



Universidad Austral de Chile

Facultad de Ciencias

Profesor Patrocinante
Dra. Gudrun Kausel
Instituto de Bioquímica
Facultad de Ciencias

**CARACTERIZACIÓN DE LOS FACTORES DE TRANSCRIPCIÓN
PTX2 Y RPX DE *Cyprinus carpio***

Tesis de Grado presentada como parte
de los requisitos para optar al grado de
Licenciado en Bioquímica y Título
Profesional de ***Bioquímico***

TAMARA SCARLETT VERA SEPÚLVEDA

VALDIVIA – CHILE

2007

INDICE DE CONTENIDOS

1. RESUMEN	1
SUMMARY	2
2. INTRODUCCIÓN	3
3. MATERIALES Y MÉTODOS	15
3.1 Materiales	15
3.1.1 Reactivos	15
3.1.2 Soluciones	16
3.1.3 Instrumentos utilizados	19
3.1.4 Animales de experimentación	20
3.2 Métodos	21
3.2.1 Extracción de hipófisis	21
3.2.2 Extracción y caracterización de ácidos nucleicos	21
3.2.2.1 Extracción de RNA total de hipófisis	21
3.2.2.2 Extracción de DNA genómico desde células sanguíneas	22
3.2.2.3 Extracción de DNA plasmidial a pequeña escala	24
3.2.2.4 Cuantificación de ácidos nucleicos	25
3.2.2.5 Fraccionamiento de RNA en gel de agarosa en condiciones denatürantes	25
3.2.2.6 Fraccionamiento de DNA en geles de agarosa	26
3.2.2.7 Digestión de DNA plasmidial	26
3.2.3 Preparación de cDNA	27

3.2.3.1	Tratamiento de RNA total con DNAsa libre de RNAsa	27
3.2.3.2	Síntesis de cDNA	27
3.2.4	Reacción en cadena de la polimerasa	28
3.2.5	5`RACE utilizando el RLM-RACE kit	28
3.2.6	Clonamiento de productos de PCR	30
3.2.6.1	Reacción de ligación del producto de PCR en un vector de DNA plasmidial	30
3.2.6.2	Preparación de células competentes JM109	30
3.2.6.3	Transformación de células competentes	31
3.2.6.4	Preparación de un stock de un cultivo bacteriano	32
3.2.7.	Análisis por hibridación <i>in situ</i>	33
3.2.7.1	Gelatinización de porta objetos	33
3.2.7.2	Preparación de cortes histológicos	33
3.2.7.3	Marcaje de oligonucleótidos para la hibridación <i>in situ</i>	34
3.2.7.4	Hibridación <i>in situ</i>	34
3.2.7.5	Análisis semicuantitativos de imágenes digitales	36
3.2.8	Análisis por Southern blot	36
3.2.8.1	Digestión de DNA genómico con enzimas de restricción	36
3.2.8.2	Fraccionamiento en gel de agarosa	37
3.2.8.3	Transferencia a una membrana de nitrocelulosa	37
3.2.8.4	Purificación de fragmentos de DNA desde geles de agarosa	39
3.2.8.5	Marcaje radiactivo de un fragmento de DNA, por el método de	40

Partidores aleatorios	
3.2.8.6 Medición de la incorporación de radiactividad en la sonda	41
3.2.8.7 Hibridación con una sonda radiactiva	41
3.2.9 Análisis de secuencias con programas de libre acceso	43
4. RESULTADOS	44
4.1 Ptx2 de <i>Cyprinus carpio</i>	44
4.1.1 Secuencias de Ptx2 de <i>C. carpio</i> y análisis comparativo con <i>D. rerio</i>	44
4.1.2 Detección de transcritos Ptx2 en hipófisis de <i>C. carpio</i>	68
4.1.3 Caracterización de secuencias genómicas de Pitx2 de <i>Cyprinus carpio</i> por análisis de Southern Blot	71
4.2 Rpx de <i>Cyprinus carpio</i>	74
4.2.1 Secuencias de Rpx de <i>Cyprinus carpio</i> y análisis comparativo con <i>Danio rerio</i>	74
4.2.2 Detección de transcritos Rpx en hipófisis de <i>Cyprinus carpio</i>	90
5. DISCUSIÓN	93
6. BIBLIOGRAFÍA	101
7. ANEXOS	110
7.1 Secuencia nucleotídica del clon número 7 de Ptx2 de <i>C. carpio</i> .	110
7.2 Secuencia nucleotídica del clon numero 28 de Ptx2 de <i>C. carpio</i> , correspondiente a la región 3`codificante.	110
7.3 Secuencia nucleotídica del clon número 38 de Ptx2 de <i>C. carpio</i> , ubicada al extremo 3`del cDNA, incluyendo la región no codificante.	111
7.4 Secuencia nucleotídica del clon número 14 de Rpx de <i>C. carpio</i>	111

7.5 Secuencia nucleotídica del clon número 46 de Rpx de <i>C. carpio</i>	111
correspondiente a la región 5`del cDNA, incluyendo la región no codificante.	
7.6 Secuencia nucleotídica del clon número 49 de Rpx de <i>C. carpio</i>	112
correspondiente a la región 5`del cDNA, incluyendo la región no codificante.	
7.7 Secuencia nucleotídica del clon número 50 de Rpx de <i>C. carpio</i>	112
correspondiente a la región 5`del cDNA, incluyendo la región no codificante.	
7.8 Secuencia nucleotídica del clon número 60 de Rpx de <i>C. carpio</i> ,	112
correspondiente a la región 3` codificante del cDNA	
7.9 Secuencia nucleotídica del clon número 63 de Rpx de <i>C. carpio</i> ,	113
correspondiente a la región 3` codificante del cDNA	
7.10 Secuencia nucleotídica del clon número 64 de Rpx de <i>C. carpio</i> ,	113
correspondiente a la región 3` codificante del cDNA	

INDICE DE FIGURAS

FIGURA 1: Esquema del desarrollo de la pituitaria en mamíferos	7
FIGURA 2: Alineamiento de secuencias en la región codificante de cDNA de distintas isoformas Ptx2	48
FIGURA 3: Esquema del diseño de oligonucleótidos para amplificar secuencias Ptx2	50
FIGURA 4: Ptx2 de <i>C. carpio</i> amplificado de cDNA de hipófisis en geles agarosa	52
FIGURA 5: Amplificación del extremo 3'-cDNA Ptx2 de <i>C. carpio</i>	53
FIGURA 6: Análisis de productos 3'-cDNA de Ptx2 de <i>C. carpio</i> en geles de agarosa	54
FIGURA 7: Secuencia genómica de Ptx2 de <i>Danio rerio</i>	56
FIGURA 8: Esquema de la organización genómica de Ptx2 humano y zebrafish	61
FIGURA 9: Secuencias Ptx2 de <i>C. carpio</i> comparadas con <i>D. rerio</i>	63
FIGURA 10: Secuencias de cDNA y aminoacídicas derivadas de Ptx2 de <i>C. carpio</i>	65
FIGURA 11: Alineamiento de secuencias aminoacídicas derivadas de cDNA Ptx2 de mamíferos y de peces	67
FIGURA 12: Análisis de la expresión de Ptx2 por hibridación <i>in situ</i>	69
FIGURA 13: Amplificación y purificación del fragmento 441 pb para preparar sonda Pitx2 específica	72
FIGURA 14: Análisis de Southern Blot de Pitx2 en DNA genómico de <i>C. carpio</i>	73
FIGURA 15: Esquema del diseño de oligonucleótidos para amplificar secuencias Rpx de <i>C. carpio</i>	76
FIGURA 16: Productos de amplificación Rpx de <i>C. carpio</i>	77
FIGURA 17: Secuencia genómica de Rpx de <i>Danio rerio</i> .	79

FIGURA 18: Alineamiento de secuencias cDNA Rpx de <i>Danio rerio</i>	83
FIGURA 19: Secuencias Rpx de <i>Cyprinus carpio</i> comparadas con <i>Danio rerio</i>	85
FIGURA 20: Alineamiento de secuencias aminoacídicas derivadas de cDNA Rpx de mamíferos y de peces	88
FIGURA. 21: Análisis de la expresión de Rpx por hibridación <i>in situ</i>	91

INDICE DE TABLAS

TABLA N°1 Oligonucleótidos para caracterizar secuencias Ptx2	49
TABLA N° 2: Lista de secuencias Pitx2 extraídas del <i>GenBank</i>	66
TABLA N° 3 Oligonucleótidos para caracterizar secuencias Rpx	75
TABLA N°4: Lista de secuencia Rpx extraídas del <i>GenBank</i>	89

LISTA DE ABREVIATURAS

- Amp Ampicilina
- Acc.Nº número de acceso
- cds secuencia codificante
- dNTP desoxirribonucleótido trifosfato
- DNAsa desoxirribonucleasa
- DO densidad óptica
- E día embrionario
- EtBr bromuro de etidio
- GH hormona de crecimiento
- IS Hibridación *in situ*
- LB medio de cultivo Luria Bertani
- MOPS ácido 3-[N-2-morfolino]propano sulfónico
- PI *pars intermedia*
- PPD *proximal pars distalis*
- POPOP p-bis[2-(5-feniloxazolil)]-benceno
- PPO 2,5-difeniloxazol
- RPD *rostral pars distalis*
- PRL prolactina
- SB buffer NaOH-ácido bórico
- SOD displasia septo-optica
- SSC citrato de sodio salino

- TA temperatura ambiente
- TAE buffer Tris-acetato; EDTA
- TCA ácido tricloro acético
- TE buffer Tris-HCl; EDTA
- U unidad o unidades

1. RESUMEN

Con el objetivo de identificar factores de respuesta temprana a cambios ambientales en teleósteos se caracterizó Ptx2 y Rpx de *Cyprinus carpio*. Estos factores de transcripción con homeobox pertenecen a la familia “bicoid-like” y son expresados tempranamente en el desarrollo. Ptx2 está implicado en el control de la asimetría derecha izquierda durante la organogénesis y mutaciones en el gen de Ptx2 se han asociado al síndrome de Rieger en humanos. Además, en mamíferos está implicado en la regulación de la hormona de crecimiento (GH) y prolactina (PRL), hormonas que en *C. carpio* exhiben expresión regulada durante la adaptación a cambios estacionales. Rpx es un marcador temprano del desarrollo de la pituitaria, esencial para la formación de esta glándula y asociado a la displasia septo óptica (SOD) en humanos.

El análisis de las secuencias parciales de cDNA Ptx2 y Rpx de carpa, permitió distinguir más de dos transcritos para Rpx e identificar dos genes Ptx2 activos transcripcionalmente. Claramente se observó reacción específica para Ptx2 y Rpx por hibridación *in situ* en las regiones *proximal pars distalis* y *pars intermedia* en la hipófisis de carpas adultas. La señal específica de Ptx2 y Rpx fue de menor intensidad en carpas aclimatizadas a verano respecto a invierno. Para Rpx se corroboró que su expresión está inversamente relacionada con la expresión de Pit-1 en la glándula pituitaria, en la cual la expresión de Rpx disminuye antes del aumento de la expresión de Pit-1 y el avance al desarrollo de las líneas celulares lactótropas, tirótropas y somatótropas. Por primera vez se han mostrado factores específicos de la glándula pituitaria con menos expresión en carpas aclimatizadas a verano, que podría permitir el desarrollo de estos factores como indicadores de efectos ambientales en la estación cálida.

SUMMARY

With the aim to identify early response factors to environmental changes in teleosts, Ptx2 and Rpx were characterized from *Cyprinus carpio*. These homeobox transcription factors belong to the bicoid-like family and are expressed early in development. Ptx2 is involved in the control of left-right asymmetry during organogenesis and mutations in the Ptx2 gene are involved in Rieger syndrome in human. In addition in mammals Ptx2 is involved in regulation of growth hormone (GH) and prolactin (PRL) expression in pituitary gland, hormones that in *C. carpio* exhibit regulated expression during seasonal adaptation. Rpx is an early marker of pituitary development, essential for the formation of this gland, and associated with septo-optic dysplasia (SOD) in man.

The analysis of the partial Ptx2 and Rpx sequences, amplified from carp pituitary cDNA, revealed more than two transcripts for Rpx and two transcriptionally active Ptx2 genes were identified. Clearly specific reaction was observed for Ptx2 and Rpx by *in situ* hybridization in the regions *proximal pars distalis* and to lesser extent in *pars intermedia* in the pituitary of adult carp. The Ptx2 and Rpx specific signal was minor in pituitary of summer acclimatized with respect to winter acclimatized carp. For Rpx this corroborated the inverse relation to Pit-1 expression in pituitary gland, where diminished Rpx expression preceeds rise of Pit-1 expression and proceeding of cell line development to lacto-, thyro- and somatotrophs. For the first time pituitary specific factors were shown to exhibit less expression in summer carp, which might allow to develop these factors as indicators of environmental effects in the warm season.

2. INTRODUCCION

La expresión génica de factores del sistema hipotálamo-hipofisiario se ve afectada en respuesta a cambios ambientales en el ectodermo euritermal *Cyprinus carpio*, tanto naturales o causados por xenobioticos (Cossins et al., 2006; Moens et al., 2006). Este trabajo apunta a la caracterización de nuevos factores hipofisiarios, que podrían jugar un rol importante en la coordinación de la red de factores que responden a estímulos ambientales.

La reprogramación de la expresión génica en el ectodermo *C. carpio*, conlleva a una adaptación reversible a cambios estacionales de su medio ambiente, que se refleja a nivel de transcripción y traducción en múltiples tejidos (Figueroa et al., 1994, 2000; Goldspink., 1995; Krauskopf et al., 1988; Kausel et al., 1998, 1999; Vera et al., 2000; Sarmiento et al., 2000; López et al., 2001; Alvarez et al., 2004). De los factores del eje hipotálamo-hipofisiario se ha mostrado variación estacional significativa en la expresión a nivel transcripcional y traduccional de la hormona prolactina (PRL) en la glándula pituitaria de carpas aclimatizadas. Aquellas aclimatizadas a la estación fría, mostraron una reacción claramente más baja con respecto a las aclimatizadas a la estación de verano (Figueroa et al., 1994, 1997), al igual que la hormona de crecimiento (GH) (Figueroa et al., 2005). Kausel et al., 1998, 1999; Salazar, 2003 mostraron que el factor de transcripción Pit-1 tiene variación estacional, detectándose una mayor cantidad de transcritos en hipófisis de carpas aclimatizadas a la estación de verano con respecto a aquellas aclimatizadas a invierno

Pit-1 es un factor de transcripción tejido específico de la glándula pituitaria (Ingraham et al., 1988; Andersen and Rosenfeld., 1994; Sekkali et al., 1999; Quantien et al., 2002a; Zhu et al., 2005), y es requerido para la diferenciación y expansión de las líneas celulares somatotropa,

lactotropa y tirotropa, expresándose en estas líneas celulares durante toda la vida (Zhu et al., 2005). En ratón se detecta en E.13.5, en las células que ocupan una posición central en la *pars distalis* de la hipófisis, y un día después en toda la *pars distalis* (Cohen and Radovick, 2002). Pit-1 es también necesario para la regulación transcripcional de GH, PRL, hormona estimulante de la tiroide subunidad beta (TSH β) y de su propio gen (Zhu et al., 2005). La expresión de Pit-1 es positivamente regulada por un factor de transcripción que posee un homeodominio, el profeta de Pit-1 (Prop1) y negativamente regulada por un segundo y altamente relacionado “paired like”, Hesx1/Rpx (Olson et al., 2006).

En *C. carpio*, durante el proceso de aclimatización estacional, el foto-período actúa como un importante modulador de la expresión de PRL (Figuerola et al., 1997). Este aumento de la expresión de PRL durante la estación de verano comparado con invierno, también está acompañado de un cambio moderado en la expresión de Pit-1, lo que sugiere la participación de otros factores en la regulación de la transcripción del gen de PRL, uno de los cuales podría ser Pitx2 (Kausel et al., 1999; Quentien et al., 2002a, b).

La glándula pituitaria en mamíferos está compuesta por dos entidades anatómicamente y funcionalmente diferentes, la adenohipófisis que comprende el lóbulo anterior e intermedio, que se origina a partir del ectodermo oral, y la neurohipofisis o lóbulo posterior, que se origina a partir del neuroectodermo, también llamado diencéfalo ventral (Zhu et al., 2005; Quentien et al., 2006). La adenohipófisis contiene seis tipos celulares diferentes, los que son caracterizados por los tipos de hormona que producen y secretan: Corticotropos: hormona adenocorticotrofina (ACTH); tirotropo: hormona estimulante de la tiroides (TSH); somatotropo: GH; lactotropo: PRL; gonadotropos: hormona folículo estimulante (FSH) y luteinizante (LH). El control del hipotálamo sobre la adenohipófisis se ejerce por hormonas sintetizadas en los *nuclei*

hipotalámicos que se liberan en la eminencia media al plexo de capilares y se transportan del hipotálamo a la adenohipófisis por un sistema circulatorio especial, el sistema portal (Bolander, 2004). En humanos el lóbulo intermedio es muy reducido en estructura y función, secreta la hormona melanocito estimulante (MSH). La oxitocina y vasopresina son sintetizadas en el núcleo supraóptico y paraventricular del hipotálamo, y son transportadas por axones terminales localizados en la neurohipófisis (Zhu et al., 2005).

En peces el desarrollo y funcionamiento del eje hipotálamo-hipofisiaria es similar, sin embargo tiene claras diferencias con respecto a los mamíferos en algunos aspectos. Morfológicamente, en peces teleósteos no existe la eminencia media ni un sistema portal (Norris, 1996). Los axones del hipotálamo llegan directamente a la glándula pituitaria, forman la neurohipófisis y algunos terminan en la adenohipófisis (Flores et al., 2007). En la adenohipófisis se reconocen tres zonas, la porción mas anterior y rostral (dorsal), contiene células foliculares y se denomina *rostral pars distalis* (RPD), la zona central comprende la *proximal pars distalis* (PPD), y la tercera región localizada en la parte mas caudal de la glándula es la *pars intermedia* (PI), cada una de estas regiones esta distinguida citológicamente y contienen distintos tipos celulares que producen diferentes hormonas tróficas (Norris, 1996).

En la RPD se encuentran las células lactotropas productoras de PRL y la células corticotropas productoras de la hormona estimulante de las glándulas adrenales (adrenocorticotropina, ACTH), en la PPD se encuentran las células somatotropas, sintetizadoras de la hormona de crecimiento (GH), células gonadotropas, sintetizadoras de la hormona estimulante de la gónadas (gonadotropinas, GTHI y GTHII) y células tiotropas, productoras de la hormona estimulante de la tiroides (tirotropina, TSH). En la PI se hallan las células melanotropas o productoras de la hormona estimulante de los melanocitos (melanotropina, MSH)

y las células somatolactotropas, sintetizadoras de la hormona somatolactina (SL), una hormona específica de peces relacionada a PRL y GH. La neurohipófisis produce la hormona arginina-vasotocina (AVT) y la isotocina (IST), que corresponden a la familia de vasopresina y oxitocina en mamíferos (Mancera, 2004).

La glándula pituitaria anterior tiene un rol crucial en el control de la homeostasis en vertebrados, sirve como un mediador de la información transmitida desde el cerebro vía hipotálamo a órganos endocrinos periféricos como la glándula tiroides, riñones y gónadas, así regula algunos procesos vitales tales como el metabolismo, crecimiento, reproducción, y comportamiento y además está involucrado en la regulación del sistema inmune (Scully and Rosenfeld., 2002; Bolander, 2004; Quentien et al., 2006).

El desarrollo normal de la glándula pituitaria anterior se lleva a cabo a través de gradientes de moléculas señales que contribuyen a los eventos del desarrollo temprano. Estos primeros pasos resultan en la inducción de la expresión de factores de transcripción, en patrones que se superponen espacial y temporalmente y que controlan la expresión de genes en la determinación y diferenciación de un tipo celular (Fig. 1) (Dasen y Rosenfeld, 1999; Scully and Rosenfeld., 2002; Cohen and Radovick, 2002; Zhu et al., 2005; Quentien et al., 2006).

Ptx2 y Rpx son factores de transcripción expresados tempranamente en la hipófisis, directamente asociados a la formación de la glándula pituitaria. Mutaciones en algunos de los factores de transcripción cruciales para el desarrollo de la pituitaria dan origen al hipopituitarismo, una deficiencia de una o múltiples hormonas pituitarias (Cohen and Radovick, 2002).

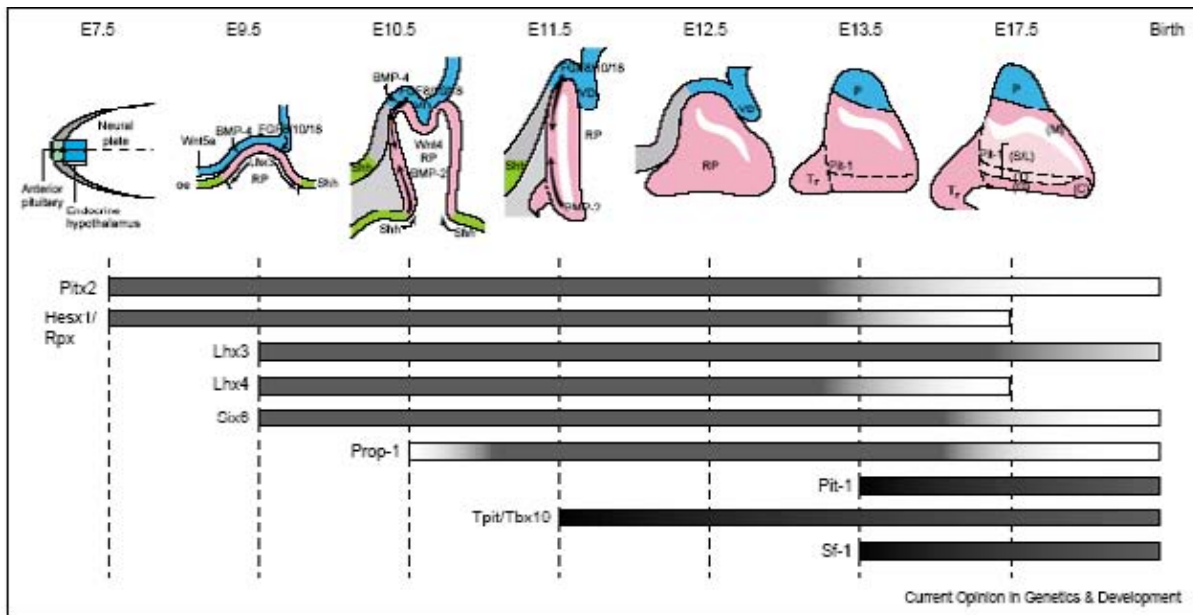


FIGURA 1: Esquema del desarrollo de la pituitaria de ratón. El diencéfalo ventral (VD), expresa BMP4, FGF8/10/18 y Wnt5a, que hacen contacto directo con el ectodermo oral (oe), e induce la formación del Rathke's Pouch (RP). Shh es expresado en todo el ectodermo oral excepto en RP. Los gradientes opuestos dorsal BMP4/FGF y ventral BMP2/Shh llevan a la proliferación en la posición indicada por la regulación de la combinación de los patrones de expresión de los factores de transcripción. Pit-1 es inducido al E13.5 en la región caudomedial de la pituitaria, la cual da origen a la somatotropo (S), lactotropo (L), tirotropo (T). Rostral tip tirotropo (T_r) es Pit-1 independiente. Corticotropo (C) y Gonadotropo (G) son diferenciados en la parte más ventral de la glándula. La región dorsal del RP llega a ser el lóbulo intermedio, conteniendo Melanotropo (M), los niveles de expresión de los factores de transcripción a través de la ontogenia de la pituitaria son indicados en un gradiente donde altos niveles de expresión son denotados en negro (extraído de Zhu et al., 2005).

Rpx (Rathke's Pouch Homeobox), también conocido como ANF (anterior neural fold), Hesx1 (gen homeobox expresado en “stem cells” embrionarias) es un miembro del tipo “paired-like”, homeobox gen originalmente descrito en *Drosophila melanogaster* (Cohen and Radovick, 2002). Es el marcador específico más temprano conocido para el primordio de la pituitaria, sugiriendo que tiene un rol en la determinación temprana o diferenciación de la pituitaria (Hermesz et al, 2003). En embriones de ratón es el primero en expresarse en pequeños grupos de células en la línea media anterior del endodermo visceral al comienzo de la gastrulación, al E 8.5 la expresión de Rpx está completamente restringida al RP. Embriones de ratones que carecen de Rpx tienen una bifurcación en RP y displasia de la pituitaria, proencefalo reducido, anoftalmia o microoftalmia, defectos en el desarrollo del tracto olfatorio y defectos en la línea media ventral del hipotálamo. Ratones neonatales tienen anormalidades en el cuerpo calloso, anterior e hipocampal comisuras y *septum pelucidum*, similar a los defectos vistos en la displasia septo óptica (SOD) en humanos (Cohen and Radovick, 2002).

SOD, también conocido como síndrome de Morsier's, es una condición heterogénea con un fenotipo altamente variable, una combinación de hipoplasia del nervio óptico, hipoplasia de la glándula pituitaria y anormalidades en la línea media del cerebro, tales como ausencia del cuerpo calloso y *septum pelucidum*. Las deficiencias pituitarias pueden ir desde deficiencia aislada de GH a pan-pituitarismo con diabetes insípida. Cualquiera atrasa o adelanta la pubertad y puede observarse una función o anatomía anormal del hipotálamo; un 62% de los individuos afectados tiene solo hipopituitarismo y un 30% tienen las tres manifestaciones (Carrière et al., 2004). SOD en humanos ha sido asociada a mutaciones en Hesx1, se han informado distintos modos de transmisión: dos de estas mutaciones R160C y I26T, fueron encontradas en pacientes consanguíneos homocigotos afectados, consistente con un modo recesivo de herencia y tres

mutaciones *missense*, S170L, T181A, Q6H y una inserción 306/307 AG, fueron encontrados en heterocigotos, mostrando penetrancia incompleta, sugiriendo la participación de otros genes. Las proteína Hesx1 de S170L, R160C inserción 306/307 AG, carecen del homeobox o muestran reducida capacidad de unión al DNA. La mutación I26T resulta en una proteína con una capacidad deteriorada para reclutar el co-represor Tle1 (Cohen and Radovick, 2002; Reynaud et al., 2004; Zhu et al., 2005).

Rpx y Prop-1 son dos proteínas altamente relacionadas que tienen funciones secuenciales en los pasos críticos en la programación de la organogénesis de la pituitaria (Olson et al., 2003, 2006). Rpx es una proteína con homeodominio que marca el campo del ectodermo oral antes de la formación de la pituitaria rudimentaria; su expresión desaparece rápidamente después de E13.5, cuando las células progenitoras comienzan a migrar ventralmente y expresan marcadores específicos de una línea celular. La atenuación de la expresión de Rpx en el desarrollo de la pituitaria coincide con la progresión de Prop1, sugiriendo una regulación temporal de la expresión de Rpx esencial para el despliegue de la activación del gen Prop1. Ambos factores pueden unir cooperativamente la misma secuencia palindrómica de DNA como homo o heterodímeros, el homodímero de Prop1 es un eficiente activador de la transcripción, la heterodimerización con Rpx trunca este efecto (Olson and Rosenfeld., 2002; Olson et al., 2003). Rpx por si mismo es un potente represor con al menos dos dominios independientes para reclutar maquinaria correpresora, la región amino terminal “engrailed homology” (eh) y el homeodominio pueden independientemente actuar como represores. El patrón de expresión temporal predice un período temprano de represión Rpx-dependiente y un período tardío de activación Prop1 dependiente, un periodo intermedio de antagonismo con un resultado dependiente en parte, de los niveles relativos de los dos factores en el núcleo y en la disponibilidad de coactivadores y

correpresores específicos (Olson and Rosenfeld., 2002; Olson et al., 2003). El dominio eh puede reclutar correpresores de la familia Groucho, tales como TLE1, el cual parece ser necesario para la función represora de Rpx (Olson et al., 2003; Carrière et al., 2004; Zhu et al., 2005)

Ptx1 y Ptx2 son dos miembros de la familia de proteínas Ptx, expresados en patrones superpuestos en el desarrollo de la pituitaria, regulan la proliferación y diferenciación celular de manera dosis dependiente (Dasen y Rosenfeld, 1999; Scully et al., 2002; Cohen and Radovick, 2002; Zhu et al., 2005). La pérdida de función de Ptx1 o Ptx2 resulta en defectos de múltiples órganos, ambos tienen similares propiedades de unión al DNA, tienen los mismos genes objetivos e interactúan con los mismos factores de transcripción (Dasen y Rosenfeld, 1999; Quentien et al., 2006).

El factor de transcripción Pitx2 (Pituitary homeobox 2), también llamado Ptx2, Otlx2, Brx, Brx1, Brx1a, Brx1b, Arp, Arp1, Rieg, Solurshin, Munc30, Pitx2a, Pitx2b, Pitx2c, pertenece a la familia de factores de transcripción con homeobox “bicoid-like” o “paired”, está implicado en el control de la asimetría derecha izquierda durante la organogénesis (Drouin et al., 1998; Smidt et al., 2000; Bisgrove et al., 2000; Essner et al., 2000, 2005). Ptx2 es expresado en altos niveles en la mayoría de los tipos celulares en la ontogenia de la pituitaria, al igual que en el desarrollo de varios órganos incluyendo corazón, dientes, pulmones, músculo, tracto digestivo, ojos (Dasen y Rosenfeld, 1999), y en las cinco líneas celulares de la glándula pituitaria anterior madura (Carrière et al., 2004; Quentien et al., 2006).

En vertebrados es esencial la generación de un patrón anteroposterior y dorsoventral, que regulen la asimetría derecha izquierda (Bisgrove et al., 1999). Señales de la línea media, incluyendo la placa precordal son responsables del patrón del eje anteroposterior, dorsoventral y derecha-izquierda (Essner et al., 2000). Tejidos de la línea media sirven como un centro

polarizador del patrón del eje anteroposterior y establecimiento de la polaridad dorsoventrales en tejidos adyacentes (Brisgrove et al., 1999).

En ratón se generan tres isoformas de Ptx2: Ptx2a (271 aa), Ptx2b (317 aa), Ptx2c (324 aa), expresadas en la pituitaria anterior, Este gen en humanos está localizado en el cromosoma 4q25 y produce una cuarta isoforma llamada Ptx2d que sólo ha sido observada en humanos, esta isoforma tiene un homeodominio parcial y la región carboxilo terminal completa (Quentien et al., 2006). En humanos la expresión de las isoformas se debe al corte y empalme alternativo y al uso de dos promotores, las isoformas c y d son consecuencia del uso de un promotor interno, ubicado en el exon 4 (Essner et al., 2000; Cox et al., 2002)

El síndrome de Axenfeld-Rieger (ARS) en humanos está asociado a mutaciones en el gen Ptx2, una enfermedad autosómica dominante con una incidencia menor a 1 en 200000, que se caracteriza por anormalidades en la cámara ocular anterior causando glaucoma en más del 50% de los casos (Carrière et al., 2004), hipoplasia dental, dimorfismo craneofacial leve y anormalidades en el ombligo (Amendt et al., 1998; Saadi et al., 2001; Priston et al., 2001; Lines et al., 2002; Carrière et al., 2004; Quentien et al., 2006).

En ratones Ptx2^{-/-} muestran severos defectos en los órganos que son levemente afectados en pacientes con ARS: no cierra la pared del cuerpo ventral, anormalidades en la asimetría derecha izquierda, defectos en el corazón, tracto digestivo ojos, dientes, pulmón y desarrollo de la pituitaria, el ratón muere al E.14.5 (Carrière et al., 2004). La invaginación de RP y el contacto directo con el neuroepitelio ocurre normalmente pero falla la progresión de la glándula pituitaria, debido a una proliferación reducida y aun incremento de la apoptosis. Estudios de alelos de Ptx2 han revelado que también es necesario para la diferenciación de

gonadotropos y expansión de la línea Pit-1 que destaca la importante relación entre estos factores de transcripción (Carrière et al., 2004; Zhu et al., 2005).

La mayoría de las mutaciones descritas para Ptx2 en humanos afectan los dominios de unión al DNA, algunas causan una pérdida de la función al no unir el DNA o al no lograr la activación transcripcional de putativos genes objetivos. Un alelo con una mutación *missense* en el homeodominio mostró una disminución en la unión al DNA, pero un gran aumento en la función de transactivación, sugiriendo que el incremento de la actividad Ptx2, puede ser tan deletéreo como la pérdida de una función. Otra mutación resulta en una unión disminuida al DNA y baja actividad transcripcional, que tiene un efecto dominante negativo visto en competición con Ptx2 wild-type (Carrière et al., 2004).

La sobre expresión de Ptx2 en la cornea de ratones transgénicos manifiestan defectos oculares característicos de ARS, sugiriendo que un exceso de la actividad Ptx2 es deletéreo para el desarrollo del ojo al igual que la pérdida de su función (Zhu et al., 2005)

En mamíferos se ha mostrado la unión de Ptx2 al DNA en la región 5' del gen de PRL y la interacción proteína-proteína con Pit-1, modulando en sinergia la expresión de PRL (Amendt et al., 1998, 1999; Saady et al., 2001; Quentien et al., 2002 a, b; Quentien et al., 2006). Ptx2 también es capaz de transactivar los promotores humanos de PRL, GH y Pit-1 *in vitro*, y dirigir la transcripción de promotores de pituitaria de rata incluyendo POMC, la subunidad α glicoproteína, LH β , FSH β , PRL y GH. (Quentien et al., 2002b). La actividad de Ptx2 es regulada por su extremo carboxilo terminal, por una pequeña región que inhibe la unión al DNA y está involucrada en las interacciones proteína-proteína. La unión de esta región a una proteína estimula la unión de Ptx2 al DNA y la activación transcripcional, posiblemente al enmascarar el

dominio inhibitorio, sin embargo la delección del dominio inhibitorio de la región carboxilo terminal no produce una estimulación de la actividad transcripcional (Amendt et al., 1999).

En *Danio rerio* se han descrito dos isoformas Ptx2a y Ptx2c, mostrando expresión diferencial en el desarrollo de este teleosteo. Ptx2c es expresado simétricamente en el presunto mesodermo durante la etapa de blástula tardía y en la placa precordial durante la gastrulación tardía. La expresión de Ptx2a es la primera en detectarse en el estado de brote en la placa precordial anterior (Essner et al., 2000).

En embriones de *zebrafish* existen tres dominios de expresión génica asimétrica que son útiles para predecir la ubicación de los órganos: *cyclops*, *lefty1* y *Pitx2* son expresados en el diencéfalo izquierdo, *cyclops*, *lefty2* y *Pitx2* en el campo izquierdo del corazón y *cyclops* y *Pitx2* en el primordio del tracto digestivo izquierdo. Al producirse distintas alteraciones de estos patrones de expresión en *zebrafish* se identifican cuatro clases fenotípicas de mutantes que tienen diferentes grados de discordancia entre cerebro corazón e intestino. La interacción de *lefty* y *ciclops* parece regular la expresión del factor de transcripción Ptx2, lo cual podría influenciar los aspectos de la asimetría interna tales como *looping* en el corazón, asimetría de los pulmones y rotación del tracto digestivo (Bisgrove et al., 2000). También se ha visto que un aumento de la expresión de Ptx2c induce la expresión de *cyclops*, sugiriendo un nuevo mecanismo de “Feedback” en *cyclops* por Ptx2c.

La expresión ectópica de Ptx2a o Ptx2c interrumpe la gastrulación, y lleva a un exceso de células en el blastodermo marginal. Ensayos en embriones de *Xenopus* muestran que la expresión ectópica de Ptx2a o Ptx2c son competentes para seleccionar al azar el desarrollo derecha-izquierda, sin embargo Ptx2a tiene un mayor impacto en la asimetría cardíaca (Essner et al., 2000).

Los estudios funcionales de los síndromes asociados a mutaciones en los genes Ptx2 y Rpx, que incluyen *knock out* y sobre expresión, muestran claramente que los dos factores de transcripción Ptx2 y Rpx, juegan un rol importante en el desarrollo y funcionamiento de la glándula pituitaria, temporalmente antes del factor de transcripción Pit-1 (Carrière et al., 2004; Zhu et al., 2005). Por eso se aborda la caracterización de estos factores pituitarios, que podrían jugar un rol importante en la coordinación de la red de factores que responden a estímulos ambientales (Elgar, 2004).

Basados en los antecedentes bibliográficos entregados se propone como hipótesis general de trabajo, que los factores de transcripción del eje hipotálamo-hipofisiario juegan un rol importante en la organización de la repuesta compensatoria a cambios ambientales.

Como objetivo principal de esta tesis se pretende **caracterizar los factores de transcripción Ptx2 y Rpx de *Cyprinus carpio***. Por lo tanto los objetivos específicos de la presente tesis son:

- 1. Aislar secuencias génicas de Ptx2 y Rpx, factores de transcripción de *Cyprinus carpio* y realizar un análisis comparativo de las secuencias.**
- 2. Identificar la expresión a nivel de transcripción sitio específico de los factores Ptx2 y Rpx en hipófisis de *Cyprinus carpio*.**
- 3. Evaluar la expresión a nivel de transcripción de Ptx2 y Rpx en hipófisis de carpas aclimatizadas a invierno y verano.**

3. MATERIALES Y METODOS

3.1 MATERIALES

3.1.4 Reactivos

En Sigma Chemical Co., se adquirió: ácido 3-N- morpholinopropanesulfónico (MOPS), ácido bórico, bromuro de etidio, N-lauril sarcosil, xilene cianol, azul de bromofenol, azul de nitro tetrazolium (NBT), 5-bromo-4-cloro-3-indolilfosfato de sodio (BCIP), levamisol, dextran sulfato, paraformaldehído, Triton X100, Nonidet P40, desoxicolato de sodio, ampicilina.

Del distribuidor Winkler Ltda. se adquirió el isotiocianato de guanidina, citrato de sodio, cloroformo, isopropanol, sodio lauril sulfato (SDS), agarosa, cloruro de potasio (KCl), agar agar, hidróxido de sodio (NaOH), acetato de potasio, albúmina de suero bovino (BSA), fracción V.

En Promega se adquirió la enzima *EcoRI* (10 U/μl), 10 X *buffer* H, RQ1 *RNAse-Free DNase* 10 X *buffer*, RQ1 *RNAse-Free DNase* (1 U/μl), RQ1 *DNase stop solution*, tampón de reacción 5 X, M-MLV RT, M-MVT RT 200 U/μl, dATP 100 mM, dTTP 100 mM, dCTP 100 mM, dGTP 100 mM, cloruro de magnesio (MgCl₂) 25 mM, 10 X tampón DNA polimerasa, libre de magnesio, *Taq* DNA polimerasa almacenada en tampón B, Oligo dT 500 ng/μl, desoxirribonucleótido terminal transferasa (TdT, 20 U/μl), 5 X tampon desoxirribonucleótido transferasa terminal, isopropil-tiogalactospiranisido (IPTG), *kit Prime-a-Gene Labeling System*, vector pGEMT-Easy (50 ng/μl), 2 X *Rapid Ligation buffer*, enzima T4 DNA ligasa 3 U/μl.

Del proveedor US Biological se adquirió el acetato de sodio, peptona, Tris base, 5-bromo-3-indolil-galactósido (X gal).

En Scharlau Chemie S.A. se adquirió el bálsamo de Canadá y el cloruro de sodio (NaCl).

En Merck (Darmstadt, Alemania), se adquirió el cloruro de calcio (CaCl_2), cloruro de magnesio (MgCl_2), 8-hidroxiquinolina, Na_2HPO_4 , KH_2PO_4 , gelatina, β -Mercaptoetanol, alcohol isoamílico, formaldehído, glicerol, formamida 37%, ácido tricloro acético (TCA), perclorato de sodio (NaClO_4).

En Boehringer-Mannheim (Enzo), RNasa A, Dig-11-dUTP (1 nmol/ μl), antidigoxigenina-AP fragmento fab.

El ácido etilendiamino tetra acético (EDTA), fenol, etanol absoluto, se adquirieron en Reedel-de Haen, el DNA marcador de tamaño molecular de 1 kb se adquirió en Fermentas, el DNA marcador de tamaño molecular 100 pb y 50 pb en Biolabs, el marcador de DNA λ *HindIII* y el extracto de levadura, fueron adquiridos en GibcoBRL, el ácido clorhídrico (HCl) se adquirió en Caledon, el Ficoll (tipo 400) y el polivinilpirrolidona en Pharmacia, el PPO, POPOP, α - ^{32}P -dCTP 3000 Ci/mmol, 10 mCi/ml, en Amersham, el kit gene clean en Bio101, el kit FirstChoice RLM-RACE se adquirió en Ambion.

3.1.5 Soluciones

- Solución de homogeneización: Tiocianato de guanidina 4 M; citrato de sodio 25 mM pH 7,0; sarcosil 0,25% y β -Mercaptoetanol 0,1 M.
- Acetato de sodio 2 M pH 4,0.
- Fenol saturado en agua pH 5,0.
- Cloroformo: alcohol isoamílico en una proporción de 24:1.
- TE pH 7,5; SDS 0,5%: Tris-HCl 10 mM pH 7,5; EDTA 1 mM pH 8,0 y SDS 0,5%.
- Acetato de sodio 0,2 M pH 5,0.

- Tampón de carga DNA: 0,25% xilene cianol FF; 30% (v/v) glicerol.
- Tampón de carga RNA: 0,25% xilene cianol FF; 0,25% azul de bromofenol, 1 mM EDTA pH 8,0, 50% (v/v) glicerol.
- MOPS 10 X: 200 mM Ácido 3-N- morpholinopropanesulfónico (MOPS) pH 7,0, acetato de sodio 80 mM y EDTA 10 mM pH 8,0.
- Cloruro de calcio (CaCl_2) 100 mM.
- Cloruro de magnesio (MgCl_2) 100 mM.
- Solución S1, preparación DNA plasmidial: 50 mM Tris-HCl pH 8,0; 10 mM EDTA pH 8,0; 400 µg/ml RNasa A.
- Solución S2, preparación DNA plasmidial: 200 mM NaOH; 1% SDS.
- Solución S3, preparación DNA plasmidial: 2,55 M Kac pH 4,8.
- Fenol saturado en Tris-HCl pH 7,4- 8,0.
- TE/RNasa: TE pH 8,0 estéril con RNasa 20 µg/ml, almacenada a -20°C.
- Medio SOC: Peptona 2%; Extracto de levadura 0,5%; NaCl 10 mM; KCl 2,5 mM; MgCl_2 5 mM; Glucosa 20 mM.
- Medio LB: 1% peptona; 0,5% extracto de levadura; 1% NaCl pH 7,0.
- Medio LB-Agar: LB, 1,8 % agar agar.
- SB 25 X; 10 mM NaOH, ajustar a pH 8,0 con ácido bórico.
- TAE 1 X: 0.04 M Tris-acetato; 1 mM EDTA.
- 4% paraformaldehído en PBS 1 X
- PBS 1 X: Na_2HPO_4 10 mM; NaCl 137 mM; KH_2PO_4 1,76 mM; KCl 2,68 mM, pH 7,4.
- Solución 1 hibridación *in situ* (IS): 100 mM Tris-HCl pH 7,4; 150 mM NaCl.
- Solución 2 IS: 100 mM Tris-HCl pH 9,5; 100 mM NaCl; 50 mM MgCl_2 .

- Solución 3 IS: 10 mM Tris-HCl pH 8; 0,1 mM EDTA.
- Solución BSA-Triton: 1% BSA; 0,3% Triton X100 en solución 1.
- Solución de revelado en IS: 225 µg/ml de NBT; 175 µg/ml BCIP, y 0,36 µg/ml Levamisol, en solución 2.
- 20 X SSC: 3 M NaCl; 0,3 M Citrato de Sodio, ajustar el pH a 7,0.
- Solución de prehibridación IS: 50% (v/v) formamida desionizada; 4 X SSC; 0,5 X reactivo de Denhardt's; 25 µg/ml DNA de timo de ternera; 10% dextran sulfato.
- Solución de Denhardt's 50 X: 1% ficol; 1% BSA; 1% Polivinilpirrolidona (PVP).
- Solución de centelleo: 4 g/l PPO y 0,1 g/l POPOP en tolueno.
- Solución denaturante, Southern blot: 1,5 M NaCl; 0,5 M NaOH.
- Solución neutralizante, Southern blot: Tris-HCl 1 M pH 7,4; NaCl 1,5 M.
- Solución de prehibridación, Southern blot: 6 X SSC; 5 X reactivo de Denhardt's; 0,5% SDS; 50% (v/v) formamida; 100 µg/ml DNA de espermio de salmón, fragmentado y denaturado.

3.1.6 Instrumentos utilizados

- Espectrofotómetro, Shimadzu UV 1203
- Baño termo regulado, Kioto YCW-03S
- Estufa, W.C Heraeus Hanau
- Shaker, LAB-LINE, INSTRUMENTS
- Microcentrífuga, Boeco M-240R, tipo 2405-13
- Termociclador Minicycler, MJ Research
- Termociclador, Thermo Electron corporation (Px2 Thermal cyclcer)
- Fuente de poder, BRL Life Technologies,INC, Model 4000
- Balanza, KERN (440-33)
- CCD Camera, Spectroline model CA 1000/F
- Video Archival unit, Spectroline model AU-1000/F
- Impresora, Sony UP-860
- Micro ondas, Samsung
- Vortex, Velp científica
- Agitador magnético Matheson Scientific (Magnetstir)
- pH metro WTW (pH 530)
- Micropipetas Wilson.
- Micropipetas Eppendorf.
- Sistema desionizador de agua Cole Palmer
- Autoclave Orthman
- Agitador orbital Electronica (IKA-VIBRAX-VXR)
- Transiluminador Vilbert Loumart (TFX-20 M)

- Contador de centelleo Packar Tri-Carb 1600TR.
- Molecular Imager FX System, BioRad

3.1.4 Animales de experimentación

Se utilizaron carpas macho de 0,7 a 2 kg, capturadas en los ríos periféricos de la ciudad de Valdivia durante las estaciones de invierno y verano, y se trasladaron a una jaula sumergida en el río Cau-Cau (Valdivia), manteniendo el foto-período y la temperatura natural.

3.2 METODOS

Los métodos utilizados se basan en Sambrook et al., 1989, a no ser que se especifique otra fuente.

3.2.1 Extracción de hipófisis

Los peces fueron sacrificados con una rápida decapitación, luego se seccionó la parte superior de la cabeza, donde se extrajo la parte adiposa que rodea el cerebro hasta dejarlo expuesto. Usando una pinza se cortaron los nervios motores para luego levantar la masa cerebral dejando a la vista la hipófisis que se ubica por debajo, empotrada en una cavidad ósea y recubierta por una membrana, la cual fue removida. La glándula pituitaria se extrajo con extremo cuidado para evitar daño del tejido. (según Figueroa et al., 1994).

3.2.2 Extracción y caracterización de ácidos nucleicos

3.2.2.1 Extracción de RNA total

Las hipófisis obtenidas en 3.2.1 se homogeneizaron, en un *Potter* con 500 µl de solución de homogeneización (tiocianato de guanidina 4 M; citrato de sodio 25 mM pH 7,0; sarcosil 0,25% y β-Mercaptoetanol 0,1 M), previamente enfriada y mantenida en hielo.

El homogenizado se trasladó a un tubo de 1,5 ml, se adicionó 50 µl de acetato de sodio 2 M pH 4,0, luego se agregó 500 µl de fenol saturado en agua pH 5,0, donde se agitó por 1 minuto, para agregar posteriormente 400 µl de cloroformo, alcohol isoamílico en una proporción de 24:1, repitiendo la agitación un par de minutos.

Posteriormente, las fases se separaron por centrifugación a 13.000 x g por 10 minutos a 4°C, se trasladó la fase acuosa, que contiene el RNA a un nuevo tubo, se adicionó 500 µl de isopropanol frío, y se mantuvo a -20°C durante toda una noche para la precipitación del RNA.

El precipitado se sedimentó por centrifugación a 13000 x g durante 30 minutos a 4°C para luego ser resuspendido en 200 µl de una solución que contiene: Tris HCl 10 mM pH 7,5, EDTA 1 mM pH 8,0 y SDS 0,5%, luego se agregó 400 µl de cloroformo, alcohol isoamilico (24:1) y se mezcló por inversión.

Para separar las fases se centrifugó a 13000 x g por 15 minutos a 4°C, con la posterior extracción de la fase acuosa, la cual se traspasó a un tubo nuevo y se precipitó nuevamente el RNA, adicionando 100 µl de acetato de sodio 0,2 M pH 5,0 y 520 µl de isopropanol frío, se mezcló y se incubó toda la noche a -20°C

El precipitado fue sedimentado por centrifugación en las mismas condiciones descritas anteriormente, se secó al aire por algunos minutos y luego se resuspendió en 20 µl de agua libre de nucleasas.

3.2.2.2 Extracción de DNA genómico desde células sanguíneas

Una característica de los glóbulos rojos de *C. carpio* es la presencia de núcleos, lo que permite que este tejido sea idóneo para la extracción de DNA genómico con un protocolo modificado de Garbutt et al., (1985).

Luego de extraer la sangre en jeringa heparinizada se debe mantener en hielo hasta su procesamiento. Durante todo el procedimiento se tuvo extremo cuidado al momento de mezclar, para conservar la integridad del DNA.

Se tomaron 0,9 ml de sangre y se mezclaron con 1,1 ml de tampón de lisis (NaH_2PO_4 1 mM pH 7,5, desoxicolato de sodio 4%, Nonidet P40 0,8%, MgCl_2 1 mM), luego se centrifugó a $10000 \times g$ por 15 min, a 4°C , y se aspiró y se eliminó el sobrenadante. El sedimento se resuspendió en 10 ml de tampón Tris-EDTA (Tris-HCl 10 mM pH 8,3, EDTA 5 mM, NaCl 150 mM), y se mezcló suavemente. Luego se adicionó 3,5 ml de NaClO_4 5 M pH 8,0, y se mezcló suavemente por inversión, posteriormente se agregó 1,5 ml de SDS 10% y se volvió a mezclar como se describió anteriormente. Luego se realizó una extracción fenólica, para eliminar el contenido proteico, adicionando igual volumen de una mezcla de fenol : cloroformo : alcohol isoamílico pH 8,0, en una proporción de 25 : 24 : 1, y se mezcló suavemente por inversión durante 15 min a TA, posteriormente se centrifugó a $3000 \times g$ durante 10 min a TA.

La fase superior acuosa se recupera y se transfiere con una pipeta de punta ancha, a un nuevo tubo en donde se agregó un volumen equivalente al recuperado, de cloroformo : alcohol isoamílico 24 : 1, se mezcló suavemente por inversión y se centrifugó en las condiciones anteriormente descritas. Este paso se repitió de dos a cuatro veces hasta que la interfase se vio clara.

El DNA se precipitó al adicionar 2,5 veces su volumen, de etanol absoluto previamente enfriado a -20°C , se mezcló suavemente y se recolectó al enrollarlo en una pipeta pasteur, luego se lavó tres veces, al sumergir esta pipeta en 15 ml de etanol 80% previamente enfriado a -20°C . Posteriormente se dejó secar al aire por un par de horas y se resuspendió en 400-1000 μl de Tris-HCl 10 mM pH 7,5 estéril, dependiendo de la cantidad aproximada de DNA recolectada con la pipeta Pasteur. En caso de que no se pudiera enrollar el DNA en la pipeta Pasteur, se incubó a -20°C durante toda la noche y se colecta por centrifugación.

Para eliminar las proteínas residuales, se incubó el DNA a 37°C durante toda una noche con proteinasa K 0,1 mg/ml, luego se repitió la extracción con cloroformo : alcohol isoamílico como se describió anteriormente, y se precipitó de la misma forma ya descrita.

El DNA genómico se almacena a 4°C hasta su utilización.

3.2.2.3 Extracción de DNA plasmidial a pequeña escala

Las colonias bacterianas transformadas, de color blanco, fueron sembradas en 5 ml de LB líquido con ampicilina 50 µg/ml y se incubaron toda la noche con agitación rotatoria a 200 r.p.m.

Se tomó 1,5 ml de cultivo líquido y se transfirió a un tubo Eppendorf de 1,5 ml para ser centrifugado a 10000 x g durante 5 minutos a temperatura ambiente.

El sedimento se resuspendió suavemente en 250 µl de solución S1 (50 mM Tris-HCl pH 8,0; 10 mM EDTA pH 8,0; 400 µg/ml RNasa A), luego se añadió 250 µl de solución S2 (200 mM NaOH; 1% SDS), tras lo cual se mezcló por inversión y se incubó durante 5 min a TA, para abrir las células y liberar el contenido. Luego se agregó 250 µl de solución S3 (2,55 M Acetato de potasio pH 4,8) y se mezcló una a dos veces por inversión y se incubó por 10 min en hielo, para arrastrar el DNA cromosomal y el RNA de alto peso molecular, con el precipitado de proteínas, membranas, potasio y SDS que se encuentran formando complejos, luego se centrifugó 5 min a 10000 x g a TA y el sobrenadante, que contiene los ácidos nucleicos de pequeño peso molecular, se transfirió a un nuevo tubo de 1,5 ml.

Para la extracción fenólica se agregó 370 µl de fenol pH 8,0 y 370 µl de cloroformo : alcohol isoamílico 24 : 1, se mezcló durante 2 min, luego se centrifugó 5 min a 10000 x g. La fase acuosa se traspasó a un tubo nuevo, con cuidado de no tocar la interfase que contiene las proteínas denaturadas, luego se extrajo con 600 µl de cloroformo : alcohol isoamílico

(24:1), mezclando por inversión a TA, se centrifugó a 10000 x g por 3 min para separar las fases y así recuperar la fase superior, teniendo cuidado de no transferir cloroformo.

El DNA se precipitó con 600 µl de isopropanol helado, se incubó a -20°C por 10 min, y se centrifugó a 13000 x g a 4°C por 15 minutos, se eliminó el sobrenadante, y se lavó el precipitado con 200 µl de etanol 70%, se realizó una breve centrifugación, se eliminó el etanol y se dejó secar al aire por 10 a 20 min. Finalmente el DNA plasmidial se resuspendió en 20 µl de agua desionizada estéril.

3.2.2.4 Cuantificación de ácidos nucleicos

La determinación de la concentración aproximada de ácidos nucleicos se realizó midiendo la absorbancia a una longitud de onda de 260 nm en un espectrofotómetro, teniendo como patrón, que una unidad de absorbancia a 260 nm es igual a 50 µg/µl para ácidos nucleicos doble hebra, 40 µg/µl para los ácidos nucleicos de hebra simple, y alrededor de 30 µg/µl para oligonucleótidos.

3.2.2.5 Fraccionamiento de RNA en gel de agarosa en condiciones denaturantes

Las muestras de RNA se prepararon en tubos estériles, mezclando 4,5 µl de RNA total (aproximadamente 20 µg), 2 µl de tampón MOPS 5 X (MOPS 0,1 M pH 7,0, acetato de sodio 40 mM, EDTA 5 mM pH 8,0), 3,5 µl de formaldehído (37%), y 10 µl de formamida, ésto se incubó a 65°C por 15 minutos para denaturar el RNA y luego se colocaron en hielo donde se adicionó 1 µl de bromuro de etidio 1 mg/ml y 2 µl de tampón de carga para RNA.

El RNA total se fraccionó en un gel de agarosa al 1% en condiciones denaturantes, el cual se preparó pesando 0,3 g de agarosa y se fundió con 21,7 ml de agua desionizada estéril a 70°C,

se dejó entibiar y se agregó 3 ml de MOPS 10 X y 5,3 ml de formaldehído 12,3 M, para obtener una concentración final de 1 X y 2,2 M respectivamente.

El fraccionamiento electroforético se realizó en tampón MOPS 1 X que contiene MOPS 20 mM pH 7,0, acetato de sodio 8 mM y EDTA 1 mM pH 8,0.

Los geles se pre-corrieron por 5 minutos a 5 V/cm, realizándose el fraccionamiento al mismo voltaje. Una vez terminada la corrida electroforética se procedió a exponer el gel a luz U.V. en un transiluminador para visualizar los RNAs, previamente teñidos con bromuro de etidio.

3.2.2.6 Fraccionamiento de DNA en geles de agarosa

Para separar los fragmentos de DNA se utilizaron geles de agarosa a distintas concentraciones en % p/v, dependiendo del tamaño del fragmento de DNA esperado a fraccionar, en general se utilizó la concentración 1%. El tampón utilizado para la preparación del gel fue SB 1 X pH 8,0, en el cual se fundió la agarosa a 70°C aproximadamente, una vez fundida se le agregó 0,5 µl de bromuro de etidio 10 mg/ml, y se puso en el molde del gel. El fraccionamiento electroforético se realizó a 50 mA, durante 30 a 50 minutos, en tampón SB 1 X pH 8,0. Una vez finalizada la electroforesis se visualizó el DNA por exposición a luz U.V.

Para estimar los tamaños de los fragmentos de DNA separados en el gel de agarosa, se corrieron paralelamente estándares de tamaño molecular conocido: λ HindIII, Promega; 1 kb Fermentas; 100 pb Biolabs.

3.2.2.7 Digestión de DNA plasmidial

La digestión se realizó con alrededor de 0,5 µg de DNA plasmidial, tampón H a 1 X (90 mM Tris-HCl, 10 mM MgCl₂, 50 mM NaCl), y 0,5 U de enzima *EcoRI*, luego se incubó por 2 horas a 37°C.

Los productos de la digestión se fraccionaron en un gel de agarosa al 1% en SB 1 X (hidróxido de sodio 0,4 mM y ácido bórico a pH 8,0), visualizándose por tinción con bromuro de etidio, al exponerlos a luz U.V. en un transiluminador.

3.2.3 Preparación de cDNA

3.2.3.1 Tratamiento de RNA total con DNAsa libre de RNAsa

Este procedimiento se realizó según las indicaciones recomendadas por el fabricante de las enzimas utilizadas. Para eliminar una posible contaminación con DNA, se realizó el tratamiento del RNA total, con DNAsa libre de RNAsa, en un volumen final de 20 µl, el cual contenía alrededor de 5 µg de RNA total, RQ1 *RNase-free DNase* 2,5 U, RQ1 *RNase-Free DNase* 1 X *Buffer*, (40 mM Tris-HCl pH 8,0; 10 mM MgSO₄; 1 mM CaCl₂).

Se incubó a 37°C por 45 minutos, luego se añadió 1 µl de RQ1 *DNase Stop solution* (20 mM EGTA pH 8,0) y se calentó por 10 minutos a 65°C para inactivar la DNAsa.

3.2.3.2 Síntesis de cDNA

Para sintetizar la primera hebra de cDNA se tomaron 5 µl (aproximadamente 1,2 µg) de RNA tratado con DNAsa libre de RNAsa según 3.2.3.1 y se agregó 0,5 µl de oligo-dT₁₅ (500 ng/µl), 8,5 µl de agua libre de nucleasas, y se calentó a 70°C durante 10 minutos, y luego se puso en hielo, y se agregó 4 µl de 5 X tampón de reacción M-MLV RT, (250 mM Tris-HCl

pH 8,3, 225 mM KCl, 15 mM MgCl₂, 50 mM DTT), 1 µl de mix dNTPs 10 mM (2,5 mM dATP, 2,5 mM dTTP, 2,5 mM dCTP, 2,5 mM dGTP), luego se incubó a 42°C por 2 minutos y se agregó 1 µl de M-MVT RT (200 U/µl), luego de lo cual se mezcló suavemente y se incubó durante 60 minutos a 42°C. Luego de esta incubación se calentó a 70°C por 15 minutos para inactivar la enzima, y se almacenó a -20°C.

3.2.4 Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

La mayor parte de las amplificaciones se realizaron a partir de cDNA de hipófisis de carpas machos, las condiciones frecuentemente utilizadas fueron las siguientes:

En general se utilizó un volumen de reacción de 50 µl, conteniendo 1 X tampón Taq DNA polimerasa, (10 mM Tris-HCl pH 9.0, 50 mM KCl 0.1% Triton X-100) 1,5 mM de MgCl₂, 0,2 mM Mix dNTPs, 1 U de *taq* DNA polimerasa, x µl de templado, 1 µl de cada oligonucleótido (20 pmol/µl). Como templado se ocupó 50 ng DNA plasmidial, 100 ng DNA genómico y 50 ng en cDNA de hipófisis.

El programa utilizado constaba de una denaturación inicial de 1 minutos a 94°C, seguida por 30 a 35 ciclos de: 94°C, por 30 segundos, 50°C por 30 segundos, 72°C por 30 segundos, y con una extensión final de 72°C por 7 minutos, finalizando a 4°C.

3.2.5 5`RACE utilizando el RLM-RACE kit

Una vez obtenido el RNA total, éste es tratado con fosfatasa alcalina de intestino de ternero (CIP), para remover el 5`fosfato de moléculas tales como rRNA, mRNA fragmentado, tRNA y contaminaciones de DNA genómico. Este tratamiento no afecta el CAP ubicado en el extremo 5`del RNA mensajero. Para ésto se realizó la siguiente reacción recomendada por el

fabricante (Ambion) 10 µg de RNA total, 2 µl de 10 X CIP tampón, 2 µl de fosfatasa alcalina de intestino de ternero (CIP) y se completó el volumen a 20 µl con agua libre de nucleasas, luego se mezcló suavemente y se incubó 1 hora a 37°C.

Posteriormente se realizó una extracción con fenol : cloroformo de la siguiente forma:

Se añadió 15 µl de una solución de acetato de amonio y 115 µl de agua libre de nucleasas, ambos entregados por el fabricante, y 150 µl de fenol ácido : cloroformo, se mezcló enérgicamente por vortex, y para separar las fases se centrifugó por 5 minutos a 10000 x g. La fase superior acuosa se transfirió a un nuevo tubo y se adicionó 150 µl de cloroformo, se mezcló por vortex y se centrifugó según las condiciones antes descritas, la fase acuosa se transfirió a un nuevo tubo y se adicionó 150 µl de isopropanol, se mezcló por vortex y se incubó por 10 minutos en hielo. Posteriormente se centrifugó a 13000 x g por 20 min y el sedimento obtenido se lavó con 500 µl de etanol 70% frío, luego se centrifugó por 5 min a 13000 x g, se eliminó el etanol y se dejó secar el sedimento al aire, el cual se resuspendió en 11 µl de agua libre de nucleasas.

Luego el RNA fue tratado con pirofosfatasa ácida de tabaco (TAP), para remover el CAP del RNA mensajero de longitud total, dejando un 5' monofosfato. Esta reacción consta de 5 µl RNA tratado con CIP, obtenido previamente, 1 µl 10 X TAP tampón, 2 µl pirofosfatasa ácida de tabaco y 2 µl de agua libre de nucleasas, esto se mezcla suavemente y se incuba a 37°C por 1 hora.

Posteriormente el oligonucleótido adaptador es ligado al mRNA obtenido el paso anterior, a través de la siguiente reacción: 2 µl RNA tratado con CIP/TAP, 1 µl 5'RACE adaptador, 1 µl 10 X tampón RNA ligasa, 2 µl T4 RNA ligasa (2,5 U/ µl), 4 µl de agua libre de nucleasas, esta mezcla de reacción se incubó por una hora a 37°C. Durante la reacción de ligación la mayoría de los RNA de longitud total capta la secuencia adaptadora en el 5' terminal.

Luego se realizó la transcripción reversa usando partidores decámeros aleatorios, para la síntesis de la primera hebra de cDNA, en una reacción que contenía 2 µl del RNA ligado al oligonucleótido adaptador, 4 µl dNTP mix, 2 µl de *Random decamers*, 2 µl 10 X RT *buffer*, 1 µl inhibidor RNAsa, 1 µl transcriptasa reversa M-MLV, 8 µl de agua libre de nucleasas, se mezcló suavemente y se incubó a 42°C por 1 hora.

El cDNA obtenido de esta manera fue utilizado para la amplificación del extremo 5' del factor de transcripción Rpx, a través de un PCR anidado. Para eso se utilizó el oligonucleótido antisentido diseñado a partir de la secuencia parcial de Rpx de carpa y los oligonucleótidos sentido del Kit.

3.2.6 Clonamiento de productos de PCR

3.2.6.1 Reacción de ligación del producto de PCR en un vector de DNA plasmidial

Los productos de PCR se ligaron al vector pGEMT-Easy (Promega) mediante la siguiente reacción recomendada por el fabricante, en un volumen final de 10 µl:

- 3 µl de producto de PCR
- 1 µl de vector pGEMT-Easy (50 ng/µl)
- 5 µl de 2 X tampon Ligasa
- 1 µl de enzima T4 DNA ligasa (3 U/µl)

Se incubó por 14 a 16 horas a 4°C para obtener una mayor eficiencia.

3.2.6.2 Preparación de células competentes JM109

A partir de una colonia aislada de la cepa JM109, se realizó un cultivo líquido en medio LB, incubando durante toda la noche a 37°C con agitación constante de 200 rpm. A partir de este

cultivo se tomo 100 μ l y se sembró en 10 ml de medio SOC, lo que se incubó a 37°C con agitación constante, hasta obtener una densidad óptica a 600 nm de 0,4-0,6, luego se ponen en hielo, para posteriormente ser centrifugadas a 245 x g por 12 minutos a 4°C. Se eliminó el sobrenadante y se resuspendió el sedimento en 10 ml de $MgCl_2$ 100 mM frío, y se volvió a centrifugar en las condiciones anteriormente mencionadas, ahora el sedimento se resuspende en 15 ml de $CaCl_2$ 100 mM previamente enfriado, se incuba durante 20 minutos en hielo, para luego repetir la centrifugación, el sedimento aquí obtenido se resuspende en 0,5 ml de $CaCl_2$ 100 mM. Las células se mantienen competentes de 3 a 5 días a 4°C

3.2.6.3 Transformación de células competentes

Para saber la eficiencia de transformación de las células competentes se realiza una transformación con 50 ng de DNA plasmidial sobre enrollado y 50 μ l de células competentes JM109 obtenidas en 3.2.6.2. Esta mezcla se incubó en hielo por 20 minutos, y luego se sometió a un shock térmico de 42°C por 50 segundos. Inmediatamente se pusieron en hielo por 2 minutos, y luego se agregó 700 μ l de medio SOC (Peptona 2%; extracto de levadura 0,5%; NaCl 10 mM; KCl 2,5 mM $MgCl_2$ 10 mM; glucosa 20 mM) preentibiado a 37°C, para así incubar con agitación constante de 150 r.p.m. a 37°C por 1,5 horas. Esta reacción se sembró en una placa de LB agar 100 μ g/ml de ampicilina y se incubó toda la noche a 37°C.

La eficiencia se obtiene por conteo de las colonias bacterianas que lograron crecer, lo que indica que tienen el plasmidio que confiere la resistencia a ampicilina.

Para realizar la transformación con el producto de ligación obtenido en 3.2.6.1, se utilizó 5 μ l de esta y 50 μ l de células competentes JM109 obtenidas en 3.2.6.2, se siguieron los pasos anteriormente descritos, hasta el momento de sembrar, en el cual se dividió en partes iguales el

medio SOC conteniendo las células transformadas, para sembrarlo en 2 placas de LB agar 100 µg/ml de ampicilina, las cuales fueron previamente impregnadas con 40 µl de X-gal al 5% y 4 µl de IPTG 50 mg/ml. Las placas se incubaron toda la noche a 37°C.

Como resultado se obtiene colonias de células bacterianas transformadas, de color blanco y azul, que fueron capaces de crecer por haber adquirido el plasmidio con resistencia a ampicilina. Las colonias blancas, son células bacterianas que en el plasmidio adquirido se incorporó un inserto de DNA que interrumpe el gen de la β galactosidasa, y las colonias azules no poseen inserto por lo que tienen la enzima β galactosidasa activa y logran metabolizar el X-gal.

3.2.6.4 Preparación de un stock de un cultivo bacteriano

A partir de una colonia bacteriana aislada se realiza un cultivo en el correspondiente medio líquido. En el caso de bacterias transformadas con el vector pGEMT-Easy recombinante se utiliza medio LB 50 µg/ml de ampicilina, se incuba a 37°C hasta obtener un cultivo con una densidad óptica a 600 nm de 0,4-0,8. Luego se sedimentan a 245 x g por 10 minutos, el sedimento se resuspende suavemente en 500 µl de una solución de: Tris-HCl 10 mM pH 8,0, y MgCl₂ 10 mM. Esta suspensión se pasa a un tubo Eppendorf estéril u otro similar, y se agrega glicerol estéril hasta llegar a una concentración de 10 a 50% glicerol, se mezcla bien, y se almacenan a -70°C hasta su utilización.

3.2.7 Análisis por hibridación *in situ*

Los procedimientos utilizados para el análisis por hibridación *in situ*, fueron extraídos de Figueroa et al., 1994.

3.2.7.1 Gelatinización de porta objetos

Para lograr una buena adhesión de los cortes histológicos se debió gelatinizar los portaobjetos, para lo cual se debió lavar con detergente y en forma minuciosa cada portaobjeto, realizando un primer enjuague con abundante agua destilada. Luego se pusieron en gradillas (canastillos) y se pasaron por agua destilada estéril, en sucesivas ocasiones y posteriormente se sumergieron en etanol 95° por 5 min y se dejaron secar al aire.

La gelatina se prepara en 500 ml de agua destilada estéril, y calentada a no más de 50°C, se agregó 2,5 g de gelatina y se agitó hasta disolución. Se dejó enfriar hasta al rededor de 30°C y se adicionó 0,25 g de sulfato de cromo y potasio.

Una vez disuelto se filtro en papel whatman 3MM y se esperó a que la solución llegara a temperatura ambiente, los canastillos se sumergen por 10 minutos a temperatura ambiente. Los canastillos se envolvieron en Alusa foil y se hornearon por una noche a 100°C

3.2.7.2 Preparación de cortes histológicos

Para la hibridación *in situ* las hipófisis fueron fijadas en paraformaldehído 4% en PBS 1 X por alrededor de 1 hora, y luego se realizaron los cortes histológicos de aproximadamente 10 µm de espesor, en criostato, los que se montaron en porta objetos de vidrio con una solución de gelatina como adhesivo. Los cortes fueron almacenados a -80°C.

3.2.7.3 Marcaje de oligonucleótidos para la hibridación *in situ*

Los oligonucleótidos se marcaron en el extremo 3' por la reacción de desoxirribonucleótido transferasa terminal (TdT), recomendada por el fabricante (Promega).

La reacción se realizó en un volumen final de 10 μ l, para lo cual se agregó 2,0 μ l de 5 X tampón de transferasa terminal, 1,0 μ l oligonucleótido específico 50 μ M, 0,5 μ l dATP 10 μ M, 1,5 μ l Dig-11-dUTP (1 nmol/ μ l), 2,0 μ l TdT (20 U/ μ l), y 3,0 μ l H₂O desionizada, logrando así concentraciones finales de: 1 X, 50 pM, 5 pM, 0,15 nmol/ μ l, 4 U/ μ l respectivamente. Se incubó por 1 hora a 37°C, y luego se puso en hielo. Se almacenó a -20°C.

3.2.7.4 Hibridación *in situ*

Se sacan los portaobjetos con los corte histológicos del Freezer -70°C y se llevan a temperatura ambiente por algunos minutos para que se sequen, lo que ayuda a una mejor fijación de los cortes al portaobjeto. Es importante marcar los portaobjetos con lápiz de diamante para saber la orientación de los cortes y definir la sonda a utilizar.

Una vez que se han secado los cortes se incuban con paraformaldehído 4% en PBS 1 X, previamente enfriado, por 5 minutos y en hielo. Tras esta incubación se realizan tres lavados de 5 min cada uno, con PBS 1 X frío, luego se sumergen en 2 X SSC, enfriado a 4°C.

La prehibridación se realiza en unas gotas sobre el corte, los cuales se mantienen en cámara húmeda durante una hora a temperatura ambiente, luego se descarta la solución de prehibridación, y es reemplazada por la solución de hibridación, (solución de prehibridación más la sonda utilizada en una dilución de 1:200), se incuba en cámara húmeda durante toda la noche a 37°C.

Al día siguiente se elimina la solución de hibridación y se ponen los cortes en un coplin para realizar lavados sucesivos, y con agitación suave, de 2 X SSC, durante 1 hora a temperatura ambiente, luego se cambia la solución por 1 X SSC y se mantienen las condiciones mencionadas,

el siguiente lavado es con 0,5 X SSC durante 30 min, y a 37°C, el cual se repite una vez pero a temperatura ambiente.

La detección inmunológica comienza con un lavado en solución 1 durante 1 minuto a temperatura ambiente, luego se incuba en solución 1 BSA-Triton X-100 durante 30 minutos a temperatura ambiente, posteriormente se elimina esta solución, para realizar la incubación en gotas sobre los cortes histológicos, con los anticuerpos antidigoxigenina-AP fragmento fab, diluidos 1:200 en solución BSA-Triton-X100, incubando en cámara húmeda de tres a cuatro horas a temperatura ambiente.

Transcurridas las 4 horas se realizó un lavado en coplin, con agitación constante durante 10 min a temperatura ambiente en solución 1, luego se cambió a solución 2 manteniendo las condiciones antes mencionadas, y luego se incubó en cámara húmeda con solución de revelado (225 µg/ml de NBT; 175 µg/ml BCIP, y 0,36 µg/ml levamisol, en solución 2), en relativa oscuridad por 20 minutos a 4 horas. El revelado se detuvo con solución 3.

Los cortes se deshidrataron en una serie de etanol en concentraciones creciente, 70%, 80%, 90%, 96% 100%-I, 100%-II, durante 30 segundos cada uno, y finalmente se pasaron por Xylol-I y Xylol-II 3 minutos cada uno. Una vez deshidratados se montaron en bálsamo de Canadá y se secaron a 37°C.

3.2.7.5 Análisis semicuantitativos de imágenes digitales

Las imágenes digitales de las hibridaciones *in situ* de cortes de hipófisis de carpa, aclimatizadas a la temporada de invierno o verano según corresponda, se procesaron computacionalmente a través del programa IMAGE-PRO PLUS 3.0, realizando así un análisis semicuantitativo de la intensidad de reacción obtenida en la hibridación *in situ*

El programa básicamente mide la densidad óptica integrada (IOD) restando el valor de la reacción de fondo, lo que permite estimar en forma idónea un valor en la reacción de hibridación.

Se seleccionaron varios campos de cada corte histológico, los valores obtenidos de la IOD de cada campo de un mismo corte fueron promediados, y posteriormente analizados por el programa Sigma-Plot, aplicando el test de student's t para conocer la significancia en las variaciones de las muestras obtenidas en la temporada de invierno con respecto a las de verano. Los datos se graficaron con el programa Sigma-Plot.

3.2.8 Análisis por Southern blot

Se realizaron digestiones de DNA genómico de distintos individuos, y se fraccionaron en un gel de agarosa al 1%, luego el DNA fue denaturado y posteriormente transferido, por capilaridad a una membrana de nitrocelulosa, la que fue hibridada con una sonda radiactiva.

3.2.8.1 Digestión de DNA genómico con enzimas de restricción

En las digestiones se utilizó entre 10 y 12 µg de DNA genómico de diferentes individuos, 3 µl de 10 X tampón React 2, 1 µl de enzima *HindIII* (10 U/µl), y agua desionizada estéril para completar a 30 µl, obteniendo concentraciones finales de 0,36 µg/µl, 1 X (50 mM Tris HCl pH 8,0, 10 mM MgCl₂, 100 mM NaCl) y 0,33 U/µl respectivamente. Esta mezcla se incubó a 37°C por toda la noche.

3.2.8.2 Fraccionamiento en gel de agarosa

Para separar los fragmentos de DNA se utilizó un gel de agarosa al 1%. El tampón utilizado par la preparación del gel fue TAE 1 X, en el cual se fundió la agarosa a 70°C aproximadamente, luego se puso en el molde del gel. Una vez realizada la gelificación, se procedió a cargar, utilizando 6 µl de tampón de carga y 30 µl de la digestión de DNA genómico. El fraccionamiento electroforético se realizó a 30 mA, durante 2 horas, en tampón TAE 1 X. Una vez finalizada la electroforesis se visualizó el DNA por exposición a luz U.V.

Para estimar los tamaños de los fragmentos de DNA separados en el gel de agarosa, se utilizó un estándar de tamaño molecular, DNA λ HindIII que se corrió paralelamente con el DNA a visualizar.

3.2.8.3 Transferencia a una membrana de nitrocelulosa

Una vez digerido el DNA genómico y fraccionado en un gel de agarosa, se transfirió a una membrana de nitrocelulosa siguiendo la metodología descrita originalmente por Southern en 1975 y modificada por Sambrook, 1989.

El gel se sumergió en HCl 0,25 N por 10 minutos, para generar “nick” en el DNA, por una breve depurinación y así facilitar la transferencia de este a la membrana de nitrocelulosa, luego se pasó una vez por agua destilada, y se lavó con agitación constante tres veces en solución denaturante (1,5 M NaCl, 0,5 M NaOH), por 10 min cada vez.

Se pasó el gel por agua destilada y luego se lavó con agitación constante en varios volúmenes de solución neutralizante (Tris-HCl 1 M pH 7,4, NaCl 1,5 M), por 30 minutos. Luego se montó la transferencia de la siguiente manera: Se tiene una bandeja que contiene la solución de

transferencia (20 X SSC), dentro de la cual se pone un soporte, el que sostiene un vidrio de un tamaño similar al del gel, el cual no debe entrar en contacto directo con la solución de transferencia. Sobre el vidrio se pone una tira de papel filtro embebida en la solución de transferencia, la cual debe ser del ancho del gel y lo suficientemente larga como para que sus extremos toquen la solución de la bandeja. Sobre él se colocó el gel invertido y marcado en uno de sus extremos para conocer la orientación de este. A continuación se colocó una membrana de nitrocelulosa del mismo tamaño que el gel, la cual se marcó en el mismo extremo del gel, luego se pusieron dos papeles filtros del mismo tamaño de la membrana de nitrocelulosa. Tanto la membrana como el papel filtro fueron previamente embebidos en 20 X SSC. Finalmente se colocó una pila de papel absorbente de las mismas dimensiones del gel, sobre la cual se puso un peso para comprimir dicha pila con la finalidad de lograr una transferencia del DNA desde el gel a la membrana de nitrocelulosa por capilaridad. Este proceso toma varias horas por lo que deja durante toda la noche.

Una vez que se desmonta la transferencia se marcan los pocillos del gel en la membrana de nitrocelulosa, luego se retira el exceso de sal lavándola en 2 X SSC por 10 minutos con agitación constante. Esta membrana se pone entre medio de papel filtro y se calienta a 80°C por dos horas en un sistema de vacío, lográndose así la fijación del DNA.

3.2.8.4 Purificación de fragmentos de DNA desde geles de agarosa

La purificación de DNA desde geles de agarosa se realizó con “The gene clean kit BIO 101 Inc”, siguiendo las instrucciones del Kit.

Luego de realizar el fraccionamiento en un gel de agarosa se visualizó el fragmento de

DNA por exposición a luz U.V. en un transiluminador, se cortó la banda deseada y se pesó. Se agregaron 3 volúmenes de NaI 6 M y se incubó a 55°C por 10 minutos para lograr una disolución total de la agarosa. Para captar el ácido nucleico se agregó 5 µl de glass milk y se mezcló, se incubó por 10 min a temperatura ambiente. Se centrifugó a 10000 x g por 10 segundos, el sedimento se resuspendió en 500 µl de solución de lavado (almacenada a -20°C), repitiendo la centrifugación antes descrita, se elimina el sobrenadante y se hace un “Spin Down”, para extraer el máximo de volumen, y se dejó secar el sedimento al aire por 5 a 10 minutos.

Una vez seco el sedimento, se agregó 10 µl de agua desionizada y estéril, y se calentó a 55°C por 10 minutos, para permitir la elución del DNA, se centrifugó a 10000 x g por 30 segundos y inmediatamente se recuperó el sobrenadante que contiene el DNA, el cual fue utilizado para la generación de una sonda radioactiva.

3.2.8.5 Marcaje radiactivo de un fragmento de DNA, por el método de partidores aleatorios.

El DNA que fue marcado radiactivamente, se obtuvo por la reacción en cadena de la polimerasa, en la cual se usó como templado una dilución del clon plasmidial pcPtx2-7, cuyo producto de amplificación es de 441 pb, el cual se fraccionó en un gel de agarosa al 1%, y se visualizó por tinción con bromuro de etidio y exposición a luz U.V. en un transiluminador, lo que permitió el aislamiento de la banda desde el gel, por el Kit The GENE CLEAN.

Una vez realizado este proceso se marco radiactivamente el DNA con el Kit Prime-a-Gene Labeling System (Promega), el cual se basa en la utilización de partidores hexameros aleatorios, y del fragmento *Klenow*, de la DNA polimerasa 1, en presencia de los 4

desoxinucleotidos trifosfatos, uno de los cuales está marcado radiactivamente con fósforo ^{32}P (α - ^{32}P -dCTP).

La reacción se realizó en un volumen de 50 μl , conteniendo 25 ng de DNA templado, denaturado a 95°C por 3 minutos, luego se pone en hielo, y se agrega el tampón de marcaje a 1 X, (0,2 M HEPES pH 6,6, 50 nM Tris-HCl pH 8,0, 5 mM MgCl_2 , 2 mM DTT, 5,2 A_{260} u/ml partidores aleatorios hexadesoxirribonucleotidos), dATP, dTTP, dGTP, no marcados a 20 μM cada uno, BSA libre de nucleasas a 400 $\mu\text{g/ml}$, 5 U de DNA polimeras1 fragmento *Klenow*, y 5 μl de α - ^{32}P -dCTP 3000 Ci/mmol, 10 mCi/ml. Se incubó a 25°C por 60 min. La reacción se detuvo, calentando a 95°C por 2 min, y luego se puso en hielo y se agregó EDTA pH 8,0 a 20 mM. La sonda es almacenada a -20°C hasta su utilización.

3.2.8.6 Medición de la incorporación de radiactividad en la sonda.

La incorporación del nucleótido marcado en la sonda se cuantificó por cuentas precipitables, usando para ello el método de precipitación con TCA, según Sambrook et al. (1989)

Una alícuota (1 μl) de la reacción de marcaje se diluyó 100 veces en agua destilada, a lo cual se le agregó a 5 ml de TCA 10% frío y 1 μg de DNA de espermio de salmón, usado como coprecipitador. Se incubó en hielo por 15 min y se filtró en una membrana de 0,2 μm , la cual se lavó tres veces con la misma solución de TCA frío, luego una vez con etanol 70% frío y por ultimo se dejó secar. El filtro se puso en un vial con 3,5 ml de solución de centelleo (4 g/l PPO y 0,1 g/l POPOP en tolueno), posteriormente esta mezcla se cuantificó en un contador de centelleo Packar Tri-Carb 1600TR.

Como control se cuantificó la cantidad total de nucleótidos marcados en el ensayo, aplicando 1 µl de la reacción directamente al filtro. La muestra se secó al aire y se analizó en paralelo.

3.2.8.7 Hibridación con una sonda radiactiva

Para prevenir la hibridación inespecífica, se realiza un bloqueo de la membrana que consiste en la prehibridación, la cual se inicia sumergiendo la membrana de nitrocelulosa en una solución de 6 X SSC por 5 minutos, luego se coloca la membrana en una bolsa de hibridación y se agrega por una esquina la solución de prehibridación, (6 X SSC, 5 X reactivo de Denhardt's, 0,5% SDS, 50% formamida, 100 µg/ml DNA de espermio de salmón, fragmentado y denaturado) alrededor de 200 µl por centímetro cuadrado de membrana de nitrocelulosa (similar a 3 ml), se sella la bolsa eliminando el máximo de burbujas, para asegurar que la membrana este constantemente en contacto con la solución y se incuba a 42°C en un horno de hibridación por 2 a 3 horas.

Una vez transcurrido este tiempo se elimina la solución de prehibridación y se reemplaza por 200 µl/cm² de solución de hibridación, que es la misma solución de prehibridación, a la cual se le agrega la sonda radiactiva, previamente denaturada a 100°C por 5 minutos y puesta en hielo inmediatamente. En general se usó aproximadamente 1x10⁶ cpm/ml de solución de hibridación. Se incubó a 42°C en el horno de hibridación por toda la noche. Luego se recuperó la solución de hibridación, y la membrana se pasó a una bandeja donde se realizaron los siguientes lavados, con agitación constante, para eliminar el exceso de sonda radiactiva e hibridación inespecífica:

- 2 X SSC y 0,5% SDS, por 5 minutos a TA.

- 2 X SSC y 0,1% SDS, por 5 minutos a 42°C.
- 2 X SSC y 0,1% SDS, por 10 minutos a 42°C.
- 1 X SSC y 0,1% SDS, por 15 minutos a 42°C.
- 0,5 X SSC y 0,1% SDS, por 15 minutos a 42°C.

Luego la membrana se pone entre papel filtro para eliminar el exceso de líquido y se envuelve en Europlast, sellando los bordes, para evitar el contacto directo entre la membrana y el equipo en que se expone a revelar.

El revelado se lleva a cabo por exposición de la membrana en el Molecular imager FX System, (BioRad), durante 16 a 20 horas.

3.2.9 Análisis de secuencias con programas de libre acceso

Con la finalidad de clonar *in silico* el gen de Ptx2 de *Danio rerio* y de diseñar oligonucleótidos para Ptx2 y Rpx se utilizaron diversos programas de libre acceso, como son:

- <http://www.sanger.ac.uk>, del cual se obtuvieron secuencias genómicas de *Danio rerio*.
- <http://www.ebi.ac.uk/clustalw>, utilizado para realizar múltiples alineamientos de secuencias.
- <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>, utilizado para la obtención de secuencias de cDNA del banco de datos GenBank
- <http://tools.neb.com/NEBcutter2>, utilizado para el análisis de restricción de diversas secuencias.
- http://frodo.wi.mit.edu/cgi-bin/primer3/primer3_www.cgi, utilizado para el diseño de oligonucleótidos.

- <http://searchlauncher.bcm.tmc.edu>, utilizado para la obtención de secuencias reversas complementarias, análisis de restricción, alineamientos múltiples y determinación de los seis posibles marcos de lectura.
- <http://www.cbil.upenn.edu/tess>, utilizado para predecir sitios de unión de factores de transcripción en secuencias de DNA.
- <http://www-bimas.cit.nih.gov/molbio/proscan>, utilizado para predecir regiones promotoras.

4 RESULTADOS

4.1 Ptx2 de *Cyprinus carpio*

4.1.4 Secuencias de Ptx2 de *Cyprinus carpio* y análisis comparativo con *Danio rerio*

Para el diseño de los oligonucleótidos se realizó un análisis de alineamiento entre distintas secuencias de especies relacionadas, donde se obtuvieron las regiones conservadas, las cuales se eligieron en el diseño de los oligonucleótidos usando como patrón la secuencia de *Danio rerio*, debido a su gran homología con las secuencias de *C. carpio* (Fig. 2).

La temperatura de fusión (T_m) de cada oligonucleótido se calculó en base a la regla de Wallace, que está dada por: $T_m = 2(A+T) + 4(G+C)$, donde G, C, A, T, son el número de los correspondientes nucleótidos en el partidor (Sambrook et al., 1987; Tabla. 1).

El alineamiento de las secuencias de cDNA en la región codificante, de varias especies e isoformas, mostró una gran variabilidad en la región 5', probablemente por eso no fue posible amplificar con el oligonucleótido zPtx2-1s, en ninguna de las posibles combinaciones con los oligonucleótidos con que se contaba (Fig. 2). La región más conservada de Ptx2 se ubica hacia la región 3' (Fig. 2), en la cual se logró obtener productos de amplificación al utilizar los oligonucleótidos en las distintas combinaciones, varios fragmentos fueron clonados y secuenciados (Fig. 3).

En un primer acercamiento se utilizaron los oligonucleótidos degenerados, Ptx2-s y Ptx3-a, diseñados a partir de una región conservada entre los distintos miembros de la familia Ptx2. Con estos oligonucleótidos se amplificó un fragmento del tamaño esperado de 441 pb en cDNA de hipófisis de *C. carpio* (Fig. 4, A). El producto de amplificación fue clonado en el vector

```

Var 1 mus      CTGGGAAGCGGTGGGACGGGGAGACAGCCGTTCTCTCTCCGGTAGCCGATAACCGGGAAT 251
Var 2 mus      CTGGGAAGCGGTGGGACGGGGAGACAGCCGTTCTCTCTCCGGTAGCCGATAACCGGGAAT 257
Var 2 homo     CCGGGAAGCAGTGGGACGCGGAGACAGCAGCTCTCTC-CCGGTAGCCGATAACCGGGAAT 584
Var 1 homo     CCGGGAAGCAGTGGGACGCGGAGACAGCAGCTCTCTC-CCGGTAGCCGATAACCGGGAAT 584
Var 2 rattus   CTGGGAAGCGGTGGGACGGGGAGACAGCCGTTCTCTC--TGGTAGCCGATAACCGGGAAT 210
Var 1 rattus   TCGTCCATGAACTGCATGAAAGGCCCGCTGCCCTTGG--AGCACCGAGCAGCCGGGACT 399
Var 3 mus      TCGTCCATGAACTGCATGAAAGGCCCGCTGCCCTTGG--AGCACCGAGCAGCCGGGACT 691
Iso C danio    TTATCCATGACCTCTATGAAGGATCCGTTGAGTTTGG---ACCACCATCATACAATCA 425
Iso a danio    TTTTTCAGAG-----GTGTGGAATTTATCTTTTTTAA---AGAGAGAAAATCAAGACTG 310
                *           *           *           *           *

```

```

Var 1 mus      GGAGACCAATTGTCGCAAACTAGTGTGCGCCTGCGTGCAATTAG----- 295
Var 2 mus      GGAGACCAATTGTCGCAAACTAGTGTGCGCCTGCGTGCAATTAGGCGTGACGCCGGCAGC 317
Var 2 homo     GGAGACCAACTGCCGCAAACTGGTGTGCGCGTGTGTGCAATTAGGCGTGACGCCGGCAGC 644
Var 1 homo     GGAGACCAACTGCCGCAAACTGGTGTGCGCGTGTGTGCAATTAG----- 628
Var 2 rattus   GGAGACCAATTGTCGCAAACTAGTGTGCGCCTGCGTGCAATTAG----- 254
Var 1 rattus   --AAGCTGTGCGCCGCTTCTCACCCTTCTGTCAACATACCCAGGCGTTAGCCATGGCTT 457
Var 3 mus      --AAGCTGTGCGCCGCTTCTCACCCTTCTGTCAACATCCCCAGGCGTTAGCCATGGCTT 749
Iso C danio    CCACGTTACCGGGAGTAAACACGCGCCGCTTTCGATGGCCTCTAGTCTGCAACCGCTT-- 483
Iso a danio    GCACG--GCTGCAAAGCAACGC-----TTTTCAACAACCACTGGTAAACAACATATA-- 360
                *           *           *

```

```

Var 1 mus      -----
Var 2 mus      CGTTGAATGTCTCTTCTCCAAAGACTCCGAAATCAAAAAGGTCGAGTTCACGGACTCTCC 377
Var 2 homo     CGTTGAATGTCTCTTCTCCAAAGACTCCGAAATCAAAAAGGTCGAGTTCACGGACTCTCC 704
Var 1 homo     -----
Var 2 rattus   -----
Var 1 rattus   CGGTCTAGCTCCTGGTC-----AGCCCCGCTCCCTGGACGCCTC 497
Var 3 mus      CGGTCTAGCTCCTGGCC-----AGCCCCGCTCCTTGGACTCCTC 789
Iso C danio    -----CAGCGGTCTGTGGAC--TC 500
Iso a danio    -----ACCTACTAAATGAGAC--TC 377

```

```

Var 1 mus      -----
Var 2 mus      CAAGAGCCGGAAGAGTTCGGCCAGCAGCAAGCTGTTCCCGCGGCAGCACCCCGGCCCAA 437
Var 2 homo     TGAGAGCCGAAAAGAGGCAGCCAGCAGCAAGTTCTTCCCGCGGCAGCATCCTGGCGCCAA 764
Var 1 homo     -----
Var 2 rattus   -----
Var 1 rattus   CAAACATAGACTGGAGGTGC-----ATACAATCTCCGATACGTCCAGCCCTGAAGTCGC 551
Var 3 mus      CAAACATAGACTGGAGGTGC-----ATACAATCTCCGATACTTCCAGCCCTGAAGTCGC 843
Iso C danio    GAAACACAGGCTGGATGTGC-----ACACGGTTTCAGACACCTCCAGTCCAGAGTCCGT 554
Iso a danio    CCACTGCCG--CAAACCTTGC-----A-----TCAACGTGTGCTCAAT-----T 413

```

```

Var 1 mus      --AGAAAGATAAGGGCCAGCAAGGAAAGAATGAGGATGTGGGCGCCGAGGACCCGTCCAA 353
Var 2 mus      TGAGAAAGATAAGGGCCAGCAAGGAAAGAATGAGGATGTGGGCGCCGAGGACCCGTCCAA 497
Var 2 homo     TGAGAAAGATAAAAGCCAGCAGGGGAAGAATGAGGACGTGGGCGCCGAGGACCCGTCTAA 824
Var 1 homo     --AGAAAGATAAAAGCCAGCAGGGGAAGAATGAGGACGTGGGCGCCGAGGACCCGTCTAA 686
Var 2 rattus   --AGAAAGATAAGGGCCAGCAGGGGAAGAATGAGGATGTGGGCGCAGAGGACCCGTCCAA 312
Var 1 rattus   AGAGAAAGATAAGGGCCAGCAGGGGAAGAATGAGGATGTGGGCGCAGAGGACCCGTCCAA 611
Var 3 mus      AGAGAAAGATAAGGGCCAGCAAGGAAAGAATGAGGATGTGGGCGCCGAGGACCCGTCCAA 903
Iso C danio    AGAGAAAGAAAAGGG--ACAAAGTAAAAACGAAGATTCAACG--ATGACCCGTGCGAA 608
Iso a danio    AGAGAAAGAAAAGGG--ACAAAGTAAAAACGAAGATTCAACG--ATGACCCGTGCGAA 467
                * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *

```

Var 1	mus	CGGGCTCATGCAGCCCTACGATGACATGTACCCGGCTATTCTGACAACAATTGGGCTGC	653	
Var 2	mus	CGGGCTCATGCAGCCCTACGATGACATGTACCCGGCTATTCTGACAACAATTGGGCTGC	797	
Var 2	homo	TGGGCTCATGCAGCCCTACGACGACATGTACCCAGGCTATTCTACACAACCTGGGCCGC	1124	
Var 1	homo	TGGGCTCATGCAGCCCTACGACGACATGTACCCAGGCTATTCTACACAACCTGGGCCGC	986	
Var 2	rattus	TGGGCTCATGCAGCCGTCAGATGACATGTACCCGGCTACTCGTACAACAATTGGGCTGC	612	
Var 1	rattus	TGGGCTCATGCAGCCGTCAGATGACATGTACCCGGCTACTCGTACAACAATTGGGCTGC	911	
Var 3	mus	CGGGCTCATGCAGCCCTACGATGACATGTACCCGGCTATTCTGACAACAATTGGGCTGC	1203	
Iso C	danio	CGGACTTATGCAGCCCTACGATGACATGTATCCAGCTATACGTACAACAACCTGGGCTGC	908	
Iso a	danio	CGGACTTATGCAGCCCTACGATGACATGTATCCAGCTATACGTACAACAACCTGGGCTGC	767	Ptx2-1s


```

Var 1 mus      CAAGGGCCTCACGTCAGCGTCTCTGTCCACCAAGAGCTTCCCCTTCTTCAACTCCATGAA 713
Var 2 mus      CAAGGGCCTCACGTCAGCGTCTCTGTCCACCAAGAGCTTCCCCTTCTTCAACTCCATGAA 857
Var 2 homo     CAAGGGCCTTACATCCGCTCCCTATCCACCAAGAGCTTCCCCTTCTTCAACTCTATGAA 1184
Var 1 homo     CAAGGGCCTTACATCCGCTCCCTATCCACCAAGAGCTTCCCCTTCTTCAACTCTATGAA 1046
Var 2 rattus   CAAGGGCCTCACGTCAGCGTCTCTGTCCACCAAGAGCTTCCCCTTCTTCAACTCTATGAA 672
Var 1 rattus   CAAGGGCCTCACGTCAGCGTCTCTGTCCACCAAGAGCTTCCCCTTCTTCAACTCTATGAA 971
Var 3 mus      CAAGGGCCTCACGTCAGCGTCTCTGTCCACCAAGAGCTTCCCCTTCTTCAACTCCATGAA 1263
Iso C danio    AAAGGGACTCACGTCGGCCTCTCTGTCTACCAAAAGCTTTCCCTTTTTCAATTCCATGAA 968
Iso a danio    AAAGGGACTCACGTCGGCCTCTCTGTCTACCAAAAGCTTTCCCTTTTTCAATTCCATGAA 827
                *****

Var 1 mus      CGTCAATCCCCTGTCCTCTCAGAGTATGTTTTCCCGGCCAACTCCATCTCATCTATGAG 773
Var 2 mus      CGTCAATCCCCTGTCCTCTCAGAGTATGTTTTCCCGGCCAACTCCATCTCATCTATGAG 917
Var 2 homo     CGTCAACCCCCTGTCATCACAGAGCATGTTTTCCCGGCCAACTCTATCTCGTCCATGAG 1244
Var 1 homo     CGTCAACCCCCTGTCATCACAGAGCATGTTTTCCCGGCCAACTCTATCTCGTCCATGAG 1106
Var 2 rattus   CGTCAATCCCCTATCCTCCCAGAGCATGTTTTCCCGGCCAACTCCATCTCATCCATGAG 732
Var 1 rattus   CGTCAATCCCCTATCCTCCCAGAGCATGTTTTCCCGGCCAACTCCATCTCATCCATGAG 1031
Var 3 mus      CGTCAATCCCCTGTCCTCTCAGAGTATGTTTTCCCGGCCAACTCCATCTCATCTATGAG 1323
Iso C danio    TGTCATCCGCTGTCGTCCCAGACCATGTTCTCCACCTAACTCTATCTCTTCAATGAG 1028
Iso a danio    TGTCATCCGCTGTCGTCCCAGACCATGTTCTCCACCTAACTCTATCTCTTCAATGAG 887
                *****

Var 1 mus      TATGTCGTCCAGCATGGTGCCCTCCGCGGTGACCGGCGTCCCGGGCTCCAGCCTCAATAG 833
Var 2 mus      TATGTCGTCCAGCATGGTGCCCTCCGCGGTGACCGGCGTCCCGGGCTCCAGCCTCAATAG 977
Var 2 homo     CATGTCGTCCAGCATGGTGCCCTCAGCAGTGACAGGCGTCCCGGGCTCCAGTCTCAACAG 1304
Var 1 homo     CATGTCGTCCAGCATGGTGCCCTCAGCAGTGACAGGCGTCCCGGGCTCCAGTCTCAACAG 1166
Var 2 rattus   TATGTCGTCCAGCATGGTGCCGTCCGCGGTGACCGGCGTCCCGGGCTCCAGCCTCAATAG 792
Var 1 rattus   TATGTCGTCCAGCATGGTGCCGTCCGCGGTGACCGGCGTCCCGGGCTCCAGCCTCAATAG 1091
Var 3 mus      TATGTCGTCCAGCATGGTGCCCTCCGCGGTGACCGGCGTCCCGGGCTCCAGCCTCAATAG 1383
Iso C danio    CATGTCCTCCAGTATGGTTCCGTCTGCTGTACCAGGTGTACCAGGATCAAGTTAAACAG 1088
Iso a danio    CATGTCCTCCAGTATGGTTCCGTCTGCTGTACCAGGTGTACCAGGATCAAGTTAAACAG 947
                *****

Var 1 mus      CCTGAATAACTTGAACAACCTGAGCAGCCCCTCGCTGAATTCGCGGTGCCACGCCCGC 893
Var 2 mus      CCTGAATAACTTGAACAACCTGAGCAGCCCCTCGCTGAATTCGCGGTGCCACGCCCGC 1037
Var 2 homo     CCTGAATAACTTGAACAACCTGAGTAGCCCCTCGCTGAATTCGCGGTGCCAGCCTGC 1364
Var 1 homo     CCTGAATAACTTGAACAACCTGAGTAGCCCCTCGCTGAATTCGCGGTGCCAGCCTGC 1226
Var 2 rattus   CCTGAATAACTTGAACAACCTGAGCAGCCCCTCGCTGAATTCGCGGTGCCACGCCCGC 852
Var 1 rattus   CCTGAATAACTTGAACAACCTGAGCAGCCCCTCGCTGAATTCGCGGTGCCACGCCCGC 1151
Var 3 mus      CCTGAATAACTTGAACAACCTGAGCAGCCCCTCGCTGAATTCGCGGTGCCACGCCCGC 1443
Iso C danio    CCTCAATAACTTGAATAACCTCAGCAACCCCTCTCTAAATTCGGGGGTTCCACGCCCGC 1148
Iso a danio    CCTCAATAACTTGAATAACCTCAGCAACCCCTCTCTAAATTCGGGGGTTCCACGCCCGC 1007 Ptx2-2a
                *** *****

Var 1 mus      CTGTCCTTACGCGCCGCCGACTCCTCCGTACGTTTATAGGGACACATGTAACTCGAGCCT 953
Var 2 mus      CTGTCCTTACGCGCCGCCGACTCCTCCGTACGTTTATAGGGACACATGTAACTCGAGCCT 1097
Var 2 homo     CTGTCCTTACGCGCCGCCGACTCCTCCGTATGTTTATAGGGACACGTGTAACTCGAGCCT 1424
Var 1 homo     CTGTCCTTACGCGCCGCCGACTCCTCCGTATGTTTATAGGGACACGTGTAACTCGAGCCT 1286
Var 2 rattus   CTGTCCTTACGCGCCGCCGACTCCTCCGTACGTTTATAGGGACACATGTAACTCGAGCCT 912
Var 1 rattus   CTGTCCTTACGCGCCGCCGACTCCTCCGTACGTTTATAGGGACACATGTAACTCGAGCCT 1211
Var 3 mus      CTGTCCTTACGCGCCGCCGACTCCTCCGTACGTTTATAGGGACACATGTAACTCGAGCCT 1503
Iso C danio    GTGCCCTTACGCCCCACCGACGCTCCGTATGTTTACCGGGACACTTGTAACCTCCAGTCT 1208 Ptx2-8s
Iso a danio    GTGCCCTTACGCCCCACCGACGCTCCGTATGTTCACCGGGACACTTGTAACTCCAGTCT 1067 N°7
                * *****

```

```

Var 1 mus      GGCCAGCCTGAGACTGAAAGCAAAGCAGCACTCCAGCTTCGGCTACGCCAGCGTGCAGAA 1013
Var 2 mus      GGCCAGCCTGAGACTGAAAGCAAAGCAGCACTCCAGCTTCGGCTACGCCAGCGTGCAGAA 1157
Var 2 homo     GGCCAGCCTGAGACTGAAAGCAAAGCAGCACTCCAGCTTCGGCTACGCCAGCGTGCAGAA 1484
Var 1 homo     GGCCAGCCTGAGACTGAAAGCAAAGCAGCACTCCAGCTTCGGCTACGCCAGCGTGCAGAA 1346
Var 2 rattus   GGCCAGTCTGAGACTAAAAGCAAAGCAACACTCCAGCTTCGGCTACGCCAGCGTGCAGAA 972
Var 1 rattus   GGCCAGTCTGAGACTAAAAGCAAAGCAACACTCCAGCTTCGGCTACGCCAGCGTGCAGAA 1271
Var 3 mus      GGCCAGCCTGAGACTGAAAGCAAAGCAGCACTCCAGCTTCGGCTACGCCAGCGTGCAGAA 1563
Iso C danio    TGCAGTCTGAGACTGAAAGCCAAAGCAACACTCGAGTTTTGGATACGCGAGCGTGCAGAA 1268
Iso a danio    TGCCAGTCTGAGACTGAAAGCCAAGCAACACTCGAGTTTTGGATACGCGAGCGTGCAGAA 1127 Ptx2-9s
                *****
                *****

Var 1 mus      CCCGGCCTCCAACCTGAGTGCTTGCCAGTATGCAGTCGACCGGCCGGTGTAACCGCGCC 1073
Var 2 mus      CCCGGCCTCCAACCTGAGTGCTTGCCAGTATGCAGTCGACCGGCCGGTGTAACCGCGCC 1217
Var 2 homo     CCCGGCCTCCAACCTGAGTGCTTGCCAGTATGCAGTGGACCGGCCCGGTGTGAGCCGCACC 1544
Var 1 homo     CCCGGCCTCCAACCTGAGTGCTTGCCAGTATGCAGTGGACCGGCCCGGTGTGAGCCGCACC 1406
Var 2 rattus   CCCGGCCTCCAACCTGAGCGCTTGCCAGTATGCGGTGCGACCGGCCGGTGTAACCGCGCC 1032
Var 1 rattus   CCCGGCCTCCAACCTGAGCGCTTGCCAGTATGCGGTGCGACCGGCCGGTGTAACCGCGCC 1331
Var 3 mus      CCCGGCCTCCAACCTGAGTGCTTGCCAGTATGCAGTCGACCGGCCGGGTGTGTAACCGCGCC 1623
Iso C danio    TCCGGCCTCCAATCTCAGCGCCTGCCAGTACGAGTGGATAGACCGGTGTAAAGAGACGAC 1328
Iso a danio    TCCGGCCTCCAATCTCAGCGCCTGCCAGTACGAGTGGATAGACCGGTGTAAAGAGACGAC 1187 Ptx2-4a
                *****
                *****

```

FIGURA 2: Alineamiento de secuencias en la región codificante de cDNA de distintas isoformas Ptx2. Destacado en calipso el codon de inicio y termino. En verde y amarillo se destaca la ubicación de los oligonucleótidos diseñados para amplificar Ptx2 de carpa. “*” indica nucleótidos idénticos. Var: Variante; Iso: Isoforma; mus: *Mus musculus*; homo: *Homo sapiens*; rattus: *Rattus norvegicus*; danio: *Danio rerio*; entre paréntesis numero acceso GenBank.

Variante 1 *Mus musculus* (NM_001042504)

Variante 2 *Mus musculus* (NM_011098)

Variante 3 *Mus musculus* (NM_001042502)

Variante 1 *Homo sapiens* (NM_153427)

Variante 2 *Homo sapiens* (MN_153426)

Variante 1 *Rattus norvegicus* (NM_00104250)

Variante 2 *Rattus norvegicus* (NM_019334)

Isoforma a *Danio rerio* (AF156906)

Isoforma c *Danio rerio* (AF132446)

Nombre	Secuencia del oligonucleótido	pb	% (G+C)	Tm
OligoPtx2-s	5'-TGGTTCAAGAAYCGNCGRGCMAARTGG-3',	27	nd	nd
Oligo Ptx3-a	5'-GTTACAHGTGTCCCKRTARAC-3'	21	nd	nd
Oligo dT anclador	5'-AGAGTGGTAACAACCTTTTTTTTTTTTTTTTTT TTTVV-3',	37	nd	nd
Oligo zPtx1-1s	5'-GAAATGGACTCCCACTGCCGC-3'	21	62	68°C
Oligo Ptx2-1s	5'-NGCCCTACGATGACATGTATC-3'	21	50	63°C
Oligo cPtx2-8s	5'-CTTGTAACCTCCAGTCTTGC-3'	19	47	56°C
Oligo cPtx2-9s	5'-GCGTGCAGAATCCGGCCTCC-3'	20	70	68°C
Oligo zPtx2-4a	5'-TCTTACACCGGTCTATCCAC-3'	20	50	60°C
Oligo cPtx2-5a	5'-TCGTAGGGCTGCATAAGTCC-3'	20	55	62°C
Oligo Ptx2-2a	5'-NCGAATTTAGAGAGGGGTTGC-3'	21	50	63°C

TABLA N°1: Oligonucleótidos para caracterizar secuencias Ptx2. nd: no determinado; **V**: puede ser A, C, o G; **Y**: T o C; **R**: G o A; **H**: A, C o T; **K**: G o T; **N**: C, G, T o A.

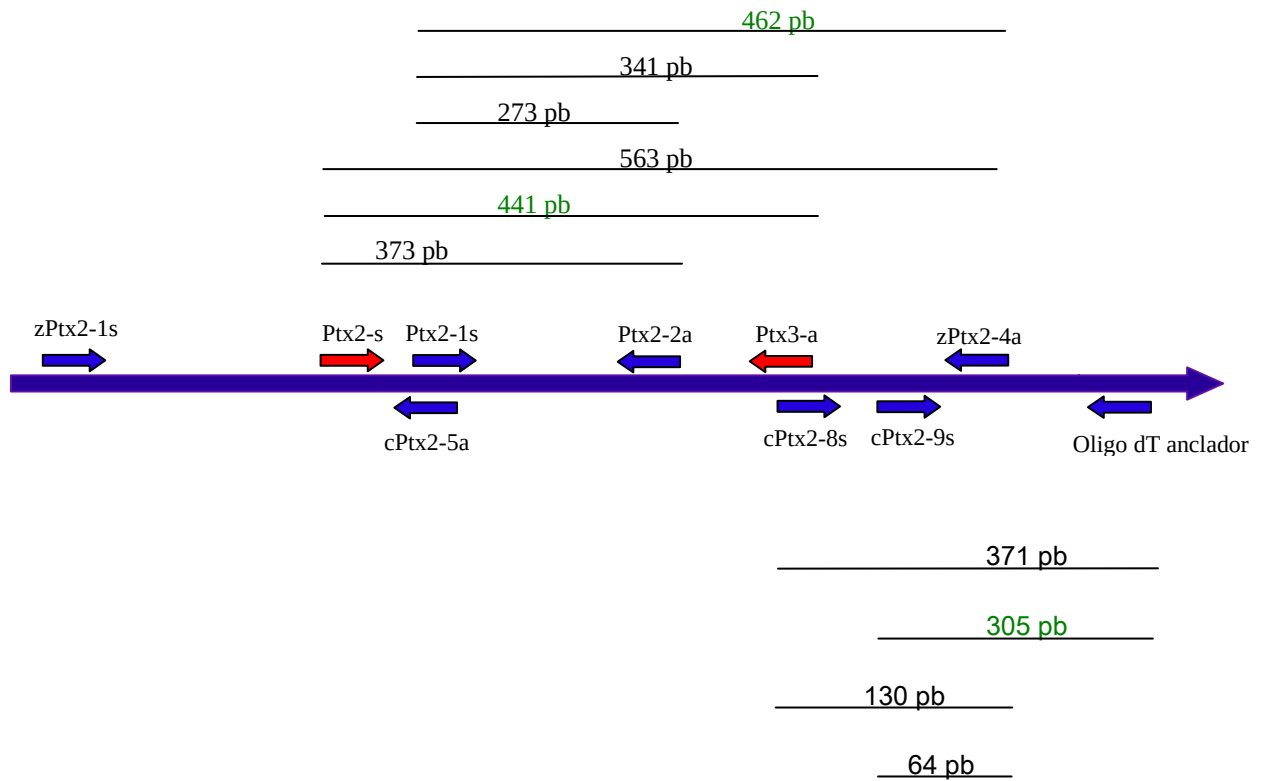


FIGURA 3: Esquema del diseño de oligonucleótidos para amplificar secuencias Ptx2. Las flechas indican la ubicación de los partidores en la secuencia de Ptx2, las líneas y los números indican tamaños esperados en una amplificación por PCR en cDNA de hipófisis de *C. carpio*. Las flechas rojas indican la ubicación de los oligonucleótidos degenerados, los números en verde los productos de amplificación secuenciados.

pGEMT-Easy y la secuencia confirmó que corresponde a Ptx2 de *C. carpio* (Anexo 7.1).

Los oligonucleótidos internos Ptx2-1s y zPtx2-4a que abarca el sector 3' codificante, amplificaron un fragmento de 462 pb. Para esta pareja de oligonucleótidos se optimizó la temperatura de apareamiento (Fig. 4, B). Debido a que en todas las temperaturas de reasociación elegidas se logró una amplificación de una sola banda, sin amplificación inespecífica aparente. Se eligió entre los tres carriles con mayor intensidad de banda (Fig. 4, B, carriles 5, 6, 7) el DNA correspondiente al carril 7, el cual tenía una temperatura de reasociación más alta, de 59,1°C, para ser clonado en pGEMT-Easy y secuenciado el DNA del clon pcPtx2-23 (Anexo 7.2).

Para lograr una amplificación de la región 3' no codificante fue necesario preparar un cDNA, utilizando el oligonucleótido dT-anclador, para su síntesis. La región 3' no codificante se obtuvo en dos rondas de amplificación con un oligonucleótido sentido interno y el oligonucleótido dT-anclador (Fig. 5). Después de 30 ciclos a una temperatura de reasociación de 50°C con el oligonucleótido cPtx2-8s y anclador, se apreciaron múltiples fragmentos de diversos tamaños (Fig. 5, A). Una alícuota de 1 µl de esta reacción se utilizó como templado para una segunda ronda de PCR semi-anidado, con los oligonucleótidos cPtx2-9s y anclador (30 ciclos, a una temperatura de reasociación de 55°C), se destaca un fragmento de aproximadamente 300 pb (Fig. 5, B, carril 3). Al clonar de la reacción de PCR, se obtuvieron 10 recombinantes y de ocho clones se analizó el DNA por digestión y los insertos mostraron diferentes tamaños, dos con aproximadamente 300 bp, tres con 250 pb, uno de 500 pb y dos con un inserto que posee un sitio de restricción para *EcoRI* dando lugar a fragmentos de 600 y 150 pb aproximadamente (Fig. 6, A). Al utilizar el DNA de estos clones como templado en una amplificación por PCR con oligonucleótidos internos (cPtx2-9s y zPtx2-4a) específicos para Ptx2 se obtuvo el producto de

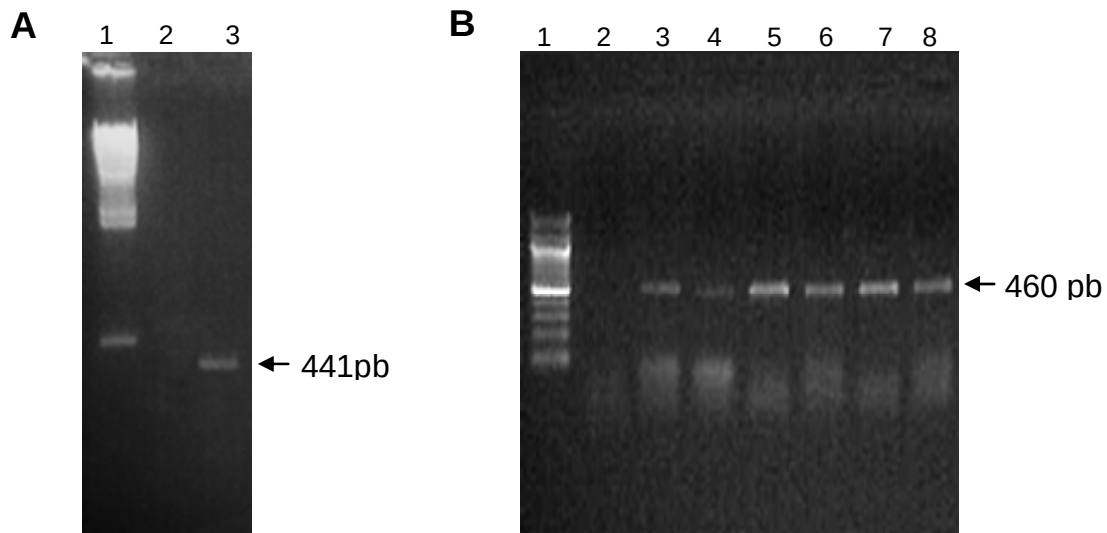


FIGURA 4: Ptx2 de *C. carpio* amplificado de cDNA de hipófisis en geles agarosa. Fraccionamiento electroforético de productos de amplificación a partir de cDNA de hipófisis de *C. carpio*, en geles de agarosa al 1%. Producto de amplificación utilizando los oligonucleótidos **(A)** Ptx2-s y Ptx3-a una temperatura de reasociación de 50°C: carril 1: St DNA λ HindIII, carril 2: control negativo sin templado, carril 3: producto de amplificación de 441 pb **(B)** Ptx2-1s y zPtx2-4a, PCR en gradiente a distintas temperaturas de apareamiento, carril 1: St 100 pb, carril 2: control negativo sin templado, carril 3: 49,1°C, carril 4: 50°C, carril 5: 52.5°C, carril 6: 55,6°C, carril 7: 59.1°C, carril 8. 60,8°C.

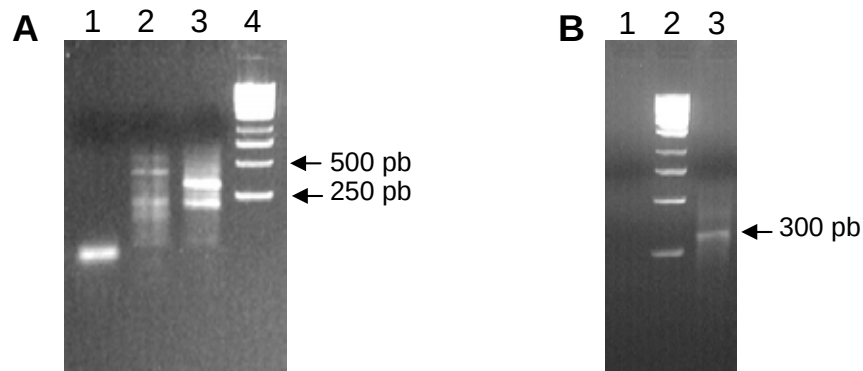


FIGURA 5: Amplificación del extremo 3'-cDNA Ptx2 de *C. carpio*. Fraccionamiento electroforético en geles de agarosa al 1% en SB 1 X, **(A)** Productos de amplificación de la primera ronda de amplificación a una temperatura de reasociación de 50°C carril 1: control negativo sin templado; carril 2: cPtx2-8s y oligonucleótido anclador, carril 3: cPtx2-9s y oligonucleótido anclador, carril 4: St 1 kb. **(B)** Producto de amplificación de la segunda ronda de PCR utilizando el templado del carril 2 del **(A)** y los oligonucleótidos cPtx2-9s y dT anclador a una temperatura de reasociación de 55°C en carril 3 destaca un fragmento de aproximadamente 300 pb, carril 1: control negativo sin templado, carril 2: St 1 kb.

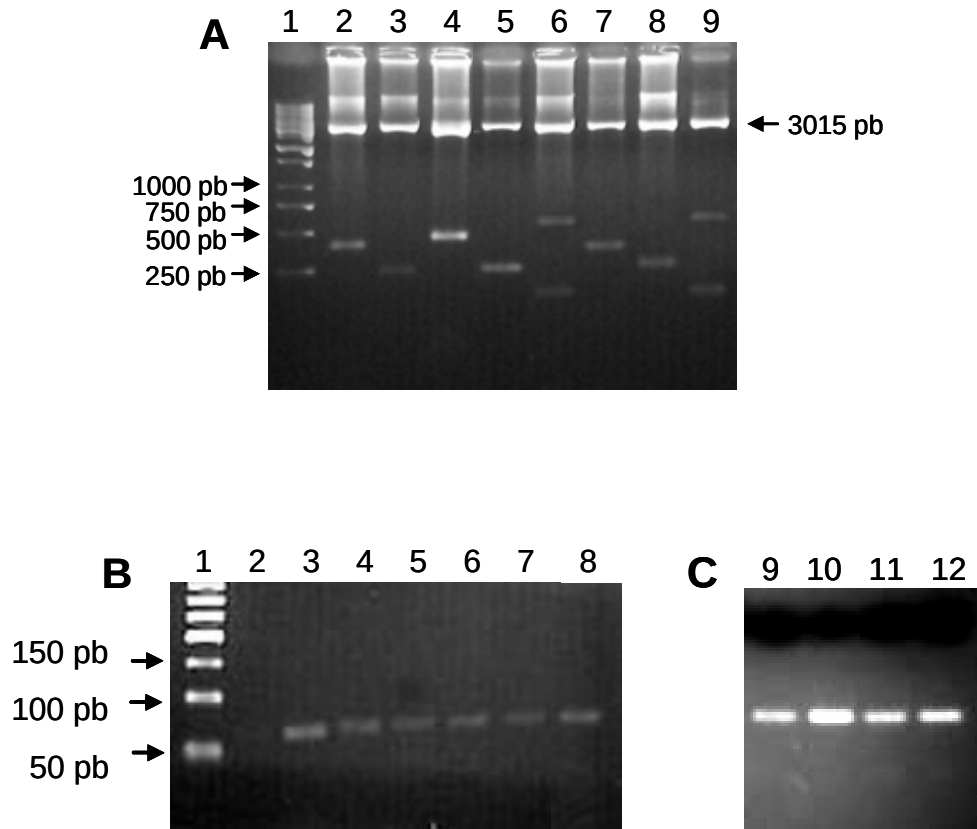


FIGURA 6: Análisis de productos 3'-cDNA de Ptx2 de *C. carpio* en geles de agarosa. (A) DNA clones pcPtx2 digerido con *EcoRI*, fraccionado en gel de agarosa al 1% en SB1X; carril 1: St 1 kb, carril 2: #32, carril 3: #31, carril 4: #33, carril 5: #35 carril 6: #37, carril 7: #38, carril 8: #39, carril 9: #40. **(B)** Confirmación de los insertos por PCR con oligonucleótidos internos, cPtx2-9s y zPtx2-4, en gel de agarosa al 2% en SB1 X, carril 1: St 50 pb, carril 2: control negativo sin templado, carril 3: control positivo, templado DNA clon pcPtx2-23; productos de amplificación con templado pcPtx2 carril 4: #31, carril 5: #32, carril 6: #33, carril 7: #35, carril 8: #37, sigue en el panel **(C)** en gel de agarosa al 1,5% en SB 1 X, carril 9: control positivo, templado pcPtx2-23, carril 10: #38 carril 11: #39, carril 12: #40.

amplificación del tamaño esperado de 64 pb (Fig. 6 B, C), sugiriendo que todos los clones obtenidos a pesar de tener insertos de diferentes tamaños corresponden a secuencias de Ptx2. El clon pcPtx2-38 se secuenció y contenía 305 pb de los cuales 200 pb corresponden a la región 3' no codificante y 105 pb a secuencia codificante confirmando que esta pertenecía a una secuencia Ptx2 (Anexo 7.3).

Para obtener información sobre la organización genómica de Ptx2 se identificó el gen Ptx2 en el genoma de *Danio rerio* en el banco de datos accesible por www.sanger.ac.uk en el cromosoma 14 (Fig. 7). Al alinear la secuencia del cDNA de la isoforma Ptx2c de *zebrafish* (AccNº. AF132446) con la secuencia correspondiente en el genoma, no se encontraron los primeros 8 pb en la secuencia genómica, posiblemente porque estos 8 bp corresponden al vector de clonamiento y no al cDNA, una observación concurrente en secuencias no procesadas.

El clonamiento *in silico* del gen Ptx2 de *D. rerio*, mostró la presencia de 5 exones (Fig. 7, 8 B). Al utilizar el programa Proscan, se revelaron posibles secuencias promotoras, frente al exon I y también frente el exon III (Fig. 7). El alineamiento de los cDNAs de las dos isoformas descritas en *zebrafish* con la secuencia genómica mostró que Ptx2a esta conformado por los exones I, II, IV, V, y Ptx2c por los exones III, IV, V, dando origen a dos secuencias aminoacídicas derivadas idénticas en la región del homeodominio y carboxilo terminal, pero diferentes en el amino terminal. En mamíferos se observan dos mecanismos en la producción de las isoformas Ptx2, la isoforma Ptx2a y b utilizan el mismo promotor y se generan por empalme alternativo, y la isoforma Ptx2c y d surgen del uso de un promotor alternativo y por empalme alternativo entre ellos (Fig. 8, A). El análisis de las secuencias del *zebrafish* sugiere que Ptx2a y c son producidas por el uso alternativo de promotores y que Ptx2a se genera por empalme alternativo (Fig. 8, B).

>Gen Ptx2 *Danio rerio*

ATCTCCTCTCATATGGTTATCATTAAAAATGATTAGATGCACAGCACATC
 GGTGTCTTATTCTAAAGAGGTCTGTGTGGTTGTAAGGACAGGCCCGGAT
 TGGCTAATCGGGAGGACCGGGAGAATCCCGGTGGGCCGGTCTGTTTTT
 GGCCGCGAGGGCCGGTGTTCCTAGCTCCAGAATCTGTTGCTCTCAGCAGT
 CACACTTTTTAAATTTATTTATTTATTTACTTGACCACAGCCTTCTTAT
 TAATTATTTTACCGCAGCTCTGCTCTTTTTATCTATTTTCTGCAGCCTGC
 AGGTTAATGATGATATACTAGATAAGTCACATTTCAATGTATAGTTGTT
 GTGGTACAGTGGTAAGCACGTTAGGTTATGACGCCACCAACCCGGGTTCTG
 TACCTCATCTGAATAACAATTTTTTTTTTTCATTTTTATTGTTAAGACAT
 ATAATACTGTTAGGGTTGTTGAACATTTGAAGTTCTAAACAGCTGTTTT
 CTCAAAAAAGACGTGATACTGTAATTAGAAATGAATTGGAATGACCT
 TATTTTATTATAGTCAGTGGTGAAGTGAAGTGGGCCGGTCTAAGGCTTGA
 AACTCCAGGGCTGAAAAAGAGTCCCACTCCGGCCCTGGTAAAAAGTCTTT
 GAACAGAGTTTTGCTCGGGTCATTTAGCCACACATCAGAGCCCTATAA
 GATATTTCTTCAAGTGTCTTCTACGACGCCAAAGATGACAACAGCGAAT
 CGATAACGAGGCGAGAAATGAAAAAGAGCCGCGGTCTGCCCGAGGCAT
 GAAGATCTTCGAGCGACCCCTTTTTCTGAACCTAGGGCATTCTTTGCAG
 GCTTTTTACGCGTGAGAAAGCAAAGGCTCCAGCTGCTGCCAGATGAAGGT
 AAAACGATGCAAGGACGCGTCTCTCCACAGAATGGATGAGGCGGGTGA
 TTCAATCAAAAAAGATATAAATACGTGCTTTTCCGATCTTTAAATCAA
 CTCAGGTTTATACAAAAATCCTTATGTCAATTTAATTTGGATGTCTAAACG
 GATATTTGGATCTGTGGAGATTTAAGAGGTTTAGTCTATATAGTATATTT
 GTGTAGGGTTGTGAGATTACCTTTTGATTGATAATTTCTAATGTCTTTAA
 AACATTAGGGATGATTTTCTAAAGAAAAATAACATGTGTATTTAAAAATC
 TTTAAGATACATTTTATTTACGGAATTTGGCGGTGAATTGATCATATTAT
 CCTACTTATTAATCTTTATTTAAACGAAAAATAAGAAAAAGGCAATATTT
 AAGAAATCCATAATTTTAGCATTATGAAGTAATAATTTGTATACTGAA
 GTGTGAGCGTCGATTTTAGGGTCAATTCGCTTTTTTATTTGCACCAAAC
 AAAATAAATGCGTTTTTGTAAATTTATTTCTATCGCGTAATGACAGTACAT
 AATTTCCGTCAACGCGCAAAATTTATGGACAAATGTGCATGTCTTTTTAG
 GCTCCACAGGCCTATTAAAGCTCTGGTAGAGAGACTGGGATATTCCAATAC
 AGGCTTGGGAATTCCTCCATGGCCGAGCGCATTAACTACTTGTAAATGG
 GTGTATGACCCACAATGTAAAAACGGATTATGCGCGTGAAACCTCCGTC
 CGGTCTGCTTTGCTCGTGTGAGATGCGCATGGAAATCAGTCCGGTGCACG
 CGGATCTTTAAAGATCATTTGCATCCAAGCCAGCTGTTCAATTCATCTCT
 AAACCTGACCGACACAGTTTGAGCAGATGCACTTTTCAACATAAGTTGCT
 ATTTTAAATTAAGCCATGTTTGTATTTAAAAATTAATCGTCTAAACAAAA
 TTAATAGGACAACCTACCCATTCTGTTGTGACGCTGATGATTAAATCA
 TATTTGCATATAGGCCCTTCTCATATTTAAATAAAGTCTAGAATGTCACA
 ACTGATCGTATCCTAATAACAAATTACAATGATTTTAAATATTATTCTA
 CATTTATTATTGTTGTTATTATATTATAGTTGCAATTTACCACGTTACGAT
 ATTGAGAATTTTGTCTTGTGTTAGTCTTCCAAACAAATGCAACAAACA
 TATGTAATGCAATATATATATATATGGGAATATATATATATATATATATA
 TACA
 CTTTATAAATGTGTTGTAATTATCTGACCAACATAAAGGTAAGGCAAGA
 GAGAATTGACAATGGAAAGGGGAGAGAGAATGAAACATTAACGCACTTA
 TATTTAATCTCATTTAAATTTAGGCTGTGTCTATAGGCATTTTGTAGC
 GTCTAATAACAATGATCGTTTATTGGCAGCCAGTTACAAATAAATGTCC
 TGATTTGATCCATATTTAGCCATGGCATTATATGTTTCATCTGTTTGAA
 TTTGTTCTTTGAATTAACATATTACAGTGTTCGATTGCTAATTTGTTAT
 CTAATTTAGCCTACCGTTTCGCATCACAAAGTTCACCCCTTACACACACT
 CTACGTGTTGGTTGTGCATACAAACACACCCACTGTGGCAGCATGCACA
 CGCACGCGCTTATACACACAACTCTCACTACGCCACGCGCTGACAGT
 CAAAGCTCGTGAGAGGGGGAATGCACTCTCTGCGTCTTTGCGCGGA
 AAAAAAGTTCCAGTCGTGTAGGCTCTGCAAAAAATGAGTTACTAAAGCAA
 CTTGTTAGGTTGTAACCTGCAAACTCTGGGTTGAAGATAATATATTCAT
 GTTTTAGTGTGTTTAAAGAAACCCAGAGATATCCCTTAACGTTCCCGTT
 GAGGAAGAAGAGGTTACGCTCCTTTTGGACCTGGCAGCAAGAGTTTATGT
 ACCCGGACATCATCAAGGGCAAAGATAAACTTTTTAGAGGTGTGGAATT
 TATCTTTTTTAAAGAGAGAAAAACAAGACTGGCAGGCTGCAAGCAACG
 CTTTTCAACAACCACTGTAAGTGCACATGACACCTATCTTGAATGTGA
 GATAATGCAAGTGAAGGAATTCTGTTCCACCTCGGGGTTGCAAGCCATGGG
 TGAACCTCAGCTTTAGTGCAGTTAGATGGAGAGGCATGATAAGTGATGCT
 CTGGCAGGTCCCACCTTGACTTTGCAGTTGATAATAATATATCGTTAACA
 CTGAGACAAACGGGACAAGGACAACCTTTACAGTTAGAGCGTGTAAATGTAC
 ATTAACACTTTGATTATTAAGCAGGAAAAATAATCATGGCAACGAAATTTGC
 TTTCAAACTAATAATTTTATTGAAATACAATATAAACTTTTTAAAT
 AATCGTGTAAAGTCCCGGAAAGTAATGTAATTTGTTTAAAGATTGTCAT

exon I

5' -UTR

TTAATATGTATTTATTTAAAGAGCATTTAAAGCCCAAGTATTTAATAAT
 TATATTATTTTACTATCTTCAGTTAGGCTAATGCAATTTACAAGTATAAA
 CATTTAAATTTGACCATCTGAAGATAAGAACATCTTGTCATATTGTAAAAT
 ATTGATTTAAAAAGTACCATAACAGTTTATAAAATTAATACATCAATAAT
 CTAATTTTCATTCACCTCAGCTAAAAACATAGGCCTAGGTAACACGAAA
 ATAAATAACATTATTAAGAAATCCGTATACACGCAAGACTTGGAGATAAT
 CATGGTTCTATCCCTAATATTAACGAACAGAGTAACATAAATCAAATT
 TTAAAGAAAAACGAAAAACAAACCTATTTTCTAAATATTTTCTTCAATT
 AATCTCTAGAACAAATTAATAAAGATATTAGTATAATGGCAAGCTCTG
 CTTTTGTCTATTTAAATAGACTCAAATAAATTTCTAATAGAAAAATACA
 TTCCAAAAATCTACACACACATTTTGCATGTTTTCTCTGTTAATGCGCT
 TTATTACTGAAATTTGCATTGATGTAGTCAAATATAAAATTTTATTGTGTC
 AAAACAAGTGAATATTGTGCTTACCTTTTTTGTGTTTAAACGGAATTTTA
 TTCACACATTTTATTTAGGCATTTGTATAAAATTCGCTTAAATTTACACA
 CCTTCAAAGTTATCGAGTCTGATTTAGAGGCCTAAATCAAACCGAACGG
 ATGGCATATAACACACACTCATACGAAAAACAAACCTTACCTTTTAGG
 CTACTCTGGATTGTAAATTTAGACACTTATGTAAATAATTTAGTAATTG
 GTACTAGTATGTCAAATAATATTTAAAGCAATAACTTTTGACTTCACAC
 AAAATGCGCACTACTGCGTACATCCAAAAAGGCACAAATTTAATTTCCA
 GACTCTCAAGTCTTTGACTAAAGGCACAGATGCGAGGCAGGTGAAATAAA
 GGGAGGGTTGAGGTAAAGCGTTGCATTCGGAGAGAGAAAAATGGAGAAGG
 AAAACGGTTAACAGCAGGATTGCATGCAAAATTTCCGACTGAAATTTATCAT
 AAGCAAACAGATGAAGCCTGGGCTAATAAAGGCCCATCTGTGTTACTTCA
 TATCGGGTTAGTTTAGAGCTGCGATAATGAATTTTGTAAATATCCAACCGA
 CAGACATCTCAATCAGACACTAATCCCTTGATTTTACCGCGGAATCACTC
 AACTTCTAGCGCTCAAACCTGCTCTCTCACCTGAAACACACACACACAGC
 GCACTGTCTCTCCTCTTTGTGCGTTGTTTTCATGCGCGTTTGGAGACAG
 AGTCTTAATTAGGAGGAACTCGAGCAAGCGCTAAGGGATTTCAAACAAA
 TGATGAGGAATGTGCTCATCCTATTACAGATAGGAACTATCCAATATATC
 ACAGTAGATTTGAAATAAATCATCACTGAGTGGCCCATCCGGTCAGACAC
 ACATTTAAAAATAAAGGTTGTAATACAGGAGATTTTGAAGATCAGAAGAA
 CCTCAGTTCCCCCGAGAAACGTTGCTAAAAGAGACACTCTTTTGTAGTGTG
 AACAGTATTTAAAAATACAAAGAGAATGTTCCGTTGTTAAACACCTATGT
 GGAAGTGTAAAGATTTGTTGATGTTAAATGTTCTTCAATTGAACCTCAATG
 CCAATAAACAAATCTTTTTGTTTATAAACCAAACGTAACAAACAAAGC
 TGACCTACACTATTACTGTTGACATACTATAAACTGTATATATTTGAT
 ACACGTGCCTAACACTTAAATAAGCTTTTCTCTTTATTTTCACTAGTAAA
 CAACATATAACCTACTAAATGGACTCCCACTGCCGCAAACTTGCATCAAC
 GTGTGCTCAATTAGGTAAAGATATTGGTGAATGACAACCTCATCTCCTTGC
 TAGGCCTTCAGAAAAAATTTAATTTATTATCAAAATTGATTGGATTTGT
 TTGGCCTTTACATAAAATTTATCTGAGGTAGAAAACGCGCTCATGAGGGTG
 TAAACACCTTTGGTGTGTTGATATGACTTTTCATTGGGAAAAGCGGAACC
 ATTAGACGTTTATAGTCAAAGATGGACATCTGCTGGTAGGACAGGATCAT
 ACAAGGATAGTGGAAAGGCTTTCGTAATGCCGCTAGCAGCTTCTTCAG
 ATTATTTTGGGATTGTAAAGCCTCTGATTTTAAATGTTCTCTAAATTATC
 TTGAAATTATAAGACAAAATGCTCGGTTATAGCCTAAAACGTAAGTCCAT
 TGCCTGGAGTAATCATGTGGGCTCTCGATAAAATTTGAAAAACATTCAAT
 CTCATCTTTCACATGTTTCAATTAATGCTAATTAATAACAGATTTAATT
 GAATTTATAAATAGGTGAATATACGTGTATCAAGTGTAAAAAAAACAAAT
 ACAATTAATTAGCATAACAATAAAATAAATTGAATAACCCGCTCCTC
 TAGCAGTTTAAAGAAATTTGTCGCATCAGAACAAATTTTACAGAACTCAGA
 CAAAATTAAGGGCTAATAAAAGGTTGATACGCAATGCGGTACGGCTTCT
 ATATCATCTGGCATCTTAATTAAGCTAATTAAGCAAATAAGATAAAAC
 ACAAATCTACTTAGTCGCATTTGTTTGCCTTTCTTTTCTGCTTCTCACT
 TTGCTGATACACAGATAAAAGTAGAAATGAGCATCAAAATGCAAAACAG
 CAAAGTAAAGGGAAAAGGCATTCGAGAGACTTGATTACCGACAATCTCGT
 CTCTTGTGCGGTAAATATATGCAACGCTTGTAGATAGACTCGGGGGAAAA
 GTAAATGTGAATGAAAGCCTCCTCGTGAGGAGGAATATACTAATGGAAG
 AATCTAATGCTCTTAATCCTATGGAAGGCTTTGTCGTCTCCCTTAT
 ATTGACTGAATTTGGTAATTAATGGCTCTGTGGTGCCTCATGGCCAATAAT
 CCACAGCAGGCAGTGAGAACGCTCTGAAGCATTTTGAAGGTCACAAATA
 ATACAGAGCAATAATCTAGTCCACATATTTCAATGCGTTTAAACAAAATG
 CACTTGTGCCATTTTCAATAGAATTTTCTGTGAGTAAAAAATGCGTAACAC
 CTGTCAATTATTAAGCACATTTTAGTGGATGTAATTATGATTTTACATGAA
 TAGTTTGTGTTTTTCAAGTGGTAGTACAATCGGTTTAAATGAATAAAAAAT
 AGATTCCTTGTGCAATAGCGATAGACTTTTACGTTCAAAAAGGGGAATAA
 ATGGCAATGATAAAATGAATAGCAAGTGTAAAAACAGGCTGAAAAATAT
 TTTTAAATAATGTTCTGTGCTAAGCACTAGTGCAATGAATACGAGGTCA
 CATCTAAACACCTGTACATAAAGATTTGTTGGTTCTATATATTCTCCA
 TATTAATAATATCCAGTACGAAAAATGTGAAGTAAAAAATGTCGTAGA

exon II

TAAGTCGGTCGGGTCGTTTTTCGTAAGCAGTTGAGTACCCCTTTCCCCCTT
 AGTATGGACTTGATTTTTGCAAGACACACACACACAAAAAACTTTCT
 GTGGATCGCCAAGATACAATTAAGTAATTATTTGATTGTTAATTTAACT
 TTAATCACAAAAGCTTTAATTTAGCAGTTTTCAAGATTGAGATCGGTTTA
 TCCAAGTTTACTTTATATATATATATATATATATATATATATATATAT
 ATATATATATATATATATATATATATATATAACCCATTTGCTTTGATATT
 TTCAGTCGAATGACTACAAAAAATACAATCCTAAGTAACGCAACGAGAA
 AGGATTTTTCTTCTCATCTCAAAAAACCTAACCTGTAAACTTAACAA
 TTCAAAATATACACAATTTTATTTGAAAATGAAGATCGGGAAAATTATAA
 ATAAATTAAGTTGTAACATAAAATAATGTTTGGCATTTAATAAAATGC
 GCAGTTTATATGATTTGGCATGTAAATGACGATGGCGATGTTTTGAAGA
 AACTTGACACAAGGTGAAGGAGCTGGAAGTCGTTAAAGATGCTCATTTAA
 AATTCTTAAGCAGATGAGCGTCTTATCAGATTAATGTAGCCTACTCAGT
 AAAAGAAAAGTGGGTGCTTCTCTCCCGCGAAATAATCACGGGCCGAAAG
 TGTATACCTCGCCAAAGTAATATACCTCGCCAAAGTGCTTTTAATCCTTA
 TATTAATTTATATAAAATGAATACAAGCCTGAATAAACTTAACTTAACT
 TGAATATTTTTTCTAATATGATTTTTTTTTTATTAGGCCTCTGTTTATC
 ATTTATGATTAACTTTTATATGGGACAGGTTTACTTGAAAAGAAAGAAA
 GAAAGAAAGAAAGAAAGAAAGAAAGAAAGAAAGAAAGAAAGAAAGT
 AAGAAAGAAAGAAAGATAGAAAGAAAGAAAGAAAGAAAGAAAGAAAGAA
 AAAACAAAAGTATTTGACACTGTCAATTCAGCTAATGAATAATAATAGA
 TAATAATAATAATAAAATAAAACATTTTGTGCAGTTGTTTAGTCTGTGTTT
 GTTAAGTCTGGTGAATTTGTTTTATTGACGACAGAAGTCTCTAAAGTTAC
 AACGCTAATAATAACGCTTTATTTTGTATAATAGCTGCTGAGAAAACTA
 ACCTGGGTTTTGAGCGTCAGGTGTACCATGATAAATGTTAAGTGATGTTA
 AATCAAGTGAATGCACGGTTTTTTTTATTACATGTTTTTAGAGAGATAGA
 AAAACATCTCAAAGTGCATAGGCTGCATTTTCTCATTTCTTGGGCCGATT
 CATAGTCGGTTTTGCCATAAAAGCTGACATGTATAGGGTTTAATGTTCCGT
 CAGATTGAGGGCGGAGTTTGTGACGTCAGGACGCATAGAGCAGCTCGGTT
 GGACAGATAGAGGGACAGCTGAAATGAAGAGCGAGGGCTGTGATGTGCAG
 GAGAGTGTGTGTATGCAAGTGGATATAATATCACATACCTGTCCCTGT
 CACTCTGGCTCTCCTTGGCTCTCGGCTGAAACCGAGATATCTTTTACCCAG
 TCGAAACGGGAAAAAATCTTTCCTTAACACTGGGCTTGTTTAATCATAT
 TTTTTTATTATTAAGCCGTTTCAGGAGTGTGCTTTTAGTGTTTAAAT
 GAGAAAGGAGCACTGGCAACGCTTGCCGATACCTCACTGCTGGACACATT
 CGTTTCTTTCTTCTTTTATTTTCTTTTATTTATTTATTTATCTGTATTTT
 TGACCTGCGCTGAGGAAGTTATAGCTGCTTGCGAGCCGTCGGTAAATCGC
 TTGCTTATCCATGACCTCTATGAAGGATCCGTTGAGTTTGGACCACCAT
 CATCACAATCACCACGTTACCGGGAGTAAACACGCGCCGCTTTCGATGGC
 CTCTAGTCTGCAACCGCTTCAGCGGTCTGTGGACTCGAAACACAGGCTGG
 ATGTGCACACGGTTTCAGACACCTCCAGTCCAGAGTCCGTAGGTAAAGACC
 TGAGGAGATTTTTAAGTTGAGTGTTTTTGGTTTTGGTGTGAGCTATCATT
 AAGTGTCTTCTCAGAAATAAACATTTTAAAACTTCGCTCGGTGTGAAA
 ACAGAGTGGGTTAGCCGACAGAGCGAGCCATGTAAATATATCAAGAGGTG
 GAACAGGCAGTTGATTCGTAGGGCTATTGAAATGAGCTACATAAGTCATA
 CCCTTTGACAGGACTTTATTTACTTAAATGTTTGTGAAAATGTGGGCTT
 CACGAATGTTTACACAGTGGCAACTGCGCTTTGTACAGAAATAGAGCAAC
 ATTCCAACTACAATGTCATTGCTTTTCGTGTGATAAAAAATGCATGCT
 GCATTTATGGCGGTTAAATATTTTCTAAATCCTGCATTAGCATTGTGAAC
 ATTTGAATTTTACCGGTACTGTTGGCTTTGCCAGAAAAAGGATGTTAGG
 ATGTTAAACGAGCGTTATAATAAATTTAATTCAGGAACATCATTAATTA
 AATTTGCGCCGTTAAATGTTTACCAGGGAACCACTTGTTATGTTACCAT
 GATGTCAATATCTTCAATTCAATAAAAGGAATTAGAGATTTGTCTCCCT
 TCACGCACACTTCTAATGTGTCAAAACCGTGCCTGAAGCTTGTTCCTC
 TGCATTAATATTTGTTTAAAGAGTGTTCCTTTTGCATTACAGAGA
 AAGAAAAGGGACAAAGTAAAAACGAAGATTCGAACGATGACCCGTCGAAA
 AAGAAGAGACAAAGCGGCAACGAACGCATTTTACTAGCCAGCAGTTACA
 GGAAGTGGAGGCCACTTTTCAGAGGAATCGCTATCCGGACATGTCGACTA
 GAGAGGAGATCGCCGTTTGGACAAATTTAACAGAGGCCAGAGTCCGAgtA
 AGTTTGATAAATAAAATTACAAGAAAAATATATGTGATATAACCTAAAT
 ATTTTATAGATTTTCTTTTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGT
 TGT
 CTATTAATTAACATAGCCTATCAGCTTAATGCTGAATTAACGTAAAC
 GTAATTTAGTGATATTTTATAGATCCACTAACAAATAAAAAATAAGATA
 TATTTCTGAATAATATATATTTTTTGCCTTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGT
 AATATTTGTTTATACATTAACCTACTTTTTAGCTAGTCTAATATGCAGG
 CGCTGCATTCTATGCTTGTCAATTTTCCATAACGTTAATTGGGTTGCATG
 CTAATATGATTTTGTAAATGTTTAAATAAAAAATCTGTCAATTGTAT
 GTTAAGAGGCTAATTTATAGGTGAGTCAAATGTTTGAATCAACACGAAA
 TAAAGACTGACGCCAAACGATGACTGACTTTAATGGAGTCACACAGTCG

5' - UTR

exon III

exon IV

CCTTTTAAGAGGTGCAAAGCTTTTATTTTGTGATTGTCATTCTCGTGTTG
 TATATACTTAGGGTTAGTGTGTCTCCGCCCTGCTTAGCGAGAATACACATT
 TAAAGCGTCGGGCGCTAAAAGTCTGAATGTGTATTGGGATTCCCGGGATC
 AGACAAGATTCCGGGTGACTGATAAAAAGTGACTTAATTAGGGAACTTAA
 CTGAGTTTGACACCACCACCATATCATTTATCTAGCCTACCTAAAACAA
 ACGGAGCAGTCCGTGTTGTTCTAACTCGATGACAGTCTTGCAATTGCTTTA
 GATAGACTAATTAATTATGTAGGCTAATTCTTTTCTACAATTGTTG**agc**
TGTGGTTCAAGAATCGACGGGCAAAATGGAGAAAAAGGAGAGGAATCAA
CAGGCTGAGCTGTGTAAAAACGGTTTCGGCCCTCAATTCAACGGACTTAT
GCAGCCCTACGATGACATGTATCCAGCTATACGTACAACAACCTGGGCTG
CAAAGGGACTCACGTGGGCTCTCTGTCTACCAAAAGCTTTCCTTTTTTC
AATTCATGAATGTCAATCCGCTGTCTGCCAGACCATGTTCTCTCCACC
TAAGTCTATCTCTCAATGAGCATGTCTCCAGTATGGTTCCTCTGCTG
TCACCGGTGTACCAAGATCAAGTTTAAACAGCCTCAATAACTTGAATAAC
CTCAGCAACCCCTCTCTAAATTCGGGGGTTCCACGCCGGCGTGCCCTTA
CGCCCCACCGACGCCCTCCGTATGTTTACCGGGACACTTGTAACTCCAGTC
TTGCCAGTCTGAGACTGAAAGCCAAGCAACACTCGAGTTTGGATACGCG
AGCGTGCAGAATCCGGCCCTCAATCTCAGCGCCTGCCAGTACGCAGTGGA
TAGACCGGTGTAAGAGACGACTGTAGAATTTACAATCCGAATCCCAGGAA
CAAGAGACTTCACCTTTTTGTTTTCAATGGCACTAGAAGAATAAACCACTGA
AACGCGTCCAATCCTGTGATGGAATGTCAAGCGGGAACGGAAGGCAAAGG
CTCCATTGCTAATAAGATTTGTTCTCTACACTAGCAAGTGCACACTAGCC
AGTGAAGAGATTAGGATACCACAATATTTAACAACAAAAAAATCTCATT
TATTTTGACGTTTCAATTTTGGACAGTAATTGACTGAACGGTTGTATATA
GGCTATACATATATCTTAATATCATCTCCAATTTGTAGAAGCGAAAGCTC
TAAGTCTTAAGCATTTTCAAGAATTCAGTTCAACACAGCATGTGGAAGAC
TTACAGGAATCATGTCTTGCTTGCGATCAAGGGAATGTACATACTAAACG
CACCAGTCTGTGTGATATTATAAATTTATTATTAAATGTCTGTGGAAT
ATAGATCTAGAATAGCAACCCCTGGGTAATAATACGCAATGTTTCTGCGA
AATGAACCTTGGTTTTTGCTCTGTGTATAATTTTGGTACGGAATTTTTGT
TTCTGTTTTCAACATCCCAAAAATAAATATTGTGTTTTATTTAATGGAA
 GTAAATATATTGTTCTAAAACATTTTCAAGAACGTTTTCTTCACAATTATTG
 AATTCAATTATTGATGGTTGTATGTGGCACACAATTGTGGCATTCTACG
 GTTTATAAAGACTCAGAGGGAAGGAAAAAGTATCTAATACACATCAGCTT
 GACATGAGTCCGGTGAAGAGGGCGAGATGTCCCGAGCAGATTAGGAGTCG
 AATATACAAGACTGACTAGAGGCTGGGCCCTCCAGTGATCAGCGACGCTTG
 AAATAACAGCAATAAGATCAGGCCAGGATGGACCACACATCACTGGACCA
 TCTGCCAGTGAACCTCTTTAAAAAAATTAATATGAAGTGATACATGATT
 GTCCAGTATTAAGCTCAATAGAACGTGTGCAAGTTGAAAAACAAGGCTCAT
 GTGTCATATGAATTATGGATTACTTAGAATAATATATAAACCGCCATCCC
 ACTGTGCAAAACAAAACCTGCATTTTATAGCAGACTCGCAGTAGGCGCGTGTA
 ATTACAAGTGATCGCGACAATGAGTGTCAATTGACTGGCTGTTTGTAAAC
 AAAGAAATCTCACAGCGTCAAACTACTGTATGGAAACGGTTTTAAAAATAG
 AGTTAAGAGGATTAAGGGAAATGTATCGCCCTAATAGAACATAACTGCGT
 TTGTGATTGGTACAGTTATTTAACTCCAGCTCAATAATAACTTATTGTCT
 TTCACGGGAAATCCTTATACTGCACTATTGTTAGCCGCCCTCTGTTGTCC
 ATCATTAACCTTCGCTGAAGTATAGCGGATAAAGTACTTAATAGAACGGAC
 AATGACATTCAATTGAAAGCCAATCAAAACAAAGGCAGGTATGCCACATAG
 ACAGGCGTTTTGTATGAGTGTGATTCTATCCATGAAATTCATGTACAGCG
 CGTACAGAACAGGATGAGAGAAGAATGTACTTTGAGTAGTGTGGTTGG
 AACAAACACAAGCGTGCTGTTAAACATGAATACTCTCATATAGTGATGATT
 AATGGAGCAGACAGAACAAGGGTGGAGAAAACAGTAAAATTGAATGCTAC
 AATTACATTTATTGAAATAATAGCGTGCTGTTATTGAATGAAAACATAA
 ACGCCTTCGCTAATTTATAGCGTCTCCGTTAAACAACAAATGCTTGTCT
 AAAATCCACAGATCGTAATCATCCGTTTTAGGTTGATACATGCTCCTGGT
 TCTCTCAGTGAAGAGCTCTCAATCTAACCAGGCCTAAATATTTCATTTCCC
 TGCAACATGACGGTCTGGGGTCCCAATACACATCTCAATAAACACTGTGA
 GCGGGGGGGCCACGGGAGCAATACATAGCAGATTACAGAGGGAACCTTC

exon V

3' - UTR

FIGURA 7: Secuencia genómica de Ptx2 de *Danio rerio*. Destacado en amarillo la región 5' y 3' no traducida, en verde se indica la secuencia de cada exon, en números romanos el numero de cada exon, en rojo sitios de empalme intron-exon, y en azul secuencias promotoras predichas por el programa Proscan: Version 1.7.

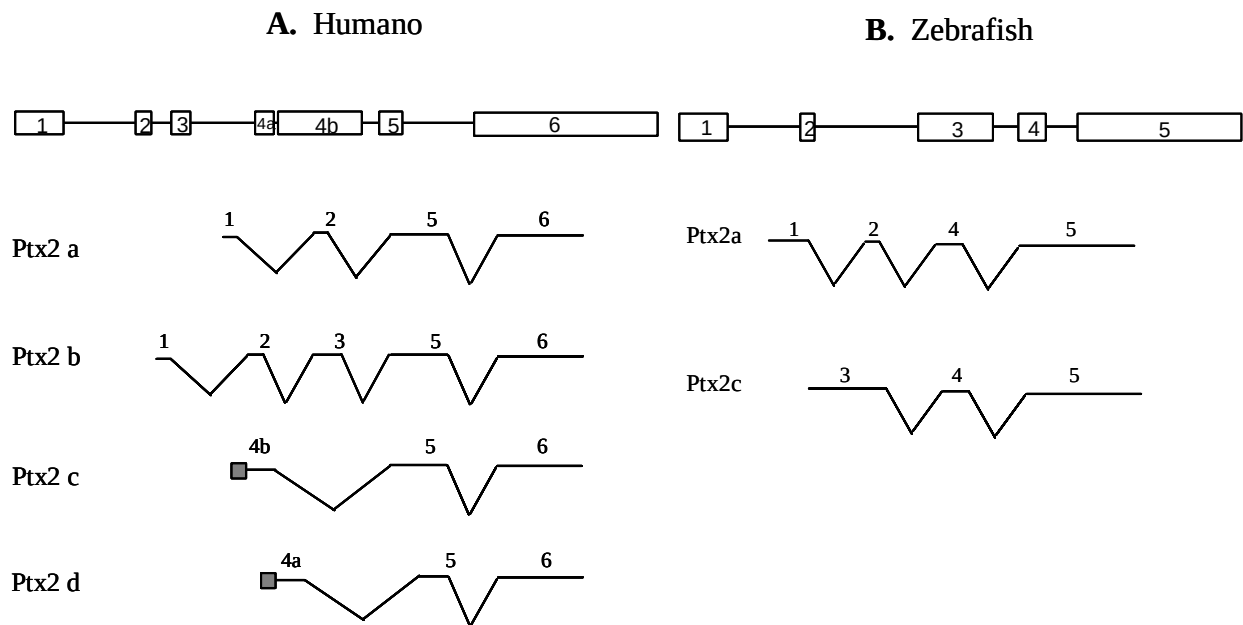


FIGURA 8: Esquema de la organización genómica de Ptx2 humano y zebrafish. (A) Organización genómica de Ptx2 y esquema de las cuatro isoformas de Ptx2 descritas en humano, las isoformas a y b se producen por empalme alternativo, y la isoformas c y d por la utilización de un promotor alternativo y por empalme alternativo **(B)** Organización genómica de Ptx2 zebrafish y esquema de las dos isoformas de Ptx2 descritas en *D. rerio*, la isoforma a se genera por empalme alternativo y la isoforma c por utilización de un promotor alternativo.

Panel (A) adaptado de Cox et al., 2002.

Las secuencias parciales de Ptx2 de *C. carpio* se alinearon y se analizaron respecto a las secuencias Ptx2 de *D. rerio* (Fig. 9). En la secuencia Ptx2a de *D. rerio* (AccNº. AF156906) se aprecia la secuencia de los cuatro exones que lo conforman: La región 5' no codificante, una región 3' no codificante más extensa que la de *C. carpio*, y la región codificante, en la cual solapan parcialmente las secuencias de *C. carpio*. Las tres secuencias parciales Ptx2 de *C. carpio* abarcan 531 pb de la región codificante, que corresponde a aproximadamente 66% de la región codificante, con respecto a Ptx2 isoforma a de *Danio rerio*, el codon de término, la secuencia 3' no traducida de 208 pb y una cola de 21 adeninas.

Las secuencias del clon pcPtx2-23 y pcPtx2-38 solapan en 24 pb y el clon pcPtx2-7 con pcPtx2-23 solapan en 299 pb, confirmando las secuencias entre ellos. Las letras pc antes del nombre de cada clon indican que corresponde a DNA plasmidial recombinante, conteniendo una secuencia de *C. carpio*. Las diferencias en pares de bases que causan el cambio en los aminoácidos, de S a T, de N a T, de P a S, y de A a T, las cuales son sustituciones conservadas o semi-conservadas (Fig. 10, destacado en azul y verde), indican la presencia de dos secuencias de Ptx2 de *C. carpio*. El análisis realizado indicó dos secuencias Ptx2 de *C. carpio* y por lo tanto se efectuó el empalme de las secuencias de los clones pcPtx2-23 con pcPtx2-38 la cual se nombró Pitx2 gen-I y se depositó en el banco de datos *GenBank* bajo el número acceso EF051103. La secuencia del pcPtx2-7 se depositó como gen-II bajo el número de acceso EF061104. Las secuencias aminoacídicas derivadas del gen-I y el gen-II muestran un 95,9% identidad entre ellos y 96,2% de identidad con respecto a la secuencia de *D. rerio* en la región que solapan (Fig. 10). En la Tabla 2 se indican los nombres y números de acceso de cada secuencia utilizada para el alineamiento de la Figura 11, en la cual destaca la conservación del homeodominio entre las diferentes especies (Fig. 11).

acgagccactctctgcgtctttgcgcggaaaaaagtccagtcgtgtaggctctgcaa
 AP-1 GATA-1
 aaatgagttactaaagcaacttgtaggttgtaactgcaaacactctgggttgagataa exon I
 Pit-1
 tatattcatgttttagtggtgttttaaagaaccagagatatcccttaacgttcccgttg
 aggaagaagaggttacgctccttttgacctggcagcaagagttatgtacccggacatc
 GATA-1
 Atcaagggcaagataaacttttccagaggtgtggaatttatcttttttaagagagaaa
 atcaagactggcagcgctgcaaagcaacgcttttcaacaaccactggtaaacaacatata exon II
 acctactaaATGGACTCCCACTGCCGCAAACTTGCATCAACGTGTGCTCAATTAGAGAAA
 M D S H C R K L A S T C A Q L E K
 GAAAAGGGACAAAGTAAAAACGAAGATTCTGAACGATGACCCGTCGAAAAAGAAGAGACAA
 E K G Q S K N E D S N D D P S K K K R Q
 AGGCGGCAACGAACGCATTTTACTAGCCAGCAGTTACAGGAAGTGGAGGCCACTTTTCAG exon IV
 R R Q R T H F T S Q Q L Q E L E A T F Q
 AGGAATCGCTATCCGGACATGTCTGACTAGAGAGGAGATCGCCGTTTGGACAAATTTAACA
 R N R Y P D M S T R E E I A V W T N L T
 R K R E R
 pcPt2-7 AGAAAAAGGGAGAGG
 GAGGCCAGAGTCCGAGTGTGGTTCAAGAATCGACGGGCAAAATGGAGAAAAAGGGAGAGG Ptx2-s
 E A R V R V W F K N R R A K W R K R E R
 N Q Q A E L C K N G F G P Q F N G L M Q
 AACCAACAGGCCGAGCTGTGTAAAAACGGTTTCGGCCCTCAATTCAACCGACTTATGCAG cPt2-5a
 AATCAACAGGCTGAGCTGTGTAAAAACGGTTTCGGCCCTCAATTCAACGGACTTATGCAG
 N Q Q A E L C K N G F G P Q F N G L M Q
 P Y D D M Y P S Y T Y N N W A A K G L T
 pcPt2-23 CCAGCTACACGTACAACAACCTGGGCTGCAAAGGGGCTCAG
 CCCTACGATGACATGTATC CCAGCTATACGTACAACAACCTGGGCTGCAAAGGGGACTCAG Ptx2-1s
 P Y D D M Y P S Y T Y N N W A A K G L T
 S A S L S T K S F P F F N S M N V N P L
 TCGGCCCTCTGTCTACCAAAAGCTTCCCCTTTTCAATTCCATGAACGTCAATCCGCTG
 TCGGCCCTCTGTCTACCAAAAGCTTCCCCTTTTCAATTCCATGAACGTCAATCCGCTG
 TCGGCCCTCTGTCTACCAAAAGCTTCCCCTTTTCAATTCCATGAATGTCAATCCGCTG exon V
 S A S L S T K S F P F F N S M N V N P L
 S S Q T M F S P P N S I S S M S M S S S
 TCTTCTCAGACCATGTTCTCCACCTAACTCCATCTTCAATGAGCATGTCCTCCAGT
 TCGTCTCAGACTATGTTCTCCACCTAACTCCATCTTCAATGAGCATGTCCTCTAGT
 TCGTCCAGACCATGTTCTCTCCACCTAACTCTATCTTCAATGAGCATGTCCTCCAGT
 S S Q T M F S P P N S I S S M S M S S S
 M V P S A V T G V P G S S L N S; T L N N L
 ATGGTTCGCTGTGCTGCTCACTGGCGTGCCCGGATCAAGCTTAAACAGCCTCAATAACTTG
 ATGGTTCGCTGTGCTGCTCACTGGCGTGCCCGGATCAAGCTTAAACACCCTCAATAACTTG
 ATGGTTCGCTGTGCTGCTCACTGGCGTGCCCGGATCAAGCTTAAACAGCCTCAATAACTTG
 M V P S A V T G V P G S S L N S L N N L
 N N L S T; N P S L N S G V P T S; P A; T C P Y A
 AATAACCTCAGCACCCCTCTCTAAATTCGGGGGTTCCAACGTGCGCGTGCCCTTACGCC
 AATAACCTCAGCAACCCCTCTCTAAATTCGGGGGTTCCACGCCGACGTGCCCTTACGCC
 AATAACCTCAACAACCCCTCTCTAAATTCGGGGTCCACGCCGCGTGCCCTTACGCC Ptx2-2a
 N N L S N P S L N S G V P T P A C P Y A

P P T P P Y V Y R D T C N S S L A S L R
 CCACCGACACCTCCGTATGTCTACCGGGACA**CTTGTA**ACTCCAGTCTTGC**CAGTCTGAGA** cPtx2-8S
CCACCGACACCACCGTAT
 CCACCGACGCCTCCGTAT**GTTTACCGGGACACTTGTAA**CTCCAGTCTTGCCAGTCTGAGA Ptx3-a
P P T P P Y V Y R D T C N S S L A S L R
L K A K Q H S S F G Y A S V Q N P A S N
 pcPtx2-38 AAT
 CTGAAAGCCAAGCAGCACTCGAGTTTTGGATACGCGA**GCGTGCAGAA**TCCGGCCTCC**AAT** cPtx2-9s
 CTGAAAGCCAAGCAACACTCGAGTTTTGGATACGCGAGCGTGCAGAAATCCGGCCTCCAAT
L K A K Q H S S F G Y A S V Q N P A S N
L S A C Q Y A V D R P V
 CTCAGCGCTTGCCAGTACGCA**GTGGATAGACCGGTGTA**Agagacgactgtagaatttaca zPtx2-4a
 CTCAGCGCTTGCCAGTACGCA
L S A C Q Y A V D R P V *
 atcccgaaatccaggaacgagagactacactttttgtttcaagggcactagaagaattaac
 atc-cgaatcccggaacaagagacttcactttttgtttcaatggcactagaagaataaac
 cactgaaacgcgtccaatcccgtgatggaatgtcaaacgggaatggaaggcaaacgcgcc
 cactgaaacgcgtccaatcctgtgatggaatgtcaacggaacggaaggcaaaggctcc
 atttccaataagattttgttctctacactagcaagtgcacactagccagtgagagatttag
 attgctaataagattttgttctctacactagcaagtgcacactagccagtgagagatttag
 gatac**gataccacaatattttaacaacaaaaaaatctcattat**tttgacgtttcaatttttgac oligo dT anclador
 gataccacaatattttaacaacaaaaaaatctcattattttgacgtttcaatttttgac
 agtaattgactgaacggttgatataggtatatacatatcttaatatcatctccaattt
 gtagaagcgaaagctctaactcttaagcattttcaagaattcagttcaacacagcatgtg
 gaaaacttacaggaatcatgtcttgcttgcatcaagggaatgtacatactaaacgcacc
 agtcgtgtgtgatattataaatttattattaaatgtctgtgtgaatatagatctagaata
 gcaaccctgggtaataatacgcaaatgtttctgcgaaatgaacttggtttttgctctgtg
 tataatattttggtacggaattttgtttcggtttttcaacatcccaaaaataaactattgt
 gttttattttaaaaaaaaaaaaaaaaaa

FIGURA 9: Secuencias Ptx2 de *C. carpio* comparadas con *D. rerio*. Secuencias nucleotídicas de cDNA; negro: Ptx2 isoforma a *D. rerio* (Acc.Nº.AF156906); rojo: pcPtx2-7; azul: pcPtx2-23; violeta: pcPtx2-38. Secuencias aminoacídicas derivadas: arriba en negrita y en el color correspondiente del cDNA de *C. carpio*; abajo del cDNA de *D. rerio*; en gris destaca la región homeodominio. Las flechas indican la ubicación de intrones respecto al gen Ptx2a de *D. rerio*. Destacado en amarillo: oligonucleótidos sentido, en verde: oligonucleótidos antisentido, en azul: posibles sitios de unión de factores de transcripción.

Ptx2 Gen-I	-----	
Ptx2 Gen-II	AGAAAAAGGGAGAGGAACCAACAGGCCGAGCTGTGTAAAAACGGTTTCGGCCCTCAATTC	60
	R K R E R N Q Q A E L C K N G F G P Q F	
Ptx2 Gen-I	-----S Y T Y N N W A	26
Ptx2 Gen-II	CCAGCTACACGTACAACAACCTGGGCT	120
	AACGGACTTATGCAGCCCTACGATGACATGTATCCAGCTATACTTACAACAACCTGGGCT	
	***** ** *****	
	N G L M Q P Y D D M Y P S Y T Y N N W A	
Ptx2 Gen-I	A K G L T S A S L S T K S F P F F N S M	86
Ptx2 Gen-II	GCAAAGGGGCTCACGTCGGCCTCTCTGTCTACCAAAGCTTCCCTTTTCAATTCCATG	180
	GCAAAGGGGCTCACGTCGGCCTCTCTGTCAACCAAAGCTTCCCTTTTCAATTCCATG	

	A K G L T S A S L S T K S F P F F N S M	
Ptx2 Gen-I	N V N P L S S Q T M F S P P N S I S S M	146
Ptx2 Gen-II	AACGTCAATCCGCTGCTCTCTCAGACCATGTTCTCCCACTTAACCTCCATCTCTTCAATG	240
	AACGTCAATCCGCTGCTGCTCTCAGACTATGTTCTCCCACTTAACCTCCATCTCTTCAATG	

	N V N P L S S Q T M F S P P N S I S S M	
Ptx2 Gen-I	S M S S S M V P S A V T G V P G S S L N	206
Ptx2 Gen-II	AGCATGTCTCCAGTATGGTTCCGCTGCTGCTCACTGGCGTGCCCGGATCAAGCTTAAAC	300
	AGCATGTCTCTAGTATGGTTCCGCTGCGGTCACCGCGTGCCCGGATCAAGCTTAAAC	

	S M S S S M V P S A V T G V P G S S L N	
Ptx2 Gen-I	S L N N L N N L S T P S L N S G V P T S	266
Ptx2 Gen-II	AGCCTCAATAACTTGAATAACCTCAGCACCCCTCTCTAAATTCGGGGGTTCCAACGTCG	360
	ACCCTCAATAACTTGAATAACCTCAGCAACCCCTCTCTAAATTCGGGGGTTCCAACGTCG	
	* *****	
	T L N N L N N L S N P S L N S G V P T P	
Ptx2 Gen-I	A C P Y A P P T P P Y V Y R D T C N S S	326
Ptx2 Gen-II	GCGTGCCCTTACGCCCCACGACACCTCCGTATGTCTACGGGACACTTGTAACCTCCAGT	393
	ACGTGCCCTTACGCCCCACGACACCAACCGTAT-----	

	T C P Y A P P T P P Y	
Ptx2 Gen-I	L A S L R L K A K Q H S S F G Y A S V Q	386
Ptx2 Gen-II	CTTGCCAGTCTGAGACTGAAAGCCAAGCAGCACTCGAGTTTGGATACGCGAGCGTGACG	

Ptx2 Gen-I	N P A S N L S A C Q Y A V D R P V	446
Ptx2 Gen-II	AATCCGGCCTCCAATCTCAGCGCTTGCCAGTACGCACTGGATAGACCGGTGAAGAGACG	

Ptx2 Gen-I	ATTGTAGAATTTACAATCCCGAATCCAGGAACGAGAGACTACACTTTTTGTTTCAAGGG	506
Ptx2 Gen-II	-----	
Ptx2 Gen-I	CACTAGAAGAATTAACCACTGAAACGCGTCCAATCCCGTGATGGAATGTCAAACGGGAAT	566
Ptx2 Gen-II	-----	
Ptx2 Gen-I	GGAAGGCAACGCGCCATTTCCAATAAGATTTGTTCTCTACACTAGCAAGTGCACACTAG	626
Ptx2 Gen-II	-----	
Ptx2 Gen-I	CCAGTGAAGAGTTTAGGATACCGAAAAA	669
Ptx2 Gen-II	-----	

FIGURA 10: Secuencias de cDNA y aminoácidas derivadas de Ptx2 de *C. carpio*. En violeta: Ptx2 gen-I *GenBank* numero acceso EF051103, resultado del empalme de las secuencias de los clones pcPtx2-23 con pcPtx2-38; arriba en negrita secuencia aminoacídica derivada del gen-I. En rojo: Ptx2 gen-II número de acceso *GenBank* EF051104, secuencia correspondiente al clon pcPtx2-7, abajo en negrita: la secuencia aminoacídica derivada del gen-II. En azul cambios conservados de aminoácidos y en verde los semi-conservados. “*” indica bases idénticas.

Nombre común	Nombre Científico	Acc.Nº sec. nucleotídica	Tipo de molécula, parcial o total	Acc.Nº sec aminoacídica derivada	Nº de aa
<i>Zebrafish</i>	<i>Danio rerio</i>	AF156906	Pitx2a mRNA, total cds	AAD40180.1	269
Pez-Espinoso	<i>Gasterosteus aculeatus</i>	AY517635	Pitx2 gen, parcial cds	AAS91493.1	150
Pez-Fletan	<i>Hippoglossus hippoglossus</i>	AY999687	Pitx2 mRNA, parcial cds	AAY18081.1	283
Pez-Hirame	<i>Paralichthys olivaceus</i> <i>Hippoglossus olivaceus</i>	AB050722	pitx2 mRNA, total cds	BAB69053.1	312
Rana Africana	<i>Xenopus laevis</i>	AJ005786.1	XPtx2a, mRNA, total cds	CAA06696	326
Humano	<i>Homo sapiens</i>	NM_153427	Pitx2, variante 1, mRNA, total cds	NP_700476.1	271
Ratón común	<i>Mus musculus</i>	NM_001042504	Pitx2, variante 1, mRNA, total cds	NP_001035969	271
Carpa común	<i>Cyprinus carpio</i>	EF051103	Pitx2 gen-I, mRNA, parcial cds	–	145
Carpa común	<i>Cyprinus carpio</i>	EF051104	Pitx2 gen-II, mRNA, parcial cds	–	131

TABLA N° 2: Lista de secuencias Pitx2 extraídas del *GenBank*

M. musculus	RKLVSACVQLEKDKSQGKNEDVGAEDPSKKKRQRRQRTHFTSSQLQELEATFQRNRYPD	65
H. sapiens	RKLVSACVQLEKDKSQGKNEDVGAEDPSKKKRQRRQRTHFTSSQLQELEATFQRNRYPD	65
X. laevis	ISDTSPPDTADKDKSHQTKNEDSSTDPSKKKRQRRQRTHFTSSQLQELEATFQRNRYPD	120
C. carpio Gen-I	- - - - -	
G. aculeatus	- - - - -	
D. rerio	RKLASTCAQLEKEKG-QSKNEDSN-DDPSKKKRQRRQRTHFTSSQLQELEATFQRNRYPD	63
H. hippoglossus	VSDTSSPESVEKEKNQSKND--DSSDDPSKKKRQRRQRTHFTSSQLQELEATFQRNRYPD	90
P. olivaceus	VSDTSSPESVEKEKNQNKND--DSSDDPSKKKRQRRQRTHFTSSQLQELEATFQRNRYPD	108
C. carpio Gen-II	- - - - -	
M. musculus	MSTREEIAVWNTL TEARVRVWFKNRRAKWKRERNNQAELCKNGFGPQFNGLMQPYDDMY	125
H. sapiens	MSTREEIAVWNTL TEARVRVWFKNRRAKWKRERNNQAELCKNGFGPQFNGLMQPYDDMY	125
X. laevis	MSTREEIAVWNTL TEARVRVWFKNRRAKWKRERNNQAELCKNGFGPQFNGLMQPYDDMY	180
C. carpio Gen-I	- - - - -	
G. aculeatus	- - - - - PYEDMY	6
D. rerio	MSTREEIAVWNTL TEARVRVWFKNRRAKWKRERNNQAELCKNGFGPQFNGLMQPYDDMY	123
H. hippoglossus	MSTREEIAVWNTL TEARVRVWFKNRRAKWKRERNNQAELCKNGFGPQFNGLMQPYEDMY	150
P. olivaceus	MSTREEIAVWNTL TEARVRVWFKNRRAKWKRERNNQAELCKNGFGPQFNGLMQPYEDMY	168
C. carpio Gen-II	- - - - - RKRENNQAELCKNGFGPQFNGLMQPYDDMY	31
M. musculus	PGYSYNNWAAKGLTSASLSTKSFPFFNSMNVNPLSSQSMFSPPNISISSMSMSSSMVPSAV	185
H. sapiens	PGYSYNNWAAKGLTSASLSTKSFPFFNSMNVNPLSSQSMFSPPNISISSMSMSSSMVPSAV	185
X. laevis	PSYSYNNWAAKGLTSASLSTKSFPFFNSMNVNPLSSQSMFSPPNISISSMSMSSGMVPSAV	240
C. carpio Gen-I	-SYTYNNWAAKGLTSASLSTKSFPFFNSMNVNPLSSQTMFSPPNISISSMSMSSMVPSAV	59
G. aculeatus	PSYTYNNWAAKGLTSASLSTKSFPFFNSMNVNPLSSQTMFSPPNIS--SMTSSMVPSAV	64
D. rerio	PSYTYNNWAAKGLTSASLSTKSFPFFNSMNVNPLSSQTMFSPPNISISSMSMSSMVPSAV	183
H. hippoglossus	PSYTYNNWAAKGLTSASLSSKSFPFFNSMNVNPLSSQTMFSPPNIS--SMTSSMVPSV	208
P. olivaceus	PSYTYNNWAAKGLTSASLSTKSFPFFNSMNVNPLSSQTMFSPPNIS--SMTSSMVPSAV	226
C. carpio Gen-II	PSYTYNNWAAKGLTSASLSTKSFPFFNSMNVNPLSSQTMFSPPNISISSMSMSSMVPSAV .*.....*.....**..*** **.*.....*	91
M. musculus	TGVPGSSLNSLNLLNLSSPSLSNAVPTPACPYAPPTPPYYRDTCNSSLASRLKAKQH	245
H. sapiens	TGVPGSSLNSLNLLNLSSPSLSNAVPTPACPYAPPTPPYYRDTCNSSLASRLKAKQH	245
X. laevis	TGVPGSSLNSLNLLNLSPSLNTAVPTSACPYAPPTPPYYRDTCNSSLASRLKAKQH	300
C. carpio Gen-I	TGVPGSSLNSLNLLNLSTPSLSNGVPTSACPYAPPTPPYYRDTCNSSLASRLKAKQH	119
G. aculeatus	TGVPGSSLNSLNLLNLSPSLNSGVPTSACPYAPPTPPYYRDTCNSSLASRLKAKQH	124
D. rerio	TGVPGSSLNSLNLLNLSPSLNSGVPTPACPYAPPTPPYYRDTCNSSLASRLKAKQH	243
H. hippoglossus	TGVPGSSLNSLNLLNLSPSLNSGVPTPCPYAPPTPPYYRDTCNSSLASRLKAKQH	268
P. olivaceus	TGVPGSSLNSLNLLNLSPSLNSGVPTPCPYAPPTPPYYRDTCNSSLASRLKAKQH	286
C. carpio Gen-II	TGVPGSSLNTLNLLNLSPSLNSGVPTPCPYAPPTPPY----- *****.*.....*.....*.....*	131
M. musculus	SSFGYASVQNPNASNLSACQYAVDRPV	271
H. sapiens	SSFGYASVQNPNASNLSACQYAVDRPV	271
X. laevis	SSFGYATVQTGPSNLSACQYAVDRPV	326
C. carpio Gen-I	SSFGYASVQNPNASNLSACQYAVDRPV	145
G. aculeatus	SSFGYASVQNPNATNLSACQYAVDRPV	150
D. rerio	SSFGYASVQNPNASNLSACQYAVDRPV	269
H. hippoglossus	SSFGY--VQNPNATNLSA-----	283
P. olivaceus	SSFGYASVQNPNATNLSACQYAVDRPV	312
C. carpio Gen-II	- - - - -	

FIGURA 11: Alineamiento de secuencias aminoacídicas derivadas de cDNA Pitx2 de distintas especies mamíferas y de peces. En gris se destacan los 60 aminoácidos del homeodominio. “*” aminoácidos idénticos; ":" sustitución por aminoácidos conservados, “.” Sustitución por aminoácidos semiconservados. En azul se destacan las 2 secuencias de *C. carpio*.

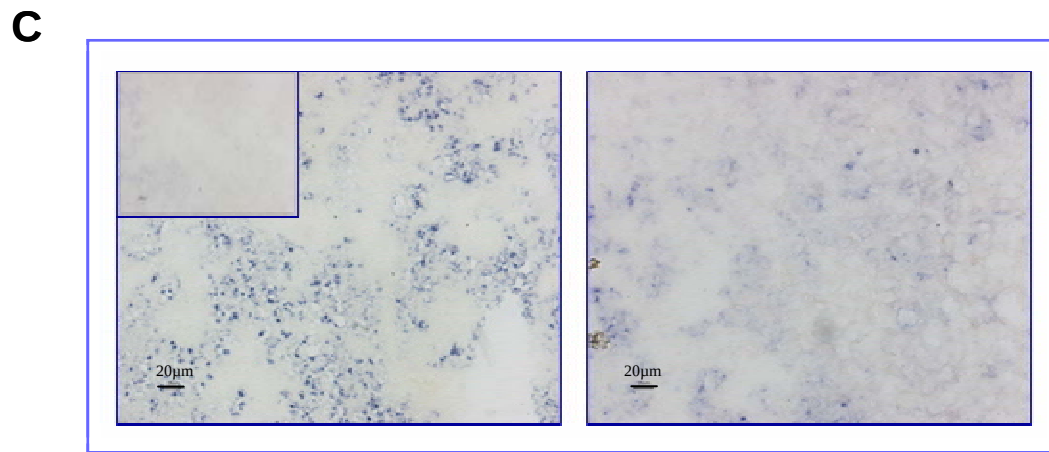
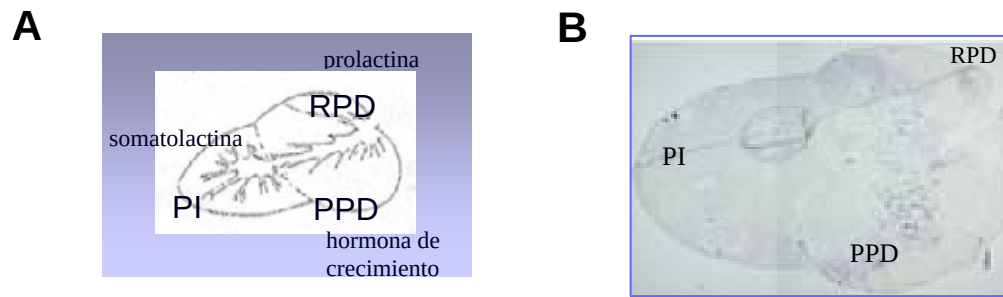
4.1.2 Detección de transcritos Ptx2 en hipófisis de *C. carpio*

Para saber en que región de la hipófisis de carpas adultas se expresa el factor de transcripción Ptx2 y si existe una diferencia significativa en su expresión al comparar carpas aclimatizadas a invierno y verano, se utilizó la metodología de hibridación *in situ*.

En un esquema de la hipófisis (Fig. 12, A), se puede apreciar las distintas zonas que conforman la hipófisis, indicando la localización de las células lactotropas, que producen PRL, en la *rostral pars distalis* (RPD), las células somatotropas, que producen GH en la *proximal pars distalis* (PPD) y la región de la producción de SL en la *pars intermedia* (PI).

La hibridación molecular detectó claramente reacción específica en la pituitaria, al utilizar la sonda Ptx3-a, con una mayor intensidad en la región PPD, menor en PI y muy leve en RPD (Fig. 12, B). Esa relación de la intensidad de la señal en las distintas áreas se observó en todos los individuos analizados. No se registró reacción en el control con el oligonucleótido sentido (Fig. 12, C).

El análisis de la reacción en PPD en carpas aclimatizadas, revela mayor reacción en las carpas de la estación fría, en comparación con las de verano (Fig. 12, C). La evaluación semicuantitativa con el programa Image-Pro-Plus en los cortes histológicos de cuatro individuos indica una diferencia significativa, aproximadamente el doble en invierno respecto a verano (n=4, student's T-test $P < 0,08$) (Fig. 12, D).



Invierno

Verano

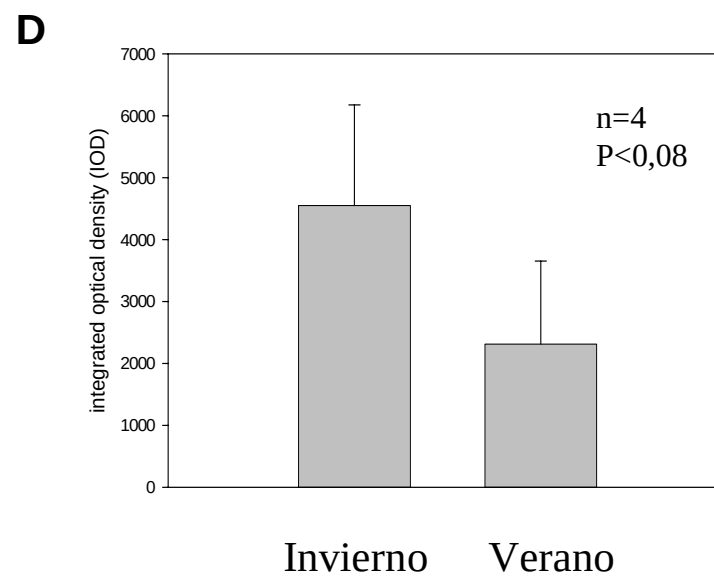


FIGURA 12: Análisis de la expresión de Ptx2 por hibridación *in situ*. Detección de transcritos Ptx2 con oligonucleótido Ptx3-a en cortes sagitales de pituitaria de carpas aclimatizadas a invierno y verano. **(A)** Esquema de la organización morfofuncional de la glándula pituitaria del teleósteo *C. carpio*. **(B)** Reacción Ptx2 específica en PPD y levemente en PI. **(C)** Reacción Ptx2 específica en PPD. El inserto muestra la reacción control con la sonda sentido, oligonucleótido Ptx2-s. **(D)** El grafico presenta el promedio de la densidad óptica integrada (IOD), con su respectiva desviación estándar de la reacción en PPD en cuatro individuos. Student's t-test $P < 0,08$. RPD: *rostral pars distalis*, PPD: *proximal pars distalis*, PI: *pars intermedia* .

4.1.3 Caracterización de secuencias genómicas de Pitx2 de *Cyprinus carpio* por análisis de Southern Blot

Se investigó la presencia de secuencias Pitx2 en el genoma de *C. carpio* por análisis de Southern blot de DNA genómico de carpa. Un fragmento de 441 pb ubicado en el exon 5 del gen, se amplificó por PCR, a partir del clon pcPitx2-7, se fraccionó y se aisló del gel de agarosa, obteniendo un porcentaje de recuperación de DNA desde el gel de agarosa de aproximadamente 75% (Fig. 13). El fragmento se marco con ^{32}P por “Random Primer” obteniendo una actividad específica de aproximadamente $2 \times 10^8 \text{cpm}/\mu\text{g}$. La secuencia de 441 pb se analizó con el programa WebCutter, encontrando dos sitios de restricción para la enzima *HindIII*, y ningún sitio de restricción para *PstI*.

El DNA genómico de tres individuos se digirió con *HindIII* y la aparición de una sombra de fragmentos indica la digestión completa (Fig.14, A). En la doble digestión *HindIII/PstI* se observa una mayor cantidad de fragmentos de menor tamaño (Fig. 14, C). En estos tres individuos se detectó una única banda del mismo tamaño con la sonda Pitx2₄₄₁ en la digestión *HindIII* y en la doble digestión *HindIII/PstI* (Fig. 14, B, D). También se realizó una digestión de DNA genómico con *PstI*, pero es difícil distinguir la bandas en el Southern Blot (no mostrado). La presencia de un fragmento de un tamaño en los ensayos realizados en las condiciones descritas no permitió distinguir el número de genes y hace necesario complementar con otras enzimas de restricción y un mayor número de individuos.

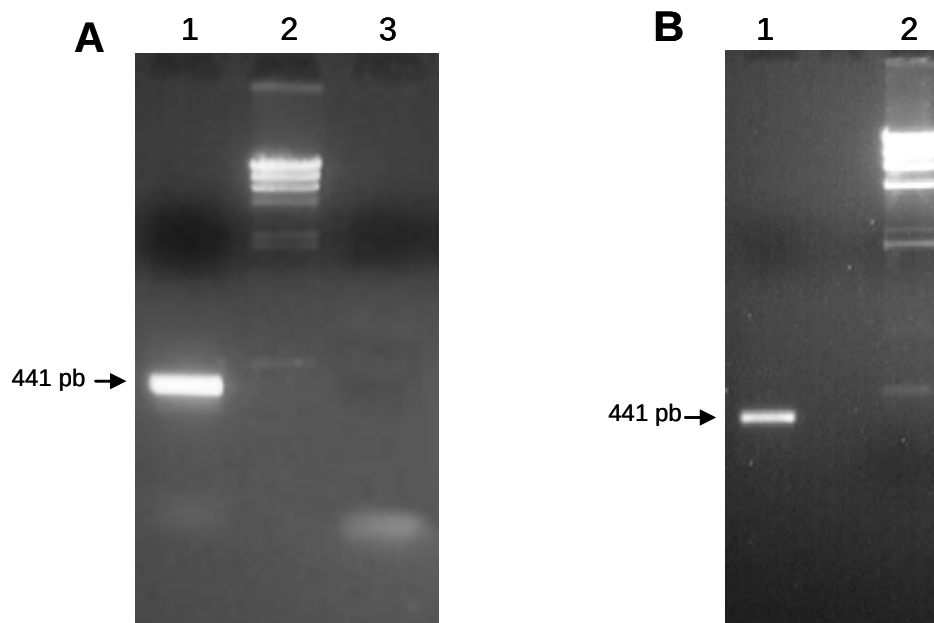


FIGURA 13: Amplificación y purificación del fragmento 441 pb para preparar sonda Pitx2 específica. Fraccionamiento en un gel de agarosa al 1% en TAE 1 X del producto de amplificación con los oligonucleótidos Ptx2-s y Ptx3-a en DNA pcPitx2-7. **(A)**, carril 1: fragmento de 441 pb, Carril 2: 0.5 μ g DNA estándar λ HindIII, carril 3: control negativo sin templado. **(B)**, carril 1: producto de amplificación purificado desde el gel en (A), carril 2: 0.5 μ g DNA estándar λ HindIII.

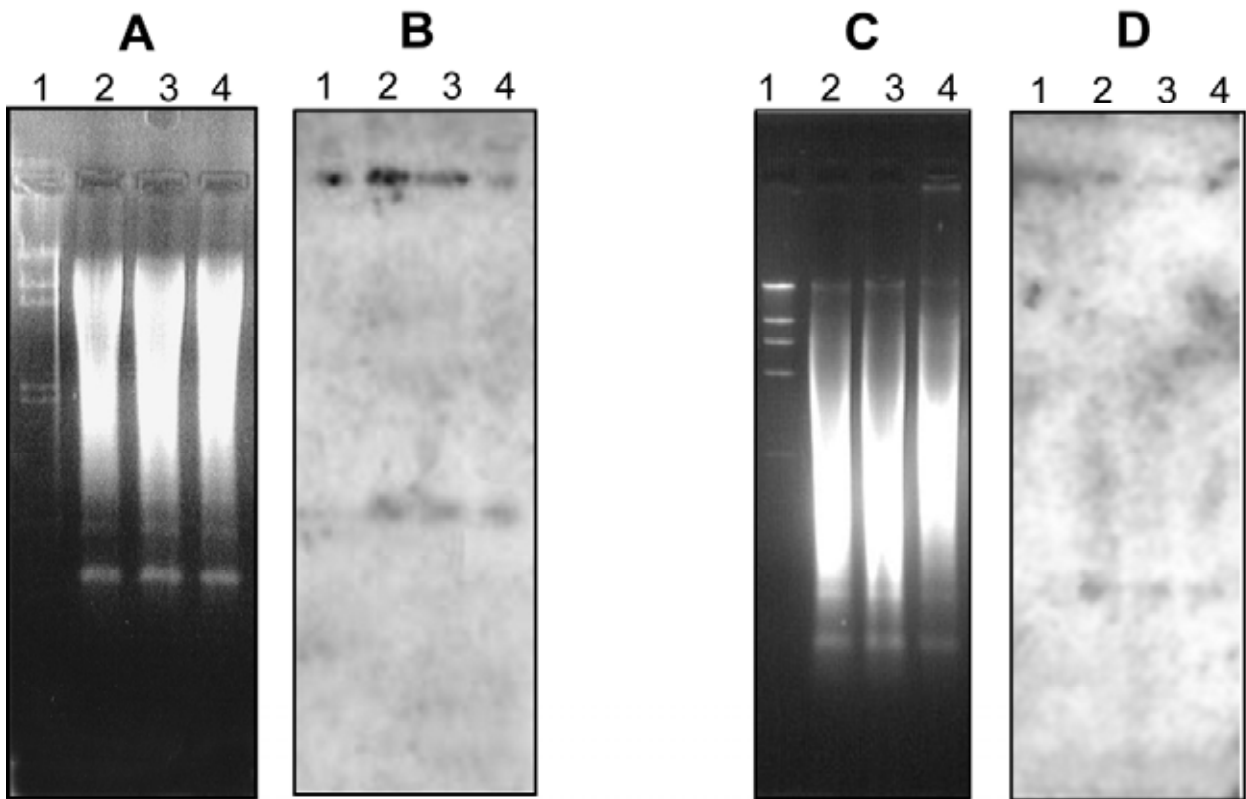


FIGURA 14: Análisis de Southern Blot de Pitx2 en DNA genómico de *C. carpio*.

Fraccionamiento en un gel de agarosa al 1% de la digestión de DNA genómico de tres individuos, Carril 1: Estándar DNA λ HindIII, carril: 2, 3 y 4: individuos, #1, #2, #3. **(A)** Digerido con *HindIII*, **(C)** digerido con *HindIII/PstI*, **(B)** y **(D)** hibridación en Southern Blot con la sonda Ptx2_{441pb} del gel en (A) y (C), respectivamente.

4.2 Rpx de *Cyprinus carpio*

4.2.1 Secuencias de Rpx de *Cyprinus carpio* y análisis comparativo con *Danio rerio*

Las secuencias Rpx se aislaron por PCR a partir de DNA genómico y cDNA de hipófisis de *C. carpio*, para lo cual se diseñaron oligonucleótidos, usando como patrón la secuencia de *D. rerio*, debido a su gran homología con las secuencias de carpa (Tabla 3 y Fig. 15). La temperatura de fusión (T_m) de cada oligonucleótido se calculó en base a la regla de Wallace (Tabla 3). Según el alineamiento la región más conservada de Rpx se ubica hacia el 3', región en la cual se logró obtener productos de amplificación, al utilizar los oligonucleótidos en las distintas combinaciones (Fig. 15).

En un primer acercamiento se utilizaron oligonucleótidos degenerados diseñados a partir de una región conservada entre los distintos miembros de la familia Rpx, ANF1-s y ANF3-a. Con estos oligonucleótidos se amplificó un fragmento del tamaño esperado, de 334 pb en DNA genómico de carpa (Fig.16, A). El producto de amplificación fue clonado en el vector pGEMT-Easy y la secuencia confirmó que corresponde a Rpx de carpa (Anexo 7.4).

Los oligonucleótidos internos ANF-1s y zRpx-4a que abarca el sector 3' codificante, amplificaron un fragmento de 264 pb en cDNA de hipófisis de carpa, la amplificación con estos oligonucleótidos se optimizó, a través de la temperatura de apareamiento (Fig.16, B) eligiendo el producto de amplificación con una temperatura de asociación más alta de 56.9°C para ser clonado en pGEMT-Easy y secuenciado el DNA de tres clones; pcRpx #60, #63 y #64 (Anexo 7.8, 7.9 y 7.10). La región 5' no codificante se obtuvo con el kit 5'RACE, en dos rondas de PCR, con un oligonucleótido antisentido específico y los oligonucleótidos OUTER e INNER pertenecientes al kit. En la primera ronda de PCR se utilizó el oligonucleótido OUTER y cRpx-3a, después de 35

Nombre	Secuencia de oligonucleótidos	pb	%GC	Tm
ANF1-s,	5'-TGAAGTGGTACATMGGSMGSAGGCC-3'	25	nd	nd
ANF3-a	5'-CTGGATYCKGTCCTCATC-3'.	18	nd	nd
zRpx-2s	5'-AATGGCTTCTCTTGCAAAC-3'	19	42	54°C
cRpx-3a	5'-GCAAGTTCTTCACGTATATC-3'	20	40	56°C
zRpx-4a	5'-CTCTCAGTGTTCTTCTCTGC-3'	20	50	60°C

TABLA N° 3: Oligonucleótidos para caracterizar secuencias Rpx. nd: no determinado; **M:**A o C; **S:** G o C; **Y:** T o C; **K:** G o T.

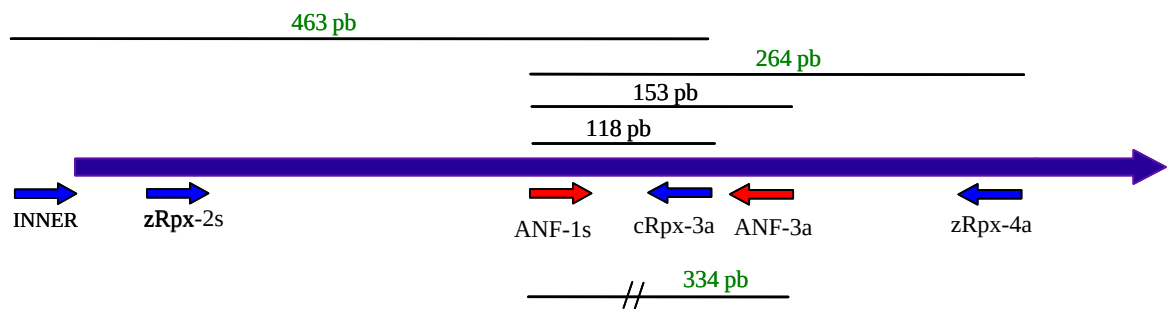


FIGURA 15: Esquema del diseño de oligonucleótidos para amplificar secuencias Rpx de *C. carpio*. Las flechas indican la ubicación de los oligonucleótidos en la secuencia Rpx, las líneas y los números indican tamaños esperados en una amplificación por PCR en cDNA de hipófisis de *C. carpio*. Los números en verde indican los productos de amplificación secuenciados, las flechas rojas la ubicación de los oligonucleótidos degenerados, $\text{---//}^{334 \text{ pb}}$, tamaño esperado en una amplificación por PCR en DNA genómico de *C. carpio*.

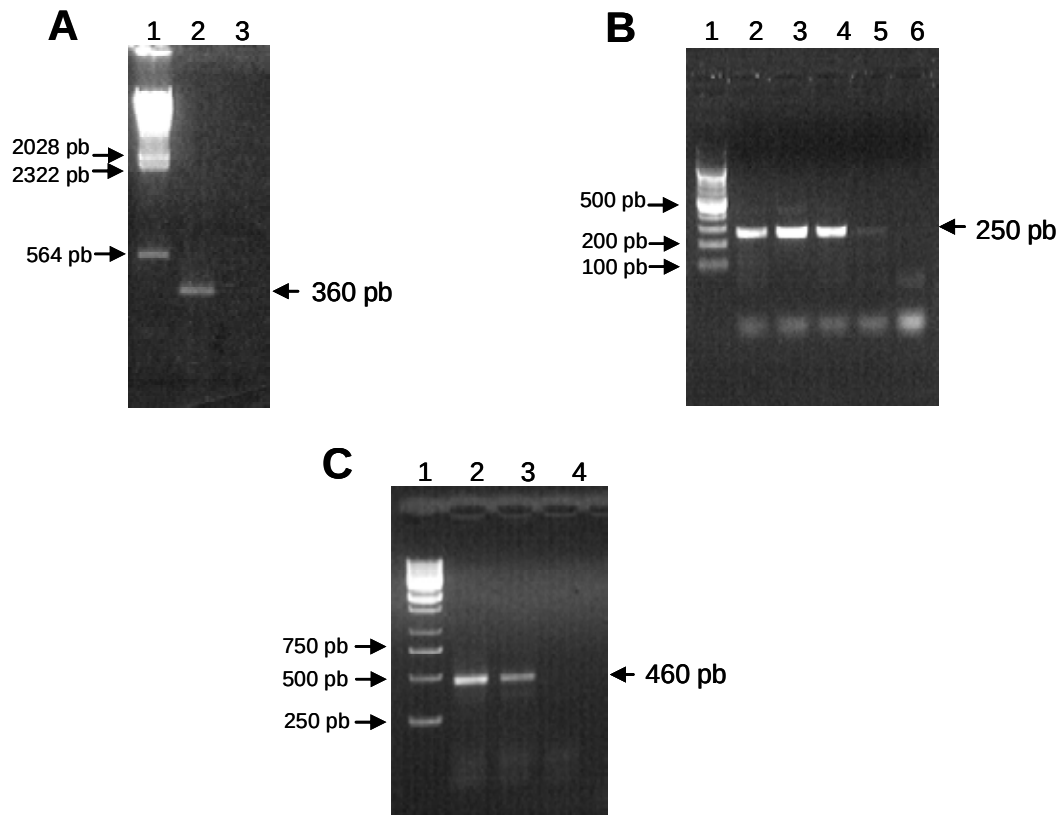


FIGURA 16: Productos de amplificación Rpx de *C. carpio*. Fraccionamiento electroforético de productos de amplificación de carpa, en geles de agarosa al 1%. Productos de amplificación con los oligonucleótidos: **(A)** ANF-1s y ANF-3a, usando DNA genómico de carpa como templado y una temperatura de reasociación de 50°C, carril 1: St λ HindIII, carril 2: producto de amplificación de 360 pb carril 3: control negativo, sin templado. **(B)** ANF-1s y zRpx-4a, gradiente de temperatura para la determinación de la temperatura óptima de reasociación, carril 1: St 100 pb, en los carriles 2, 3, 4 se utilizó como templado un cDNA de hipófisis de carpa, en carril 2: 51.8°C, en carril 3: 54.2°C, en carril 4: 56.9°C, en carril 5 se usa como templado cDNA sintetizado con el kit 5`RACE a 50.3°C, carril 6: control negativo, sin templado. **(C)** segunda ronda de PCR 5`RACE, utilizando los oligonucleótidos INNER y cRpx-3a, en carril 1 St 1 kb, carril 2: 60.3°C, carril 3: 62.9°C, carril 4: control negativo, sin templado.

ciclos a una temperatura de reasociación de 55°C, no se obtuvo amplificación aparente, por lo que una alícuota de esta reacción se utilizó para la segunda ronda de PCR semianidado, con los oligonucleótidos INNER y cRpx-3a, 30 ciclos y una temperatura de reasociación de 60.3°C y 62.9°C, obteniendo productos de amplificación de 460 pb aproximadamente (Fig 16, C). Se eligió la reacción que en el gel se aprecia una mayor intensidad de banda, para ser clonado, obteniéndose tres recombinantes, clones pcRpx #46, #49 y #50, que fueron secuenciados (Anexo 7.5, 7.6 y 7.7)

La secuencia del gen Rpx de *zebrafish* se obtuvo por clonamiento *in silico* y se identificaron 4 exones (Fig. 17). Cabe mencionar que las secuencias de *zebrafish*, especialmente las genómicas, todavía están en proceso de ser mejoradas y eso podría explicar las incongruencias en el alineamiento de “contigs” que contenían los exones Rpx, por lo tanto se presentan las secuencias de cada “contig” encontrado en el banco de datos (Fig. 17). Al alinear la secuencia de cDNA obtenida por empalme *in silico* del DNA genómico con el cDNA Rpx (Acc.Nº NM_131349) se encontró un gap de 10 pb en la región del microsatélite, además el alineamiento de estas secuencias arrojó 8 cambios puntuales a nivel nucleotídico en la zona codificante, y cuatro de estos cambios dan origen a sustituciones en la secuencia aminoacídica derivada (Fig. 18). Esto indica que la secuencia cDNA obtenida del DNA genómico no es la misma del transcrito secuenciado y sugiere que existen dos genes en *zebrafish*.

Las secuencias parciales de Rpx de carpa se alinearon y se analizaron respecto a la secuencia de Rpx *Danio rerio* (Fig. 19), donde se aprecia claramente la diferencia en el extremo 5', por lo que probablemente el oligonucleótido diseñado en el inicio de la traducción zRpx-2s no logró amplificar la secuencia esperada a partir del cDNA. A pesar de esto se logró amplificar la región 5' incluyendo la región no codificante, al utilizar la metodología de 5' RACE, y se

>Zv6_NA1842.1

[illegible]

5' UTR

Exon I

[illegible]

Exon II

>Zv6_scaffold1632

GTGAGGGGTGTNNNNNNNNNNNGATCAATTCAGAGCTGAATGAGACAATTATTACATGCT
GCTTCCAGCAAATTGCCAAGCGGCCATTGTGCTTTTGTGAAGCCGAGCATCTTCCTCCAT
GCATGTCAACAGAGAGAATGGGAATATTCAAGCAGGATTAGTTTTAAACAGCATTATAGGC
TTTATTATATATATATATATATATATATATATATATATATGAACAATTTTTGTTATT
TAACTTTATTTTGAACGTATTTAAATGTATATGTGTGTGTGTGTGTGTATACACACA
AACACATTTAAACACGTTGCAAAATATATTGTAATAAAACAAAAATTGGCAAAAAA
ATGTTTTTGGCCATTTTTGAATATTTAGCAATAAACCTGTTTAAAAAATAAAGGGAACA
CTTGGAGTTACATTGTGTTGTTTAAAGTGTTCCTTTATTTTTGAGCAGAATATTTCTGC
AAACACATTTTTGGACCGTTTTTGGAAATAAATTTTTAAAAATATATTTCAAATCATTC
AAATATTCAAATTGCAATACAAGGAGATAAATGCACATTTTAATACATATATAATACATA
TTTAATACACAATGCAGATATCACACCAATCAAGCAAGGAATAAACTTAGATACTTTTAC
AAACTTTATATAATTTATATATACATTACAAAAGAATAAACATGAATTAATCTTGCTAA
ACATTTGGTTCTGTTTTATTCTTTGTATATGTATATTTTTATATATATATTTTTAAATGA
TGGATACTTTAATATTTTCTTCACCTTAAAAATATATTTTGAATATGTTTTGGATTAAAT
GAAATGTATCTTCAATTAAAAAAAAAAATAAATTAAGTTTAAGTGAACATCACAGATACAA
CATGTATTTAGCATGTATTTCAAATATATTTTGGCCAGGAAAAAATAATTTTTACCAI
ATGCAAAATGCTTAAGACAAAATGTGTTTTAAATGTACTTTTACTCATTATTATTTTTT
TGTCGTTTACCTCCagATCAAGATATTAGAGAGTGTTCCTCAAGTGAACCTCATACCCAGG
TATTGATATACGTGAAGAAGCTTGCGAAGAAGCTTCATTTAGATGAGGACAGAATCCAGgt
GAACACTGATTTAAATCTCAAATATTGCATCATTTACTGTAAACATATCATTTTTGTCTG
ATTTTTTATGTCTGATTTATTATTATATATTTTAATCCAATATTAATGTGTAAAAATTCT
AAGTAAAATAATGTAAAAAGTCCAATTTTGCACAAAAGTCTTATATTTTGTGGACAAGAA
TATATTTTAGCAGTACTGTAGCTATAGCCAAAAATAGACAGATTTTTCTTTTATGGCAA
ATTATTAGAAATATAAGATAATATGACGTCCCATGAAGATGTTTAGTTCAATTTCTACTG
TAAATATATCAAAACGTAATTTTTCATTTAGTAATATTAATTGAAGAACTCAACTTGTTCA
ACTTTAAAGGTGATTTTCTCAATGTTTACATTTTAGGATTCCAGACAAAATATTGATCCA
ACCAATTTCTGTTTAAACAGAGAGCAGATTTTTTTCAGCACATTTCTAATCATAATATTTT
TAATAACTCATCTCTAATAAATGATTTATTTTATCTTTGCCATGATGACAGTAAATAATA
TTTGACTACATATTTCTCAAGACACTTCTATACAGCTTAAAGTGACATTTAAAGGGTTAA
CTAGGTTAATTAGGTTAACTAGGCAGGTTAGGGTAATTAGGCAAGTTATTGTATAATGAT
GTTTTGTTCTGTAGACTATTGAAAAGAAATATAGCTTAATGGGGCTAATAATATTGACCT

Exon III

3' UTR

FIGURA 17: Secuencia genómica de Rpx de *Danio rerio*. Destacado en amarillo la región 5' y 3' no traducida, en verde se indica la secuencia de cada exon, en números romanos el número de cada exon, en rojo sitios de empalme intron-exon. (N)n: secuencia desconocida.

Localización base de datos: Zv6_NA1842.1, localización genómica: Zv6_NA1842

Localización base de datos: Zv6_scaffold1632, localización genómica:11

Rpx 1 -ATCAGTTGGAGTTAAATTAAGGACTTGAGTTTAGCAATGGCTTCTCTTGCAAACAGCC 59
Rpx 2 GATCAGTTGGAGTTAAATTAAGGACTTGAGTTTAGCAATGGCTTCTCTTGCAAACAGCC 60

CGTCTGTGTTTACCATCGACAGCATCCTGGGACTGGATCGACCGGAGCAGAGAACATGTC 119
CGTCTGTGTTTACCATCGACAGCATCCTGGGACTGGATCGACCGGAGCAGAGAACATGTC 120

↓

CTTACAGGCCCTGGACAGACGTGAAGCCAGCATGTCAGAATCGTCGAGTGGTGACAGAAA 179
CTTACAGGCCCTGGACAGACGTGAAGCCAGCATGTCAGAATCGTCGAGTGGTGACAGAAA 180

G

ATGATGCTCCAGTGGATGTGAGAGGAAATGAAGATGGTAAATCTTTCAGTAAATCACCAA 239
GTGATGCTCCAGTGGATGTGAGAGGAAATGAAGATGGTAAATCTTTCAGTAAATCACCAA 240

E

CTGACTCGTACAGGAGAACACTAAACTGGTACATTGGGCGCAGGCCGAGAACAGCCTTCT 299
CTGACTCGTACAGGAGAACACTGAACTGGTACATCGGGCGCAGGCCGAGAACAGCCTTCT 300

↓

CCAGTGTTTCAGATCAAGATATTAGAGAGTGTTTTCCAAGTGAACATCATACCCAGGTATTG 359
CCAGTGTTTCAGATCAAGATATTAGAGAGTGTTTTCCAAGTGAACATCATACCCAGGTATTG 360

H

ATATACGTGAAGAACTTGCGAAGAAGCTT**CA**TTTAGATGAGGACAGAATCCAGATTTGGT 419
ATATACGTGAAGAACTTGCGAAGAAGCTT**CA**TTTAGATGAGGACAGAATCCAGATTTGGT 420

Q

TCCAGAACAGAAGAGCAAAGCTGAAGCGTTTCGCACAGAGAGTCCCAGTTCCTCATGGTGA 479
TCCAGAACAGAAGAGCAAAGCTGAAGCGTTTCGCACAGAGAGTCCCAGTTCCTCATGGTGA 480

S **T**

AAAACGTCTCT**AG**CGATTTACAA**AC**GGCAGAGAAGAACAC**TGA**GAGTAGAACTACATTT 539
AAAACGTCTCT**AA**CGATTTACAA**AT**CGGCAGAGAAGAACAC**TGA**GAGTAGAACTACATTC 540

N **I**

CTTTATTATTATTATTATTATTATTATTATTATTATCATCATTATTATTTCTCTGTT 599
CTT-----ATTATTATTATTACTATTATTATTATCATCATTATTATTTCTCTGTT 590
*** *****

ACCAAATTGTAATTTATTAATGTCTTTATTAGTTATGTCTTTTTATGATTTAAATGATA 659
ACCAAATTGTAATTTATTAATGTCTTTATTAGTTATGTCTTTTTATGATTTAAATGATA 650

AAAATACCTATTGTTATTTTTATTGTGTGTGTTTGGTCAAAATATAAATAAATAATTCT 719
AAAATACCTATTGTTATTTTTATTGTGTGTGTTTGGCCAAAATATAAATAAATAATTCT 710

AAAACCTT 726
AAAACCTT 717

FIGURA 18: Alineamiento de secuencias cDNA Rpx de *Danio rerio*. Rpx 1: secuencia empalmada *in silico* del gen Rpx *D. rerio*. Rpx 2: cDNA Acc.Nº. NM_131349.1. Destacado en negrita los codones que codifican para un aminoácido diferente en cada secuencia y solamente se indican los respectivos aminoácidos en la parte superior e inferior de cada secuencia. Destacado en calipso codon de inicio y término. “*” indican nucleótidos idénticos, las flechas indican la ubicación de los intrones, los números romanos corresponden a cada exon.

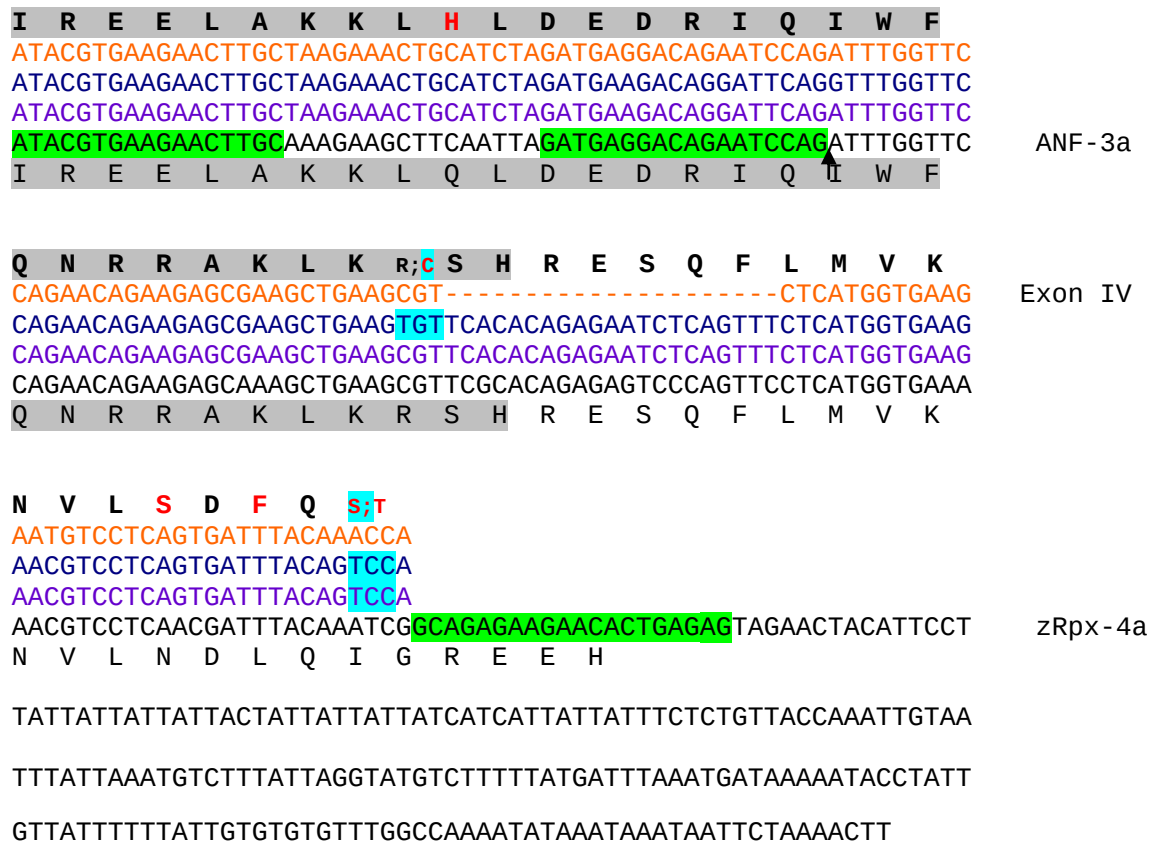


FIGURA 19: Secuencias Rpx de *Cyprinus carpio* comparadas con *Danio rerio*. Secuencias nucleotídicas de cDNA; negro: Rpx *D. rerio* (Acc.Nº.NM_131349); fucsia: pcRpx-46; azul claro: pcRpx-49; verde: pcRpx-50; naranja: pcRpx-60; azul oscuro: pcRpx-64; lila: pcRpx-63. Secuencias aminoacídicas derivadas; arriba correspondiente al cDNA de *C. carpio*, en negrita y en rojo los aminoácidos que no se encuentran o son diferentes en la secuencia de *D. rerio*, destacadas en calipso el cambio de un aminoácido entre las secuencias de *C. carpio* y su respectivo codon. Abajo del cDNA de *D. rerio*, en negro correspondiente a *D. rerio*. Destacado en gris la región homeodominio, en amarillo los oligonucleótidos sentido, en verde los oligonucleótidos antisentido. Las flechas indican la posición de los intrones con respecto al gen Rpx de *D. rerio*.

obtuvo la región codificante, con respecto a *Danio rerio* (Acc.Nº NM 131349) excepto los 14 nucleótidos del 3' codificante.

El marco de lectura abierta permite el inicio de una cadena aminoacídica derivada a partir de un ATG en 19 bp (Fig. 19). Sin embargo, el alineamiento con la secuencia correspondiente de *D. rerio* coincide claramente con la secuencia aminoacídica derivada del segundo ATG (Fig. 19). La frecuencia de la utilización de codones en carpa no descarta la posibilidad de que la secuencia comience en el primer ATG en 19 pb.

En las secuencias parciales Rpx de carpa se aprecian 18 pb (alternativamente 51 pb si empieza del 2º ATG) de la región 5' no codificante y 538 pb de la región codificante (ó 505 pb si se empieza del segundo ATG) que corresponde a más del 97% de la región codificante. Las secuencias de los clones del extremo 5' solapan en 73 pb con los clones de la región 3', lo cual confirma la secuencia entre ellas. Sin embargo sólo dos secuencias son idénticas en la región que solapan, por lo que sólo se pudo realizar un empalme de éstas para ser depositado en el banco de datos *GenBank* bajo el número acceso EF051105. Las diferencias en pares de bases, en los distintos clones, que causan el cambio de los aminoácidos, N a D, R a C, S a T (Fig. 19, destacado en calipso), sugieren la presencia de dos genes Rpx de carpa.

El análisis de las secuencias aminoacídicas derivadas de *C. carpio* y de *D. rerio* mostró 78% de identidad, y el alineamiento de secuencias aminoacídicas derivadas de Rpx de diferentes especies, muestra la región más conservada hacia el carboxilo terminal, en el homeodominio y las secuencias flanqueantes (Fig. 20). En la tabla número 4 se indican los nombres y números de acceso de cada secuencia utilizada para el alineamiento de las secuencias aminoacídicas en la figura 20.

```

H. sapiens      -----MSPSLQEGAQLGENKPSSTCSFSIERILGLDQKKDCVPLMK 40
O. cuniculus    -----MSPNLQEGARLVEGKPSSTSFSIESILGLDQKKDDAPSMK 40
M. musculus      -----MSPSLREGAQLRESKPAPCSFSIESILGLDQKKDCTTSVR 40
D. rerio         -----MASLANSPS-----VFTIDSILGLDRPEQR---TC 27
C. carpio        MKTRRRGLDLQMASLTVSTHQNRSMRQCAFTIDSILGLDRPDPTVLSA 50
                  ..*      .      *: *: *****: .

H. sapiens      PHRPWADTCSSSGKDGNLCLHVPNPPSGISFPSVVDHPMPEERASKYENY 90
O. cuniculus    PHRPWADTCSSLGKDANLRLHVSPFNGISFPHPGDHPMPEERAMKYENY 90
M. musculus      PHRPWTDTCGNSEKDGNPPLHAPDLPSETSFPCPVDHPRPEERAPKYENY 90
D. rerio         PYRPWTDVKPACQ---NRRVVTES-----DAPVDVRENED-----GKS 62
C. carpio        PYRPWTDVKPAGQ---NRGVVADS-----GASVDVRVNED-----SKS 85
                  *:***:*.      * : . .      *      *:      :

H. sapiens      FSASERLSLKREL SWYRGRRPRTAFTQNQIEVLENVFRVNCYPGIDIRED 140
O. cuniculus    FSASERASLKRELNWYRGRRPRTAFTQNQVEVLENVFRVNCYPGIDIRED 140
M. musculus      FSASETRSLKREL SWYRGRRPRTAFTQNQVEVLENVFRVNCYPGIDIRED 140
D. rerio         FSKSPTDSYRRTLNWYIGRRPRTAFSSVQIKILES VFQVNSYPGIDIREE 112
C. carpio        YSKPPADS YRRTLNWYIGRRPRTAFSSVQIKILES VFQVNSYPGIDIREE 135
                  :* .      * :* *.* ** *****: . *: :*: **.**: *****:

H. sapiens      LAQKLNLEEDRIQIWFQNRRAKLKRSHRESQFLMAKKNFNTNLE----- 185
O. cuniculus    LARKLNLEEDRIQIWFQNRRAKLKRSHRESQFLMA----- 175
M. musculus      LAQKLNLEEDRIQIWFQNRRAKMKRSRRESQFLMAKKPFNPDLLK----- 185
D. rerio         LAKKLQLEDRIQIWFQNRRAKLKRSHRESQFLMVKNVLN-DLQIGREEH 161
C. carpio        LAKKLHLEDRIQVWFQNRRAKLKCSHRESQFLMVKNVLS-DLQS----- 179
                  **:***:*.*****:*****.* *:*****.

```

FIGURA 20: Alineamiento de secuencias aminoacídicas derivadas de cDNA Rpx de mamíferos y de peces. En gris se destacan los 60 aminoácidos del homeodominio. “*” aminoácidos idénticos; “:” sustitución por aminoácidos conservados, “.” Sustitución por aminoácidos semiconservados. En azul se destaca la secuencia de *Cyprinus carpio* y en rojo la secuencia de *Danio rerio*.

Nombre común	Nombre Científico	Acc.Nº sec. nucleotídica	Tipo de molécula, parcial o total	Acc.Nº sec aminoacídica derivada	Nº de aa
Ratón	<i>Mus musculus</i>	NM_010420	Hesx1, mRNA total cds	NP_034550	185
Conejo	<i>Oryctolagus cuniculus</i>	AF102132.	ANF, mRNA parcial cds	AAD11791	175
<i>Zebrafish</i>	<i>Danio rerio</i>	NM_131349	DANF, mRNA, total cds	NP_571424.1	161
Humano	<i>Homo sapiens</i>	NM_003865.	Hesx1 mRNA, total cds	NP_003856.1	185
Carpa común	<i>Cyprinus carpio</i>	EF051105	Rpx mRNA, parcial cds	—	179

TABLA N°4: Lista de secuencia Rpx extraídas del *GenBank*

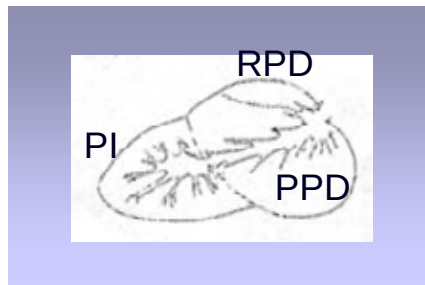
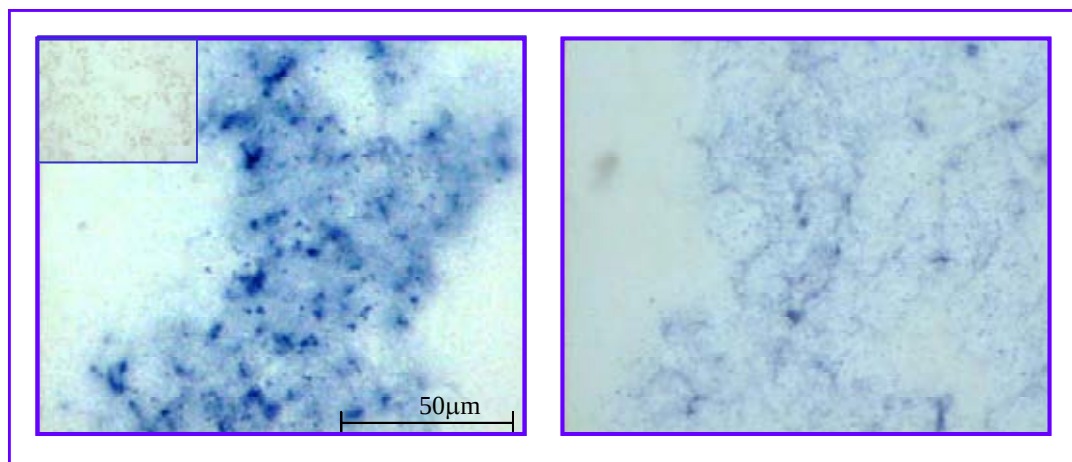
4.2.2 Detección de transcritos Rpx en hipófisis de *Cyprinus carpio*

Para saber en que región de la hipófisis de carpas adultas se expresa el factor de transcripción Rpx y si existe una diferencia significativa en su expresión al comparar carpas aclimatizadas a invierno y verano, se realizó una hibridación *in situ*.

En un esquema de la hipófisis (Fig. 21, A), se puede apreciar las distintas zonas que conforman la hipófisis, indicando la localización de las células lactótropas, que producen PRL, en la *rostral pars distalis* (RPD), las células somatotropas, que producen GH en la *proximal pars distalis* (PPD) y la región de la producción de SL en la *pars intermedia* (PI).

La hibridación detectó claramente reacción específica en la pituitaria, al utilizar la ribosonda Rpx antisentido, con una mayor intensidad en la región PPD, menor en PI y escasa en RPD. Esa relación de la intensidad de la señal en las distintas áreas se observó en todos los individuos analizados. En el control con la ribosonda sentido no se registró reacción (Fig. 21, B).

El análisis de la reacción en PPD en carpas aclimatizadas, mostró mayor reacción en las carpas de la estación fría, en comparación con las de verano (Fig. 21, C). La evaluación semicuantitativa con el programa Image-Pro-Plus en los cortes histológicos de cuatro individuos indicó una diferencia significativa, aproximadamente el doble en invierno respecto a verano (n=4, $P<0.09$) (Fig. 21, C).

A**B**

Inverno

Verano

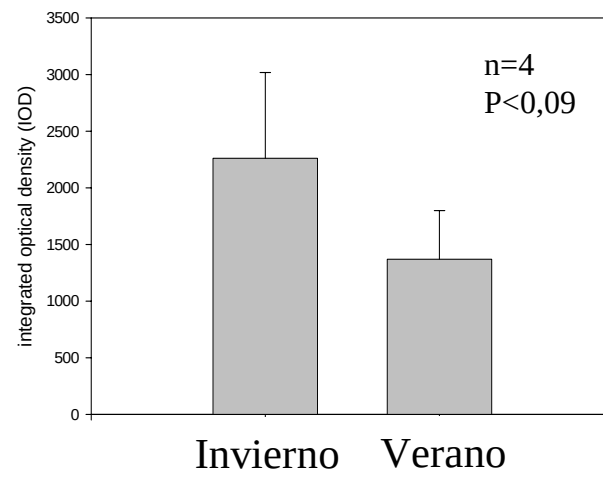
C

FIGURA 21: Análisis de la expresión de Rpx por hibridación *in situ*. Detección de transcritos de Rpx con la ribosonda Rpx antisentido en cortes sagitales de pituitaria de carpas aclimatizadas a invierno y verano. **(A)** Esquema de la organización morfofuncional de la glándula pituitaria del teleosteo *C. carpio*. **(B)** Reacción Rpx específica en PPD. El inserto muestra la reacción control con la sonda sentido. **(C)** El grafico presenta el promedio de la densidad óptica integrada (IOD), con su respectiva desviación estándar de la reacción en PPD en cuatro individuos. Student's t-test $P < 0,09$. RPD: *rostral pars distalis*, PPD: *proximal pars distalis*, PI: *pars intermedia* (PI).

5. DISCUSIÓN

Ptx2 y Rpx son factores de transcripción de tipo homeobox, altamente conservado en la zona carboxilo terminal, que incluye la región de unión al DNA (Kazanskaya et al., 1997; Drouin et al., 1998). Por lo tanto el alineamiento múltiple de las secuencias de cDNA de Ptx2, entre las distintas especies mamíferas y la secuencia conocida de *Danio rerio*, permitió el diseño de partidores específicos que pertenecen a regiones consenso. Todas las secuencias de los partidores tanto de Ptx2 como de Rpx son 100% idénticas a la secuencias de *Danio rerio*, debido a que es una especie cercana, perteneciente a la familia *cyprinidae*, al igual que la carpa común, *Cyprinus carpio* (Elgar, 2004; Christoffels et al., 2006). En peces no estaban anotados los genes Ptx2 y Rpx, y para revelar la organización genómica se clonaron *in silico*, a partir de la secuencia del genoma de *Danio rerio*, lo que permitió interpretar mejor las secuencias de las isoformas de estos factores de transcripción en teleósteos (Smidt et al., 2000; Cox et al., 2002).

En mamíferos se observan dos mecanismos en la producción de las isoformas Pitx2, por empalme alternativo y por uso de un promotor alternativo. (Smidt et al., 2000; Cox et al., 2002). En *zebrafish* se conocen dos isoformas y el análisis de las secuencias sugirió que la isoforma Ptx2a se genera por empalme alternativo y la isoforma Ptx2b por el uso de un promotor alternativo. Eso sugiere que a pesar de tener un número diferente de exones respecto a mamíferos (Cox et al., 2002), el mecanismo de la formación de isoformas está conservado.

Al realizar el análisis de las secuencias parciales de Ptx2 de carpa se identificó el 66% de la región codificante, con respecto a la isoforma Ptx2a de *D. rerio* (Acc.Nº AF156906), estas secuencias parciales corresponden a la región 3', dentro del exon 5 de *D. rerio*, por lo que en *C. carpio* no fue posible determinar a que isoforma correspondían los transcritos clonados. Los

distintos tamaños de insertos obtenidos durante el clonamiento del extremo 3' no codificante de Ptx2 de carpa sugiere que existen variantes en el largo de esta región en *C. carpio*. Las secuencias de cDNA Ptx2 *D. rerio*, a las que se puede acceder en el banco de datos, hasta ahora muestran diferentes tamaños en la región 3'-no codificante pero no se puede concluir si los transcritos tienen diferente tamaño en el 3' o les faltan una parte en el recombinante (Essner et al., 1999). Por otro lado se podría explicar la diferencia de tamaño entre los distintos clones, si fueran transcritos de distintos genes como se ha visto en múltiples ejemplos de genes duplicados en carpa (Arends et al., 1998; Figueroa et al., 2005; Christoffel et al., 2006; Quezada et al., 2006).

Las diferencias en la secuencia codificante corroboran que hay transcritos de dos genes. En el análisis comparativo de las secuencias parciales de Ptx2, obtenidas por PCR usando como templado cDNA de hipófisis de carpa, se observaron catorce cambios a nivel nucleotídico ampliamente distribuidos, cuatro de estos cambios producen diferencias en la secuencia aminoacídica derivada, dos de ellos son sustituciones conservadas y dos son semiconservadas. Esto indica claramente la presencia de dos genes de Ptx2 en el genoma duplicado de la carpa.

En el clonamiento *in silico* de la secuencia genómica de Rpx *D. rerio*, se identificaron 4 exones, lo que difiere de la organización génica de hesx1/Rpx en ratón, el cual tiene 5 exones, (Thomas et al., 1995). En el análisis de las secuencias Rpx parciales obtenidas a partir de cDNA de hipófisis de *C. carpio* mostró múltiples cambios puntuales a nivel nucleotídico ampliamente distribuidos incluyendo la región homeodominio; tres de ellos dan origen a cambios en las secuencias aminoacídicas derivadas, en la región del homeodominio y uno de estos cambios nucleotídicos en la región carboxilo terminal, también da origen a un cambio en la secuencia aminoacídica derivada, además uno de los clones que abarca la región 3' codificante posee un gap de 21 nucleótidos lo que se traduce en la pérdida de 7 aminoácidos, dentro de los cuales se

incluyen 2 aminoácidos pertenecientes al homeodominio. Ninguno de estos cambios puntuales, ni el gap de 21 nucleótidos en una de las secuencias, causa un codon de detención, ni un corrimiento en el marco de lectura, lo que nos indica que no se trata de pseudogenes (Zhang, 2003). En suma, el análisis de las secuencias indica la presencia de transcritos de dos genes *Rpx* activos, como se ha visto en variados ejemplos de genes duplicados en *C. carpio* (Arends et al., 1998; Figueroa et al., 2005; Kausel et al., 2006). Además, las diferencias aparentes al alinear la secuencia de cDNA *Rpx zebrafish* con la del cDNA obtenido por empalme *in silico* de la secuencia de DNA genómico de *zebrafish* sugiere dos genes de *Rpx* en este pez, que corrobora la duplicación genómica en teleósteos (Hoegg and Meyer, 2005).

C. carpio es una especie tetraploide y se estima por un análisis de microsatélites que la duplicación del genoma ocurrió hace 12 millones de años (David et al., 2003). Con el análisis de los genomas de *Danio rerio*, *Oryzias latipes*, *Takifugu rubripes* y *Tetraodon nigroviridis* se confirmó la tercera ronda de duplicación genómica (3R) en la evolución a los peces teleósteos (Hoegg and Meyer, 2005; Steinke et al., 2006). En peces, anfibios y plantas la duplicación genómica es muy frecuente y se relaciona con adaptación a habitats nuevos y/o extremos (Ohno, 1970). Sorprendentemente se ha reportado el primer mamífero con un genoma duplicado, la rata viscacha, *Tympanoctomys barrerae*, un pequeño roedor que habita un ambiente extremo en los salares de Argentina (Gallardo, 1999). Hasta el descubrimiento de este animal se había pensado que la duplicación genómica en mamíferos como algo imposible, debido a la determinación del sexo a través de cromosomas sexuales (Gallardo, 2000). En la gran mayoría de los peces el sexo se determina por factores ambientales como la temperatura y acceso a alimentos (Gilbert, 2003). Sin embargo, la posibilidad de estudiar la función de genes duplicados amplía las posibilidades de encontrar nuevas funciones, principalmente en términos de regulación y la importancia de

caracterizarlos por separado en un organismo con el genoma duplicado como en el pez *C. carpio* (Elgar, 2004).

Para genes duplicados existen los siguientes destinos; pérdida y pseudogenización, conservación de la función, subfuncionalización y el desarrollo de una nueva función (Zhang, 2003). La subfuncionalización de genes duplicados puede ser espacial o temporal, como ocurre en la expresión sito específico con los transcritos de los dos genes para somatolactina (SL) de *D. rerio* en hipófisis de peces adultos, la forma SL α en la región más posterior de la *pars intermedia* y la forma SL β en la región anterior de la *pars intermedia* cercana al límite de la *pars distalis* (Zhu et al., 2004). En el caso de la expresión de los dos genes de POMC, se vio que es afectada en respuesta al estrés producido por cambios de temperatura, se produce una variación en la proporción de la expresión de transcritos de POMC I: POMC II, en hipófisis de *C. carpio* (Arends et al., 1998). Recientemente mostramos una expresión diferencial de los genes duplicados de Pit-1, con mayor expresión del gen-I respecto al gen-II en la pituitaria de carpas aclimatizadas a la estación fría (Kausel et al., 2006). Esto demuestra la ventaja de estudiar la regulación de expresión génica en el genoma de un pez tetraploide ya que puede facilitar discriminar función y regulación específica (Elgar, 2004).

Al evaluar la reacción específica para Ptx2 y Rpx obtenida por hibridación *in situ* en hipófisis de carpas adultas aclimatizadas a invierno, con respecto a la obtenida en aquellas aclimatizadas a la estación cálida se encontró que en invierno hay aproximadamente el doble de transcritos que en verano. Para otros genes expresados en hipófisis hasta ahora estudiados, como PRL, GH y Pit-1, se ha observado mayor expresión en carpas aclimatizadas a verano respecto al invierno (Figuroa et al., 1994, 1997; Kausel et al., 1998, 1999, 2006). Además, los genes de carácter ubicuo, β actina y CK2 subunidad β , que mostraron variación de la expresión a nivel de

transcripción en respuesta a cambios ambientales, exhibieron mayor expresión en hígado de carpas aclimatizadas a verano respecto a invierno (Sarmiento et al 2000; Vera et al., 2000). Sin embargo, a través de *diferencial display* se observaron más genes con mayor número de transcritos en invierno respecto a verano, uno de los cuales se identificó como nucleolina (comunicación personal). En hígado de *C. carpio*, existe un aumento de la expresión de nucleolina en invierno, respecto a verano, que está relacionado con una segregación del nucleolo e inhibición de la expresión de los genes de rRNA en la estación fría (Alvarez et al., 2003, 2004).

La presencia de transcritos de Ptx2 en las distintas regiones de la glándula pituitaria de carpa sugiere una función en la regulación la expresión de genes específicos de estas regiones. En la hibridación *in situ* la reacción de mayor intensidad se detectó en la PPD, lo cual sugiere que Ptx2 podría estar involucrado en la regulación del gen GH que se expresa en esta región de la pituitaria de carpa (Figuerola et al., 2005). Sin embargo, se correlaciona negativamente la presencia de GH que es mayor en verano comparado con invierno y se necesitan estudios funcionales para conocer la interacción y regulación en este modelo (Figuerola et al., 2005). En peces no hay estudios funcionales respecto a una posible regulación del gen de PRL o GH con Ptx2, regulación que se ha mostrado en modelos mamíferos (Quentien et al., 2002a, b). Estudios de unión y de trans-activación en los promotores humanos de PRL, GH, y Pit-1 mostraron que Ptx2 es capaz de unirse a estos promotores y activarlos (Quentien et al., 2002b). Al cotransfectar células que no expresan Pit-1 o Ptx2, con el promotor de PRL de rata o humano frente el gen de luciferasa y con un vector que expresa Ptx2, o Pit-1, o ambos, se vio la capacidad de activar este promotor y que Ptx2 y Pit-1 en conjunto lograban un fuerte sinergismo en la activación de la expresión, mediada por el promotor de PRL (Amendt et al., 1998, 1999; Quentien et al., 2002a,

b). Para los promotores de GH y Pit-1 humanos, se vió un efecto aditivo al cotransfectar células CV1 con Ptx2 y Pit-1 (Quentien et al., 2002b).

En ratas adultas se encontró por un lado la presencia de transcritos Ptx2 en casi todas las células del lóbulo anterior e intermedio de hipófisis y por otro lado en estudios funcionales se demostró la actividad trans-activadora de Ptx2 (Smidt, et al., 2000). Claramente las tres isoformas descritas en rata fueron capaces de estimular la expresión del gen reportero luciferasa en tres constructos: (a) α -GSU-Luc, el promotor del gen alfa-GSU, (b) 3CE3-Luc, el promotor mínimo de POMC incluyendo tres veces la secuencia CE3 que une específicamente a los miembros de la familia Ptx, y (c) -480/+63 POMC-Luc, la región proximal del promotor POMC. La más eficiente para trans-activar estos promotores fue la isoforma Ptx2a, seguida por Ptx2c y de una forma menos eficiente Ptx2b (Smidt et al., 2000).

También se ha mostrado una regulación diferencial de la expresión génica mediada por las distintas isoformas de Ptx2 en otros promotores; en el promotor de PRL, y dos promotores de genes que no se expresan en la hipófisis como son PLOD1, cuyo gen codifica la enzima que cataliza la formación de hidroxilisina en colágeno, que tiene un rol en la especificidad de la matriz extra celular y entrega la base de la formación de tejidos y órganos, y Dlx2, cuyo gen codifica un factor de transcripción expresado en el mesénquima y células epiteliales de la región mandibular y maxilar, y en el diencéfalo (Cox et al., 2002). Transfecciones transientes en tres tipos celulares revelaron activación de los promotores de PLOD1 y Dlx2 mediado por Ptx2a y Ptx2c, sin embargo Ptx2b es inactivo. En contraste Ptx2b es más eficiente para trans-activar el promotor de PRL que Ptx2a o Ptx2c. Interesantemente la cotransfección de Ptx2a o Ptx2c con Ptx2b resulta en una activación sinérgica en los promotores de PLOD1 y Dlx2. También se

demonstró que las isoformas de Ptx2 tienen actividades transcripcionales distintas, dependiendo del tipo celular utilizado para la transfección (Cox et al., 2002).

En cuanto a las interacciones proteína-proteína, en Ptx2 humano, todas las isoformas de Ptx2 son capaces de formar homodímeros, Ptx2b es más eficiente al formar heterodímeros, con las isoformas a y c (Cox et al, 2002). Ptx2 también es capaz de formar heterodímeros con Pit-1, y se postula que a través de este mecanismo ocurre la actividad sinérgica de trans-activar el promotor de PRL humano (Amendt et al., 1999). En la carpa se mostró en el presente estudio la expresión de Ptx2 en las regiones PPD y PI de la hipófisis donde se expresa el factor de transcripción Pit-1 que sugiere que estos factores podrían interactuar en las células productoras de GH y SL (Kausel et al., 1999; Figueroa et al., 2005; López et al., 2001).

En cuanto a Rpx no hay estudios funcionales en adultos. En el desarrollo se ha mostrado la interacción proteína-proteína, donde Rpx es capaz de formar homodímeros y heterodímeros con el factor de transcripción Prop-1, reprimiendo la propiedad activadora de Prop-1, cuando esto ocurre no hay activación de la expresión Pit-1 (Olson and Rosenfeld, 2002; Olson et al., 2003).

Los resultados obtenidos permitieron establecer como conclusión que se logró amplificar por PCR en cDNA de pituitaria de carpas adultas, secuencias parciales de Ptx2, y Rpx las cuales presentan un alto grado de identidad con respecto a las secuencia de *Danio rerio*, con lo que se cumplió el primer objetivo específico de aislar secuencias génicas de Ptx2 y Rpx, factores de transcripción de *Cyprinus carpio* y realizar un análisis comparativo de las secuencias. El análisis de las secuencias de los clones de Ptx2 de carpa mostró claras diferencias en la región codificante por lo que se identificaron dos genes que se transcriben activamente. Las secuencias parciales de Rpx indican la presencia de más de dos transcritos.

En el presente trabajo se muestra por primera vez la expresión a nivel de transcripción sitio específico de los factores Ptx2 y Rpx en hipófisis de carpas adultas. Por hibridaciones *in situ*, se estableció que los transcritos de Ptx2 y Rpx se expresan principalmente en la PPD, en menor grado en la PI de hipófisis de *Cyprinus carpio*.

Claramente se observó mayor presencia de transcritos de Ptx2 y Rpx en hipófisis de carpas aclimatizadas a invierno respecto a verano. El análisis semicuantitativo la hibridación *in situ*, detectó alrededor del doble de transcritos en las hipófisis de carpas aclimatizadas a invierno. Cabe destacar que cuando se encuentran pocos transcritos de Pit-1, en invierno hay mayor presencia de Rpx y viceversa, lo que concuerda con que en el desarrollo de la pituitaria la expresión de Pit-1 surge sólo cuando disminuye, en forma significativa la expresión de Rpx, lo que indica una regulación de la expresión de Pit-1 por Rpx y Prop-1 (Olson et al. 2003, 2006).

Estos nuevos hallazgos, de una baja expresión de las secuencias génicas de los factores de transcripción Rpx y Ptx2 en verano, estación en la cual otros genes están fuertemente expresados y por lo tanto es más difícil distinguir un efecto estimulador, sugieren la utilidad de Ptx2 y Rpx para indicar efectos ambientales a la expresión de factores hipofisiarios en verano.

6. BIBLIOGRAFÍA

- Álvarez, M., Quezada, C., Navarro, C., Molina, A., Bouvet, P., Krauskopf, M., Vera, M. I. (2003). An increased expression of nucleolin is associated with a physiological nucleolar segregation. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 301, 152-158.
- Álvarez, M., Molina, A., Quezada, C., Pinto, R., Krauskopf, M., Vera, M. I. (2004). Eurythermal fish acclimatization and nucleolar function: a review. *Journal of Thermal Biology* 29, 663-667.
- Amendt, B. A., Sutherland, L. B., Semina, E. V., Russo, A. F. (1998). The molecular basis of Rieger Syndrome. *The Journal of Biological Chemistry* 273, 20066-20072.
- Amendt, B. A., Sutherland, L. B., Russo, A. F. (1999). Multifunctional Role of the Pitx2 Homeodomain Protein C- Terminal Tail. *Molecular and Cellular Biology* 19, 7001-7010.
- Andersen, B., Rosenfeld, M. G. (1994). Pit-1 determines cell types during development of the anterior pituitary gland. A model for transcriptional regulation of cell phenotypes in mammalian organogenesis. *The Journal of Biological Chemistry* 269, 29335-29338.
- Arends, J. R., van der Gaag, R., Martens, G. J. M., Wendelaar, S. E., Bonga, Flik, G. (1998). Differential expression of two pro-opiomelanocortin mRNAs during temperature stress in common carp (*Cyprinus carpio* L.). *Journal of Endocrinology* 159, 85-91.
- Bisgrove, B. W., Essner, J. J., Yost, H. J. (1999). Regulation of midline development by antagonism of lefty and nodal signaling. *Development* 126, 3253-3262.
- Bisgrove, B. W., Essner, J. J., Yost, H. J. (2000). Multiple pathways in the midline regulate concordant brain, heart and gut left-right asymmetry. *Development* 127, 3567-3579.

- Bolander, F.F. (2004). *Molecular Endocrinology*. Third edition. Elsevier Academic Press, Amsterdam. pp.26-31.
- Carrière, C., Gleiberman, A., Lin, C. R., Rosenfeld, M. G. (2004). From panhypopituitarism to combined pituitary deficiencies: do we need the anterior pituitary? *Reviews in Endocrine & Metabolic Disorders* 5, 5-13.
- Christoffels, A., Bartfai, R., Srinivasan, H., Komen, H., Orban, L. (2006). Comparative genomics in cyprinids: common carp ESTs help the annotation of the zebrafish genome. *BMC Bioinformatics*, 7(Suppl 5):S2.
- Cohen, L. E., Radovick, S. (2002). Molecular basis of combined pituitary hormone deficiencies. *Endocrine Reviews* 23, 431-442.
- Cossins, A., Fraser, J., Hughes, M., Gracey, A. (2006). Post-genomic approaches to understanding the mechanisms of environmentally induced phenotypic plasticity. *The Journal of Experimental Biology* 209, 2328-2336.
- Cox, C. J., Espinoza, H. M., McWilliams, B., Chappell, K., Morton, L., Hjalt, T. A., Semina, E. V., Amendt, B. A. (2002). Differential regulation of gene expression by Pitx2 isoforms. *The Journal of Biological Chemistry* 277, 25001-25010.
- Dasen, J. S., Rosenfeld, M. G. (1999). Signaling mechanisms in pituitary morphogenesis and cell fate determination. *Current Opinion in Cell Biology* 11, 669-677.
- David, L., Blum, S., Feldman, M. W., Lavi, U., Hille, J. (2003). Recent duplication of the common carp (*Cyprinus carpio* L.) genome as revealed by analyses of microsatellite loci. *Molecular Biology and Evolution* 20, 1425–1434.

- Drouin, J. Lamolet, B. Lamonerie, T. Lanctot, C. Tremblay, J. J. (1998). The PTX family of homeodomain transcription factors during pituitary development. *Molecular and Cellular Endocrinology* 140, 31-36.
- Elgar, G. (2004). Plenty more fish in the sea: comparative and functional genomics using teleost models. *Briefings in Functional Genomics and Proteomics* 3, 15-25.
- Essner, J. J., Branford, W. W., Zhang, J., Yost, J. H. (2000). Mesendoderm and left-right brain, heart and gut development are differentially regulated by Pitx2 isoforms. *Development* 127, 1081-1093.
- Essner, J. J., Amack, J. D., Nyholm, M. K., Harris, E. B., Yost, J. H. (2005). Kupffers vesicle is a ciliated organ of asymmetry in the zebrafish embryo that initiates left right development of the brain, heart and gut. *Development* 132, 1247-1260.
- Figuerola, J., Molina, A., Alvarez, M., Villanueva, J., Reyes, A., León, G., Krauskopf, M. (1994). Prolactin gene expression and changes of prolactin pituitary level during the seasonal acclimatization of the carp. *Comparative Biochemistry and Physiology* 108, 551-560.
- Figuerola, J., Reyes, A., Ríos, M., Vera, M., Krauskopf, M. (1997). Effect of temperature and photoperiod on prolactin transcription in *Cyprinus carpio*. *Zoological Science* 14, 353-357.
- Figuerola, J., Kausel, G., San Martín, R. (2000). Growth hormone expression in carp pituitary during acclimatization. *The Journal of Physiology* 523P: 36S
- Figuerola, J.; San Martín, R.; Flores, C.; Grothusen, H.; Kausel, G. (2005). Seasonal modulation of growth hormone mRNA and protein levels in carp pituitary: evidence for two expressed genes. *Journal of Comparative Physiology B-Biochemical Systemic and Environmental Physiology* 175, 185-192.

- Flores, C., Muñoz, D., Soto, M., Kausel, G., Romero, A., Figueroa, J. (2007). Copeptin, derived from isotocin precursor, is a probable prolactin releasing factor in carp. *General and Comparative Endocrinology* 150, 343-354.
- Gallardo, M. H., Bickham, J. W., Honeycutt, R. L., Ojeda, R. A., Köhler, N. (1999). Discovery of tetraploidy in a mammal. *Nature* 401, 431.
- Gallardo, M.H., (2000). Naturaleza insólita. *Investigación y Ciencia*, pp 38-39.
- Garbutt, G. J., Wilson, J. T., Schuster, G. S., Leary, J. H., Ward, D. C. (1985). Use of biotinylated probes for detecting sickle cell anemia. *Clinical Chemistry* 31, 1203-1206.
- Gilbert, S. F. (2003). Environmental regulation of animal development. In: *Developmental Biology*. Seventh edition, Sinauer Associates, Inc., pp721-745. Sutherland, Massachusetts
- Goldspink, G. (1995). Adaptation of fish to different environmental temperature by qualitative and quantitative changes in gene expression. *Journal of Thermal Biology* 20, 167-174.
- Hermesz, E., Williams-Simons, L., Mahon, K. A. (2003). A novel inducible element, activated by contact with Rathke's pouch, is present in the regulatory region of the Rpx/Hesx1 homeobox gene. *Developmental Biology* 260, 68-78.
- Hoegg, S., Meyer, A. (2005). Hox cluster as models for vertebrate genome evolution. *TRENDS in Genetic* 21, 421-424
- Ingraham, H. A., Chen, R., Mangalam, H. J., Elsholtz, H. P., Flynn, S. E., Lin, C. R., Simmons, D. M., Swanson, L., Rosenfeld, M. G. (1988). A tissue-specific transcription factor containing a homeodomain specifies a pituitary phenotype. *Cell* 55, 519-529.
- Kausel, G., Vera, M., Figueroa, J., Hernández, J., San Martín, R., Molina, A., Chavez, V. M., Muller, M., Martial, J. and Krauskopf, M. (1998). Effect of seasonal acclimatization on the

- expression of the carp transcription factor Pit-1. *Biochemical and Molecular Biology International* 45, 813-821.
- Kausel, G., Vera, M. I., San Martín, R., Figueroa, J., Molina, A., Muller, M., Martial, J. Krauskopf, M. (1999). Transcription factor Pit-1 expression is modulated upon seasonal acclimatization of eurythermal ectotherms: Identification of two Pit-1 genes in the carp. *Journal of Cellular Biochemistry* 75, 598-609.
- Kausel, G., Salazar, M., Castro, L., Vera, T., Romero, A., Muller, M., Figueroa, J. (2006). Modular changes of cis-regulatory elements from two functional Pit1 genes in the duplicated genome of *Cyprinus carpio*. *Journal of Cellular Biochemistry* 99, 905-921.
- Kazanskaya, O.V., Severtzova, E. A., Anukampa Barth, K., Ermakova, G. V., Lukyanov, S. A., Benyumov, A. O., Pannese, M., Bocinelli, E., Wilson, S. W., Zarsky, A. G. (1997). Anf: a novel class of vertebrate homeobox genes expressed at the anterior end of the main embryonic axis. *An International Journal on Genes and Genomes* 200, 25-34.
- Krauskopf M, Amthauer R, Araya A, Concha M, Leon G, Rios L, Vera MI, Villanueva J. (1988). Temperature acclimatization of the carp. Cellular and molecular aspects of the compensatory response. *Archives Biology and Medicine Experimental* 21, 151-157.
- Lines, M. A., Kozlowski, K., Walter, M. A. (2002). Molecular genetics of Axenfeld-Rieger malformations. *Human Molecular Genetics* 11, 1177-1184
- Lopez, M, Figueroa, J, Kausel, G., Vera, M. I., Krauskopf, M. (2001). In situ hybridization of somatolactin transcripts in the pituitary glands from acclimatized carp (*Cyprinus carpio*). *Biological Research* 34, 7-13.

- Mancera, J. M. (2004). Osmorregulación en peces teleósteos: Departamento de Biología. Facultad de Ciencias del Mar y Ambientales. Universidad de Cádiz, España. Manual de Curso dictado en Valdivia, 2004.
- Moens, L.N., Van der Ven, K., Van Remortel, P., Del-Faero, J., De Coen, W.M. (2006). Expresión profiling of endocrine-disrupting compounds using a customized *Cyprinus carpio* cDNA microarray. *Toxicological Sciences* 93, 298-310.
- Norris, D. O. (1996). Comparative aspects of the hypothalamo-hypophysial system in nonmammalian vertebrates. in: *Vertebrate Endocrinology*, Third Edition by Digital Stock, Inc., pp.166-215.
- Ohno, S. (1970). *Evolution by gene duplication*. Springer-Verla, Heidelberg.
- Olson, L. E., Rosenfeld, M. G. (2002). Perspective: genetic and genomis approaches in elucidating mechanisms of pituitary development. *Endocrinology* 143, 2007-2011.
- Olson, L. E., Dasen, J. S., JU, B. G., Tollkuhn, J., Rosenfeld, M. G. (2003). Paired-like repression/activation in pituitary development. *Recent Progress in Hormone Research* 58, 249-261.
- Olson, L. E., Tollkuhn, J., Scafoglio, C., Krones, A., Zhang, J., Ohgi, K. A., Wu, W., Taketo, M. M., Kemler, R., Grosschedl, R., Rose, D., Li, X., Rosenfeld, M. G. (2006). Homeodomain-mediated beta-catenin-dependent switching events dictate cell-lineage determination. *Cell* 125, 593-605.
- Priston, M., Kozlowski, K., Gill, D., Letwin, K., Buys, Y., Levin, A. V., Walter, M. A., Héon, E. (2001). Functional analyses of two newly identified PITX2 mutants reveal a novel molecular mechanism for Axenfeld-Rieger syndrome. *Human Molecular Genetics* 10, 1631-1638.

- Quentien, M. H., Manfroid, I., Moncet, D., Gunz, G., Muller, M., Grino, M., Enjalbert, A., Pellegrini, I. (2002a). Pitx factors are involved in basal and hormone-regulated activity of the human prolactin promoter. *The Journal of Biological Chemistry* 277, 44408-44416.
- Quentien, M. H., Pitola, F., Gunz, G., Guillet, M. P., Enjalbert, A., Pellegrini, I. (2002b). Regulation of prolactin, GH, and Pit-1 gene expression in anterior pituitary by Pitx2: An approach using Pitx2 mutants. *Endocrinology* 143, 2839-2851.
- Quentien, M. H., Barlier, A., Franc, J. L., Pellegrini, I., Brue, T., Enjalbert, A. (2006). Pituitary transcription factors: From congenital deficiencies to gene therapy. *Journal of Neuroendocrinology* 18, 633-642.
- Quezada, C., Navarro, C., San Martín, R., Álvarez, M., Molina, A., Vera, M. I. (2006). Genomic organization of nucleolin gene in carp fish: Evidence for several genes. *Biological research* 39, 353-365.
- Reynaud, R., Saveanu, A., Barlier, A., Enjalbert, A., Brue, T. (2004). Pituitary hormone deficiencies due to transcription factor gene alterations. *Growth Hormone & IGF Research* 14, 442-448.
- Saadi, I., Semina, E. V., Amendt, B. A., Harris, D. J., Murphy, K. P., Murray, J. C., Russo, A. F. (2001). Identification of a dominant negative homeodomain mutation in Rieger Syndrome. *The Journal of Biological Chemistry* 276, 23034-23041.
- Sambrook, J., Fritsch, E. F., Maniatis, T. (1989). *Molecular Cloning. A laboratory manual*. Second edition. Cold Spring Harbor Laboratory Press. New York.
- Salazar, M. (2003). Aislamiento y caracterización de la secuencia promotora del factor de transcripción Pit-1 del pez *Cyprinus carpio*. Tesis de Grado Bioquímica, Universidad Austral de Chile.

- Sarmiento, J., Leal, S., Quezada, C., Kausel, G., Figueroa, J., Vera, M. and Krauskopf, M. (2000). Environmental acclimatization of the carp modulates the transcription of β -actin. *Journal of Cellular Biochemistry* 80, 223-228.
- Sekkali, B., Brim, H., Muller, M., Argenton, F., Bortolussi, M., Colombo, L., Belayew, A., Martial, J.A. (1999). Structure and functional analysis of a tilapia (*Oreochromis mossambicus*) growth hormone gene: Activation and repression by pituitary transcription factor Pit-1. *DNA and Cell Biology* 18, 489-502.
- Scully, K. M., Rosenfeld, M. G. (2002). Pituitary development: Regulatory codes in mammalian organogenesis. *Science* 295, 2231-2235.
- Smidt, M. P., Cox, J. J., van Schaick, H. S. A., Coolen, M., Schepers, J., van der Kleij, A. M., Burbach, J. P. H. (2000). Analysis of three Ptx2 splice variants on transcriptional activity and differential expression pattern in the brain. *Journal of Neurochemistry* 75, 1818-1825.
- Steinke, D., Hoegg, S., Brinkmann, H., Meyer, A. (2006). Three rounds (1R/2R/3R) of genome duplications and the evolution of the glycolytic pathway in vertebrates. *BMC Biology* 1-14.
- Thomas, P. Q., Johnson, B. V., Rathjen, J., Rathjen, P. D. (1995). Sequence, genomic organization, and expression of the novel homeobox gene Hesx1. *The Journal of Biological Chemistry* 270, 3869-3875.
- Vera, M. I., Kausel, G., Barrera, R., Leal, S., Figueroa, J., Quezada, C. (2000). Seasonal adaptation modulates the expression of the protein kinase CK2 β subunit gene in the carp. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 271, 735-740.
- Zhang, J. (2003). Evolution by gene duplication: an update. *TRENDS in Ecology and Evolution* 18, 292-298.

Zhu, Y., Stiller, J. W., Shaner, M. P., Baldini, A., Scemama, J.-L., Capehart, A. A. (2004).

Cloning of somatolactin and cDNAs in zebrafish and phylogenetic analysis of two distinct somatolactin subtypes in fish. *Journal of Endocrinology* 182, 509-518.

Zhu, X., Lin, C. R., Prefontaine, G. G., Tollkuhn, J., Rosenfeld, M. G. (2005). Genetic control of pituitary development and hypopituitarism. *Current Opinion in Genetics and Development* 15, 332-340.

7 ANEXOS

En los anexos 1al 10 las secuencias indicadas en negrita corresponden al vector pGEMT-Easy, las secuencias destacadas en amarillo corresponden a la ubicación de los oligonucleótidos sentido utilizados para la amplificación, destacado en verde la ubicación de los oligonucleótidos antisentido, entre paréntesis tamaño del inserto.

7.1 Secuencia nucleotídica del clon número 7 de Ptx2 de *C. carpio*. **S**: puede ser C o G, **W**: A o T, **Y**: T o C.

```
>pcPtx2-7 600 pb; Ptx2s y Ptx3a (441 pb)
TCCCATATGGTCSWYCTGCAGGCGGCCGCGAATTCAGTAGTGATTGTTACACSTGTCCCT
GTAGACATACGGTGGTGTCGGTGGGGCGTAAGGGCACGTCGGCGTGGAACCCCCGAATT
TAGAGAGGGGTTGCTGAGGTTATTCAAGTTATTGAGGGTGTTTAAGCTTGATCCGGGCAC
GCCGGTGACCGCAGACGGAACCATACTAGAGGACATGCTCATTGAAGAGATGGAGTTAGG
TGGGGAGAACATAGTCTGAGACGACAGCGGATTGACGTTTCATGGAATTGAAAAAGGGGAA
GCTTTTGGTTGACAGAGAGGCCGACGTGAGCCCCTTTCAGCCCAGTTGTTGTAAGTATA
GCTGGGATACATGTCATCGTAGGGCTGCATAAGTCCGTTGAATTGAGGGCCGAAACCGTT
TTTACACAGCTCGGCCTGTTGGTTCCTCTCCCTTTTTCTCCACTTTGCCCGACGATTCTT
GAACCAAATCGAATTCCCGCGGCCGCGCCATGGCGGCCGGGAGCATGCGACGTCGGGCCCAA
TTGCCCCTATAGTGAGTCGTATTACAATTCAGTGGCCGTCGTTTTACAACGTCGTGACTG
```

7.2 Secuencia nucleotídica del clon número 23 de Ptx2 de *C. carpio*, correspondiente a la región 3'codificante.

```
>pcPitx2-23 SP6 600 bp; Ptx2-1s y zPtx2-4a (462 pb)
GGGAGCACTCCATATGGTCGACCTGCAGGCGGCCGCGAATTCAGTAGTGATTGCCCTACG
ATGACATGTATCCCAGCTACACGTACAACAACCTGGGCTGCAAAGGGGCTCACGTCGGCCT
CTCTGTCTACCAAAAGCTTCCCCTTTTTCAATTCCATGAACGTCAATCCGCTGTCTTCTC
AGACCATGTTCTCCCCACCTAACTCCATCTCTTCAATGAGCATGTCCTCCAGTATGGTTC
CGTCTGCTGTCACTGGCGTGCCCGGATCAAGCTTAAACAGCCTCAATAACTTGAATAACC
TCAGCACCCCTCTCTAAATTCGGGGGTTCCAACGTCGGCGTGCCCTTACGCCCCACCGA
CACCTCCGTATGTCTACCGGGACACTTGTAACCTCCAGTCTTGCCAGTCTGAGACTGAAAG
CCAAGCAGCACTCGAGTTTTGGATACGCGAGCGTGCAAGAATCCGGCCTCCAATCTCAGCG
CTTGCCAGTACGCAGTGGATAGACCGGTGTAAGAAATCGAATTCCCGCGGCCGCGCCATGGC
GGCCGGGAGCATGCGACGTCGGGCCCAATTCGCCCTATAGTGAGTCGTATTACAATTCAC
```


7.3 Secuencia nucleotídica del clon número 38 de Ptx2 de *C. carpio*, ubicada al extremo 3' del cDNA, incluyendo la región no codificante.

>pcPtx2-38 420 pb; cPtx2-9s y dT anclador (305 pb)

CTTGGGCCGCTCCAGCTCCCGGCCCTGGCGGCCGGGAATTCGATTGCAGTGGTAACAC
TTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTCGTATCCTAAACTCTTCACTGGCTAGTGTGCACTTGCT
 AGTGTAGAGAACAAATCTTATTGGAAATGGCGCGTTTGCCTTCCATTCCCGTTTGACATT
 CCATCACGGGATTGGACGCGTTTCAGTGGTTAATTCTTCTAGTGCCCTTGAAACAAAAAG
 TGAGTCTCTCGTTCTGGGATTCCGGGATTGTAAATTCTACAATCGTCTCTTACACCGGT
 CTATCCACTGCGTACTGGCAAGCGCTGAGATTGGAGGCCGGATTCTGCACGC**AATCCTAG**
TGAATTCGCGGCCGCTGCAGGTCGACCAATGGGAGAGCTCCCAACGCGTTGGATGCATA

7.4 Secuencia nucleotídica del clon número 14 de Rpx de *C. carpio*. Las bases destacadas en cursiva corresponden al intron, en rojo sitios de empalme intron-exon

>Rpx-14 480 bp; ANF-1s y ANF-3a (334 pb)

CCGACGTCGCATGCTCCCGGCCGCGCATGGCGGCCGGGAATTCGATTTGACTGGTACAT
AGGGAGGAGGCCGCGAACGGCGTTCTCTAGTGTT**CAG***GT*AAACGTT**CACATATACATGTG**
ATTTACCAGAAATTTGTCTAAATATGTCCCGGCTAATAAAAATATGTTCTAAGAAATGAAAG
CTCATATTGGACTATTTGTGATTTCTGTATAATAACTAAAAAGTAAATTGTGTTTTACCC
CTGTCCATTTTGTACCTATAAATTTTTTTTCAATGTCC*AG*ATCAAGATATTGGAGAGTGT
 GTTTCAAGTGAAC**TACACCCGGGCATTGATATACGTGAAGAACTTGCTAAGAACTGCA**
 TCT**AGATGAGGACCGGATCCAG****AATCACTAGTGAATTCGCGGACCGCCTGCAGGTCGACC**
ATATGGGAGAGCTCCCAACGCGTTGGATGCATAGCTTGAGTATTCCTATAGTGTACCTA

7.5 Secuencia nucleotídica del clon número 46 de Rpx de *C. carpio*, correspondiente a la región 5' del cDNA, incluyendo la región no codificante.

>Rpx-46-Sp6 600 pb; Oligonucleótido INNER y cRpx-3a (458 pb)

GGAGCTCTCCCATATGGTCGACCTGCAGGCGGCCGCGAATTCAGTGTGATTGCAAGTTC
TTACAGTATATCAATGCCTGGGTATGAGTTCACTTGAAACACACTCTCCAATATCTTGAT
 CTGAACACTAGAGAAAGCTGTCCGCGGTCTGCGGCCGATGTACCAGTTCAGTGTCTCCT
 GTAAGAGTCTGCTGGGGGTTTACTGTAAGATTTACTGTCTTCATTCACCCTCACATCCAC
 TGAAGCACCAGTGTCTGCCACCACGCCACGGTCTGTCCCGCTGGTTTCACGTCTGTCCA
 GGGTCGGTAAGGTGCTGACAGGACGGTCTGGGGTCCGGTCTGTGAGTCCCAGGATGCT
 GTCGATGGTGAAGGCACACTGTCTGGGCATCGAGCGGXTCTGATGCGTGCTCACTGTGAG
 AGAAGCCATCTGGAGATCCAGTCCTCTTCTTCTGGTTTTTCATCAAAGCCAGCAACGTT**C**
ATCAAAGCCAGCAAACGCGAGCGTCTGGATC**AATCGAATTC****CCGCGGCCGCGCATGGCGGCG**
GGAGCATGCGACGTCGGGCCCAATTCGCCCTATAGTGAGTCGTATTACAATTCAGTGGCC

7.6 Secuencia nucleotídica del clon número 49 de Rpx de *C. carpio*, correspondiente a la región 5' del cDNA., incluyendo la región no codificante.

>Rpx-49-SP6 600 pb; Oligonucleótido INNER y cRpx-3a (459 pb)
GCGTTGGGAGCTCTCCCATATGGTCGACCTGCAGGCGGCCGCGAATTCAGTAGTGATTGC
AAGTTCTTCACGTATATCAATGCCTGGGTATGAGTTCACTTGAAACACACTCTCCAATAT
 CTTGATCTGAACACTAGAGAAAGCTGTCCGCGGTCTGCGGCCGATGTACCAAGTTCAGTGT
 TCTCCTGTAAGAGTCTGCTGGGGGTTTACTGTAAGATTTACTGTCTTCATTCACCCTCAC
 ATCCACTGAAGCACCAGTGTCTGCCACCACGCCGCGGTTCTGTCCCGCTGGTTTCACGTC
 TGTCAGGGTTCGGTAAGGTGCTGACAGGACGGTTCTGGGGTCCGGTCTGTGAGTCCCAG
 GATGCTGTCGATGGTGAAGGCACACTGTCTGGGCATCGAGCGGTTCTGATGCGTGCTCAC
 TGTGAGAGAAGCCATCTGGAGATCCAGTCTCTTTCTTCTGGTTTTTCATCAAAGCCAGCAA
 ACGTTT**CATCAAAGCCAGCAAACGCAGCGTCTGGATCCGCG**AATCGAATTC**CCGCGGCCG**
CCATGGCGGCCGGGGAGCATGCGAACGTGCGGGGCCAATTCGCCCATCGAATTCCCGCGG****

7.7 Secuencia nucleotídica del clon número 50 de Rpx de *C. carpio*, correspondiente a la región 5' del cDNA, incluyendo la región no codificante.

>Rpx-50-Sp6 576 pb; Oligonucleótido INNER y cRpx-3a (459 pb)
GCGTTGGGAGCTCTCCCATATGGTCGACCTGCAGGCGGCCGCGAATTCAGTAGTGATTGC
AAGTTCTTCACGTATATCAATGCCTGGGTATGAGTCCACTTGAAACACACTCTCCAATAT
 CTTGATCTGAACACTAGAGAAAGCTGTCCGCGGTCTGCGGCCGATGTACCAAGTTCAGTGT
 TCTCCTGTAAGAGTCTGCTGGGGGTTTACTGTAAGATTTACTGTCTTCATTCACCCTCAC
 ATCCACTGAAGCACCAGTGTCTGCCACCACGCCACGGTTCTGTCCCGCTGGTTTCACGTC
 TGTCAGGGTTCGGTAAGGTGCCGACAGGACGGTTCTGGGGTCCGGTCTGTGAGTCCCAG
 GATGCTGTCGATGGTGAAGGCACACTGTCTGGGCATCGAGCGGTTCTGATGCGTGCTCAC
 TGTGAGAGAAGCCATCTGGAGATCCAGTCTCTTTCTTCTGGTTTTTCATCAAAGCCAGCGA
 ACGTTT**CATCAAAGCCAGCAAACGCAGCGTCTGGATTCCGCG**AATCGAATTC**CCGCGGCCG**
CCATGGCGGCCGGGAGCATGCGACGTGCGGGCCCAATT

7.8 Secuencia nucleotídica del clon número 60 de Rpx de *C. carpio*, correspondiente a la región 3' codificante del cDNA.

>Rpx-60-Sp6 360 pb; ANF 1-s y zRpx-4a (243 pb)
GCGTTGGGAGCTCTCCATATGGTCGACCTGCAGGCGGCCGCGAATTCAGTAGTGATTCTC
TCAGTGTTCTTCTCTGCTGGTTTGTAATCACTGAGGACATTCTTCACCATGAGACGCTT
 CAGCTTCGCTCTTCTGTTCTGGAACCAAATCTGGATTCTGTCCTCATCTAGATGCAGTTT
 CTTAGCAAGTTCTTCACGTATATCAATGCCCGGGTGTGAGTTCACTTGAAACACACTCTC
 CAATATCTTGATCTGAACACTAGAGAAAGCTGTCCGC**GGCCTCCTCCCGATGTACCAAGTT**
CAAATCGAATTC**CCGCGGCCGCCATGGCGGCCGGGAGCATGCGACGTGCGGCCCAATTCG**

7.9 Secuencia nucleotídica del clon número 63 de Rpx de *C. carpio*, correspondiente a la región 3' codificante del cDNA.

>Rpx-63-SP6 420; ANF 1-s y zRpx-4a (264 pb)

GC GTTGGGAGCTCTCCCATATGGTCGACCTGCAGGCGGCCGCGAATTCACTAGTGATT**CT**
CTCAGTGTTCTTCTCTGCTGGACTGTAAATCACTGAGGACGTTCTTCACCATGAGAACT
 GAGATTCTCTGTGTGAACGCTTCAGCTTCGCTCTTCTGTTCTGGAACCAAATCTGAATCC
 TGTCTTCATCTAGATGCAGTTTCTTAGCAAGTTCTTCACGTATATCAATGCCTGGGTATG
 AGTTCACCTCGAAACACACTCTCTAATATCTTGATCTGAACACTAGAGAAAGCTGTCCGCG
GCCTCCTCCCGATGACCAGTTCAAATCGAATT**CCCGCGGCCGCCATGGCGGCCGGGAGCAT**
GCGACGTCGGGCCCAATTCGCCCTATAGTGAGTCGTATTACAATTCACTGGCCGTCGTTT

7.10 Secuencia nucleotídica del clon número 64 de Rpx de *C. carpio*, correspondiente a la región 3' codificante del cDNA.

>Rpx-64 SP6 420; ANF 1-s y zRpx-4a (264 pb)

TGGGAGCTCTCCATATGGTCGACCTGCAGGCGGCCGCGAATTCACTAGTGATT**TGAACTG**
GTACATAGGGAGGAGGCCGCGGACAGCTTCTCTAGTGTTCAAGATATTGGAGAG
 TGTGTTTCAAGTGAACATACCCAGGCATTGATATACGTGAAGAACTTGCTAAGAACT
 GCATCTAGATGAAGACAGGATTCAGGTTTGGTTCCAGAACAGAAGAGCGAAGCTGAAGTG
 TTCACACAGAGAATCTCAGTTTCTCATGGTGAAGAACGTCCTCAGTGATTTACAGTCCAG
CAGAGAAGAACACTGAGAGAATCGAATTCCCGCGGCCGCCATGGCGGCCGGGAGCATGC
GACGTCGGGCCCAATTCGCCCTATAGTGAGTCGTATTACAATTCACTGGCCGTCGTTT