15. Presencia del transcrito *fem-1* en *L.vannamei*. Neg: Negativo.

### 7.3 Localización del transcrito *fem-1* en gónada masculina y femenina de *L.vannamei* por hibridación *in situ*.

#### 7.3.1 Localización de *fem-1* en gónada masculina y femenina.

La hibridación *in situ* con la sonda antisentido de *feminization* (*fem-1*) en cortes de gónada femenina y masculina (Fig. 16, 17 y 18) permitió localizar la presencia de éste gen, el cual es expresado en el citoplasma de ovocitos en pre-maduración así como en ovocitos en peri-nucleolos temprano (Fig. 16). En el caso de la región masculina el transcrito fue localizado en células dentro de los túbulos seminíferos en la región testicular (Fig. 17) así como en la región de los vasos deferentes (Fig. 18). La señal parece emerger de la región del acrosoma y en partículas citoplasmáticas que rodean al núcleo.

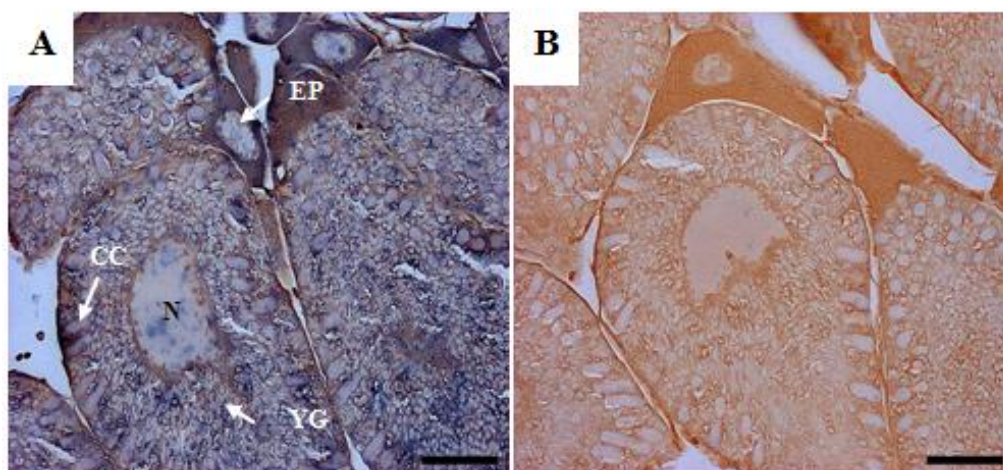


Fig.16. Expresión de *fem-1* en ovario de adultas de *L. vannamei* determinado por hibridación *in situ*. (A) Ovocitos en pre-maduración, señal de hibridación “antisentido”. La hibridación con sonda “sentido” (B) no mostró señal. Barra escala= A, B) 50µm, N=Núcleo. EP= ovocitos en peri-nucleolos temprano. CC= Criptas corticales. YG= Gránulos de vitelo.



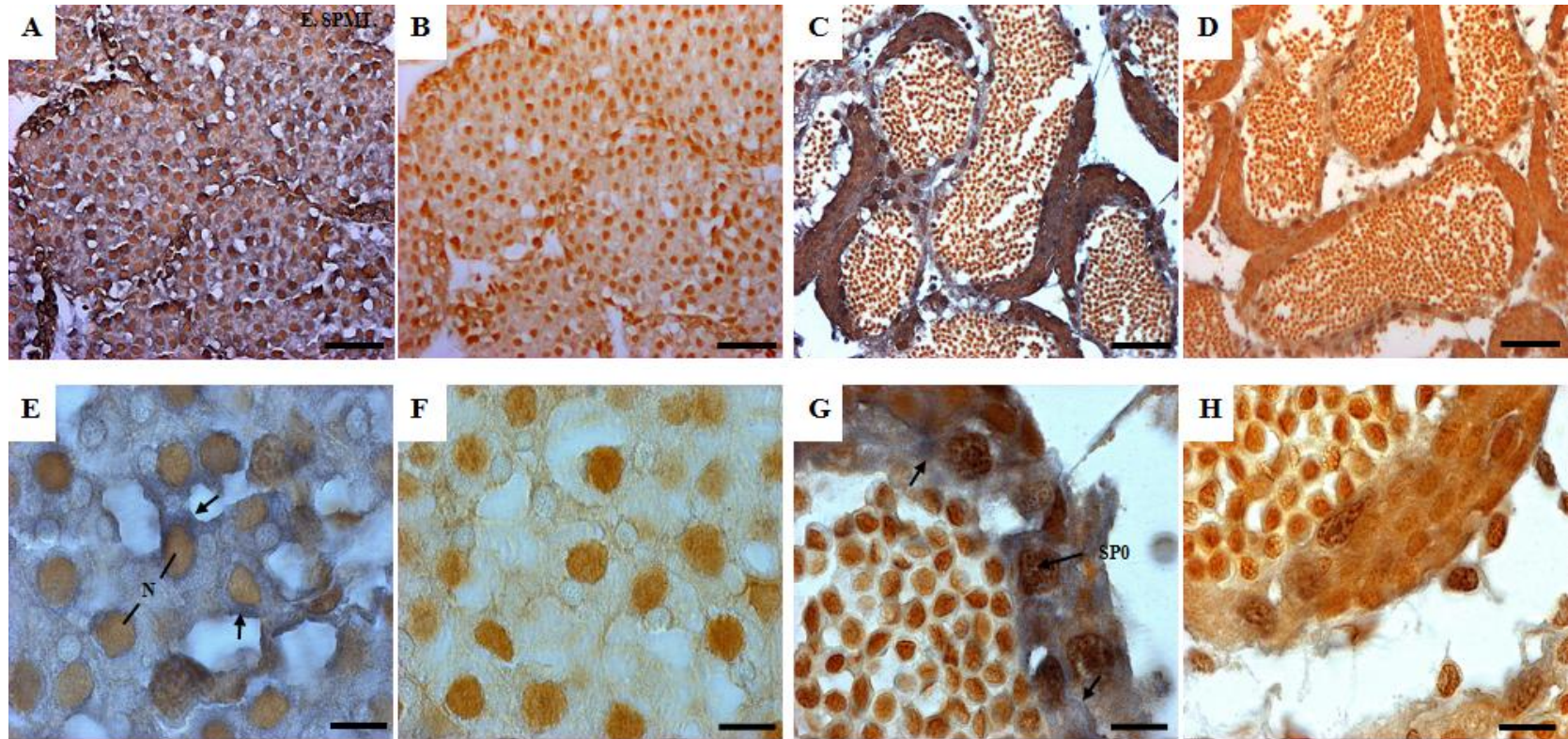


Fig.17. Expresión de *fem-1* en testículos de adultos de *L. vannamei* determinado por hibridación *in situ*. (A, E, C, G) señal de hibridación “antisentido” dentro de los túbulos seminíferos (flechas oscuras) y en la periferia de los mismos. La hibridación con sonda “sentido” (B, F, D, H) no mostró señal. Barra escala= A, B, C, D) 50 $\mu$ m, E, F, G,H) 10 $\mu$ m. E.SPMT: Espermátida temprana. N=Núcleo. SPO= Espermatogonia.

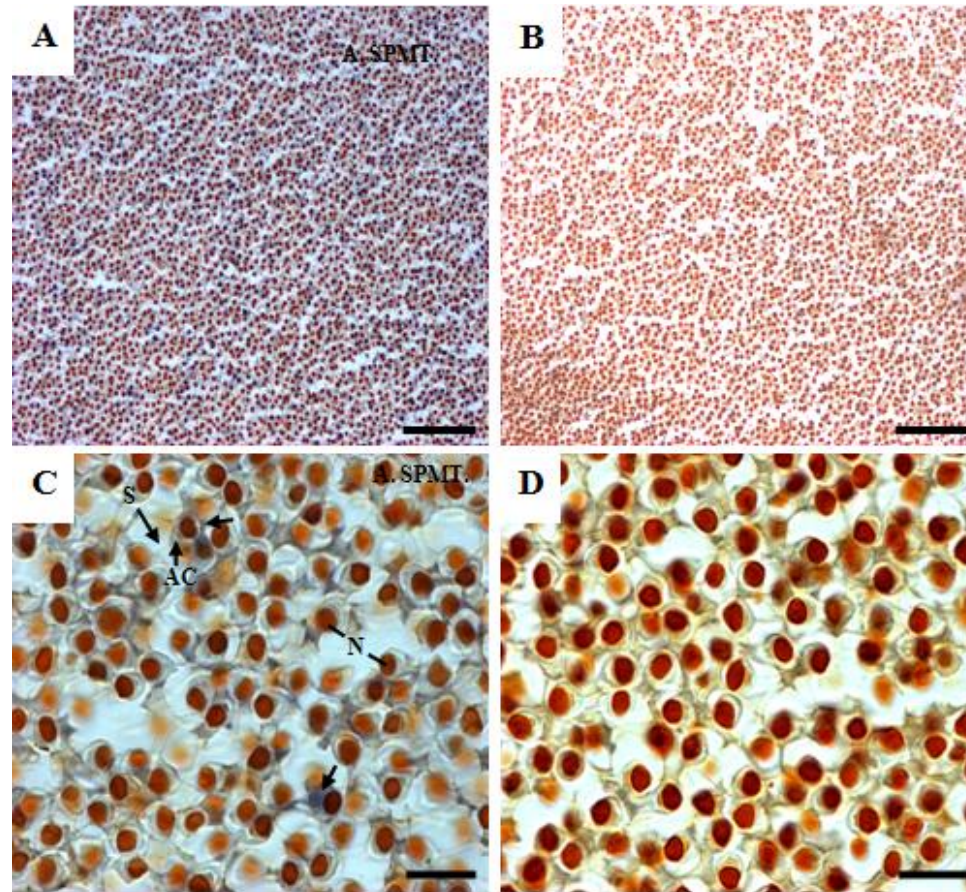


Fig.18. Expresión de *fem-1* en vaso deferente de *L. vannamei* determinado por hibridación *in situ*. (A, C) señal de hibridación “antisentido”. La hibridación con sonda “sentido” (B, D) no mostró señal. Barra escala= A, B) 50 $\mu$ m, C, D) 10 $\mu$ m. A.SPMT: Espermátida avanzada. N=Núcleo. AC= Acrosoma. S= Spike.



## **7.4 Bloqueo específico del gen *fem-1* a través de ARN de interferencia en hembras y machos adultos.**

7.4.1 Evaluación del silenciamiento de *fem-1* mediante análisis de expresión génica.

### 7.4.1.1 Estabilidad de genes de referencia.

Para determinar la estabilidad de los genes de referencia, los resultados de *Cq* de las muestras fueron analizados mediante RefFinder. Esta herramienta integra análisis de estabilidad con diferentes algoritmos estadísticos (geNorm, Normfinder, BestKeeper y el método comparativo de  $\Delta Ct$ ). El resultado indicó que los genes *Ubiquitina* y *L8* presentaban mayor estabilidad para las muestras evaluadas en gónada, *Ubiquitina* y *factor de elongación* para el caso de pedúnculo ocular (Fig. 19).

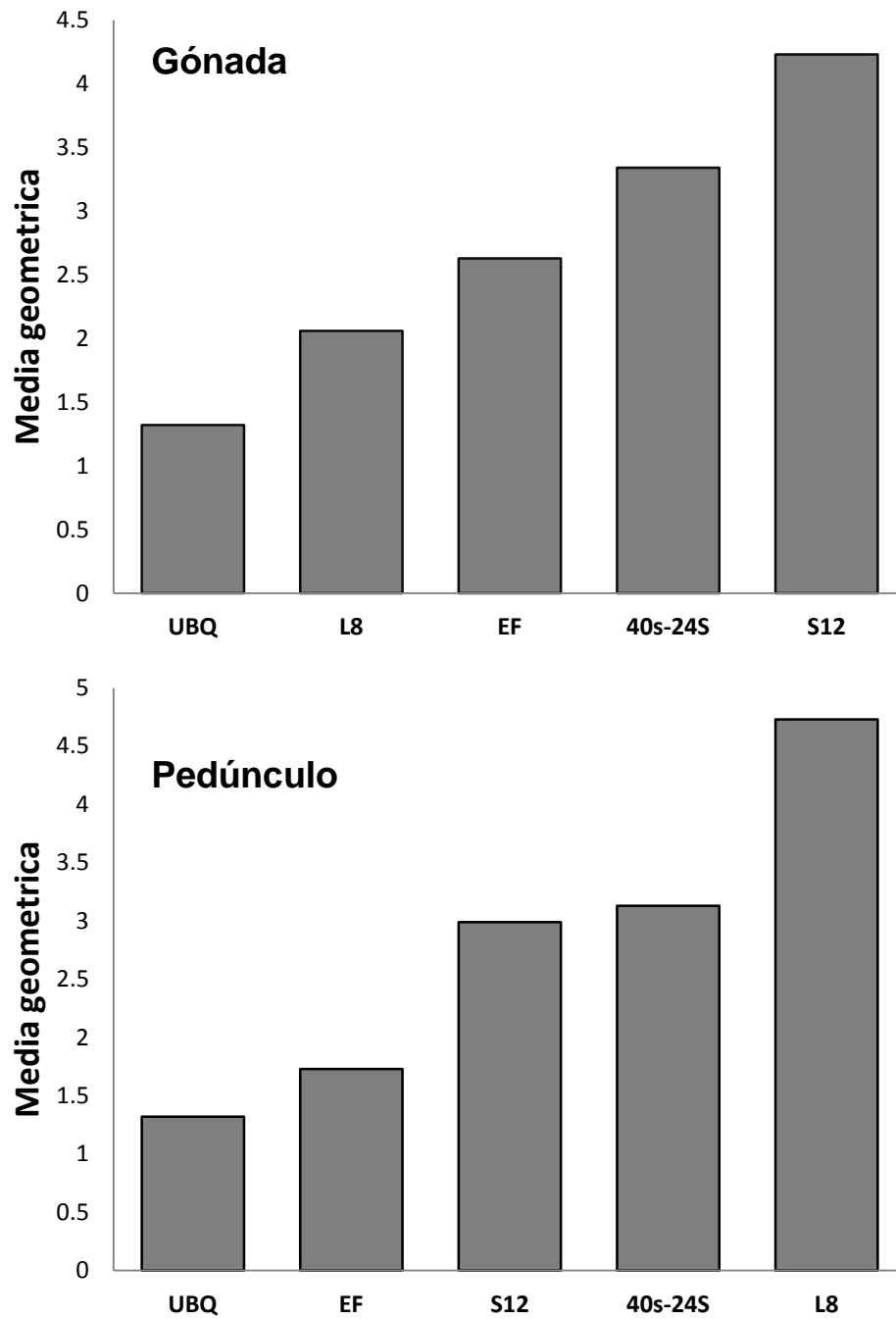


Fig. 19. Estabilidad evaluada como la media geométrica de los valores obtenidos con los algoritmos que integran RefFinder.

Tabla III. Secuencias de oligonucleótidos-cebadores de los genes de referencia y genes blancos. T: temperatura de alineamiento; pb: pares de bases; Cq: Cq mínimo de la curva estándar; E: eficiencia.

Genes	Dirección	Secuencia (5'→3')	T(°C)	Producto (pb)	Cebador μM	Cq	E %
<i>40s-24s</i>	Forward	CAGGCCGATC AACTG TCC	60	204	0.5	22.75	95.5
	Reverse	CAATGAGAGCTTGCCTTTCC					
<i>Factor de elongación: ef2</i>	Forward	CTGTGGTCTGGTTGGTGTG	60	141	0.5	19.35	89.4
	Reverse	TCGGATGAGTTCTTGGGTTTC					
<i>L8</i>	Forward	GCCTAAGGTGCGTGGTGT	58	181	0.46	20.90	87.2
	Reverse	ATTCTGCCTTGGGTCCTTCT					
<i>S12</i>	Forward	GTGGAAGGAGACGTTGGTGT	60		0.46	20.87	89.1
	Reverse	AGAGCCTTGACCGCTTCAT					
<i>Ubiquitina</i>	Forward	GGGAAGACCATCACCCCTTG	60	146	0.46	20.10	87
	Reverse	TCAGACAGAGTGCGACCATC					
<i>Feminization: fem-1</i> <i>GenBank: KF573432</i>	Forward	TAGGGTGGGGATGCGTTCTT	64	220	0.2	17.73	97.6
	Reverse	AGGAGAGGTGGCCGTTCTTG					
<i>Vitelogenina: Vtg</i> <i>GenBank: AY321153.2</i>	Forward	CCCGCCTTCATTGAGGTGAC	64	139	0.2	21.47	100.5
	Reverse	CAACACCGCGACTCTCTCCA					

#### 7.4.1.2 Expresión relativa de *fem-1* en gónada y pedúnculo de camarones tratados con dsRNA-*fem-1*.

La expresión relativa del gen *fem-1* en gónada no presentó diferencias significativas entre tratamiento por sexo ni entre sexos, lo cual indica que el silenciamiento no fue detectado después de los cinco días de que los organismos fueron tratados con dsARN-*fem-1*. Por otra parte la expresión relativa para pedúnculo presenta diferencias significativas en la expresión del gen para las hembras tratadas con respecto a los controles, sugiriendo que en éste tejido el silenciamiento genético pudo ser detectado, mientras que en machos no existe evidencia de silenciamiento (Fig. 20).

#### 7.4.1.3 Expresión relativa de *vitelogenina* en gónada de camarones tratados con dsRNA-*fem-1*.

En el presente estudio la expresión relativa evaluada para *vitelogenina* en gónada de machos no presentó cambios significativos en los niveles de expresión con respecto al control. Sin embargo en hembras se observó un incremento significativo de los organismos tratados con dsARN-*fem1* con respecto al control eGFP pero no así con el control de solución salina (Fig. 21).

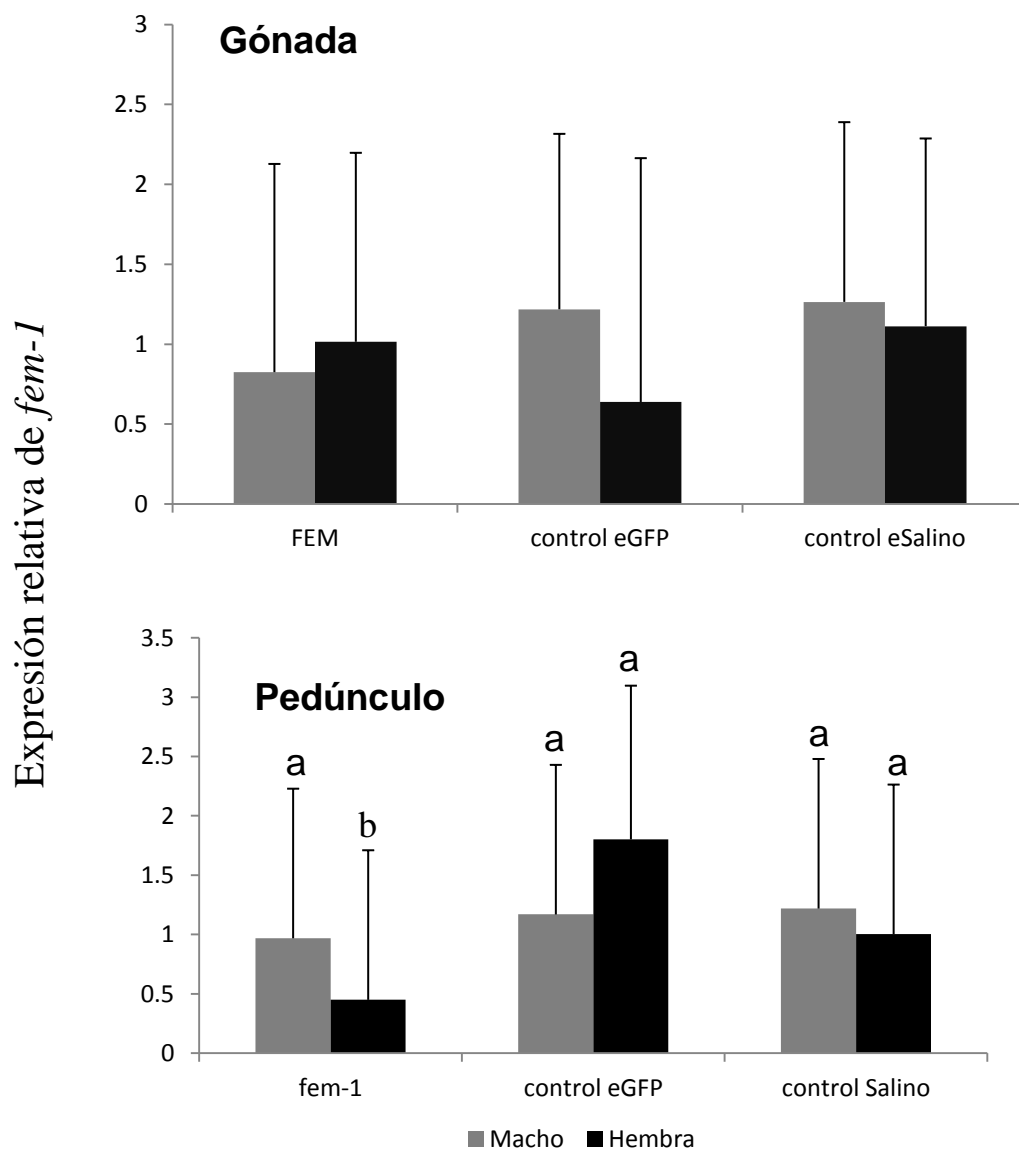


Fig. 20. Expresión relativa de *fem-1* en gónada y pedúnculo de camarones tratados con dsRNA*fem-1* y sin tratamiento control eGFP y salino. Diferentes letras indican diferencias significativas ( $p < 0.05$ ; prueba post-hoc de Fisher para diferencias entre grupos). Las barras de dispersión representan el error estándar. Se utilizaron los genes *ubiquitina* y *L8* para normalizar en gónada y *ubiquitina* y *ef* para pedúnculo.

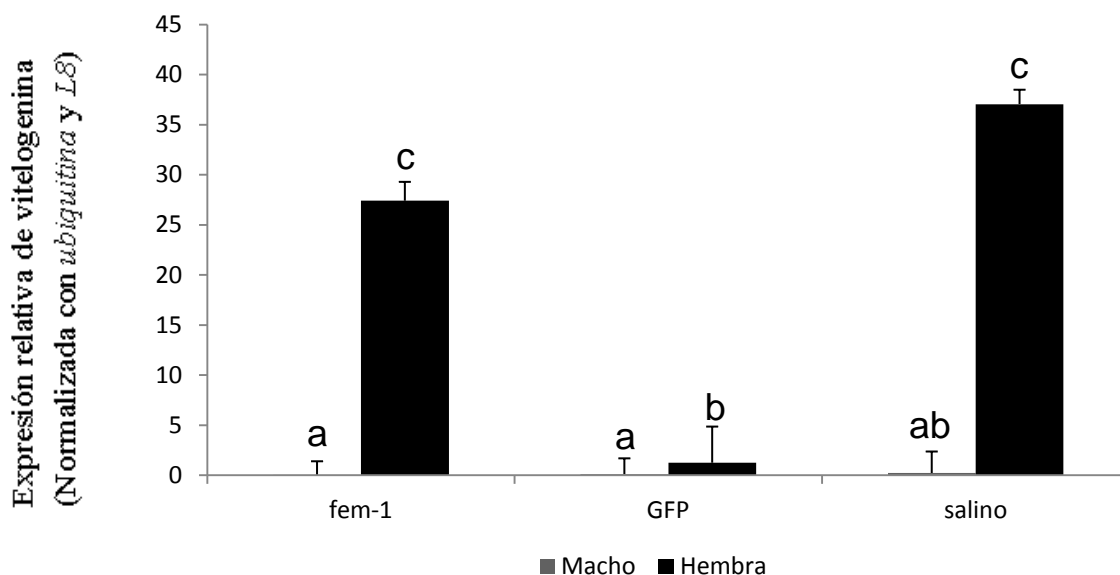


Fig. 21. Expresión relativa de *vitelogenina* en gónada de ambos sexos de camarones tratados con dsRNA *fem-1* y sin tratamiento control eGFP y salino. Diferentes letras indican diferencias significativas ( $p < 0.05$ ; prueba post-hoc de Fisher para diferencias entre grupos). Las barras de dispersión representan el error estándar.

## 8. DISCUSIÓN

### 8.1 Caracterización del o los transcritos del gen *fem-1* en *L. vannamei*.

En éste estudio se aislaron y caracterizaron cinco transcritos completos para el gen *fem-1*, los cuales presentaban residuos repetidos correspondientes al dominio conservado *ankyrin repeat* (ANK) característico en éste gen, como ha sido reportado en diferentes especies (Ventura-Holman *et al.*, 1998; Ventura-Holman y Maher, 2000; Ventura-Holman *et al.*, 2005). Sin embargo el análisis *in silico* de identificación de sitios alternos de transcripción a través de TATA-Box no pudo explicar los transcritos cortos aislados. Una probabilidad de lo anterior radica en la metodología RACE, donde es característico obtener secuencias no completas en dirección 5'. Lo antes descrito se debe a la presencia de fragmentos más cortos que son producto de la degradación del fragmento real, y dado que el adaptador RACE en dirección 5' une cualquier tipo de fragmento, los ensamblajes generados al final podrían ser un reflejo de degradación en lugar de transcritos alternos. Sin embargo, estos no

deben ser descartados hasta no presentar un análisis de validación por *northern blot*, el cual es un método para obtener información acerca del tamaño de particulares moléculas de ARN y la posible existencia de variantes en longitud de un específico ARN, donde este último es fraccionado por un gel de electroforesis y luego el ARN es transferido hacia una membrana, la que posteriormente es analizada por la unión de una o más pruebas marcadas para específicos ARN (Alwine *et al.*, 1977).

El transcrito más grande caracterizado, el cual se aisló en todos los tejidos evaluados (testículo, ovario, pedúnculo de hembras juveniles y embrión) presentó una longitud total de 3778 pb con una UTR 5' de 88pb y 1772 pb de UTR 3' codificando en su marco de lectura abierto +2 (ORF +2) una proteína de 638 aminoácidos (aa). Secuencias proteicas para *fem-1* en otras especies muestran un tamaño de proteína similar al reportado en *L.vannamei*, en *C.elegans* la isoforma principal posee 656 aa (GenBank: CCD61590.1), *Daphnia pulex* 633 aa (GenBank: EFX74179.1), *Crassostrea gigas* 622 aa (GenBank: EKC22118.1) y en *Homo sapiens* 617 aa (GenBank: NP\_064562.1). Los análisis filogenéticos de diversas isoformas para el gen *fem-1* colocan a la proteína de *L.vannamei* entre las clasificadas únicamente como FEM-1 dentro de una diversidad de especies. Las proteínas pertenecientes al dominio ANK son encontradas filogenéticamente en una amplia diversidad de organismos, las cuales se encuentran involucradas en un rango de funciones biológicas mediando interacciones proteína-proteína, dentro de las cuales se encuentran la regulación del ciclo celular, interacciones con el citoesqueleto, factores de transcripción, en el intercambio iónico y canales de calcio (Sedgwick y Smerdon, 1999). El plegamiento de las repeticiones ANK juega un importante papel para su función (Mosavi *et al.*, 2002) debido a que se unen a diferentes tipos de proteínas, lo anterior es atribuido a su dominio de unión a proteínas particularmente localizadas en la membrana celular. Dicho dominio posee en general la siguiente secuencia conservada -G-TPLH-GH-VA-LL-GA-ND-. Un mismo patrón con algunas sustituciones es observado en la secuencia de *fem-1* encontrada en *L.vannamei* L.vFEM-1 mostrando seis repeticiones (Fig. 10) con esta firma y ocho regiones de la familia ANK identificadas a través de un análisis de familias proteicas (Las cuales

incluyen las repeticiones encontradas) Pfam misma que en conjunto le proporcionan la identidad estructural a este dominio.

El alto grado de homología de ANK en la proteína y su identidad estructural del camarón *L. vannamei* podría reflejar la conservación a través de la evolución de interacciones proteína-proteína parecida a las que implica FEM-1 en la determinación del sexo en *C. elegans* (Ellis y Scheld, 2007). A nivel estructural, L. vFEM-1 en su modelo proteico generado, presenta identidad significativa con la proteína cristalizada de la región *D34 of human ANKYRIN-R* (Michaely *et al.*, 2002). Esta región de ANK puede asociarse con proteínas transportadores de iones, a la proteína clatrina y a la espectrina, una proteína periférica de la membrana (Michaely *et al.*, 2002); sugiriendo una posible función similar para la proteína L.vFEM-1 en la región periférica de la membrana celular.

Por otra parte y aunque la proteína correspondiente a *C. elegans* no ha sido aún cristalizada, esta última fue generada *in silico* y muestra homología estructural con la proteína aislada de *L. vannamei* manifestando mayor identidad estructural que la región cristalizada en humanos, ambos análisis apoyan la idea de una posible función de la proteína aislada en éste estudio con los análisis genéticos en términos de función molecular en *C. elegans*, los cuales muestran que la proteína FEM-1 interviene en el flujo principal de los genes que controlan la diferenciación sexual siendo clave tanto en la línea somática como germinal. Su represión es mediada en ambas líneas por la región citoplasmática de la proteína transmembranal TRA-2A, sin embargo su interacción directa no ha sido evidenciada, sino más bien con la proteína FEM-3 del complejo proteico FEM a través de una regulación proteína-proteína (Ellis, 2007). La manera en que la regulación es llevada permanece sin descubrirse, sin embargo ésta asociación proteica ha sido demostrada por ensayos *in vitro* mediante interacciones híbridas (Hansen y Pilgrim, 1999). Por otra parte el mecanismo por el cual las proteínas FEM regulan a TRA-1 es mediado por un complejo ubiquitin ligasa CUL-2, en donde FEM-1 es reconocido como el substrato, y FEM-2 - FEM-3 actúan como cofactores (Starostina *et al.*, 2007), donde TRA-1 es un factor de transcripción que promueve los genes que dan lugar a las hembras (etapa de ovogénesis en hermafroditas) tanto en la línea germinal como somática. Lo anterior coloca a la proteína FEM-1 en



funciones claves en la diferenciación sexual dada a través de sus repeticiones las cuales forman el dominio ANK que participa tanto a nivel membrana como con proteínas que actúan sobre factores de transcripción.

Como se mencionó anteriormente, la región *D34 of human ANKYRIN-R* (Michaely *et al.*, 2002) que ha sido asociada a interacciones con proteínas en la periferia de la membrana y con factores de transcripción, mostró un *score* significativo con la proteína aislada en *L. vannamei*, y además ésta última con la proteína generada de *C.elegans* manifestando de igual manera un *score* significativo, por lo tanto, y dado las regulaciones genéticas observadas también en *C. elegans* se podrían inferir funciones similares en términos de represión y regulación en la cascada genética presentada en la diferenciación sexual para *L. vannamei*.

## **8.2 Localización por hibridación *in situ* en gónada de macho y hembra, y análisis por PCR semi-cuantitativa para establecer si el gen *fem-1* se expresa ubicua o específicamente en otros tejidos.**

La localización por hibridación *in situ* del transcrito de *fem-1* dentro de los túbulos seminíferos en testículo de machos de *L. vannamei*, así como en espermatogonias, es consistente con lo observado en ratón (*Mus musculus*) donde la variante *fem1b* fue específicamente expresada en células germinales dentro de los túbulos seminíferos del testículo, además de estar presente durante la organogénesis en células epiteliales de los ductos anterior y ventral de la próstata, asimismo se encontró que es altamente expresado en espermatogonias (Wang *et al.*, 2008). Resultados similares también son encontrados en la rata Wistar (*Rattus norvegicus*), donde lograron localizar la presencia de altos niveles de *Fem1b* durante procesos de meiosis y después, durante la espermiogénesis (Oyhenart *et al.*, 2005). Mutantes nulas para *fem1b* generadas, muestran defectos en la morfogénesis ductal de la próstata y en la expresión de proteínas secretoras, por lo que se cree que *fem1b* podría poseer una función conservada en la generación del dimorfismo sexual implicada en el desarrollo de la glándula de la próstata (Oyhenart *et al.*, 2005). En el caso de la región ovárica, la hibridación fue observada en la zona del citoplasma en ovocitos. Es conocido

que *fem-1* es un gen determinante del sexo en *C. elegans*, cuya expresión se requiere para todos los aspectos del desarrollo correcto de los machos (Doniach y Hodgkin, 1984). Animales sin actividad de la proteína FEM-1 se desarrollan como hembras. Asimismo, se ha establecido que la contribución del cigoto de *fem-1* es suficiente para el desarrollo masculino somático (Doniach y Holguín, 1984), sin embargo se ha identificado un requisito citoplasmático de la madre de *fem-1* RNA en la espermatogénesis. Por lo tanto, se ha propuesto que la ausencia de ARN maternal en la línea germinal de *fem-1* de homocigotos, conduce a la feminización de la línea germinal en su progenie (Jonhson, 2010). De acuerdo a lo anterior, la localización de *fem-1* en ovocitos de *L. vannamei* podría estar de igual forma representando una condición de efecto materno, contribuyendo en los procesos de espermatogénesis en la progenie que ocurren en ésta especie.

Por otra parte la expresión por PCR semi-cuantitativa de *L.vfem-1* fue observada en los diferentes tejidos evaluados en ambos sexos de *L.vannamei*. Lo anterior viene acorde con los mecanismos de regulación a nivel proteína establecidos para éste gen en el nematodo *C.elegans*, donde niveles similares de expresión para el gen *fem-1* han sido cuantificados en hermafroditas y machos a través del desarrollo tanto en la línea germinal como somática y durante la etapa adulta, por lo que una regulación del gen *fem-1* a un nivel post-transcripcional es la que parece estar ocurriendo en *C. elegans* (Gaudet *et al.*, 1996). Si bien en la prueba de *L. vannamei* no se midieron niveles de expresión de forma cuantitativa, si se realizó posteriormente una aproximación parcial por PCR en tiempo real aprovechando el modelo experimental integrado y el cual fue desarrollado en el objetivo cuatro; el cual muestra que los niveles de expresión de *L.vfem-1* entre el pedúnculo ocular y gónada en organismos controles (inyectados con solución salina) permanecen sin cambios entre tejido y sexo (Fig.22).

Por lo tanto, la presencia cualitativa y el perfil cuantitativo observados parecen indicar una expresión global y por consecuencia una regulación post-transcripcional para el gen y no con tendencia tejido específico, particularmente dirigido hacia la línea germinal como ha sido observado en ratón *Mus musculus* (Ventura-Holman *et al.*, 1998), donde genes homólogos a *fem-1* de *C.elegans* identificados, denominados *fem-1a* y *fem-1b* muestran

perfiles de expresión del tipo tejido específico. La variante *fem1a* muestra abundante expresión en músculo cardíaco y esquelético de ambos sexos y se encuentra de igual forma en tejido embrionario a través de los días 7 hasta 17 del desarrollo. A diferencia de *fem1a*, la variante *fem1b* solo muestra altos niveles de transcritos en la región testicular y para la región ovárica los transcritos de ambas isoformas a penas son detectables, perfilando en el ratón un claro sistema de regulación del gen *fem-1* a un nivel de transcripción, representando una función tejido específico a diferencia de la función global observada en *C.elegans* (Ventura- Holman *et al.*, 1998) y al parecer en *L.vannamei*.

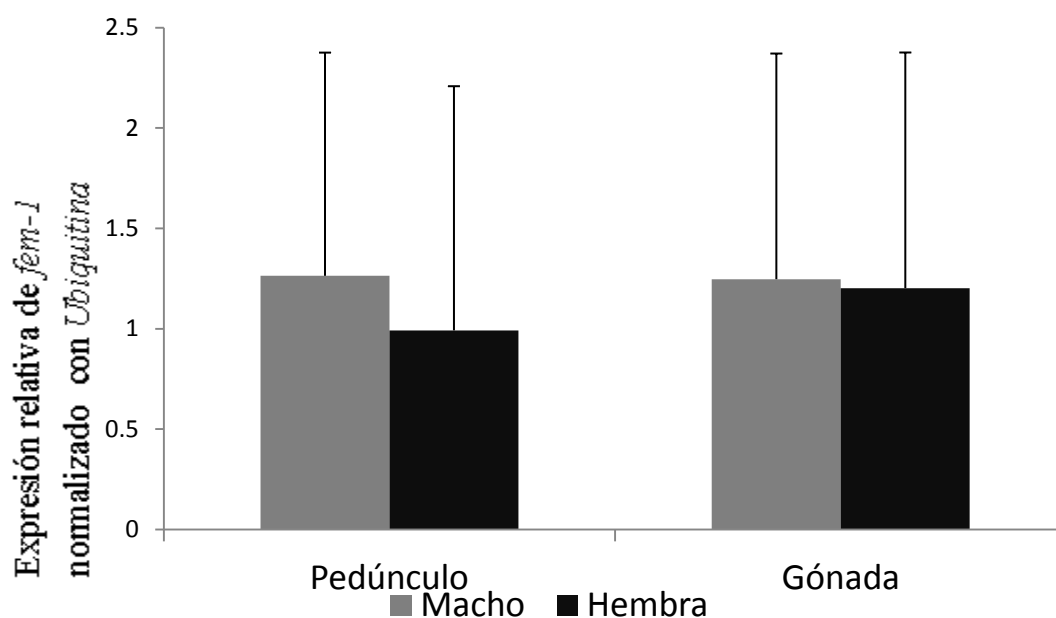


Fig. 22. Expresión relativa de *L.vfem-1* en gónada y pedúnculo ocular de camarones control salino. Las barras de dispersión muestran el error estándar.

Resultados similares han sido observados también en la variante *fem1B* aislada en humanos *Homo sapiens*, homólogo al gen *fem1b* en ratón y la variante *fem1c* aislada en el ave pinzón *Taeniopygia guttata* (Ventura-Holman *et al.*, 2005). Para las dos isoformas los ensayos por *northern blot* muestran patrones de expresión testículo específico, no obstante no han sido todavía examinadas las diferencias de expresión entre sexos en tejido somático

(Ventura y Marher, 2000), únicamente en la variante aislada de dicha ave se han realizado análisis de expresión en tejido cerebral con patrones de expresión similares entre machos y hembras. Lo observado en distintos organismos evidencia diferentes perfiles de expresión existentes con dos tendencias, en donde en primera instancia, la expresión del gen *fem-1* es encontrada en todos los tejidos evaluados tanto en la línea germinal como somática y un segundo perfil donde la expresión tiende a ser más tejido específico con énfasis en la región testicular. Sin embargo la definición de su función además de la establecida en *C. elegans* como involucrados directamente en la diferenciación sexual, ha sido relacionada únicamente como participe en el desarrollo correcto sexual secundario en machos.

En *L. vannamei* los perfiles preliminares de expresión para la variante parecen inclinarse hacia lo observado en *C. elegans* además de lo establecido previamente en su caracterización y a la presencia de dominios repetidos ANK los cuales coinciden en número de seis al igual que en *C. elegans*. Sin embargo es recomendable realizar un estudio completo mediante PCR cuantitativo en todos los tejidos posibles de *L. vannamei* encaminado a mostrar que las diferencias de expresión están siendo medidas con esta herramienta más sensible, para evidenciar de manera más clara la existencia de perfiles de expresión no tejido-específico.

### **8.3 Bloqueo específico del gen *fem-1* a través de ARN de interferencia en hembras y machos adultos.**

El uso del ARN de interferencia (RNAi) ha emergido en recientes años como una herramienta poderosa, tanto para identificar la función de genes como para combatir enfermedades a través de la supresión genética de manera post-transcripcional en animales y plantas (Fire, 1999). El inicio del silenciamiento es llevado de manera general por el procesamiento de doble cadena de ARN (dsRNA) mediante la enzima Dicer en pequeños fragmentos de oligonucleótidos, conocidos como “small interfering RNAs” (siRNAs), los cuales subsecuentemente sirven como secuencias guía para dirigir al complejo RISC (RNA-induced silencing complex) con la finalidad de degradar ARNm con secuencia complementaria (Hammond *et al.*, 2000) (Fig.23.).

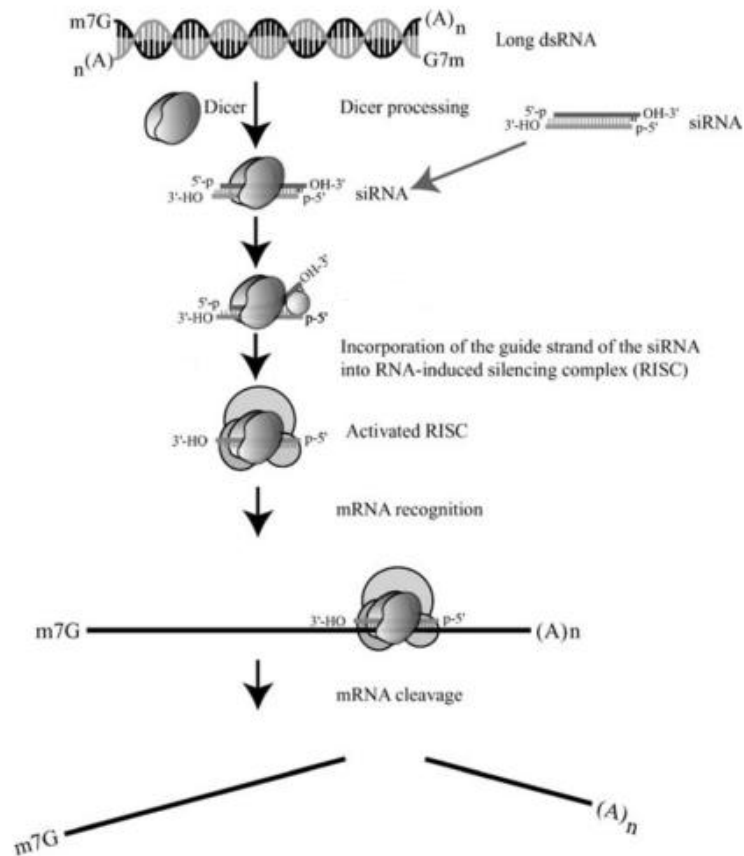


Fig. 23. Vía clásica de interferencia (RNAi) en *Drosophila* (Tomado y modificado de Dykxhoorn y Lieberman, (2005).

En un componente funcional, en *C.elegans* el silenciamiento genético ha permitido el colocar a un grupo diverso de genes que han sido aislados en diversas vías de regulación genética, particularmente en la diferenciación sexual, integrando resultados fenotípicos con los observados a partir de expresión diferencial en genes adyacentes que se creó participan en la misma vía de regulación. Entre los genes claves identificados que intervienen en la diferenciación sexual tanto somática como germinal se encuentra el gen *fem-1*, su inhibición a través de interferencia genética muestra patrones de reversión sexual resultando en hembras fértiles para ambos sexos, donde el sexo macho es eliminado (Stothard y pilgrim, 2003). A nivel de expresión los niveles del transcrito de *vitelogenina* pueden ser considerados como una forma de feminización cuando cambios en los niveles

de éste último son cuantificados en el sexo masculino el cual es regulado indirectamente por el gen *fem-1* en *C. elegans*.

En el presente estudio los perfiles de expresión de *L. vfem-1* no evidenciaron efectos de silenciamiento particularmente en la región de la gónada de hembras y machos después de los cinco días de haber sido tratados. Por otro lado en pedúnculo ocular la disminución de la expresión fue detectada solamente para el caso de las hembras. Éstas diferencias en la supresión de *L. vfem-1* tejido-específico pueden ser asociados a distintos factores entre los cuales destacan la eficiencia del RNAi *in vivo*, a la relación del tamaño del transcrito objetivo y el tamaño del híbrido de doble cadena dsRNA así como su concentración, el tiempo transcurrido de la inyección de dsRNA y la recolección de tejidos en términos de duración del silenciamiento, la eficiencia de la dsRNA asumida por diferentes tipos de células, la forma en que se lleva a cabo el inoculo y la abundancia del gen objetivo (Fire *et al.*, 1998).

No obstante, condiciones similares de silenciamiento a los realizados en el presente estudio con resultados positivos han sido utilizados (en términos de cantidad de dsRNA y peso del camarón) para determinar el efecto del silenciamiento de las subunidades de *Hipoxia inducible factor 1* (HIF-1) con tamaños de doble cadena de 836 pb para la subunidad alfa y 611 pb la beta (Soñanez-Organis *et al.*, 2010), así como para la hormona inhibidora de la muda (MIH, 216pb) de *Litopenaeus ensis* (Tiu y Chan, 2007). El tamaño de dsRNA utilizado para *L. vfem-1* fue de 660 pb y es conocido que tamaños de 600-800pb trabajan bien para la mayoría de los genes (Tiu y Chan, 2007), por lo que ésta variable parece no estar implicada en los resultados observados. Sin embargo en diversos estudios muestran que el tiempo en el cual el silenciamiento es más evidente está representado dentro de las primeras 48 horas y a diferencia de lo antes descrito, el tiempo para la recolección de muestras en este estudio fue de 120 hrs después del tratamiento, lo cual parece haber sido demasiado tiempo con dichas condiciones para la toma de tejidos.

En el camarón blanco *L. vannamei* la expresión del gen de *vitelogenina* en condiciones normales presenta una baja expresión en machos, sin embargo dado que el gen *fem-1* en *C.*

*elegans* regula negativamente y de manera indirecta al gen de la *vitelogenina*, en el presente estudio se esperaba encontrar un aumento en los niveles de expresión de éste gen mostrándose como un indicador de feminización o disrupción endocrina debido a una consecuencia del silenciamiento genético del gen *L. vfem-1* (Fig.24.). Mientras que en hembras de *L. vannahmei* el gen de la *vitelogenina* es altamente expresado en condiciones normales (Raviv *et al.*, 2006) y además el aumento de su expresión es correlacionado con el grado de desarrollo gonadal (Arcos *et al.*, 2011). Sin embargo es distinguido que en *C. elegans* la proteína de *vitelogenina* podría estar siendo modulada a través del FEM-1 (Wang y Kimble, 2001), por lo que un aumento en la expresión de *vitelogenina* en organismos tratados con dsRNA *fem-1* en relación a los controles podría ser en efecto una consecuencia del silenciamiento genético en hembras observado por la modificación en la regulación genética.

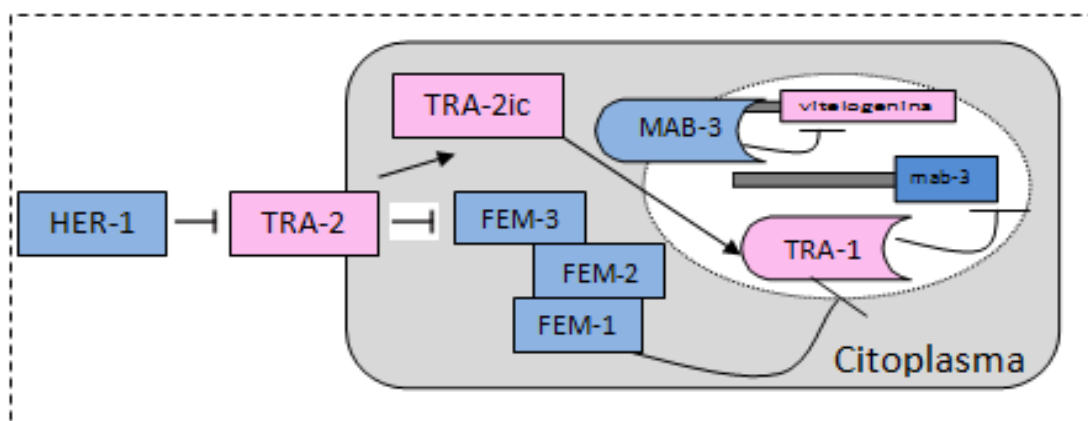


Fig.24. Vías de regulación del gen de la *vitelogenina* en *C. elegans*. La proteína HER-1 en animales machos X0 está unido a TRA-2, y esta inactivación permite que las proteínas FEM actúen en la represión de TRA-1, lo que a su vez permite la expresión del gen *mab-3*, codificando un factor de transcripción que inhibe al gen de la *vitelogenina* y por lo tanto que la célula tome el destino de macho. En Hembras XX HER-1 no está presente por lo que TRA-2 inhibe a las proteínas FEM, y esto permite que TRA-1 ejerza su función feminizante bloqueando la expresión del gen *mab-3* y subsecuentemente que la expresión de *vitelogenina* sea llevada. Interesantemente, un fragmento intracelular de TRA-2 (TRA-2ic) también puede interactuar directamente con TRA-1. Cuadros mostrados en azul promueven el destino de macho, y en rosa a hembras. Interacciones positivas son indicadas con una flecha “→”, e interacciones negativas por “-|”.

En el actual estudio los niveles de expresión de *vitelogenina* en la región testicular y ovárica no presentaron incrementos significativos en los organismos tratados, en parte como resultado de la no detección del silenciamiento para el gen *L. vfem-1* a los cinco días de haber sido tratados, por lo que la des-regulación genética no pudo ser observada. Entre otras posibles razones se encuentra la edad de los organismos, donde por ejemplo ha sido reportado en *Oreochromis niloticus* (tilapia) que la edad en los tratamientos de reversión sexual en ésta especie juega un papel importante, mostrando que en organismos juveniles (alevines) de tilapia donde la gónada está aun sin diferenciar los tratamientos de reversión sexual son efectivos, sin embargo cuando estos son aplicados en edad de adultos, no se observan efectos de reversión (Morales, 1991; Bocek *et al.*, 1992; Ahmad y Shakoori, 1993; Green y Teichert-Coddington, 1993; Hiott y Phelps, 1993; Phelps *et al.*, 1995; Jimenez y Arredondo, 2000b). De acuerdo a lo antes descrito en el presente estudio la edad de los organismos como adultos pudo haber jugado un papel importante en términos de silenciamiento e impacto proteico, probablemente debido a la carga proteico-hormonal ya establecida. Dado que, de acuerdo a la organogénesis descrita por Garza-Torres *et al.* (2009) la diferenciación sexual en *L. vannamei* ocurre cuando el organismo alcanza una edad de post-larva 16, además para el caso de los machos las células primordiales que dan lugar a la glándula androgenica aparecen cuando el macho alcanza una talla de post-larva de 52 días aproximadamente. La hormona producida por dicha glándula parece fungir como un componente endócrino de la regulación de la diferenciación sexual. Consecuentemente existe la posibilidad que a una edad temprana en *L. vannamei*, donde los niveles de proteínas involucradas en la diferenciación sexual no han alcanzado aun su máxima presencia, estos puedan ser alterados de forma significativa por el silenciamiento genético provocando algún cambio en vías genéticas en términos de expresión en genes como la *vitelogenina*.

Aunado a lo anterior también es importante el considerar la condición fisiológica inherente de cada organismo en términos de distintos desarrollos gonádicos y por consecuencia de muda que presentaba cada organismo al momento del tratamiento, dado que no fue aplicado un tratamiento de cobre previo al silenciamiento para homogenizar la población en cuanto a



estadios de muda, lo cual trae consigo variación individual en términos de la respuesta al silenciamiento genético.

Por otra parte, las diferencias significativas observadas en los niveles de expresión de *vitelogenina* únicamente con el control negativo eGFP pero no así con el control salino (Fig.21.), muestra un efecto de lo reportado en otras especies, en el cual el uso de éste control negativo ha tenido efectos provocando supresión de una variedad de genes, por ejemplo en *Apis mellifera* donde el control GFP que corresponde a un gen que no existe en dicho organismo, ha mostrado que aproximadamente 1400 genes son alterados en respuesta a dicho control, donde alrededor del 10% son genes conocidos para ésta especie.

Lo anterior parece ser el resultado ya sea de forma directa o indirecta de un efecto conocido como “*off target*” (Echeverri y Perrimon, 2006), en el cual los pequeños fragmentos generados a partir de la doble cadena son desviados y pueden dar “*hit*” con al menos suficientes pares de bases de una secuencia complementaria como para ocasionar un desequilibrio genético a través de otros tipos de transcritos, los cuales no eran el objetivo inicial. En general entre los genes que se observaron afectados en *Apis mellifera* fueron aquellos que estaban involucrados en importantes procesos metabólicos y del desarrollo asociado al procesamiento de ARN y transporte, al metabolismo de hormonas, inmunidad y respuesta a estímulos externos y a estrés (Nunes *et al.*, 2013). En células de mamíferos también ha sido reconocido que éste control negativo tiene efectos secuencia específicos “*off target*” (Tschuch *et al.*, 2008). Consiguente, y de acuerdo a lo antes mencionado, el patron observado en la región ovárica parece indicar un efecto “*off target*” para el gen de la *vitelogenina* dado que en el control salino los niveles de éste gen no disminuyeron como los niveles observados en eGFP.

## 9. CONCLUSIONES

1. El análisis *in silico* de las secuencias obtenidas permiten colocar al gen *Lyfem-1* dentro de un posible amplio rango de funciones, entre las que destaca su unión a proteínas de membrana, así como a factores de transcripción como ha sido observado en *C. elegans*.
2. El gen *fem-1* es localizado en células germinales tanto de machos como hembras de *L. vannamei*, asimismo es expresado en todos los tejidos evaluados y no parece existir una tendencia marcada de expresión tejido-específico.
3. Los análisis de interferencia no muestran evidencia suficiente para establecer que el gen *fem-1* en *L. vannamei* está implicado en la diferenciación sexual. No obstante un importante efecto “*off-target*” por eGFP-dsRNA en los niveles de expresión de *vitelogenina* fue identificado. Lo que justifica el desarrollar más pruebas en el contexto de lograr determinar las condiciones experimentales necesarias para que los resultados de dicha técnica puedan ser observados.

## 10. RECOMENDACIONES

1. Realizar un ensayo por *Northern blot* para confirmar variantes encontradas en los distintos tejidos de *L. vannamei*. Además cuando se requiera caracterizar un transcrito, el cual tiene posibilidades de presentar variación en el extremo 5' es preferible iniciar con Ligase Mediated Rapid Amplification of cDNA Ends (RACE–RLM RNA) (Muruyama y Sugano, 199; Shaefer, 1995) en el cual el adaptador 5' posee modificaciones para ser ligado únicamente a fragmentos 5' que contengan el CAP 5' y así evitar uniones inespecíficas a fragmentos producto de la degradación.
2. Llevar a cabo un análisis por qPCR en los diferentes tejidos para establecer mediante una herramienta más sensible los perfiles de expresión.
3. Considerar para futuros experimentos de interferencia genética un ensayo previo para establecer la dosis y el tiempo adecuado para poder observar de forma más clara el silenciamiento y por consecuencia los posibles efectos en términos de regulación de genes importantes, así como el uso de más de un gen control inexistente para el organismo.

## 11. LITERATURA CITADA

- Ahmad, M. Y., Shakoori, A. R. 1993. Effect of orally administered 17-alpha - methyltestosterone on sex reversal and growth of *Oreochromis niloticus*. Proceedings of Pakistan congress of zoology. 1992. Zoological Society of Pakistan, c/o Dep. Zool., Univ. Punjab New Campus, Lahore (Pakistan). 12:317- 323.
- Ahringer, J., Kimble, J. 1991. Control of the sperm–oocyte switch in *Caenorhabditis elegans* hermaphrodites by the *fem-3* 3'untranslated region. *Nature*, 349, 346–348
- Ahringer, J., Rosenquist, T.A., Lawson, D.N., Kimble, J. 1992. The *Caenorhabditis elegans* sex determining gene *fem-3* is regulated post-transcriptionally. *EMBO J.* 11, 2303–2310.
- Alwine, J. C., Kemp, D. J., Stark, G. R. 1977. Method for detection of specific RNAs in agarose gels by transfer to diazobenzyloxymethyl-paper and hybridization with DNA probes, *74*(12), 5350–5354.
- Andersen, C.L., Jensen, J.L., Ørntoft, T.F. 2004. Normalization of real-time 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.
- Aungsuchawan, S., Browdy, C. L., Withyachumnarnkul, B. 2011. Sperm capacitation of the shrimp *Litopenaeus vannamei*, 3, 188–195. doi:10.1111/j.1365-2109.2010.02579.
- Barton, M.K., Kimble, J. 1990. *fog-1*, a regulatory gene required for specification of spermatogenesis in the germ line of *Caenorhabditis elegans* . *Genetics* 125, 29-39.
- Belote, J.M. 1989. The control of sexual development in *Drosophila melanogaster*: genetic and molecular analysis of a genetic regulatory hierarchy. *Gene* 82, 161-167.
- Bnezic, J.A.H., Kenway, M., Ballment, E. 2001. Growth of *Penaeus monodon* X *Penaeus esculentus* tiger prawn hybrids relative to the parental species. *Aquaculture* 193, 227-237.
- Bocek, A., Phelps, R. P., Popma, T.J. 1992. Effect of feeding frequency on sex-reversal and on growth of Nile tilapia, *Oreochromis niloticus*. *Journal of Applied' Aquaculture.* 1(3):97-103
- Bono, M., Hodgkin, J. 1996. Evolution of sex determination in *Caenorhabditis*: unusually high divergence of *tra-1* and its functional consequences. *Genetics* 144, 587–589
- Breedon, L., Nasmyth, K. 1987. Similarity between cell-cycle genes of budding yeast and fission yeast and the Notch gene of *Drosophila*. *Nature* 329: 651–654.

- Bull, J.J. 1983. Evolution of sex determining mechanisms. The Benjamin Cummings Publishing Company, Inc Menlo Park, California. USA. 315pp.
- Bustin, S.A., Benes, V., Garson, J.A., Hellemans, J., Huggett, J., Kubista, M., Mueller, R., Nolan, T., Pfaffl, M., Shipley, G.L., Vandesompele, J., Wittwer, C.T. 2009. The MIQE guidelines: minimum information for publication of quantitative real-time PCR experiments. *Clin. Chem.* 55, 611-622.
- Bustin, S.A., Benes, V., Nolan, T., Pfaffl, M.W. 2005. Quantitative real-time RT-PCR - a perspective. *J. Mol. Endocrinol.* 34, 597-601.
- Bridges, C.B. 1921. Triploid intersex in *Drosophila melanogaster*. *Science* 54, 252-254.
- Campos-Ramos, R., Garza-Torres, R., Guerrero-Tortolero, D. D., Maeda-Martínez, A.M., Obregón-Barboza, M. 2006. Environmental sex determination, external sex differentiation and structure of the androgenic gland in the Pacific white shrimp *Litopenaeus vannamei* (Boone). *Aquaculture Research* 37(15): 1583–1593.
- Carmi, I., Meyer, B. J. 1999. The Primary Sex Determination Signal of *Caenorhabditis elegans*.
- Corpet, F. 1988. Multiple sequence alignment with hierarchical clustering. *Nucl. Acids Res.*, 16(22), 10881-10890.
- Chan, S., Rankin, S., Keeley, L. 1988. Characterization of the molt stages in *Penaeus vannamei*: setogenesis and hemolymph levels of total protein, ecdysteroids, and glucose. *Biological Bulletin* 175, 185-192.
- Chan SL., Tan KO, Zhang L, Yee KS, Ronca F, Chan MY, Yu VC.1999. F1Aalpha, a death receptor-binding protein homologous to the *Caenorhabditis elegans* sex-determining protein, FEM-1, is a caspase substrate that mediates apoptosis. *J Biol Chem.* 274, 32461–32468.
- Chen, P., Ellis, R.E. 2000. TRA-1A regulates transcription of *fog-3*, which controls germ cell fate in *C. elegans*. *Development* 127, 3119–3129.
- Chow S., Sandifer P.A. 1999. Differences in growth, morphometric traits and male sexual maturity among Pacific White shrimp, *Penaeus vannamei*, from different commercial hatcheries. *Aquaculture* 92, 165-178.
- Clifford, R., Lee, M., Nayak, S., Ohmachi, M., Giorgini, F., Schedl, T. 2000. FOG-2, a novel F-box containing protein, associates with the GLD-1 RNA binding protein and directs male sex determination in the *C. elegans* hermaphrodite germline, *5276*, 5265–5276.

- Coschigano, K.T., Wensink, P.C. 1993. Sex-specific transcriptional regulation by the male and female *doublesex* proteins of *Drosophila*. *Genes Dev* 7, 42-54.
- Dafa, T. A., Fu, G., Alphey, L. 2010. Use of a regulatory mechanism of sex determination in pest insect control. *Journal of Genetics* 89, No. 3. 301-305.
- Doniach, T., Hodgkin, J. 1984. A sex determiner gene, *fem-1*, required for both male and hermaphrodite development in *Caenorhabditis elegans*. *Developmental Biology* 106, 223-235.
- Doniach, T. 1986. Activity of the sex-determining gene *tra-2* is modulated to allow spermatogenesis in the *C. elegans* hermaphrodite. *Genetics* 114: 53–76.
- Echeverri, C.J., Perrimon, N. 2006: High-throughput RNAi screening in cultured cells: a user's guide. *Nat Rev Genet* , 7(5):373-384.
- Ellis, R.E., Scheld, T. 2007. Sex determination in the germ line. WormBook ed. The *C. elegans* Research Community, WormBook, doi/10.1895/wormbook.1.82.2, <http://www.wormbook.org>
- Ellis, R.E., Kimble, J. 1995. The *fog-3* gene a regulation of the cell fate in the germ line of *Caenorhabditis elegans*. *Genetics* 139, 561-577.
- Fire, A., Xu S., Montgomery, MK., Kostas, S.A., Diver, S.E., Mello, C.C. 1998. Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans* . *Nature* 391, 806-811.
- Garza-Torres, R., Campos-Ramos, R., Maeda-Martinez, M. 2009. Organogenesis and subsequent development of genital organs in female and male Pacific white shrimp *Penaeus (Litopenaeus) vannamei*. *Aquaculture* 296, 136-142.
- Gaudet, J., VanderElst, I., Spence, A.M. 1996. Post-transcriptional regulation of sex determination in *Caenorhabditis elegans*: widespread expression of the sex-determining gene *fem-1* in both sexes. *Mol Biol Cell* 7(7): 1107-1121.
- Gempe, T., Beye, M. 2010. Function and evolution of sex determination mechanisms, genes and pathways in insects. *Bioessays* 33, 52-60.
- Goll, D.E., V.F. Thompson, R.G. Taylor., T. Zalewska. 1992. Is cal pain activity regulated by membranes and autolysis or by calcium and calpastatin? *BioEssays* 14: 549–556.
- Goodaezi, O.M., Maher, F.J., Cui, J., Guo, X., Taylor, D.K, Azziz R. 2008. *FEMIA* and *FEMIB*: novel candidate genes for polycystic ovary syndrome. *Human Reproduction* 23, 2849-2849.
- Googwin, E.B., Ellis, R.E. 2002. Turning clustering loops: sex determination in *Caenorhabditis elegans*. *Current Biology* 12, R111-R120.

- Graham, P.L., Kimble, J. 1993. The *mog-1* gene is required for the switch from spermatogenesis to oogenesis in *Caenorhabditis elegans*. *Genetics*, 133, 919–931.
- Graham, P.L., Schedl, T., Kimble, J. 1993. More *mog* genes that influence the switch from spermatogenesis to oogenesis in the hermaphrodite germline of *Caenorhabditis elegans*. *Dev. Genet.*, 14, 471–484
- Green, B.W., Teichert-Coddington, D. R. 1993. Production of *Oreochromis niloticus* fry for hormonal sex reversal in relation to water temperature. *Journal of Applied Ichthyology* 9:230-236
- Haag, E.S., Wang, S., Kimble, J. 2002. Rapid evolution of the nematode sex determining genes *fem-3* and *tra-2*. *Current Biology* 12, 2035-2041.
- Hammond, S.M., Bernstein, E., Beach, D., Hannon, G. J. 2000. An RNA directed nuclease mediates post-transcriptional gene silencing in *Drosophila* cells. *Nature* 404:293–296.
- Hansen, D., Pilgrim, D. 1999. Sex and the single worm: sex determination in the nematode *C. elegans*. *Mech Develop* 83:3-15 Haunerland, N.H., 1996. Insect storage proteins: gene families and receptors. *Insect Biochemistry and Molecular Biology* 26, 755-765.
- Hediger, M., Burghardt, G., Siegenthaler, C., Buser, N., Hilfikerkleiner, D., Dubendorfer, A., Bopp, D. 2004. Sex determination in *Drosophila melanogaster* and *Musca domestica* converges at the level of the terminal regulator *doublesex*. *Dev Genes Evol.* 214, 29-42.
- Hellemans, J., Mortier, G., De Paepe, A., Speleman, F., Vandesompele, J. 2007. qBase relative quantification framework and software for management and automated analysis of real-time quantitative PCR data. *Genome Biol.* 8, R19.
- Herman, R.K. 2005. Introduction to sex determination. *WormBook*, ed. The *C. elegans* Research Community, WormBook, doi/10.1895/wormbook.1.71.1, <http://www.wormbook.org>
- Hiott, A. E., Phelps, R. P. 1993. Effects of initial age and size on sex reversal of *Oreochromis niloticus* fry using methyltestosterone. *Aquaculture*. 112(4):301-308.
- Hodgkin, J. 2002. Exploring the envelope: systematic alteration in the sex-determination system of the nematode *Caenorhabditis elegans*. *Genetics* 162:767-780.
- Hodgkin, J. 1986. Sex determination in the nematode *C.elegans*: analysis of *tra-3* suppressors and characterization of *fem* genes. *Genetics* 114, 15-52.
- Hodgkin, J. 1987. A genetic analysis of the sex-determining gene, *tra-1*, in nematode *Caenorhabditis elegans*. *Genes and Development* 1, 731-745.

- Hodgkin, J.A., Brenner, S. 1977. Mutations causing transformation of sexual phenotype in the nematode *Caenorhabditis elegans*. *Genetics* 86:275–287.
- Hodgkin, J., Zellan, J. D., Albertson, D. G. 1994. Identification of a candidate primary sex determination locus, *fox-1*, on the X chromosome of *Caenorhabditis elegans*. *Development* 120, 3681-3689.
- Humanson, 1972. *Animal Tissue Techniques*. San Francisco, Freeman and Co Company, San Francisco. 661 pp.
- Hamaoka, B. Y., Iii, C. E. D., Geisbrecht, B. V., Leahy, D. J. 2004. Crystal structure of *Caenorhabditis elegans* HER-1 and characterization of the interaction between HER-1 and TRA-2A, *101*(32), 11673–11678.
- Hunter, C.P., Wood, W. B. 1992. Evidence from mosaic analysis of masculinizing gen *her-1* for cell interactions in *C. elegans* sex determination. *Nature* 355, 551-555.
- Itoh, Y., Kampf K., Arnold, P.A. 2009. Disruption of FEM1C-W gen in zebra finch: evolutionary insights on avian ZW genes.
- Jimenez, B. M. L. y Arredondo, F. J. L. 2000b. Manual tecnico para la reversion sexual de Tilapia. Serie Desarrollos Tecnologicos (Eds). Universidad Autonoma Metropolitana, Iztapalapa, DF.35p.
- Jin, S.W., Arno, N., Cohen, A., Shah, A., Xu, Q., Chen, N., Ellis, R.E. 2001a. In *Caenorhabditis elegans*, the RNA-binding domains of the cytoplasmic polyadenylation element binding protein FOG-1 are needed to regulate germ cell fates. *Genetics* 159, 1617–1630.
- Jin, S.W., Kimble, J., Ellis, R.E. 2001b. Regulation of Cell Fate in *Caenorhabditis elegans* by a Novel Cytoplasmic Polyadenylation Element Binding Protein. *Dev. Biol.* 229, 537–553.
- Johnson Lynn Cheryl. 2010. Regulation of germ-line expression of the *Caenorhabditis elegans* gene *fem-1* by maternal transcripts. Thesis of Doctor of Philosophy. University of Toronto.240p.Toron-Canada.
- Kimble, J., Edgar, L., Hirsh, D. 1984. Specification of male development in *Caenorhabditis elegans*: the fem genes. *Dev Biol* 105(1): 234-239.
- Koebernick, K., Pieler, T. 2002. Gli-type zinc finger proteins as bipotential transducers of Hedgehog signaling. *Differentiation* 70, 69–76.
- Kuwabara, P.E., Kimble, J. 1995. A predicted membrane protein, TRA-2a, directs hermaphrodite development in *Caenorhabditis elegans*. *Development* 121, 2995-3004.



- Kuwabara, P.E., Okkema, P.G., Kimble, J. 1992. *tra-2* encodes a membrane protein and may mediate cell communication in *Caenorhabditis elegans* sex determination pathway. *Mol.Biol.Cell.* 3, 461-473.
- Leelatanawit, R., Sittikankeaw, K., Yocawibun, P., Klinbunga, S., Roytrakul, S., Aoki, T., Menasveta, P. 2009. Identification, characterization and expression of sex-related genes in testes of the giant tiger shrimp *Penaeus monodon*. *Comparative biochemistry and physiology. Part A, Molecular & integrative physiology*, 152(1), 66–76. doi:10.1016/j.cbpa.2008.09.004
- Lu, D., Ventura-Holman, T., Li, J., McMurray, R.W., Subauste, J.S., Maher JF. 2005. Abnormal glucose homeostasis and pancreatic islet function in mice with inactivation of the *Fem1b* gene. *Mol Cell Biol.* 25, 6570–6577.
- Luitjens, C., Gallegos, M., Kraemer, B., Kimble, J., Wickens, M. 2000. CPEB proteins control two key steps in spermatogenesis in *C. elegans*. *Genes Dev.* 14, 2596–2609.
- Luz, J. G., Hassig, C. A., Pickle, C., Godzik, A., Meyer, B. J., Wilson, I. A. 2003. XOL-1, primary determinant of sexual fate in *C. elegans*, is a GHMP kinase family member and a structural prototype for a class of developmental regulators. *Genes & Development* 17, 977-990.
- Magallón-Barajas, F. J., Villarreal-Colmenares, H., Arcos-Ortega, F., Avilés-Quevedo, S., Civera-Cerecedo, R., Cruz-Hernández, P., González-Becerril, A., Gracia-López, V., Hernández-Llamas, A., Hernández-López, J., Ibarra-Humphries, A. M., Lechuga-Deveze, C., Mazón-Suástegui, J. M., Muhlia-Melo, A. F., Naranjo-Páramo, J., Pérez-Enríquez, R., Porchas-Cornejo, Portillo-Clark, G., Pérez-Urbiola, J. C. 2007. Orientaciones Estratégicas para el Desarrollo Sustentable de la Acuicultura en México. Publicaciones especiales del Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, S. C. Cámara de Diputados. LX Legislatura.
- Manolakou, P., Lavranos, G., Angelopoulou. 2006. Molecular pattern of sex determination in the animal kingdom: a comparative study of biology of reproduction. *Reproductive Biology and Endocrinology* 4-59.
- Marina, E. D. B., Juan, L., Richards, B., Biológicas, E. D. C., Nacional, U., Rica, C. 2013. Descripción histológica de la ovogénesis y espermatogénesis del camarón de cultivo, *Litopenaeus vannamei*, 48(1988), 335–344.
- Martínez-Córdova, L.R. 2002. Camaronicultura: Avances y tendencias. ADT EDITOR S.A. México. 180pp.
- Martinez-Cordova, L.R. 1994. Camaronicultura: bases técnicas y científicas para el cultivo de camarones peneidos. AGT EDITOR, S.A. México. 233p.

- Maruyama, K. and Sugano, S. 1994. Oligo-capping: a simple method to replace the cap structure of eukaryotic mRNAs with oligoribonucleotides. *Gene* 138:171-174.
- Meyer, B. J. 2005. Introduction to sex determination. WormBook, ed. The *C. elegans* Research Community, WormBook, doi/10.1895/wormbook.1.71.1, <http://www.wormbook.org>
- Mehra, A., Gaudet, J., Heck, L., Kuwabara, P.E., Spence, A.M. 1999. Negative regulation of male development in *Caenorhabditis elegans* by a protein-protein interaction between TRA-2A and FEM-3. *Genes Dev* 13, 1453-1463.
- Mendez, R., Richter, J.D. 2001. Translational control by CPEB: a means to the end. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 2, 521–529.
- Michaely, P., Tomchick, D. R., Machius, M., Anderson, R. G. W. 2002. Crystal structure of a 12 ANK repeat stack from human ankyrinR, 21(23).
- Morales, D.A .1991. La Tilapia en Mexico. Biología, cultivo y pesquerías. A G. T. Editor S. A Mexico, D. F. 190 p
- Mosavi, L. K., Minor, D. L., Jr., Peng, Z. Y. 2002. Consensus-derived structural determinants of the ankyrin repeat motif. *PNAS* 99, 16029-34.
- Mckeown, M., Belote, J.M., Baker, B.S. 1987. A molecular analysis of transformer, a gene in *Drosophila melanogaster* that controls female sexual differentiation. *Cell* 48, 489-499.
- Nagoshi, R.N., Mckeown, N., Belote, K.C., Baker, B.S. 1988. The control of alternative splicing at genes regulating sexual differentiation in *D. melanogaster*. *Cell* 53, 229-236.
- Nicoll, M., Akerib, C. C., Meyer, B. J. 1997. X-chromosome-counting mechanisms that determine nematode sex. *Nature* 388, 200-204.
- Nigon, V. 1951. Polyploidie expérimentale chez un nematode libre, *Rhabditis elegans* Maupas. *Biol. Bull. Fr. et Belg.* 95, 187-225.
- Nunes, F., Aleixo, A., Barchuk, A., Bomtorin, A., Grozinger, C., Simões, Z. 2013. Non-Target Effects of Green Fluorescent Protein (GFP)-Derived Double-Stranded RNA (dsRNA-GFP) Used in Honey Bee RNA Interference (RNAi) Assays. *Insects*, 4(1), 90–103. doi:10.3390/insects4010090.
- Ohbayashi, F., Suzuki, M., Mita, A., Okano, K., Shimada, T. 2001. A homologue of the *Drosophila melanogaster* gene in is transcribed into sex-specific mRNA isoforms in the silkworm, *Bombyx mori*. *Comp. Biochem. Physiol.* 128, 145-158.
- Okkema, P.G., Kimble, J. 1991. Molecular analysis of *tra-2*, a sex determining gene in *C. elegans*. *EMBO J.* 10, 171.176.

- Oyhenart, J., Benichou, S., Raich, N. 2005. Putative Homeodomain Transcription Factor 1 interacts with the Femization Factor Homolog *fem1b* in Male Germ Cells. *Biology of Reproduction* 72, 780-787.
- Pfaffl, M.W., Tichopad, A., Prgomet, C., Neuvians, T.P. 2004. Determination of stable housekeeping genes, differentially regulated target genes and sample integrity: BestKeeper--Excel-based tool using pair-wise correlations. *Biotechnology letters* 26:509-515.
- Pérez-Rostro, C.I., Ibarra A.M. 2003a. Quantitative genetic parameter estimates for size and growth rate traits in Pacific White shrimp, *Penaeus vannamei* (Boone 1931) when reared indoors. *Aquaculture Research* 34, 543-553.
- Pérez-Rostro, C.I., Ramírez J.L., Ibarra. 1999. Maternal and cage effects on genetics parameter estimation for pacific White shrimp *Penaeus vannamei* Boone. *Aquaculture Research* 30, 681-693.
- Perry, M. D., Li, W., Trent, C., Perry, M. D., Li, W., Trent, C., Judith, M. 1993. Molecular characterization of the *her-1* gene suggests a direct role in cell signaling during *Caenorhabditis elegans* sex determination, 216–228. doi:10.1101/gad.7.2.216
- Raviv, S., Parnes, S., Segall, C., Davis, C., Sagi, A. 2006. Complete sequence of *Litopenaeus vannamei* (Crustacea: Decapoda) vitellogenin cDNA and its expression in endocrinologically induced sub-adult females. *General and comparative endocrinology*, 145(1), 39–50. doi:10.1016/j.yggen.2005.06.009
- Rechsteiner, M. 1990. PEST sequences are signals for rapid intracellular proteolysis. *Semin. Cell Biol.*, 1, 433-440.
- Roy, A., Kucukural, A., Zhang, A. 2010. I-TASSER: a unified platform for automated protein structure and function prediction. *Nature Protocols*, vol 5, 725-738.
- Roy, A., Yang, J., Zhang, Y. 2012. COFACTOR: an accurate comparative algorithm for structure-based protein function annotation. *Nucleic Acids Research*, vol 40, W471-W477.
- Rosenquist, T.A, Kimble, J. 1988. Molecular cloning and transcript analysis of *fem-3* , a sex-determination gene in *Caenorhabditis elegans* . *Genes Dev* 2:606–616.
- Rozen, S., Skaletsky, H. J. 2000. [Primer3 on the WWW for general users and for biologist programmers.](http://fokker.wi.mit.edu/primer3/) En: Krawetz S, Misener S (eds) *Bioinformatics Methods and Protocols: Methods in Molecular Biology*. Humana Press, Totowa, NJ, pp 365-386. [Source code available at http://fokker.wi.mit.edu/primer3/.](http://fokker.wi.mit.edu/primer3/)
- SAGARPA. 2011. Anuario Estadístico de Acuicultura y Pesca.
- Sánchez, L. 2008. Sex-determining mechanisms in insects, *Int.J.Dev.Biol.*52: 837-856.

- Salz, K. H., Erickson, W.J. 2010. Sex determination in *Drosophila*. Landes Bioscience. 60-70.
- Saccone, G., Peluso, I., Artiaco, D., Giordano, E., Bopp, D., Polito, L.C. 1998. The *Ceratitis capitata* homologue of the *Drosophila* sex determining gene *Sex-lethal* is structurally conserved, but not sex-specifically regulated. *Development* 125, 1495-1500.
- Sanchez, L. 2008. Sex-determining mechanisms in insects. *Int. J. Dev. Biol.* 52, 837-856.
- Scali, C., Catteruccia, F., Li, Q., Querrero, I. 2005. Identification of sex specific transcripts of the *Anopheles gambiae doublesex* gene. *J.Exp.Biol.* 208, 3701-3709.
- Schauer, I.E., Wood, W. B. 1990. Early *C.elegans* embryos are transcriptionally active. *Development* 110. 1303-1317.
- Schedl, T., Kimble, J. 1988. fog-2, a germ-line-specific sex determination gene required for hermaphrodite spermatogenesis in *Caenorhabditis elegans*. *Genetics* 123, 755-769.
- Sedgwick, S. G., Smerdon, S. J. 1999. The ankyrin repeat : a diversity of interactions on a common structural framework, *0004*(August), 311–316.
- Shaefer, B. 1995. Revolution in rapid amplification of cDNA ends: new strategies for polymerase chain reaction cloning of full-length cDNA ends. *Analytical Biochem.* 227: 225-273.
- Shen, M. M., Abate, C. 2003. Roles of the Nkx3.1 homeobox gene in prostate organogenesis and carcinogenesis. *Dev Dyn* 228,767–778.
- Sherman, D., Frommer, M. 1998. The *Bactrocera tryoni* homologue of the *Drosophila melanogaster* sex determination gene *doublesex* gene. *Insect Mol.Biol.* 7, 355-366.
- Siervert, V., Kuhn, S., Traut, W. 1997. Expression of the sex determination cascade genes *sex-lethal* and *doublesex* in the phorid fly *Megaselia scalaris*. *Genome* 40, 211-214.
- Silver, N., Best, S., Jiang, J., Thein, S.L. 2006. Selection of housekeeping genes for gene expression studies in human reticulocytes using real-time PCR. *BMC molecular biology* 7:33.
- Sifuentes-Romero, I., Merchant-Larios, H., García-Gasca, A. 2010. Gene Expression Patterns Hox gene expression in the embryonic genital system of the sea turtle *Lepidochelys olivacea* ( Eschscholt , 1829 ), a species with temperature-dependent sex determination. *Gene Expression Patterns*, 10(6), 290–298. doi:10.1016/j.gep.2010.06.004

- Skipper, M., Milne, C. A., Hodgkin, J. 1999. Genetic and molecular analysis of *fox-1*, a numerator element involved in *Caenorhabditis elegans* primary sex determination. *Genetics* 15J, 617-631
- Soñanez-Organis, J. G., Racotta, I. S., Yepiz-Plascencia, G. 2010. Silencing of the hypoxia inducible factor 1 –HIF-1- obliterates the effects of hypoxia on glucose and lactate concentrations in a tissue-specific manner in the shrimp *Litopenaeus vannamei*. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 393(1-2), 51–58. doi:10.1016/j.jembe.2010.06.031
- Spence, A. M., Coulson, A., Hodgkin, J. 1990. The product of *fem-1*, a nematode sex-determining gene, contains a motif found in cell cycle control proteins and receptors for cell-cell interactions. *Cell* 60, 981–990.
- Staelens, J., Rombaut, D., Vercauteren, L., Argue, B., Benzie, J., M., Vuylsteke, M. 2008. High-Density Linkage Maps and sex-Linked Markers for the Black Tiger Shrimp (*Penaeus monodon*). *Genetics* 179, 917-925.
- Starostina, G., Lim J. M., Schvarzstein, M., Wells, L., Spence, A.M., Kipreos, E.T. 2007. A CUL-2 ubiquitin ligase containing three FEM proteins degrades TRA-1 to regulate *C.elegans* sex determination. *DevCell*. 13,127-139.
- Sedgwick, S. G., Smerdon, S. J. 1999. The ankyrin repeat : a diversity of interactions on a common structural framework, *0004*(August), 311–316.
- Stothard, P., Pilgrim, D. 2003. Sex-determination gene and pathway evolution in nematodes. *BioEssays* 25,221-231.
- Stothard, P., Hansen D., Pilgrim D. 2002. Evolution of the PP2C family in *Caenorhabditis*: rapid divergence of the sex-determining protein FEM-2. *J Mol Evol*. 54:267-282.
- Tan- Fermín, J.D., Pudadera, R.A. 1989. Ovarian Maturation Stages of the wild giant tiger prawn, *Penaeus monodon* Fabricus. *Aquaculture* 77, 229 – 242.
- Tiu, S.H.K., Chan, S.M. 2007. The use of recombinant protein and RNA interference approaches to study the reproductive functions of a gonad-stimulating hormone from the shrimp *Metapenaeus ensis*. *FEBS J*. 274, 4385–4395.
- Trent, C., Purnell, B., Gavinski, S., Hageman, J., Chamberlin, C., Wood, W.B. 1991. Sex-specific transcriptional regulation of the *C.elegans* sex determining gen *her-1*. *Mech.Dev*. 34, 43-56.
- Tschuch, C., Schulz, A., Pscherer, A., Werft, W., Benner, A., Hotz-Wagenblatt, A., Mertens, D. 2008. Off-target effects of siRNA specific for GFP. *BMC molecular biology*, 9, 60. doi:10.1186/1471-2199-9-60

- Vandesompele, J., Preter, K.D., Pattyn, F., Poppe, B., Roy, N.V., Paepe, A.D., Speleman, F., 2002. Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. *Genome Biol.* 3, 1-12.
- Ventura-Holman, T., Maher, J. F. 2000. Sequence, organization, and expression of the human FEM1B gene. *Biochemical and biophysical research communications*, 267(1), 317–20. doi:10.1006/bbrc.1999.1942.
- Ventura-Holman, T., Seldin, M.F., Li, W., Maher, J.F.1998. The murine fem1 gene family: homologs of the *Caenorhabditis elegans* sex-determination protein FEM-1. *Genomics* 54:221–230.
- Verhulst, C.E, Zande, L.V, Beukeboom, W.L. 2010. Insect sex determination: it is all involves around transformer. *Genetics & Development*, 20:376-383.
- Wang, S., Kimble, J. 2001. The TRA-1 transcription factor binds TRA-2 to regulate sexual fates in *Caenorhabditis elegans*. *The EMBO journal*, 20(6), 1363–72. doi:10.1093/emboj/20.6.1363
- Wang, X., Desai N., Hu P.Y., Price, M.S, Shen, A.C., Shen, M.M. 2008. Mouse *Fem1b* interacts with the Nkx3.1 Homeoprotein and is required for proper male secondary sexual development.*Dev Dyn* 237(10), 2963-2972.
- Ye, Y., Godzik, A. 2004. FATCAT: a web server for flexible structure comparison and structure similarity searching. *Nucleic Acid Research*, 32:W582-585
- Zhang, B., Gallegos, M., Puoti, A., Durkin, E., Fields, S., Kimble, J., Wickens, M. P. 1997. A conserved RNA-binding protein that regulates sexual fates in the *C. elegans* hermaphrodite germline. *Nature* 390, 477-84
- Zhang, J. Skolnick, *TM-align: A protein structure alignment algorithm based on TM-score* , *Nucleic Acids Research*, 2005 33: 2302-2309
- Zhang, L., Yang, C., Zhang, Y., Li, L., Zhang. 2006. A genetic linkage map of Pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei*): sex-linked microsatellite markers and high recombination rates. *Genetica* 131, 37-49.
- Zhang, Y. 2008. I-TASSER server for protein 3D structure prediction. *BMC Bioinformatics*, 9:40.

## **12. ANEXOS**

### **ANEXO I**

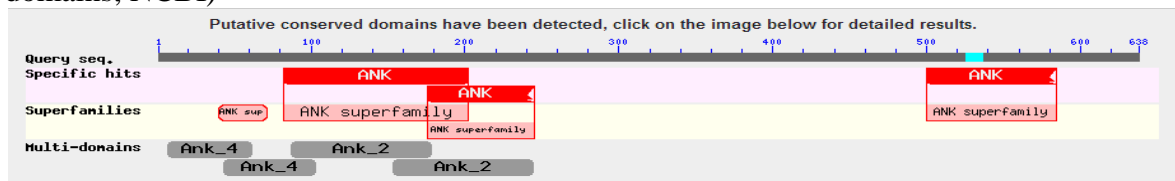
#### **SECUENCIAS AISLADAS EN ESTE TRABAJO**

Secuencia completa de ADNc traducida caracterizada por RACE y depositada en la base de datos pública GenBank-NCBI

LOCUS SEQ1 3778 bp mRNA linear INV 22-AUG-2013  
DEFINITION [Litopenaeus vannamei] fem-1 mRNA, Complete cds.  
ACCESSION SEQ1  
VERSION  
KEYWORDS .  
SOURCE Litopenaeus vannamei (Pacific white shrimp)  
ORGANISM Litopenaeus vannamei  
Eukaryota; Metazoa; Ecdysozoa; Arthropoda; Crustacea; Malacostraca;  
Eumalacostraca; Eucarida; Decapoda; Dendrobranchiata; Penaeoidea;  
Penaeidae; Litopenaeus.  
REFERENCE 1 (bases 1 to 3778)  
AUTHORS Galindo Torres,P.E., Galindo Sanchez,C.E., Llera Herrera,R.A.,  
Gomez Anduro,G.A., Arcos Ortega,G.F. and Ibarra,A.M.  
TITLE Characterization and localization of the fem-1 gene in Litopenaeus  
vannamei  
JOURNAL Unpublished  
REFERENCE 2 (bases 1 to 3778)  
AUTHORS Galindo Torres,P.E., Galindo Sanchez,C.E., Llera Herrera,R.A.,  
Gomez Anduro,G.A., Arcos Ortega,G.F. and Ibarra,A.M.  
TITLE Direct Submission  
JOURNAL Submitted (22-AUG-2013) Laboratorio de Genetica y Mejoramiento  
Animal Acuicola, Centro de Investigaciones Biologicas del Noroeste,  
S.C., Instituto Politecnico Nacional 195, Playa Palo de Santa Rita  
Sur, Baja California Sur, La Paz 23096, Mexico  
COMMENT Bankit Comment: ALT EMAIL:pgalindo@cibnor.mx.  
Bankit Comment: TOTAL # OF SEQS:1.  
  
##Assembly-Data-START##  
Sequencing Technology :: Sanger dideoxy sequencing  
##Assembly-Data-END##  
FEATURES Location/Qualifiers  
source 1..3778  
/organism="Litopenaeus vannamei"  
/mol\_type="mRNA"  
/db\_xref="taxon:6689"  
/tissue\_type="Gonad"  
CDS 89..2005  
/codon\_start=1  
/product="FEM-1"  
/translation="MEFKNGVFNAARDGNLRLKMLLDHRSRSEVARMVSARTNGATP  
LVMASKNGHLSCEVEYLVERCNADLEQVGSVVFDEGETIDGAPPLWCAAAAAGHLDVVSYL  
LGKAANVNATTKTNSTPLRAACFDGHFDIVKYLVEHNADIEVANRHGHTCLMIARYKG  
HFDIAKYLIDIAANVNRKSVKGNTALHDCAESGSLEIMKLLLDHCAKMDVDSYGMTPL  
LAASVTGHTHIVEYLISRSDLVSRKDKIDALELLGATYVDKRDMLGALRFWKAMSE  
RYEYDLMIYPKPVQOSPAAAYENSVEVMTMQQLDEIISDPDEMERMQUALVRERILGPA  
HPDTSYYIRYRGAVYADTGNFDRCLTLWYALDMQQKILEPLSPMTQSSSFVSTELFS  
FMMSEAKNRGRVPVNFCDMMRVFEKCMREVEVGMSQLSKVNNSGCGTVLANGGERD  
TTYFHRTLVIITMHLVCLLTKLGPGLTALQRHTMRKAVYHLVRMDPRGTGGVTPHLAC  
SRDSSATVGRFPICTFPSLEVVSLLLEVGADPCATDQQGNTPLHTLASNKQCRRELLT  
SLLAAGAHLDTLNGSGQSFASLRASRGQRLSQLINPLHYTSLQCLAATIRRHGLHYS  
TVLHPRLSKFVDQH"  
BASE COUNT 1039 a 763 c 806 g 1170 t



## Detección de dominios conservados para la traducción conceptual de *fem-1* (Conserved domains; NCBI)



### Secuencias proteicas de *fem-1* aisladas por tejido y sexo

>3778 pb (Gónada macho y hembra, embrión y pedúnculo de hembra juvenil)

```
MEFKNGVFNAARDGNLRRLLKMLLDHRSRSEVARMVSAARTNGATPLVMASKNGHLSCVEYLVERCNADLEQV
GSVVFDEGTIDGAPPLWCAAAAAGHLDDVVSYLLGKAANVNATTKTNSTPLRAACFDGHFDIVKYLVEHNADIEV
ANRHGHTCLMIARYKGFHDIAYLIDIAANVNRKSVKNTALHDCAESGSLEIMKLLLDHCAKMDVDSYGMP
LLAASVTGHTHIVEYLSRSDLVSRKDKIDALELLGATYVDKKRDMGLALRFWKMMAMSERYEYDLMIYPKPVQ
QSPIAAAYENSVEVMTMQQLDEIISDPDEMARMQALLVRERILGPAHPDTSYYIRYRGAVYADTGNFDR
CITLWMYALDMQKILEPLSPMTQSSFVSTFELFSFMMSEAKNRGRRVPVNFCDMMRVFEKCMREVEV
GMSQLSKVNNSSGCGTVLANGGERDTTYFHRTLVTMHLVCLLTKLGPGLTALQRHTMRKAVYHLVRMD
PRGTGGVTPHLACSRDSSATVGRFPICTFPSLEVVSLLLEVADPCATDQQGNTPLHTLASNKQCRRELL
TSLLAAGAHLDLTLNGSGQSFASLRASRGQRLSQLINPLHYTSLQCLAAATIRRHGLHYSTVLPRLSKFVDQH
```

>3016 pb (Gónada macho)

```
MTMQQLDEIISDPDEMARMQALLVRERILGPAHPDTSYYIRYRGAVYADTGNFDR
CITLWMYALDMQKILEPLSPMTQSSFVSTFELFSFMMSEAKNRGRRVPVNFCDMMRVFEKCMREVEV
GMSQLSKVNNSSGCGTVLANGGERDTTYFHRTLVTMHLVCLLTKLGPGLTALQRHTMRKAVYHLVRMD
PRGTGGVTPHLACSRDSSATVGRFPICTFPSLEVVSLLLEVADPCATDQQGNTPLHTLASNKQCRRELL
TSLLAAGAHLDLTLNGSGQSFASLRASRGQRLSQLINPLHYTSLQCLAAATIRRHGLHYSTVLPRLSKFVDQH
```

>2900 pb (Gónada macho, embrión, pedúnculo de hembra juvenil)

```
MAMSERYEYDLMIYPKPVQSPPIAAAYENSVEVMTMQQLDEIISDPDEMARMQALLVRERILGPAHPDTSYYIRYR
GAVYADTGNFDR
CITLWMYALDMQKILEPLSPMTQSSFVSTFELFSFMMSEAKNRGRRVPVNFCDMMRVFEKCMREVEV
GMSQLSKVNNSSGCGTVLANGGERDTTYFHRTLVTMHLVCLLTKLGPGLTALQRHTMRKAVYHLVRMD
PRGTGGVTPHLACSRDSSATVGRFPICTFPSLEVVSLLLEVADPCATDQQGNTPLHTLASNKQCRRELL
TSLLAAGAHLDLTLNGSGQSFASLRASRGQRLSQLINPLHYTSLQCLAAATIRRHGLHYSTVLPRLSKFVDQH
```

>3072 pb (Gónada de hembra)

```
MTPLLAASVTGHTHIVEYLSRSDLVSRKDKIDALELLGATYVDKKRDMGLALRFWKMMAMSERYEYDLMIYPK
PVQQSPIAAAYENSVEVMTMQQLDEIISDPDEMARMQALLVRERILGPAHPDTSYYIRYRGAVYADTGNFDR
CITLWMYALDMQKILEPLSPMTQSSFVSTFELFSFMMSEAKNRGRRVPVNFCDMMRVFEKCMREVEV
GMSQLSKVNNSSGCGTVLANGGERDTTYFHRTLVTMHLVCLLTKLGPGLTALQRHTMRKAVYHLVRMD
PRGTGGVTPHLACSRDSSATVGRFPICTFPSLEVVSLLLEVADPCATDQQGNTPLHTLASNKQCRRELL
TSLLAAGAHLDLTLNGSGQSFASLRASRGQRLSQLINPLHYTSLQCLAAATIRRHGLHYSTVLPRLSKFVDQH
```

>2446 pb (Muestras en distintos tiempos del desarrollo embrionario)

MREVEVGMSQLSKVNNSGCGTVLANGGERDTTYFHRTLVTMHLVCLLTKLGPGLTALQRHTMRKAVYHLVR  
MDPRGTGGVTPLHLACSRDSSATVGRFPICTFPSLEVVSLLLEVADPCATDQQGNTPLHTLASNKQCRRELLTS  
LLAAGAHLDLNGSGQSFASLRASRGQRSLINPLHYTSLQCLAAATIRRHGLHYSTVLHPRLSKFVDQH

## ANEXO II

### DESCRIPCIÓN DE PROTOCOLOS

#### (A) Extracción de ARN

1. Pesar 100mg de perlas de cristal (SIGMA Glass beads, acid washed, 425-600  $\mu\text{m}$ ) y colocarlo en un tubo Eppendorf.
2. Agregar 1 mL de TriPure Isolation Reagent (fenol guanidina tiocinato).
3. Maniobrar las muestras para evitar degradación mientras se pesa. Pesar no más de 100 mg de gónada y colocar el tejido en el tubo eppendorf con perlas de cristal y TriPure. Mantener en hielo las muestras previamente pesadas.
4. Homogenizar el tejido en el equipo FastPrep®-24 durante 40 segundos a una velocidad de 6 m/s. En caso de quedar tejido homogenizar nuevamente. Mantener en hielo las muestras.
5. Centrifugar las muestras 14,000 rcf por 5 min a 4<sup>0</sup>C. Mantener en hielo.
6. Transferir la fase superior a un nuevo tubo eppendorf evitando la matriz (perlitas) y el tejido restante (recuperar aproximadamente 850  $\mu\text{L}$ ).
7. Incubar las muestras 5 min a temperatura ambiente.
8. Agregar 300  $\mu\text{L}$  de cloroformo y 10 s en el vortex.
9. Incubar 5 min a temperatura ambiente.
10. Centrifugar a 14,000 rcf por 5 min a 4<sup>0</sup>C.
11. Transferir la fase acuosa (aproximadamente 450  $\mu\text{L}$ ) a un tubo de 1.5 mL cuidando de no tomar la fase intermedia.
12. Agregar 500  $\mu\text{L}$  de etanol al 100% y mezclar por inversión 5 veces.
13. Incubar 30 min a -20°C.
14. Centrifugar 14,000 rpm por 15 min a 4<sup>0</sup>C.
15. Lavar el pellet de ARN con 500  $\mu\text{L}$  de etanol al 75% (para hacer 100 mL: 75 mL de etanol absoluto y 25 mL de agua DEPC (Dietilpirocarbonato)).
16. Incubar en hielo por 10 minutos.
17. Centrifugar a 14,000 rcf por 5 min a 4<sup>0</sup>C y descartar el sobrenadante.
18. Repetir el lavado del pellet con etanol al 75%, incubar en hielo por 10 min., centrifugar a 14,000 rcf por 5 min a 4<sup>0</sup>C.
19. Descartar el sobrenadante y secar el pellet a temperatura ambiente hasta que se evapora todo el etanol.
20. Resuspender el ARN en agua DEPC (el volumen dependerá del tamaño del pellet).
21. Cuantificar el ARN total en un NANODROP.

#### (B) Tratamiento con DNAsa

1. Tomar 5  $\mu\text{L}$  (1  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ ) de ARN y agregar:

RQ DNAsa	5 $\mu\text{L}$
RQI Buffer de reacción 10x	1.5 $\mu\text{L}$
H <sub>2</sub> O libre de nucleasas	3.5 $\mu\text{L}$

2. Incubar a 37°C por 30 min.
3. Agregar 1  $\mu\text{L}$  de RQI DNAsa STOP.
4. Incubar a 65°C por 10 min. Colocar en hielo hasta la siguiente reacción o almacenar a -20°C.

**(C) Síntesis de cDNA**

1. En caso de que las muestras de ARN libre de ADNg fueran almacenadas a -20°C, descongelarlas en hielo.
2. Cuantificar la concentración de ARN en NANODROP.
3. Realizar la combinación del ARN con oligo (dT)<sub>15</sub>:

**CONTROL (+)**

ARN (1 µg)	2 µL
Oligo (dT) <sub>15</sub> (0.5 µg/rx)	1 µL
H <sub>2</sub> O libre de nucleasas	2 µL
<i>Total</i>	<i>5 µL</i>

**CONTROL (-) A (sin template)**

Oligo (dT) <sub>15</sub>	1 µL
H <sub>2</sub> O nucleasa free	4 µL
<i>Total</i>	<i>5 µL</i>

**REACCIÓN CON ARN**

Oligo (dT) <sub>15</sub> (0.5 µg/rx)	1 µL
ARN libre de ADNg (mínimo 1 µg/rx)	5 µL
<i>Total</i>	<i>6 µL</i>

4. Incubar a 70°C por 5 minutos.
5. Colocar inmediatamente en hielo 5 min. y centrifugar 10 s (para colectar lo condensado).
6. Colocar los tubos en hielo hasta la siguiente reacción.
7. Preparar las siguientes mezclas (en hielo): realizar los cálculos para el número de reacciones.

**REACCIÓN CON ARN (1 Rx)**

H <sub>2</sub> O libre de nucleasas	5 µL
Im Prom II 5x buffer	4 µL
MgCl <sub>2</sub> (concentración final 6 mM)	2 µL
dNTP Mix	1 µL
RNAsin (inhibidor de ribonucleasas)	1 µL
Improm II Transcriptasa Reversa	1 µL
<i>Total</i>	<i>14 µL</i>

**CONTROL (-) sin enzima**

H <sub>2</sub> O libre de nucleasas	6 µL
Im Prom II 5x buffer	4 µL
MgCl <sub>2</sub> (concentración final 6 mM)	2 µL
dNTP Mix (concentración final 0.5 mM/dNTP)	1 µL
RNAsin (inhibidor de ribonucleasas)	1 µL
<i>Total</i>	<i>14 µL</i>

8. Agregar 14 µL de la mezcla al ARN con oligo (dT)<sub>15</sub> 0.5 µg/µL para obtener un volumen final de 20 µL.
9. Calentar la mezcla de reacción 25°C por 10 min para realizar el alineamiento; para la extensión 42°C por 60 min; y 70°C por 15 min para la inactivación de la enzima.
10. Centrifugar y almacenar el ADNc a -20°C.

**(D) Paraformaldehido 4%**

1. Calentar a 60°C 450ml de H<sub>2</sub>O DEPC.
2. Disolver 20gr de paraformaldehido en H<sub>2</sub>O DEPC caliente, cubrir y mantener a 60°C en agitación (No permitir que suba a más de 70°C).
3. Adicionar 1 gota de NaOH 2N por cada 100ml (la solución aclarará en unos minutos).
4. Remover del calor y adicionar 50 ml de PBS 10X
5. Ajustar el pH a 7.2 adicionando HCl. El volumen final deberá ser de 500 ml.
6. Filtrar y colocar en hielo. Manteniendo protegido de la luz.
7. Usar inmediatamente o almacenar a -20°C hasta su uso.

**(E) Técnica histológica****Agua DEPC (1L)**

- 1 L de agua destilada
- 1 mL de DEPC
- Esterilizar 24 h

**Solución Davidson modificada (1L)**

- 500 mL de agua DEPC
- 300 mL de formol (formaldehido al 40% -Carlo Erba-4156829)
- 150 mL de etanol absoluto (VWRM 20.820.564)
- 50 mL de ácido acético glacial (Carlo Erba-401422)

**Etanol 70% (1L)**

- 700 mL de etanol absoluto
- 300 mL de agua DEPC

**Inclusión en parafina**

La inclusión en parafina se realiza con la ayuda de un aparato de inclusión (histokinette) programable, en las siguientes soluciones:

Etanol 80% .....1h  
 Etanol 95% .....2h  
 Etanol 95% .....2h  
 Etanol 95% .....1h  
 Etanol 100% .....2h  
 Etanol 100% .....2h  
 Etanol 100% .....1h  
 Xilol (Claral)...1h  
 Xilol (Claral)...2h  
 Parafina.....2h  
 Parafina.....2h  
 Tiempo total:18h

**(F) Eva green IX**

Buffer 5x	3 $\mu$ L
MgCl <sub>2</sub> 25mM	1.5 $\mu$ L
dNTP	0.3 $\mu$ L
Taq (Promega)	0.09 $\mu$ L
EvaGreen 20x	0.75 $\mu$ L
H <sub>2</sub> O	1.86 $\mu$ L
<i>Total</i>	<i>7.5 <math>\mu</math>L</i>

**(G) Minipreps**

1. Transferir 1.5 ml de cultivo bacteriano a un tubo eppendorf.
2. Centrifugar 1 min a máxima velocidad y eliminar el sobrenadante totalmente.
3. Agregar 100  $\mu$ L de *Cell resuspension solution* (50 mM Tris-HCL pH 8.0; 10 mM de EDTA pH 8.0; 80  $\mu$ g de RNAsa) y resuspender el pellet.
4. Agregar 100  $\mu$ L de buffer de lisis 200mM NaOH y SDS 1% (preparar en el momento a partir de soluciones 400Mm NaOH y SDS 2%; medio volumen de cada una).
5. Agregar 120  $\mu$ L de buffer de neutralización (Acetato de potasio 3M pH 5.5; ajustar pH con ácido acético) y mezclar por 3 min.
6. Centrifugar por 1 min a máxima velocidad y transferir sobrenadante a un tubo nuevo.
7. Agregar 200  $\mu$ L de isopropanol y mezclar.
8. Centrifugar 1 min a máxima velocidad y descartar sobrenadante.
9. Agregar 50 $\mu$ L de etanol al 70%.
10. Centrifugar por 1 min a máxima velocidad y descartar sobrenadante, volver a centrifugar y eliminar sobrenadante con punta.
11. Agregar 25 $\mu$ L de H<sub>2</sub>O estéril y resuspender el pellet.
12. Realizar digestión enzimática.

**(H) Transformación de ligación con pGEM-T Easy vector y selección de colonias.**

1. Preparar 1 día antes cajas Petri con medio LB-Agar con ampicilina y almacenarlas a 4°C (25 g de LB y 15 g de Agar para 1L; 2.4  $\mu$ L de ampicilina por 1 ml de Lb; 20 ml por caja).
2. Poner las cajas a 37°C al iniciar la transformación.
3. Descongelar las bacterias en hielo.
4. Mezclar 5  $\mu$ L de ligación en 50  $\mu$ L de bacterias.
5. Incubar en hielo por 30 min.
6. Dar choque térmico a 41°C por 20 s.
7. Poner inmediatamente en hielo por 2 min.
8. Incubar en 200  $\mu$ L de medio SOC.
9. Incubar a 37°C con agitación por 2 h.
10. Inocular dos cajas Petri, a las cuales previamente se les agrego 40  $\mu$ L de X-Gal y 7  $\mu$ L de IPTG: caja 1 con 50  $\mu$ L y caja 2, con el sobrante 150  $\mu$ L.
11. Incubar 18 horas a 37°C.

**Selección de colonias**

1. Preparar LB con ampicilina (200  $\mu$ L por cada 200 ml de LB)
2. Distribuir en tubos 2ml de LB-ampicilina por cada tubo.
3. Levantar colonias positivas (Blancas) mas aisladas con un palillo de madera y colocarlo dentro del tubo.
4. Marcar las colonias seleccionada en caja Petri.

5. Incubar a 37°C con agitación a 240 rpm toda la noche.

### (I) Marcaje de sonda de hibridación

1. Partir 1µg del fragmento lineal en un volumen final de 13 µL para cada sonda y poner en hielo.
2. Preparar las siguientes reacciones:

	<b>SP6 (Apa I) (antisentido)</b>	<b>T7 (pst I) (sentido)</b>
10X NTP lab mix (7)	2µL	2µL
10X transcription buffer	2µL	2µL
RNase inhibidor (10)	1µL	1µL
RNapol SP6 (11)	2µL	-
RNapol T7 (12)	-	2µL
TOTAL	7µL	7µL

1. Mezclar paso 1 con 2 y centrifugar brevemente.
2. Incubar por 2 h a 37°C
3. Agregar 2µL de DNAsa I e incubar 15 min a temperatura ambiente.
4. Agregar 2µL de EDTA 0.2M, pH 8.0 para detener la reacción.
5. Almacenar a -20°C.

### (J) Preparación de laminillas con Poly L-Lisina (SIGMA)

1. Enjuagar las laminillas con H<sub>2</sub>O MilliQ.
2. Sumergir por completo las laminas en la solución de lavado por 30 min (Sacar y sumergir varias veces)

<b>Solución de lavado para 30 laminillas</b>	
	NaOH 33g
	H <sub>2</sub> O MilliQ 133 ml
Etanol 95%	200ml

1. Enjuagar las laminillas con H<sub>2</sub>O en repetidas ocasiones.
2. Sumergir por completo las laminillas en solución de Poly-L-lisina por 30 min (Secando previamente el H<sub>2</sub>O de las laminillas).

<b>Solución de poly-L-lisina</b>	
	H <sub>2</sub> O MilliQ 250ml
	PBS IX (filtrado) 35 ml
	Poly-L-lisina 60ml

Nota: La Poly-L-lisina se agrega hasta el momento que se va a utilizar la solución.

3. Enjuagar las laminillas con H<sub>2</sub>O una vez para quitar el excedente.
4. Enjuagar las laminillas con Etanol al 100% una vez.
5. Poner a seca en horno o estufa a 50°C toda la noche y almacenar no más de 14 días antes de su uso.

**(K) Hibridación *in situ***

1. Desparafinar e hidratar las laminillas
  - Xilol 1- 10min
  - Xilol 2- 10min
  - Etanol 100%- 5min
  - Etanol 95% - 5min
  - Etanol 80% - 5min
  - Etanol 50% - 5min
  - H<sub>2</sub>O DEPC - 5min
  - PBS DEPC - 5min
2. Drenar el líquido y colocar en cámara húmeda (Humedecer con SSC 2x).
3. Agregar 100 µL de proteína K (10 µg/ml) en PBS a cada laminilla y cubrir con parafilm.
4. Incubar 15min a 37°C.
5. Lavar en PBS 1X durante 5 min a temperatura ambiente.
6. Colocar las laminillas en paraformaldehído al 4% en PBS durante 20 min a temperatura ambiente.
7. Lavar en PBS 1X nuevo por 5 min, dos veces.
8. Lavar en H<sub>2</sub>O y deshidratar las laminillas.
  - H<sub>2</sub>O DEPC - 5 min
  - Etanol 50% - 5 min
  - Etanol 80% - 5 min
  - Etanol 95% - 5 min
  - Etanol 100%- 5 min (2)
9. Dejar secar al aire libre durante 20 min.
10. Agregar ~65 µL de solución de hibridación en un tubo estéril por cada laminilla a hibridar (1 tubo para sonda sentido y uno para sonda antisentido)
11. Adicional 5 µL de cada sonda en cada tubo (T7= antisentido y SP6=sentido) y mezclar pipeteando varias ocasiones.
12. Agregar 70 µL del mix de sonda a cada laminilla debidamente marcada y cubrir con parafilm.
13. Incubar 12 hrs a 42°C en cámara húmeda con SSC 2x.

**(L) Lavados post-hibridación y detección**

1. Lavar 2 veces con buffer de lavado 1 (SSC 2x/0.1 SDS) por 5 min a temperatura ambiente.
2. Lavar 2 veces con buffer de lavado 2 (SSC 0.5x/0.1 SDS) a 42°C por 5 min a temperatura ambiente.
3. Lavar 2 veces con buffer de lavado 3 (buffer ácido maleico/Tween 20 0.3%) por 5 min a temperatura ambiente.
4. Drenar el líquido de las laminillas y colocarlas en cámara humedecida con SSC 2X.
5. Añadir 100 µL de *Blocking solution* 1x y cubrir con parafilm.
6. Incubar 30 min a temperatura ambiente.
7. Drenar el líquido y añadir 100 µL de solución anti-dig 1:100 (1 µL de anti-dig diluido en 99 µL de *blocking solution* 1x) y cubrir con parafilm.
8. Incubar 30 min a temperatura ambiente.
9. Lavar 2 veces en buffer de lavado 3 por 5 min.
10. Drenar el líquido de las laminillas y colocarlas en cámara húmeda.
11. Equilibrar con 100 µL de buffer de detección (Tris-HCL, pH, 9.5) e incubar por 10 min a temperatura ambiente.
12. Preparar solución de revelado: 3 µL/BCIP en 150 µL de buffer de detección y mezclar.
13. Drenar las laminillas y colocarlas en cámara húmeda
14. Agregar 150 µL de la solución de revelado a cada laminilla
15. Incubar por 15 min en oscuridad.
16. Enjuagar las laminillas con H<sub>2</sub>O MilliQ 2 veces.
17. Teñir las laminillas por 2 min con café de Bismark.



18. Sumergir 10 veces las laminillas en etanol al 70% (4 diferentes soluciones)
19. Sumergir 10 veces las laminillas en etanol al 90% (4 diferentes soluciones)
20. Sumergir 10 veces las laminillas en etanol al 100% (4 diferentes soluciones)
21. Sumergir 10 veces las laminillas en xilol (3 diferentes soluciones)
22. Montar.