



CENTRO DE INVESTIGACIONES BIOLÓGICAS
DEL NOROESTE, S.C.

Programa de Estudios de Posgrado

**EVALUACIÓN DEL PATRÓN DE EXPRESIÓN Y
LOCALIZACIÓN DE CÉLULAS DE EXPRESIÓN
DEL GEN *p33-RINGO/Speedy* DURANTE LA
GAMETOGÉNESIS DE LA ALMEJA MANO DE
LEÓN (*Nodipecten subnodosus*) DIPLOIDE Y
TRIPLOIDE.**

TESIS

Que para obtener el grado de

Maestro en Ciencias

Uso, Manejo y Preservación de los Recursos Naturales
(Orientación: Acuicultura)

P r e s e n t a

JOSÉ VÍCTOR LÓPEZ FLORES

La Paz, Baja California Sur, Mayo de 2015

ACTA DE LIBERACION DE TESIS

En la Ciudad de La Paz, B. C. S., siendo las 10:00 horas del día 23 del mes de Abril del 2015, se procedió por los abajo firmantes, miembros de la Comisión Revisora de Tesis avalada por la Dirección de Estudios de Posgrado del Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, S. C., a liberar la Tesis de Grado titulada:

"Evaluación del patrón de expresión y localización de las células de expresión del gen *p33-RINGO/Speedy* durante la gametogénesis de la almeja mano de león (*Nodipecten subnodosus*) diploide y triploide"

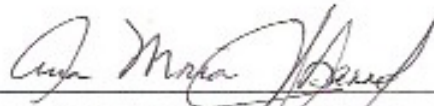
Presentada por el alumno:

José Víctor López Flores

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

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

LA COMISION REVISORA



Dra. Ana Maria Ibarra Humphries
DIRECTOR DE TESIS



Dra. Gracia Aligia Gómez Anduro
CO-TUTOR



Dr. Ilie Sava Racotta Dimitrov
CO-TUTOR



DRA. ELISA SERVIERE ZARAGOZA,
DIRECTORA DE ESTUDIOS DE POSGRADO Y FORMACIÓN DE
RECURSOS HUMANOS

COMITÉ TUTORIAL

Directora:

Dra. Ana María Ibarra Humphries
CIBNOR, La Paz, B. C. S.

Co-tutores:

Dra. Gracia Alicia Gómez Anduro
CIBNOR, La Paz, B.C.S

Dr. Ilie Sava Racotta Dimitrov
CIBNOR, La Paz, B.C.S.

COMITÉ REVISOR DE TESIS

Dra. Ana María Ibarra Humphries
Dra. Gracia Alicia Gómez Anduro
Dr. Ilie Sava Racotta Dimitrov

JURADO DE EXAMEN DE GRADO

Dra. Ana María Ibarra Humphries
Dra. Gracia Alicia Gómez Anduro
Dr. Ilie Sava Racotta Dimitrov
Dra. Cristina Escobedo Fregoso (Suplente)

RESUMEN

La almeja mano de león (*Nodipecten subnodosus*) es el bivalvo más grande de la familia Pectinidae presente en Baja California Sur, y debido a su alta tasa de crecimiento y valor comercial se considera una especie atractiva para la acuicultura. Estudios recientes han demostrado que la condición de triploidía inducida en esta especie resulta en organismos completamente estériles. Tal esterilidad se ha propuesto que es una consecuencia de problemas presentados durante la meiosis, en los puntos de expresión de genes de “*checkpoints*” o de verificación del control de la fidelidad del ciclo meiótico. Entre los genes involucrados en la progresión del ciclo celular se sabe que las cinasas dependientes de ciclinas (CDK) participan en la progresión del ciclo celular, y que estas a su vez requieren ser activadas por una cinasa activadora de ciclina (CAK) proveyendo un control temporal sobre las mismas. Sin embargo, existe otro grupo de proteínas más recientemente descubiertas que pueden activar a las CDKs permitiendo la progresión del ciclo celular, la familia de proteínas nombrada como RINGO/Speedy. Dentro de esta familia de proteínas se encuentra p33 RINGO/Speedy la cual se considera importante para la maduración meiótica, y aunque inicialmente se le catalogó como un iniciador de la maduración del ovocito de *Xenopus* induciendo la transición de G₂/M, también puede inducir la progresión de la fase G₁/S y además puede evitar la activación de “*Checkpoints*”.

La caracterización del gen *p33* en almeja mano de león a partir de una secuencia parcial obtenida de librerías SSH indicó que el transcrito de este gen tiene una secuencia de 1288pb con una región codificante de 1017pb que traduce a una proteína de 338aa en el ORF+2. El análisis bioinformático comprobó que pertenece a la familia RINGO/Speedy, y el análisis filogenético la ubica junto con las otras secuencias de sus homólogos/ortólogos de los moluscos, sin embargo la comparación estructural de los modelos de *Xenopus tropicalis* y *Crassostrea gigas* nos dicen que ambas son diferentes a la proteína p33 de mano de león. El análisis de expresión relativa diferencial entre diploides y triploides por PCR-semicuantitativo indica que este gen se expresa en diploides en las primeras etapas de la gametogénesis y después del desove en machos, y en organismos triploides en los estadios gametogénicos inactivo-inicial, avanzado y desove de los diploides. Además se confirmó que p33 se expresa exclusivamente en la gónada durante la meiosis dado que el análisis de ubicuidad de la expresión en tejidos somáticos fue negativo. La localización de las células de expresión por hibridación *in situ* (ISH), indicó que p33 se expresa exclusivamente en las gonias, y comprobó lo obtenido en el experimento de expresión relativa, dado que fue posible localizar el transcrito de gen *p33* en diploides en los inicios de la gametogénesis y en organismos desovados, y en triploides en todo el espacio temporal del análisis.

Palabras clave: Gametogénesis, ‘*checkpoint*’, diploide, triploide, expresión semicuantitativa, filogenia, ISH.

ABSTRACT

The lion's paw scallop (*Nodipecten subnodosus*) is the biggest bivalve of the Pectinidae family in Baja California Sur, and because of its high growth rate and its high commercial value makes it an attractive species for aquaculture. Recent studies have shown that the condition of triploidy in the lion's paw scallop result in complete sterility. The sterility seen in triploids has been proposed as a consequence of problems present during meiosis, more specifically in gene expression of cell cycle checkpoints that controls and ensures the fidelity of cell division. Among the genes involved in the control of the cell cycle it is known that cyclin-dependent kinases (CDK) play a role in cell cycle progression and these in turn need to be activated by a cyclin-activated kinase (CAK) providing a temporal control over their activity. However there is another group of proteins recently discovered that can activate CDKs allowing the cell cycle to continue, named as RINGO/Speedy. Within this family of proteins is p33 RINGO/Speedy that is important for meiotic maturation, and although it was initially cataloged as an initiator of *Xenopus* oocyte maturation inducing the G₂/M transition, it also may induce the progression in the G₁/S phase and inhibit the activation of "checkpoints".

The characterization of *p33Nsub* gene in lion's paw scallop from a partial sequence obtained of SSH libraries indicated that the gene transcript has a sequence of 1288bp with a coding region of 1017bp that translate into a protein of 338aa in the ORF+2. The bioinformatics analysis indicated that this gene belongs to the RINGO/Speedy family and the phylogenetic analysis placed it along the other sequences of its mollusks homologues/orthologous. However the structural comparison of the *Xenopus tropicalis* and *Crassostrea gigas* protein models indicated that the lion's paw p33 protein is different. The analysis of relative expression between diploids and triploids by semiquantitative-PCR showed that gene expression in diploids occurs in the first stages of gametogenesis and after spawning, and in triploids at all three ages corresponding to inactive-early, advanced, and spawn stages in diploids. Furthermore it was confirmed that *p33Nsub* expression is exclusive for the gonad during meiosis given that the expression analysis in the somatic tissues was negative. The specific localization of expression by *in situ* hybridization (ISH) indicated that expression of p33 occurred in the gonia cells, and proved the results of relative expression as it was possible to localize the *p33Nsub* gene transcript in diploids at the beginning of gametogenesis and in spawned organisms, and in triploids in all the temporal space of the analysis.

Key words: Gametogenesis, 'checkpoint', diploid, triploid, semiquantitative expression, phylogeny, ISH.

DEDICATORIA

A todos los que a lo largo de mi desarrollo académico me han acompañado, aunque algunos ya no estén presentes.

AGRADECIMIENTOS

Al CONACYT por la beca de maestría otorgada (No.341455) y por los recursos económicos aportados por el proyecto CONACYT-CB-166573 ‘Genómica del Molusco Pectínido *Nodipecten subnodosus* en Condición Diploide y Triploide: Mecanismos Genéticos de Diferenciación Sexual, del Control de la Fidelidad de la Meiosis y del Crecimiento Muscular’ bajo la responsabilidad de la Dra. Ana Maria Ibarra Humphries que hicieron posible este trabajo; al Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste (CIBNOR) por las instalaciones prestadas para el desarrollo de la presente investigación. Al personal de posgrado: Dra. Elisa Serviere Zaragoza, Lic. Osvelia Ibarra Morales, Lic. Leticia González Rubio, Claudia Elizabeth Olachea, Tania Verónica Núñez Valdez por la ayuda brindada durante mi formación académica y por las facilidades prestadas.

Agradezco especialmente a mi directora de tesis la Dra. Ana María Ibarra Humphries, a quien de manera personal y académica, admiro y respeto por su gran trayectoria científica y la calidad de persona que es, a ello le estaré agradecido por siempre por su paciencia, apoyo, atención, las exigencias y consejos para mi formación académica, además por la confianza manifestada y todas sus enseñanzas transmitidas. Gracias también por los comentarios que aunque no siempre lindos, fueron siempre con la intención y objetivo de mejorar el trabajo.

A la Dra. Gracia Alicia Gómez Anduro, que como cotutora de este trabajo también participó activamente en mi formación académica, mostrando siempre gran paciencia y muy buenos comentarios respecto al desarrollo del trabajo, le agradezco mucho por sus asesorías, comentarios, revisiones, enseñanzas y sobre todo por la guía y el tiempo que me dedicó.

A la Dr. Ilie Sava Racotta Dimitrov por sus comentarios, por la ayuda en la corrección y enriquecimiento del documento de tesis. Que aunque no siempre fue posible contar con su asistencia a las reuniones de comité; sus comentarios, revisiones y observaciones siempre fueron muy oportunos y enriquecedores.

Al laboratorio de Genética y Mejoramiento Animal Acuícola particularmente a los técnicos: M.C. Susana Ávila Álvarez por las facilidades otorgadas para el acceso y trabajo casi de forma ininterrumpida en el laboratorio, así como también al M.C. José Luis Ramírez Arce por la ayuda brindada en los muestreos, por sus consejos y conocimientos transmitidos, y de manera general les agradezco a ambos porque su amistad dentro y fuera del trabajo hizo muy agradable mi estancia.

Al Dr. Pedro Cruz Hernández por los tips, ayuda, consejos y comentarios para enriquecer las presentaciones de los seminarios.

De manera especial agradezco a personas que aunque no estuvieron dentro del laboratorio a del grupo de trabajo considero grandes amigos y gracias a ellos la estancia en la institución resulto ser muy placentera de corazón les agradezco por todo a la técnico Mayra de Fátima Vargas Mendieta, al técnico Jesús Antonio Aguilar Villavicencio y Pedro Luna García.

Al laboratorio de Histología e Histoquímica: Dra. María del Carmen Rodríguez Jaramillo y a María Eulalia Meza Chávez por su disponibilidad para el desarrollo de cortes histológicos y su disposición para el procesamiento general de las muestras, además por la preparación y conocimientos que me facilitaron en la documentación y análisis de imágenes.

De manera especial, también agradezco al Dr. Juan Carlo Pérez Urbiola y a la técnico M.C. Roxana Bertha Inohuye Rivera, ya que ellos fueron los que inicialmente me abrieron las puertas al CIBNOR y por ellos tuve la oportunidad de conocer y crecer bastante personal y profesionalmente.

A mis compañeros del laboratorio: Claudia (la negra) por sus consejos, levantones de ánimo y por su amistad, Rosy que de igual manera fue de gran ayuda en los muestreos, le agradezco además por sus consejos (aunque a veces parecían más regaños), su amistad y el tempo dedicado, a Itzia por su apoyo para la realización de ISH, consejos y por mantenerme alerta con una broma diaria, Pavel a quien considero un amigo, le agradezco por sus comentario, y su ayuda cuando le fue requerida, a Armando por su ayuda en la realización del árbol filogenético, y sobre todo por su amistad dentro y fuera del

laboratorio, también agradezco a Mayra por su ayuda en los muestreos, su amistad y el tiempo compartido, a Adriana por las buenas anécdotas. A mis compañeros y amigos de mi grupo de maestría, y a todos mis amigos: Hamid, Gilberto, Landis, Ivan, Claudia, etc.

Al Dr. Raúl Antonio Llera Herrera por su ayuda y consejos en cuestiones técnicas e informáticas, sobre todo en la edición y análisis de secuencias, además de las revisiones y comentarios al desarrollo del documento.

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

Agradezco a los responsables de Laboratorio de cómputo Horacio Sandoval Gómez por su gran apoyo en la instalación de software y soporte técnico y al personal de posgrado.

Y por último agradezco especialmente a mis padres José Víctor y Enriqueta por su apoyo en todo momento, por tener la confianza en mí y darme las herramientas para mi desarrollo personal, académico, profesional y por estar siempre presente y disponibles, los amo.

ÍNDICE DE CONTENIDO

RESUMEN	IV
ABSTRACT	V
DEDICATORIA	VI
AGRADECIMIENTOS	VII
ÍNDICE DE CONTENIDO	X
LISTA DE FIGURAS	XII
LISTA DE TABLAS	XVI
1. INTRODUCCIÓN	1
2. ANTECEDENTES	3
2.1. Triploidía en moluscos	3
2.2 La gametogénesis	3
2.3 Familia de proteínas RINGO/Speedy	5
2.4 p33 RINGO/Speedy: Un iniciador de la maduración gamética	6
3. JUSTIFICACIÓN	8
4. HIPÓTESIS	9
5. OBJETIVOS	10
4.1 Objetivo general	10
4.2 Objetivos específicos	10
6. MATERIALES Y MÉTODOS	11
6.1 Producción de triploides	11
6.2 Mantenimiento de organismos en campo	11
6.3 Material biológico	11
6.4 Confirmación de ploidía	12
6.5 Extracción y cuantificación de ARN total	16
6.6 Caracterización del transcrito del gen <i>p33</i>	16
6.6.1 Diseño de cebadores para RACE	17
6.6.2 Caracterización del transcrito de <i>Nsubp33</i>	18
6.6.3 Análisis de secuencias, productos PCR-M13 secuenciados	21
6.7 Descripción de las relaciones filogenéticas de p33 en invertebrados	22
6.8 Análisis de la expresión génica en diploides y triploides por PCR- semicuantitativo	22

6.8.1 Selección del gen de referencia para evaluar la expresión de <i>p33-RINGO/Speedy</i> .	22
6.8.2 Diseño de cebadores para PCR-semicuantitativo.	23
6.8.3 Análisis de expresión génica por PCR-semicuantitativo.	23
6.8.4 Síntesis de cDNA para análisis de la expresión génica.	24
6.9 Localización de las células de expresión.	27
6.9.1 Diseño de ribosondas para Hibridación <i>In Situ (ISH)</i> .	28
7. RESULTADOS	30
7.1 <i>Caracterización del transcrito del gen p33 en almeja mano de león (Nodipecten subnodosus)</i> .	30
7.2 Descripción de las relaciones filogenéticas de p33 en invertebrados.	42
7.3 Evaluar la expresión diferencial del gen <i>p33Nsub</i> de almeja mano de león diploide y triploide durante la gametogénesis.	45
7.4 Localización de las células de expresión.	53
8. DISCUSIÓN	56
9. CONCLUSIONES	61
10. RECOMENDACIONES.	62
11. LITERATURA CITADA	63
ANEXOS	69
Anexo I. Extracción de ARN.	69
Anexo II. Tratamiento con DNAsa.	71
Anexo III. PolyA-Oligodt Celulosa.	72
Anexo IV. Síntesis cDNA-RACE	74
Anexo V. Ligación con pGEM-T Easy Vector.	76
Anexo VI. Transformación de ligación con pGEM-T Easy Vector	77
Anexo VII. Minipreps.	78
Anexo VIII. Purificación con LiCl 8M	79
Anexo IX. Síntesis de ADNc.	80
Anexo X. Hibridación in situ ISH.	83
A) TRATAMIENTO DE LAMINILLAS CON POLY-L-LISINA (modificado de HU, 2004)	83
B) TRANSCRIPCIÓN Y MARCAJE DE RIBOSONDAS (kit DIG RNA labeling T7/SP6).	83
C) Hibridación in situ con ribosonda marcada con Digoxigenina (Sifuentes-Romero <i>et al.</i> 2010)	84
D) Post-hibridación y detección	86

Anexo XI: Secuencias utilizadas para el análisis filogenético: en la columna Proteína se muestra el nombre con el que está registrada cada proteína en el GenBank, en la columna Acceso o Genbank se muestra el numero y/o código de acceso, en la columna Secuencia se muestra la secuencia completa de la proteína y en la columna Especie la especie animal de la cual se aisló, predijo o se caracterizó esta proteína.88

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** La Familia RINGO/Speedy en vertebrados (tomado de Chauhan *et al.*, 2012).....6
- Figura 2.** Anatomía de *Nodipecten subnodosus*.13
- Figura 3.** Estadios gametogénicos para hembras diploides (A, C, E) y triploides (B, D, F) de *N. subnodosus*. Inicio de la ovogénesis en diploides (A) con oogonias (o), los ovocitos previtelogénicos (prev), y unos pocos ovocitos vitelogénicos (vo) y (B) triploides con oogonias y ovocitos previtelogénicos. Las etapas avanzadas de la ovogénesis en (C), los diploides con un gran número de ovocitos vitelogénicos (vo) y postvitelogénicos (PVO). En (D) triploides con ovocitos, la mayoría previtelogénicos (prev) y pocos ovocitos vitelogénicos (vo). Las etapas finales de la ovogénesis, con (E) diploides se desovaron, y con algunos ovocitos postvitelogénicos (PVO). En (F) los triploides muestran acinos vacíos, aún con ovocitos previtelogénicos (prev). (Tomada de Maldonado-Amparo *et al.* 2004)14
- Figura 4.** Estadios gametogénicos para machos diploides (A, C, E) y triploides (B, D, F) de *N. subnodosus*. Inicios de la espermatogénesis en diploides (A) con las espermatogonias (SPG), espermatocitos (spc), y algunos espermátidas (SPT), (B) triploides que muestran solamente espermatogonias y espermatocitos. Las etapas avanzadas de la espermatogénesis en diploides (C) con un gran número de espermatocitos (CPE), espermátidas (SPT), y los espermatozoides (SPZ), y en triploides (D) que muestran en su mayoría espermatocitos (SPC). Las etapas finales de la espermatogénesis en diploides (E) tienen el modelo centrípeto en acinos, con espermatocitos periféricos (SPC), espermátidas intermedios (SPM), y céntrico espermatozoides (esp), triploides (F) con ninguna matriz claro, pocos espermatocitos, y la evidencia de reabsorción por las células vacuoladas (vc). (Tomada de Maldonado-Amparo *et al.* 2004).....15

Figura 5. Diagrama general de la técnica RACE (Tomada de Llera-Herrera, 2013)	17
Figura 6. Electroforesis en agarosa-TAE 1% de ARN total de gónada de <i>Nodipecten subnodosus</i> . En el primer carril el marcador de peso molecular y concentración, en el resto de los carriles imágenes del ARN extraído, en el carril 3 se desglosan las unidades ribosomales.	30
Figura 7. Verificación de cDNA. Electroforesis en agarosa-TBE 1% de cDNA-RACE de gónada de <i>Nodipecten subnodosus</i> . En el primer carril el marcador de peso molecular, en carril central la comprobación del cDNA 3' y en el carril de la derecha la comprobación del cDNA 5'	31
Figura 8. Electroforesis en agarosa-TBE 1% de productos PCR-RACE y PCR-RACE anidada, de gónada de <i>Nodipecten subnodosus</i> . En el primer carril el marcador de peso molecular, en los siguientes dos carriles los productos 5' y 3', los siguientes dos carriles marcados con 5'N y 3'N corresponde a los productos PCR-RACE anidada, al final el control negativo de la reacción.....	32
Figura 9. Electroforesis en agarosa-TBE 1% de productos PCR-M13 de ADNp, en el primer carril el marcador de peso molecular, los carriles antes del control negativo corresponden a las amplificaciones de las diferentes colonias, al final el control negativo de la reacción.	32
Figura 10. Transcrito del gen <i>p33Nsub</i> obtenido por RACE y su traducción conceptual a proteína. El ORF se denota en minúsculas, la proteína codificada se indica en mayúsculas y con el color rojo-sepia se señala el dominio SPY conservado en la proteína. Las regiones 5'UTR y la 3'UTR se indican en mayúsculas. Los cebadores usados en RACE, ISH y PCR semicuantitativo se señalan subrayados (ver Tabla I y III).....	35
Figura 11. Predicción estructural <i>p33Nsub Nodipecten subnodosus</i>	36
Figura 12. Predicción estructural Speedy/RINGO protein <i>Xenopus tropicalis</i>	36
Figura 13. Predicción estructural Speedy 1-B <i>Crassostrea gigas</i>	37
Figura 14. Predicción estructural X1 <i>Aplysia californica</i>	37
Figura 15. Predicción estructural X2 <i>Aplysia californica</i>	38
Figura 16. Predicción estructural X3 <i>Aplysia californica</i>	38
Figura 17. Predicción estructural X4 <i>Aplysia californica</i>	39

- Figura 18.** Alineamientos estructurales, en A) El modelo proteico de p33Nsub contra Speedy 1-B de *Xenopus leavis*, en B) la comparación estructural entre p33Nsub y Speedy protein 1-B de *Crassostrea gigas*.40
- Figura 19.** Alineamientos estructurales de p33Nsub contra las 4 isoformas de PREDICTED: speedy protein A-like en *Aplysia californica*; en A) El modelo proteico de p33Nsub contra X1, en B) la comparación estructural entre p33Nsub y X2, en C) el modelo proteico de p33Nsub contra X3 y en D) la comparación estructural entre p33Nsub y X4 (entendiéndose que X1, X2, X3 y X4, corresponden cada una a una de las 4 isoformas de la proteína Speedy encontradas en *Aplysia californica*).41
- Figura 20.** Alineamiento múltiple de la región conservada usada para la construcción del árbol filogenético con los homólogos y ortólogos de p33Nsub en vertebrados e invertebrados.43
- Figura 21.** Árbol filogenético de los homólogos y ortólogos de p33Nsub en vertebrados e invertebrados.44
- Figura 22.** Electroforesis en agarosa-TAE 1% de ARN de diferentes tejidos de *Nodipecten subnodosus* purificado con LiCl8M, en el primer carril el marcador de peso molecular y concentración, en el resto de los carriles imágenes del ARN purificado, en el carril 2 se desglosan las unidades ribosomales.46
- Figura 23.** Electroforesis en agarosa-TBE 1% de productos PCR con RNA de los diferentes tejidos de *Nodipecten subnodosus* tratado con DNAsa. En el primer carril el marcador de peso molecular, en los siguientes dos carriles los productos (los carriles marcados con rojo denotan aquellas muestras con resultado negativo al tratamiento), al final el control negativo de la reacción.47
- Figura 24.** Electroforesis en agarosa-TBE 1% de productos PCR con cDNA de los diferentes tejidos de *Nodipecten subnodosus*. En el primer carril el marcador de peso molecular, en los siguientes carriles los productos de PCR con el gen β -actina, al final el control negativo de la reacción.47
- Figura 25.** Electroforesis para evaluar el número de ciclos para el análisis de semicuantificación, en el prime carril el marcador de peso y concentración Low DNAMass Ladder (Invitrogen), al centro marcados con los números 20, 23, 25, 28, 30 son el número de ciclos de amplificación y finalmente los controles positivo y negativo de la reacción para los que se usó el gen de la β -actina.48
- Figura 26.** Electroforesis de productos PCR-semicuantitativo de gónadas, A, B, C, D y E son organismos diploides, mientras que F, G y H son organismos triploides. En A se

muestra la amplificación de *p33* para diploides en gametogénesis inactiva-inicial, B) gametogénesis avanzada región femenina, C) gametogénesis avanzada región masculina, G) desove región femenina y H) desove región masculina; la amplificación del gen de referencia (*EFv*) para da uno de estos casos se muestra debajo de la amplificación del gen blanco (*p33*). En F) se muestra la amplificación de *p33* para triploides en: K) triploides de la misma edad que los diploides del grupo A en gametogénesis inicial, G) triploides de la misma edad que los diploides del grupo B y C en gametogénesis avanzada, H) triploides de la misma edad que los diploides del grupo D y E en desove; las amplificaciones de gen de referencia (*EFv*) debajo de la amplificación de gen blanco (*p33*). Expresión relativa del gen *p33Nsub* en relación al gen control *EFv*, para organismos diploides (2N's) en los estadios de gametogénesis inactiva-inicial, avanzada y desove, y expresión relativa del mismo gen *p33Nsub* para triploides (3N's) en la misma edad que los diploides para los estadios gametogénicos observados en diploides. La barra de dispersión representa el intervalo de confianza al 95% y diferentes letras indican diferencias significativas entre estadios y/o ploidías resultantes del análisis comparativo de las medias utilizando un análisis post-hoc de Fisher.....50

Figura 27. Electroforesis de productos PCR-Ubicuidad de la expresión del gen *p33Nsub* en diploides y el gen control *EFv*: A) *p33* manto, B) control positivo *EFv* manto, C) *p33* músculo, D) control positivo *EFv* músculo, E) *p33* glándula digestiva, F) control positivo *EFv* glándula digestiva, G) *p33* branquia, H) control positivo *EFv* branquia, I) *p33* pie, J) control positivo *EFv* pie. Al centro de las dos filas de carriles el marcador de concentración y peso molecular.....52

Figura 28. Electroforesis de productos PCR-Ubicuidad de la expresión de *p33Nsub* en triploides y el gen control *EFv*: A) *p33* manto, B) control positivo *EFv* manto, C) *p33* músculo, D) control positivo *EFv* músculo, E) *p33* glándula digestiva, F) control positivo *EFv* glándula digestiva, G) *p33* branquia, H) control positivo *EFv* branquia, I) *p33* pie, J) control positivo *EFv* pie. Al centro de las dos filas de carriles el marcador de concentración y peso molecular.....53

Figura 29. Hibridación con ribosonda marcada con digoxigenina en gónadas de diploides; A) Gametogénesis inactiva-inicial, B) Gametogénesis avanzada y C) Desove. AV= acino vacío, TC= tejido conectivo, G= Gonía, PV= Ovocitos previtelogénicos, V-I= ovocitos vitelogénicos primarios, V-II= ovocitos vitelogénicos secundarios, SPG= espermatogonia, SPC= Espermátocitos y SPM= Espermátida.....54

Figura 30. Hibridación con ribosonda marcada con digoxigenina en gónadas triploides; A) Grupo 1 de triploides, correspondiente a la edad en que los diploides se encontraron en gametogénesis inicial-inactiva; B) Grupo 2, correspondiente a la edad en que los diploides se encontraron en gametogénesis avanzada, C) Grupo 3, correspondiente a

la edad en que los diploides estaban en desove. AV= acino vacío, TC= tejido conectivo, G= Gonia.....55

Figura 31. La expresión de LM23, un ortólogo de p33 en *Rattus norvegicus* y su relación con algunos genes del ciclo celular y la apoptosis. La expresión de algunos de ellos cambio significativamente después de la interferencia de LM23, como se muestra por el análisis de microarreglo. La regulación negativa de LM23 puede bloquear la transición entre las fases G1/S y G2/M de la célula en espermatogénesis (tomada de Cheng *et al.*, 2011).....59

LISTA DE TABLAS

Tabla I. Cebadores específicos <i>p33-Speedy</i>	18
Tabla II. Cebadores universales M13.....	20
Tabla III. Cebadores para PCR-semicuantitativo.....	23
Tabla IV. Resultados del análisis de varianza para estimar el efecto de la ploidía sobre la expresión relativa de p33 con el modelo anidado.	51

1. INTRODUCCIÓN

La almeja mano de león (*Nodipecten subnodosus*) es el bivalvo más grande de la familia Pectinidae presente en Baja California Sur, y debido a su alta tasa de crecimiento y valor comercial, se considera una especie atractiva para la acuicultura (Maeda-Martínez & Lodeiros-Seijo, 2011). La producción de semilla en condiciones de laboratorio con fines acuícolas se ha realizado principalmente a un nivel experimental, con técnicas de producción descritas en Mazón-Suastegui *et al.* (2011). Sin embargo, una de las problemáticas asociadas con la producción en laboratorio es la reducida variabilidad genética debido al uso de un bajo número de reproductores y al hecho de que esta especie es una hermafrodita funcional que puede resultar en semilla autofecundada (Petersen *et al.*, 2008; Ibarra *et al.*, 2011). Una alternativa para la producción de esta especie en laboratorio y su siembra para cultivo en áreas naturales es la producción de organismos estériles, como son por ejemplo los triploides (Petersen *et al.*, 2006), los cuales pueden o no presentar paralelamente un mejor crecimiento (Maldonado-Amparo *et al.*, 2004; Ramírez-Arce, 2009). La inducción a la triploidía como alternativa de producción se ha usado con éxito en moluscos (Gouletquer *et al.*, 1996; Ibarra-Humphries & Ramírez-Arce, 2008; Maldonado-Amparo *et al.*, 2004) y en la almeja mano de león la aplicación de esta biotecnología resulta en organismos estériles totalmente, esto como consecuencia de problemas presentados durante la meiosis, que deriva en la activación de genes de “*checkpoints*” o puntos de verificación del control de la fidelidad del ciclo meiótico (Maldonado-Amparo & Ibarra 2002a, 2002b). Al igual que hay genes de tipo *checkpoint*, existen otros genes cuyo papel es permitir que el ciclo celular ocurra o continúe a pesar de posibles errores, resultando en ocasiones en la promoción de tumores o crecimiento no controlado (Gastwirt *et al.*, 2006 & 2007; McAndrew *et al.*, 2009).

Por ejemplo, se sabe que las cinasas dependientes de ciclinas (CDK) son las encargadas de controlar la progresión del ciclo celular, y que estas a su vez requieren de ser activadas por una cinasa activadora de ciclina (CAK), lo cual provee de cierta forma un control temporal

del ciclo celular (Gastwirt *et al.*, 2007; Chauhan *et al.*, 2012). Sin embargo, recientemente se identificó a otro grupo de proteínas que pueden unirse y activar a las CDKs, y hacen esto a pesar de no presentar homología con las ciclinas (Dinarina *et al.*, 2009; Nebreda, 2006). Esta nueva familia de proteínas nombrada como RINGO/ Speedy se considera importante para la maduración meiótica (Gastwirt *et al.*, 2007), y dentro de esta familia de proteínas se encuentra p33 RINGO/Speedy. Aunque inicialmente se le catalogó como un iniciador de la maduración del ovocito de *Xenopus* mediante la inducción de la transición G₂/M (Lenormand *et al.*, 1999; Yamashita, 2000), se sabe ahora que puede inducir la progresión de la fase G₁/S y que además puede evitar la activación de “*Checkpoints*” (McAndrew *et al.*, 2009).

2. ANTECEDENTES

2.1. Triploidía en moluscos

Con la finalidad de incrementar la productividad del cultivo de la almeja mano de león se han desarrollado diversas tecnologías, entre ellas la inducción a la triploidía. El objetivo principal de la aplicación de esta biotecnología es incrementar la tasa de crecimiento y el tamaño del músculo aductor (Gouletquer *et al.*, 1996, Ibarra-Humphries & Ramírez-Arce, 2008; Maldonado-Amparo *et al.*, 2004). La mejora en crecimiento de los triploides se adscribe al hecho de que estos no llegan a la madurez sexual o presentan una gametogénesis inhibida, por lo que no utilizan energía para su reproducción y por tanto cuentan con un excedente de energía para el crecimiento (Allen & Downing, 1986).

En pectínidos como la almeja mano de león *N. subnodosus*, se ha observado que la movilización de las reservas somáticas hacia la gónada durante la gametogénesis depende de la disponibilidad del alimento en el medio. Es decir, si el sitio de cultivo presenta temporadas de baja productividad primaria, la estrategia de los organismos va a ser de almacenar y movilizar energía de sus tejidos, principalmente de la glándula digestiva (Arellano-Martínez *et al.*, 2004) y del músculo aductor hacia la formación y crecimiento de sus gametos. Pero por el contrario, si el sitio presenta una alta productividad primaria, va a verse disminuida esta movilización de energía debido a que esta puede ser adquirida del alimento presente en el sitio y no es necesario utilizar las reservas almacenadas (Racotta *et al.*, 2003, 2008; Palacios *et al.*, 2004, 2005).

2.2 La gametogénesis

La gametogénesis es el proceso de diferenciación de las células germinales para producir gametos maduros. Esta se divide en varias etapas, siendo la primera la proliferación

mitótica de las células madre o gonias. En el caso especial de la espermatogénesis, las siguientes etapas comprenden la meiosis I y II y consisten en dos reducciones cromosómicas que ocurren por la división de los espermatoцитos primarios y secundarios, seguido de la espermiogénesis de espermátidas haploides (Liu *et al.*, 2007). La ovogénesis en moluscos como la almeja mano de león difiere de la espermatogénesis en que los ovocitos previtelogénicos resultantes de la proliferación mitótica de las ovogonias incrementan en tamaño por la acumulación de vitelo pero permanecen arrestados en la meiosis I sin completar reducción cromosómica alguna hasta que son desovados y fertilizados. Durante la gametogénesis diferentes genes que codifican a las proteínas necesarias para el desarrollo y división de las células germinales en etapas específicas son expresados. Sin embargo, genes de este tipo así como sus interacciones genéticas no se habían caracterizado en moluscos pectínidos hasta recientemente, cuando Llera-Herrera *et al.* (2013) aislaron varios genes a través de la producción de librerías sustractivas de la gónada de la almeja mano de león. El aislamiento de esos genes es importante ya que permite estudiar la función de los mismos en un contexto de diploides y triploides. Esto es, se ha propuesto que la inhibición de la gametogénesis y esterilidad resultante en los organismos pectínidos triploides es una consecuencia de problemas presentados durante la meiosis, en sí, durante la sinapsis y recombinación, ya que al presentar tres pares de cromosomas homólogos durante estos procesos, se deben activar genes involucrados en los mecanismos conocidos como “*checkpoints*” o puntos de verificación del control de la fidelidad del ciclo meiótico (Maldonado-Amparo & Ibarra 2002a, 2002b), resultando esto en una esterilidad parcial o total.

De los genes y proteínas involucrados en el ciclo celular, se sabe que la progresión del ciclo celular meiótico es controlado por diversas cinasas dependientes de ciclinas (CDK 1, 2, 4, 6), las cuales requieren de ser activadas por ciclinas (ciclina A, B, D, o E), proveyendo esto con un control temporal sobre su actividad (Gastwirt *et al.*, 2007; Chauhan *et al.*, 2012). Sin embargo, existe otro grupo de proteínas que también pueden unirse y activar a las CDKs a pesar de no presentar homología con las ciclinas, como son las proteínas de la familia RINGO/Speedy (Dinarina *et al.*, 2009; Nebreda, 2006).

2.3 Familia de proteínas RINGO/Speedy

Esta relativamente nueva familia de proteínas llamada RINGO/Speedy, originalmente reportadas en ovocitos de *Xenopus* (Gastwirt *et al.*, 2007), consta al menos de ocho miembros, y se pueden encontrar desde levaduras hasta vertebrados; todas comparten una región central de la cual proviene su nombre, llamada la caja de RINGO/Speedy (Gastwirt *et al.*, 2007; Yamazaky & Ward, 2011). Recientemente Chauhan *et al.* (2012) describieron la relación filogenética de esta familia de proteínas en vertebrados (Fig. 1). Las proteínas de esta familia han sido identificadas como reguladoras de la meiosis (Yamazaky & Ward 2011; Nebreda, 2006). Como fue mencionado antes, estas proteínas son capaces de unirse y activar a las CDKs independientemente de que suceda o no la activación por las ciclinas (Gastwirt *et al.*, 2007; Nebreda, 2006; Yamazaky & Ward, 2011), y por la capacidad de estas proteínas para inducir la progresión de la fase G₂ a M durante el ciclo celular, se considera que la expresión de los miembros de esta familia es importante para la maduración meiótica (Gastwirt *et al.*, 2007).

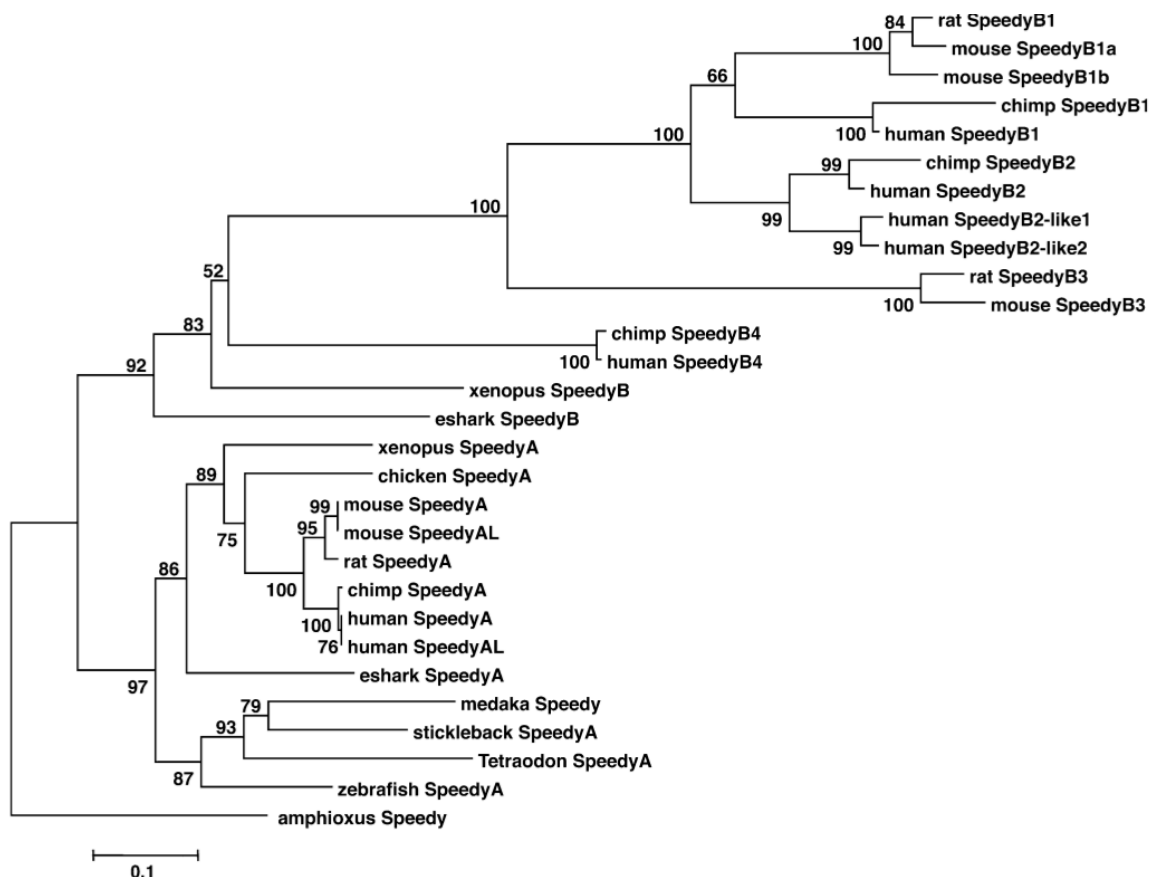


Figura 1. La Familia RINGO/Speedy en vertebrados (tomado de Chauhan *et al.*, 2012).

2.4 p33 RINGO/Speedy: Un iniciador de la maduración gamética

El gen *p33*, que traduce a la proteína p33 RINGO/Speedy, primero se relacionó como un iniciador de la maduración del ovocito mediante la inducción de la transición G_2/M en los ovocitos de *Xenopus* (Lenormand *et al.*, 1999; Yamashita, 2000). Posteriormente se encontró que también puede inducir la progresión de la fase G_1/S cuando se sobreexpresa en diferentes tejidos humanos, y más recientemente se ha encontrado asociado con la promoción de tumores, posiblemente debido a su capacidad para evitar la activación de “Checkpoints” (McAndrew *et al.*, 2009). Un estudio reciente de la familia de proteínas RINGO/Speedy en vertebrados ha encontrado que esta familia de genes se expresa

predominantemente en los testículos, aunque se detectó una menor expresión en otros tejidos (Chauhan *et al.*, 2012). En la almeja *N. subnodosus* se detectó una expresión predominantemente en ovario y testículos en desarrollo gametogénico temprano (Llera-Herrera *et al.*, 2013).

p33 se ha identificado como una proteína capaz de inducir eficazmente la maduración de ovocitos inmaduros en *Xenopus*, y cuando se inyecta en forma de ARN de doble cadena en estudios de interferencia (ARNi) se ha observado una inhibición de la síntesis de proteínas esenciales en la maduración gamética (Ferby *et al.*, 1999); de hecho se ha establecido que p33 RINGO/Speedy induce la ruptura de la vesícula germinal o GVBD (Germinal Vesicle Breakdown) considerablemente más rápido que la progesterona (Yamashita, 2000).

3. JUSTIFICACIÓN

Se han realizado múltiples esfuerzos para el desarrollo de triploides como una tecnología de producción, cuyo objetivo principal es incrementar la productividad en organismos de cultivo (Maldonado-Amparo *et al.*, 2004; Ramírez-Arce, 2009). Aunque el incremento del tamaño en triploides de *Nodipecten subnodosus* se ha relacionado más con el medio en el que se cultiva que con su ploidía solamente, la esterilidad resultante de la triploidía es independiente del medio de cultivo. Tal esterilidad representa una ventaja para el cultivo de organismos en sitios donde existen poblaciones naturales ya que permite evitar la ‘contaminación’ con gametos derivados de organismos producidos artificialmente y con baja variabilidad genética (Petersen *et al.*, 2006). Con este trabajo se busca identificar las células en las cuales se expresa el gen *p33* y comparar su expresión en diploides y triploides durante la gametogénesis, lo cual potencialmente ayudará a entender algunos de los procesos que pueden inducir a la esterilidad en organismos de interés.

4. HIPÓTESIS

Si p33 de la familia RINGO/Speedy está relacionado con genes de meiosis en *Nodipecten subnodosus*, entonces la expresión del transcrito de este gen variará entre diploides y triploides, y si su expresión es gónada-específica esta será mayormente observable en células germinales en desarrollo meiótico temprano.

5. OBJETIVOS

4.1 Objetivo general

- Evaluar el patrón de expresión y localizar las células de expresión del gen *p33* *RINGO/Speedy* durante la gametogénesis de almeja mano de león (*Nodipecten subnodosus*) diploide y triploide.

4.2 Objetivos específicos

- Caracterizar el transcrito del gen *p33* en almeja mano de león (*Nodipecten subnodosus*) y conocer su relación filogenética con sus homólogos/ortólogos en otras especies de invertebrados y vertebrados.
- Evaluar la expresión diferencial del gen *p33* de almeja mano de león diploide y triploide durante la gametogénesis.
- Localizar las células de expresión del gen *p33* durante la gametogénesis de almeja mano de león diploide y triploide.

6. MATERIALES Y MÉTODOS

6.1 Producción de triploides

Para la inducción a la triploidía de almeja mano de león se utilizó el protocolo ya establecido en el laboratorio de Genética y Mejoramiento Animal Acuícola del CIBNOR (Ruiz-Verdugo et al., 2001; Maldonado-Amparo *et al.*, 2004; Ibarra-Humphries & Ramírez-Arce, 2008). Este método para el caso específico de *N. subnodosus* consiste en la inhibición de la extrusión del segundo cuerpo polar posterior a la fertilización de desoves manejados individualmente, aplicando citocalasina-B (SIGMA) a una concentración de 0.75 mg/L, cuando se observa el primer cuerpo polar en aproximadamente el 50% de los huevos fecundados del grupo control correspondiente, y lavando los gametos cuando alrededor del 50% de los gametos del grupo control presentan el segundo cuerpo polar.

6.2 Mantenimiento de organismos en campo

Los organismos diploides y triploides se mantuvieron en canastas ostrícolas en el medio natural; las canastas se colocaron en el estero Rancho Bueno, BCS., y cada 30 días se les dio mantenimiento, el cual consistió en cambiar a los organismos a canastas limpias y retirar los epibiontes de los organismos.

6.3 Material biológico

Se realizaron muestreos mensuales desde febrero del 2013 hasta agosto del mismo año con fines de contar con todos los estadios de desarrollo gonádico. Cada mes se muestrearon

alrededor de 100 organismos presuntos triploides y 50 diploides, todas las muestras obtenidas se preservaron en ARNlater a -20°C hasta su uso. Se tomó gónada para análisis histológicos y así verificar el estadio de desarrollo gonádico, localizar las células de expresión por hibridación in situ (ISH por sus siglas en inglés) y para análisis de expresión génica; adicionalmente se muestreo músculo aductor, glándula digestiva, manto, branquia y pie (Fig. 2) que son los tejidos para evaluar la ubicuidad de la expresión, de cada uno de los organismos muestreados se tomó una porción del manto para establecer la ploidía (almacenado a -80°C hasta su análisis). Dentro del grupo de los triploides solamente se procesaron histológicamente aquellos organismos que fueron certificados como triploides genéticos. Una vez iniciada la maduración sexual en campo se continuó con los muestreos con el fin de obtener organismos maduros y desovados para los análisis de expresión génica diferencial.

6.4 Confirmación de ploidía

Para la confirmación de la ploidía se siguió la metodología descrita en Maldonado-Amparo *et al.* (2004) utilizando la porción de manto muestreada y congelada, y analizando la ploidía en un citometro de flujo (PARTEC PA-III) siguiendo la metodología establecida por Allen (1983).

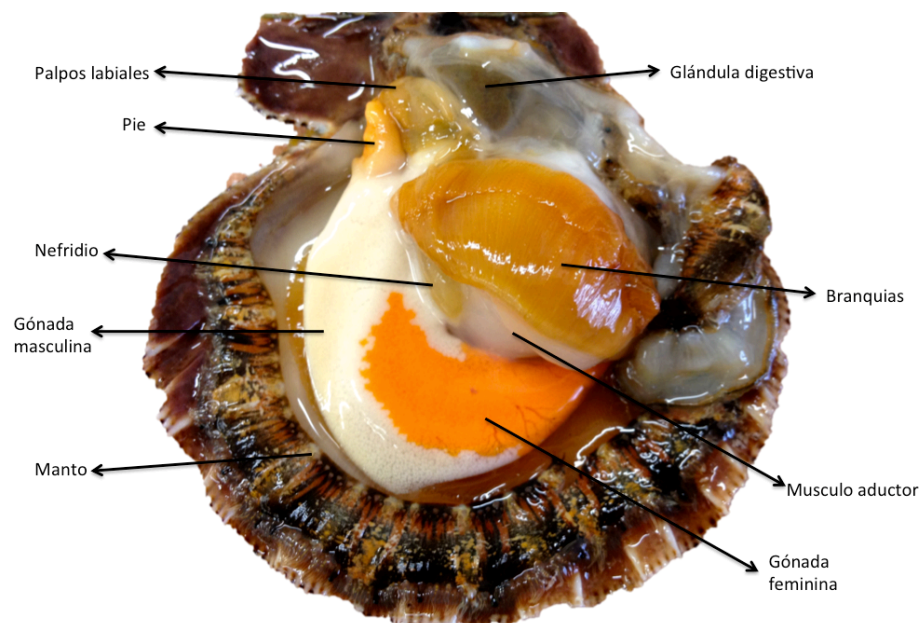


Figura 2. Anatomía de *Nodipecten subnodosus*.

Una vez confirmada la ploidía del muestreo correspondiente, se procedió con el procesamiento histológico de las gónadas para observar las células y el desarrollo gonádico, el cual consistió en hacer inclusiones en parafina y cortes de los mismos para ser teñidos con hematoxilina y eosina. Para la diferenciación por estadio de desarrollo gonádico se empleó la escala de Maldonado-Amparo *et al.* (2004) para *Nodipecten subnodosus* (Figs. 3 y 4).

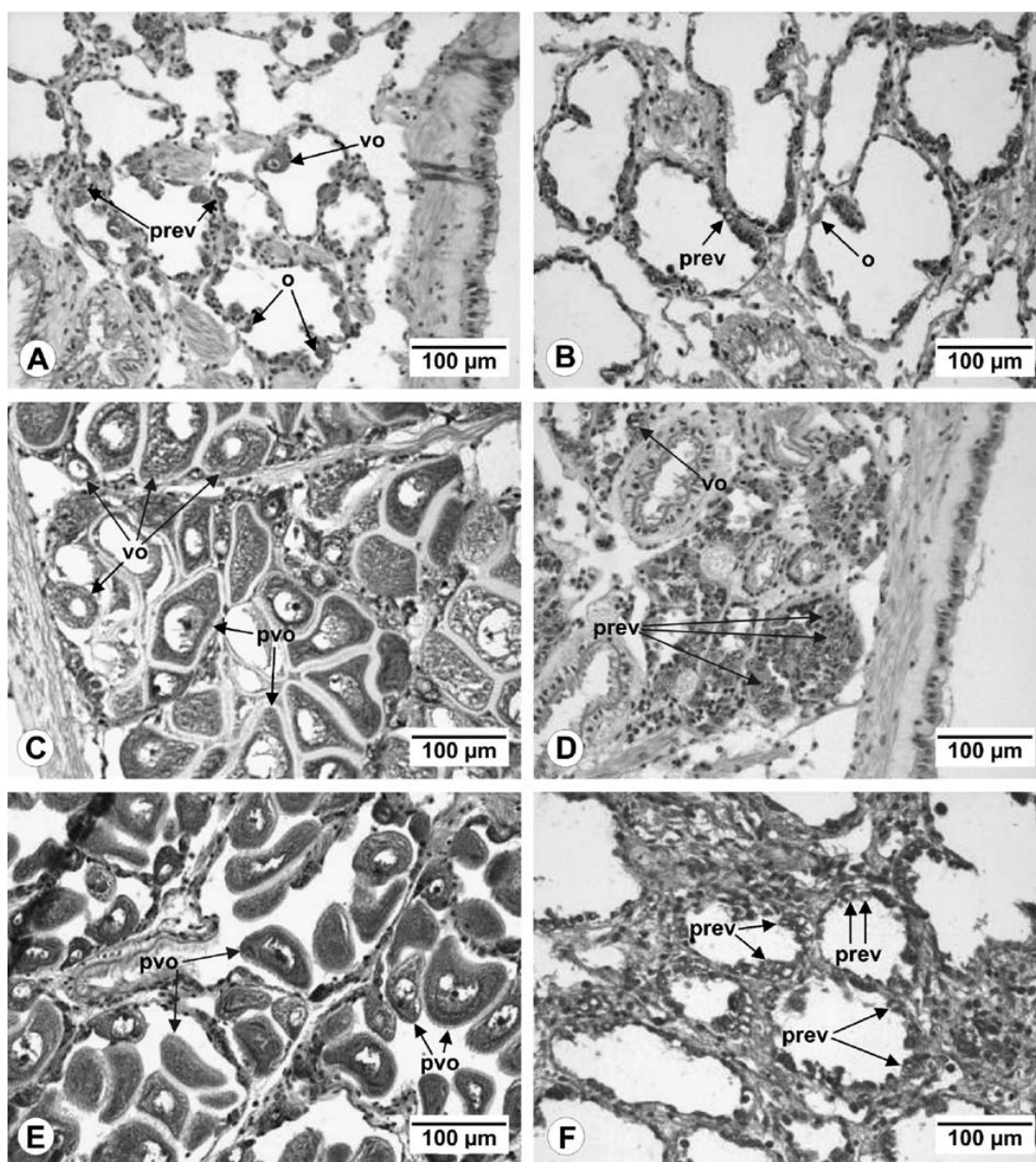


Figura 3. Estadios gametogénicos para hembras diploides (A, C, E) y triploides (B, D, F) de *N. subnodosus*. Inicio de la ovogénesis en diploides (A) con oogonias (o), los ovocitos previtelogénicos (prev), y unos pocos ovocitos vitelogénicos (vo) y (B) triploides con oogonias y ovocitos previtelogénicos. Las etapas avanzadas de la ovogénesis en (C), los diploides con un gran número de ovocitos vitelogénicos (vo) y postvitelogénicos (PVO). En (D) triploides con ovocitos, la mayoría previtelogénicos (prev) y pocos ovocitos vitelogénicos (vo). Las etapas finales de la ovogénesis, con (E) diploides se desovaron, y con algunos ovocitos postvitelogénicos (PVO). En (F) los triploides muestran acinos vacíos, aún con ovocitos previtelogénicos (prev), (Tomada de Maldonado-Amparo *et al.*, 2004)

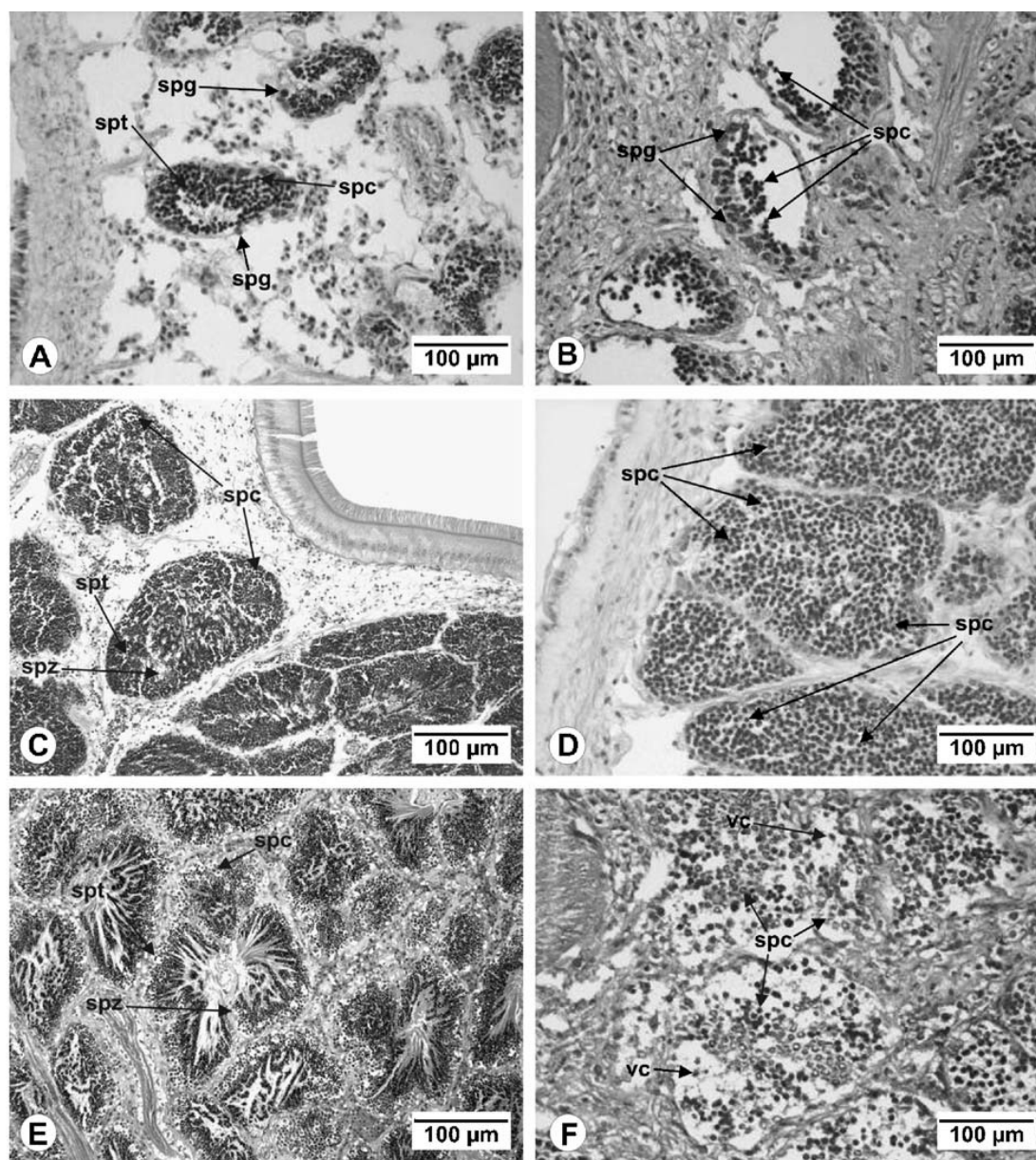


Figura 4. Estadios gametogénicos para machos diploides (A, C, E) y triploides (B, D, F) de *N. subnodosus*. Inicios de la espermatogénesis en diploides (A) con las espermatogonias (SPG), espermatocitos (spc), y algunos espermatidas (SPT), (B) triploides que muestran solamente espermatogonias y espermatocitos. Las etapas avanzadas de la espermatogénesis en diploides (C) con un gran número de espermatocitos (CPE), espermatidas (SPT), y los espermatozoides (SPZ), y en triploides (D) que muestran en su mayoría espermatocitos (SPC). Las etapas finales de la espermatogénesis en diploides (E) tienen el modelo centrípeto en acinos, con espermatocitos periféricos (SPC), espermatidas intermedios (SPM), y céntrico espermatozoides (esp), triploides (F) con ninguna matriz claro, pocos espermatocitos, y la evidencia de reabsorción por las células vacuoladas (vc), (Tomada de Maldonado-Amparo *et al.*, 2004)

6.5 Extracción y cuantificación de ARN total

La extracción se realizó utilizando Tripure Isolation Reagent (Roche Applied Science 40% de fenol, 24% de guanidina y tiocianato) siguiendo el protocolo establecido por el proveedor (Anexo I), el ARN se resuspendió en un volumen de 15 μ L de H₂O MilliQ. El ADN genómico se eliminó empleando DNAsa 1 (RQ1 DNase, Promega) siguiendo el protocolo establecido por el proveedor (Anexo II), y se cuantificó por espectrofotometría en un NanoDrop 2000 (Thermo Scientific). Al finalizar cada extracción la calidad del ARN total obtenido se confirmó por electroforesis en gel agarosa al 1%, con TAE 1X, a 60 volts por 45 minutos, teñido con GelRed (Life Technologies) y se visualizó y documentó en el transiluminador UV BioDoc-It Imaging System (UVP BioImaging Systems).

6.6 Caracterización del transcrito del gen *p33*

Se empleó la técnica de RACE (*Rapid Amplification of cDNA Ends*) para amplificar de forma específica y por separado, los extremos 5' y 3' partiendo de una secuencia parcial intermedia, a partir de la cual se diseñaron cebadores específicos para este gen, que con ayuda de los adaptadores SMART hacen posible amplificar los extremos del gen por separado, y posteriormente utilizando técnicas de biología molecular es posible clonar estos fragmentos para después secuenciarlos y hacer su posterior reconstrucción (Fig. 5).

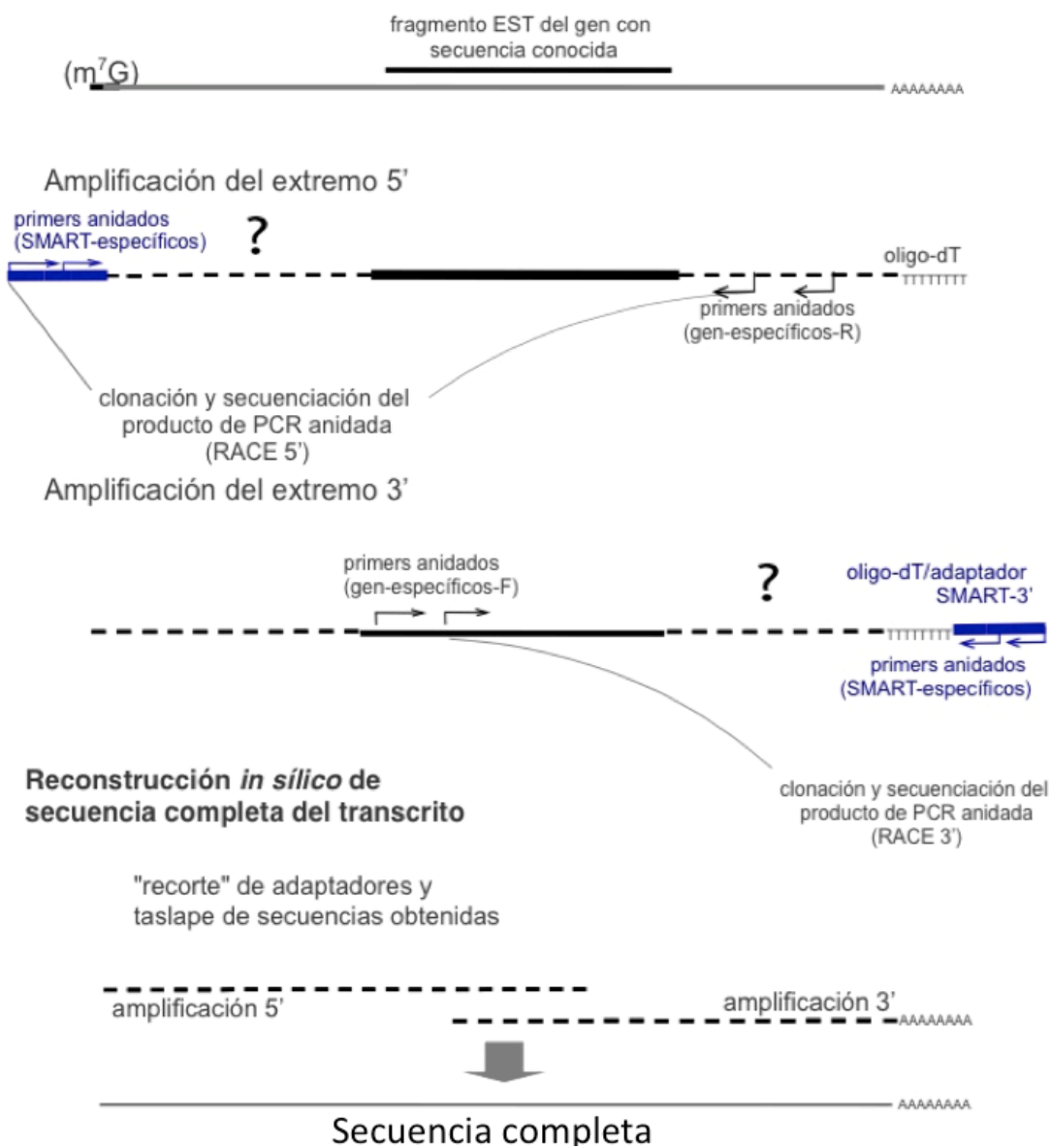


Figura 5. Diagrama general de la técnica RACE (Tomada de Llera-Herrera, 2013)

6.6.1 Diseño de cebadores para RACE

A partir de una secuencia (contig perteneciente al isotig 01997 y al isogroup 01833, para el gen *Nsubp33* en Llera-Herrera *et al.* 2013), con una longitud de 363 pares de bases, se diseñaron cebadores específicos para el aislamiento del transcrito del gen p33 en *N.*

subnodosus (Tabla 1), utilizando el programa Primer3Plus Versión: 2.3.6 (Untergasser *et al.*, 2012).

Tabla I. Cebadores específicos *p33-Speedy*.

Cebador	Secuencia*	Tm °C
p33-F1	5'- <u>ATGGGCTCTTGGTCACAAATGG</u> -3'	63.6
p33-R1 (antisentido de p33-F1)	5'- <u>CCATTTGTGACCAAGAGCCCAT</u> -3'	63.9
p33-F2	5'- <u>AGCGATGCTGTGAAGAGATAATGG</u> -3'	63.4
p33-R2 (antisentido de p33-F2)	5'- <u>CCATTATCTCTTCACAGCATCGCT</u> -3'	63.4
p33-R3 (está en antisentido)	5'- <u>CAATCGTCATCAGGGTCTTT</u> -3'	58
p33-F3	5'- <u>ACTTGTTCTGGGCTAAGATCGGT</u> -3'	61.64
F=Forward, R=Reverse, Tm= melting temperature o temperatura media de fusión		

* El diferente subrayado de los cebadores es con fines de localizarlos en la secuencia completa incluida en resultados.

6.6.2 Caracterización del transcrito de *Nsubp33*

Una vez que se tuvieron muestras de cada uno de los estadios de desarrollo gonádico, se inició con la caracterización del transcrito *Nsubp33*, para ello se hizo un pool ecualizado de ARN de gónada en diversos estadios de desarrollo gametogénico (gametogénesis inactiva-inicial, gametogénesis avanzada y desove); con este pool se inició la selección de ARN-polyA siguiendo el protocolo establecido por el proveedor en el kit comercial Poly(A)Purist™ Kit de Ambion® (Anexo III). La síntesis cDNA se realizó a partir de 260mg de ARN-polyA empleando SMARTer™ RACE cDNA Amplification Kit de

Clontech, siguiendo las indicaciones del fabricante (Anexo IV) para sintetizar cDNA-RACE. Durante la síntesis de cDNA SMARTer se agregó una secuencia que sirve como adaptador y lugar de hibridación para los cebadores UPM (Universal Primer Mix) y ayuda a verificar la obtención de los extremos; para el extremo 5' la secuencia adaptador es 5'-AAG CAG TGG TAT CAA CGC AGA GTA CXX XXX-3' (X= bases desconocidas propiedad de Clontech), y para el extremo 3' es 5'-AAG CAG TGG TAT CAA CGC AGA GTA C(T)30 VN-3' (N = A, C, G o T; V = A, G, o C).

Para verificar la adecuada síntesis de cDNA, se realizó un PCR de punto final, a 30 ciclos de amplificación con una concentración de 1 mM de GoTaq^R Flexi Buffer, 2 mM de MgCl₂, 0.2 mM de dNTP's Mix, 0.2 μM de cebadores β-actina F y R, 1U/μL de GoTaq^R Flexi DNA Polymerase (Promega) y 1 μL de cDNA. Las condiciones de amplificación fueron: desnaturalización inicial a 94°C por 3 min seguida de 30 ciclos de 94°C por 30 s (desnaturalización), 60°C por 30 s (alineamiento) y 72°C por 1 min (extensión), con una extensión final a 72°C por 10 min, en el equipo C1000 TouchTM Thermal Cycler Bio-Rad. Con estos productos se hizo una electroforesis en gel de agarosa 1%, con TBE 1X, a 80 volts, por 40 min, los productos fueron teñidos con GelRed 1X (Life Technologies), usando como referencia de tamaño el marcador Direct Load Wide Range DNA Marker (SIGMA) de 50 a 10,000 pares de bases, se visualizaron y documentaron en un transiluminador UV BioDoc -It Imaging System (UVP BioImaging Systems).

Una vez que se produjeron los cDNA de las regiones 5' y 3' en forma independiente para aislar la secuencia del transcrito del gen *p33* utilizando la técnica de RACE, se usaron los cebadores específicos mostrados en la tabla 1, que se diseñaron como fue mencionado en la sección 6.6.1.

La caracterización del transcrito del gen *Nsubp33* se inició con una PCR de punto final, con las concentraciones de reactivos siguientes: 2 mM Advantage 2 PCR Buffer, 2 mM de Universal Primer A Mix, 0.2 mM de dNTP's Mix, 0.2 μM de Cebador R para la banda 5' y 0.2 μM de Cebador F para la banda 3', 1U/μL de Advantage 2 Polymerase Mix y 1 μL de cDNA. La amplificación se realizó en el equipo C1000 TouchTM Thermal Cycler con una

desnaturalización inicial a 94°C por 3 min, seguida de 30 ciclos de 94°C por 30 s (desnaturalización), 30 s de alineamiento y 2 min de extensión a 72°C, al finalizar los 30 ciclos una extensión final a 72°C por 5 min. Los productos amplificados se visualizaron con una electroforesis en gel de agarosa 1% y se documentó en un transiluminador UV BioDoc-It Imaging System (UVP BioImaging Systems),

Tomando los productos obtenidos de PCR-RACE como template, se realizó una PCR-RACE anidada para la cual las condiciones de amplificación en el mismo equipo antes mencionado fueron: desnaturalización inicial a 94°C por 3 min, seguida de 30 ciclos de 94°C por 30 s (desnaturalización), 62°C por 30 s (alineamiento) y 72°C por 2 min de extensión, al finalizar los 30 ciclos una extensión final a 72°C por 5 min. Terminando esta reacción se hizo una electroforesis en gel de agarosa 1%, con TBE. Los productos de PCR-RACE y PCR-RACE anidada se ligaron al vector pGEM®-T-Easy (Promega), siguiendo el protocolo establecido por el proveedor (Anexo V).

El producto de ligación se clonó en bacterias *Escherichia coli* quimiocompetentes de la cepa JM109. Las bacterias transformadas se cultivaron en medio LB-Agar-Ampicilina por 18 horas a 37°C para la propagación de las colonias esto siguiendo el protocolo descrito en el anexo VI.

Para verificar el tamaño de los insertos se realizó una PCR de colonia empleando los cebadores M13 (Tabla 2) que amplifican una región del plásmido que alberga el inserto. Los productos se verificaron en electroforesis de agarosa 1%, estimando el tamaño de los insertos en cada clona.

Tabla II. Cebadores universales M13.

Cebador	Secuencia	T _m °C
M13 F	5'-GTAAAACGACGACGGCCGA-3'	57.6
M13 R pUC	5'-CAGGAAACAGCTATGAC-3'	50.6

De las colonias confirmadas por PCR como positivas se extrajo ADN plasmídico siguiendo la metodología descrita en el anexo VII, y después de amplificar con los cebadores universales M13 (tabla II) se procedió con el envío de las secuencias a Macrogen en Corea para su secuenciación.

6.6.3 Análisis de secuencias, productos PCR-M13 secuenciados

Las secuencias obtenidas fueron editadas utilizando el programa CLC Workbench 7.0 para eliminar las regiones de baja calidad y el vector de clonación. Se realizó un ensamble de los fragmentos obtenidos tanto con el RACE 5' como el RACE 3'. Posteriormente se condujeron análisis bioinformáticos de la secuencia única obtenida para determinar la región correspondiente al marco de lectura de traducción proteica y su traducción conceptual en aminoácidos (ORFinder, NCBI; <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gorf/gorf.html>). Esta secuencia proteica se utilizó para el análisis filogenético y para predecir la estructura de la proteína, esto último con ayuda de la herramienta en línea I-TASSER (Zhang, 2008) (<http://zhanglab.ccmb.med.umich.edu/I-TASSER/>), una vez obtenidos los modelos proteicos, se compararon estructuralmente con ayuda de la herramienta en línea FATCAT (Ye y Godzik, 2004) (<http://fatcat.burnham.org/>).

Con fines de identificar regiones conservadas en la proteína se utilizó el programa en línea <http://pfam.xfam.org/> de Finn *et al.* (2014). Para evaluar la estabilidad de la proteína, el punto isoeléctrico, la vida media de ésta en el citoplasma celular, entre otras propiedades de la proteína resultante, se utilizó la herramienta en línea ProtParam disponible en <http://us.expasy.org/tools/protparam.html>

Finalmente, se utilizó el programa PRETTYSEQ (<http://bioinfo.nhri.org.tw/cgi-bin/emboss/prettyseq>) para obtener la imagen de la secuencia nucleotídica y proteica.

6.7 Descripción de las relaciones filogenéticas de p33 en invertebrados

Partiendo de la secuencia completa del gen *Nsubp33* y su traducción conceptual a proteína se inició con la búsqueda de proteínas homólogas y ortólogas en otros invertebrados y vertebrados en la base de datos GenBank de NCBI. Una vez identificados dichos homólogos y ortólogos en otras especies de invertebrados y vertebrados, se generaron arboles por máxima verosimilitud para esta proteína, iniciando con el de las secuencias encontradas en GenBank como homólogos/ortólogos de p33 usando la herramienta de análisis para alineamiento Muscle. Posteriormente se determinó la matriz de sustitución de aminoácidos más adecuada con la herramienta *MODELTEST*, partiendo de estos análisis se generaran arboles filogenéticos con un soporte estadístico *bootstrap* de 5000, todo lo anterior empleando el programa MEGA6 (Tamura *et al.* 2013).

6.8 Análisis de la expresión génica en diploides y triploides por PCR- semicuantitativo

6.8.1 Selección del gen de referencia para evaluar la expresión de *p33-RINGO/Speedy*

Para aplicar la técnica de semicuantificación, primero se debe encontrar un buen gen de referencia, con el cual comparar la amplificación de nuestro gen a evaluar. Aunque hay pocos trabajos publicados con mano de león en donde se haya hecho cuantificación de la expresión en tiempo real o qPCR por sus siglas en inglés y se hayan evaluado condiciones de gametogénesis, en el 2012 Llera-Herrera *et al.* evaluaron la expresión de diferentes genes, en condiciones de estudio similares al actual trabajo, donde además de otros genes evaluados como posibles genes de referencia, se usó factor de elongación (*Ef*) con resultados satisfactorios.

6.8.2 Diseño de cebadores para PCR-semicuantitativo

De la secuencia *p33Nsub* se diseñaron cebadores utilizando el software Primer3plus Versión: 2.3.6 (Untergasser *et al.*, 2012) para la cuantificación de la expresión del gen *p33-RINGO/Speedy* por PCR-semicuantitativo (tabla III).

Tabla III. Cebadores para PCR-semicuantitativo.

Cebador	Secuencia	T _m °C	Tamaño amplificado en pb
sqPCR-F	5'-ACATGGGAGGCTTTTCTCGG-3'	60	
sqPCR-R (sentido)	5'-CAAAGCTGTTGTGAGCAAGCGA-3'	60	442
EFv-F	5'-GGATTGGTACAAGGGATGGAG-3'	60	
EFv-R	5'-CATTGAAATGCTCCACACCAG-3'	60	401
F=Forward, R=Reverse, T _m = melting temperature o temperatura media de fusión			

6.8.3 Análisis de expresión génica por PCR-semicuantitativo

Con fines de establecer las diferencias en expresión génica entre diploides y triploides, así como definir el estadio de gametogénesis en el cual se expresa el gen *p33* en almeja mano de león, se utilizaron 3 organismos diploides de cada uno de los siguientes estadios de desarrollo gametogénico: inmadura-inactiva-inicial (acinos y gonias presentes), gametogénesis avanzada (ovocitos y espermatozoides presentes), y desove. Para el caso de los dos últimos estadios se tomaron muestras separadas de la región ovárica y la testicular en todos los individuos. Los triploides a utilizar para este análisis, fueron seleccionados con base en el tiempo o el número de muestreo, es decir; en escala mensual, de igual

manera serán 3 organismos por grupo de estudio.

Adicionalmente se evaluó la ubicuidad de la expresión del transcrito del gen p33, muestreando los siguientes tejidos: músculo aductor, branquia, glándula digestiva, pie y manto.

6.8.4 Síntesis de cDNA para análisis de la expresión génica

Se sintetizó cDNA a partir de 1 μ L RNA de gónadas de diploides y triploides. Para el grupo de organismos diploides la determinación del estadio gametogénico se hizo observando los cortes histológicos y comparándolos con las referencias de Maldonado-Amparo *et al.* (2004). Para el caso del grupo de triploides, dado que estos no maduran y por tanto no es posible utilizar la misma referencia, se usó como referencia el tiempo, al tratarse de un cultivo coordinado y se usó como escala de referencia el tiempo y no el estadio de desarrollo gonádico.

Previa síntesis de cDNA, se inició con la ecualización de las muestras a analizar, esto para evitar variación en los tratamientos por el manejo técnico y minimizar los errores, primero se purificó todo el ARN de manera aleatoria con LiCl 8M, siguiendo el protocolo descrito en el VIII, y al finalizar la purificación de todas las muestras se comprobó la integridad del ARN con una electroforesis en agarosa 1%.

Después de purificar todas las muestras, se les dio tratamiento con DNAsa para eliminar ADN genómico, el cual puede interferir durante la cuantificación de la expresión. Para el tratamiento con DNAsa se siguió el protocolo establecido por el proveedor y descrito en el anexo II. Al finalizar el tratamiento se hizo una PCR de punto final del ARN tratado usando como gen de referencia el de la β -actina a 30 ciclos de amplificación con una concentración de 1 mM de GoTaq^R Flexi Buffer, 2 mM de MgCl₂, 0.2 mM de dNTP's Mix, 0.2 μ M de cebadores β -actina F y R, 1U/ μ L de GoTaq^R Flexi DNA Polymerase (Promega) y 1 μ L de RNA-DNAfree. Las condiciones de amplificación fueron: desnaturalización

inicial a 94°C por 3 min, seguida de 30 ciclos de 94°C por 30 s (desnaturalización), 60°C por 30 s (alineamiento) y 72°C por 1 min (extensión), con una extensión final a 72°C por 10 min, en el equipo C1000 Touch™ Thermal Cycler. Con estos productos se hizo una electroforesis en gel de agarosa 1%, con TBE 1X, a 60 volts, por 60 min, los productos fueron teñidos con GelRed (Life Technologies), usando como referencia de tamaño el marcador Direct Load Wide Range DNA Marker (SIGMA) 50 a 10, 000 pares de bases, se visualizaron y documentaron en un transiluminador UV BioDoc -It Imaging System (UVP BioImaging Systems).

Las muestras en las que hubo una amplificación se consideraron como aquellas en las que no se ha eliminado el ADN genómico por completo, por lo que a estas se les dio un segundo tratamiento con DNAsa hasta eliminar todo el ADN genómico, la eliminación se comprobó igual por PCR punto final usando la técnica y metodología descritas anteriormente.

Con las muestras ya libres de ADN genómico, se siguió con la síntesis de cDNA; para ello, antes se purificaron de nuevo todas las muestras con LiCl 8M (anexo VIII), para eliminar todos los reactivos y demás sustancias que pudieran interferir en la reacción de retrotranscripción durante la síntesis de cDNA. Al finalizar con la retrotranscripción se hizo una PCR de punto final del cDNA recién sintetizado, usando como gen control el gen β -actina con las mismas características de concentración y amplificación descritas en párrafos anteriores. Al final se hizo una electroforesis con los productos de PCR-cDNA para verificar la correcta síntesis de cDNA, esperándose un producto de aproximadamente 200 pares de bases. Los cDNA's se almacenaron a -20°C hasta el análisis de PCR-semicuantitativo.

En primera instancia se evaluó el número de ciclos a utilizar como patrón para el análisis de semicuantificación; el número de ciclos óptimo permite ver los amplicones lo suficientemente oscuros sin saturar la imagen y que se puedan apreciar. Para esto se hizo una PCR punto final usando los cebadores EFv-F y EFv-R (Tabla III) se usó un programa de amplificación a de 30 ciclos, primero la reacción de PCR se detuvo a los 20 ciclos y se

sacó la primera reacción, posteriormente a los 23, 25 28 y 30 ciclos respectivamente, el control positivo fue β -actina la reacción tenía una concentración de 1 mM de GoTaq^R Flexi Buffer, 2 mM de MgCl₂, 0.2 mM de dNTP's Mix, 0.2 μ M de cebadores EFv-F y R, 1U/ μ L de GoTaq^R Flexi DNA Polymerase (Promega) y 1 μ L cDNA. Las condiciones de amplificación fueron: desnaturalización inicial a 94°C por 1 min, seguida de 30 ciclos de 94°C por 15 s (desnaturalización), 60°C por 30 s (alineamiento) y 72°C por 30 s (extensión), con una extensión final a 72°C por 10 min, en el equipo C1000 TouchTM Thermal Cycler. Con estos productos se hizo una electroforesis en gel de agarosa 1%, con TBE 1X, a 90 volts, por 60 min, los productos fueron teñidos con GelRed (Life Technologies), usando como referencia de tamaño el marcador Low DNA Mass Ladder (Invitrogen) 100 a 2000 pares de bases y documentados en un transiluminador UV BioDoc-It Imaging System (UVP BioImaging Systems).

Dado este resultado se decidió usar 28 ciclos como patrón de ciclos de amplificación para todo el análisis, y se hicieron reacciones de PCR de punto final con el cDNA de cada una de las muestras más el control positivo usando como gen de referencia a el Factor de Elongación (EFv), usando los cebadores que se mencionan en la Tabla III sección 6.6.3 el programa de amplificación fue de 28 ciclos, y la concentración de reactivos es la misma que se menciona en el párrafo anterior donde se evaluó el número de ciclos de amplificación. Las condiciones de amplificación fueron: desnaturalización inicial a 94°C por 1 min, seguida de 28 ciclos de 94°C por 15 s (desnaturalización), 60°C por 30 s (alineamiento) y 72°C por 30 s (extensión), con una extensión final a 72°C por 10 min, en el equipo C1000 TouchTM Thermal Cycler. Con estos productos se hizo una electroforesis en gel de agarosa 1%, con TBE 1X, a 90 volts, por 60 min, los productos fueron teñidos con GelRed 1X (Life Technologies), usando como referencia de tamaño el marcador Low DNA Mass Ladder (Invitrogen) 100 a 2000 pares de bases, se visualizaron y documentaron en el equipo Gel Doc XR+ system (Bio-Rad).

Se estimó la expresión relativa de p33 (ER p33) como:

$$\text{ER p33} = \text{intensidad de pixeles de p33} / \text{intensidad de pixeles del gen control EFv}$$

Con los datos obtenidos de la expresión relativa a través de la medición de la intensidad de pixeles de cada una de las bandas se condujo un análisis estadístico utilizando un análisis de varianza con dos factores fijos incluidos en el siguiente modelo anidado:

$$ER_{p33} = \text{Ploidía} + \text{Estadio (Ploidía)} + \text{error}$$

Para la evaluación de la ubicuidad de la expresión del gen *Nsubp33* en los diferentes tejidos de la almeja mano de león (*Nodipecten subnodosus*), se extrajo ARN de cada uno de los tejidos (manto, músculo, glándula digestiva, branquia y pie) tanto diploides como triploides, siguiendo el protocolo descrito en el anexo I; el ARN se trató con DNAsa (anexo II) y finalmente se hizo la retrotranscripción (anexo IX). Una vez obtenido el cDNA se procedió a realizar las amplificaciones, y al igual que con el tratamiento de semicuantificación para gónadas, se usó el mismo programa de amplificación. Los productos fueron visualizados en un gel de agarosa 1% posteriormente a una electroforesis con TBE 1X, a 90 volts, por 60 min. Las amplificaciones fueron teñidos con GelRed (Life Technologies), usando como referencia de tamaño el marcador Low DNA Mass Ladder (Invitrogen) 100 a 2000 pares de bases, y se visualizaron y documentaron en el equipo Gel Doc XR+ system (Bio-Rad).

6.9 Localización de las células de expresión

Con el interés de localizar *in situ* las células de expresión específicas del gen *p33*; se diseñaron sondas marcadas con digoxigenina, partiendo del transcrito caracterizado *p33Nsub* y siguiendo la metodología descrita por López Cuadros (2013) y Sifuentes-Romero *et al.* (2010) para hibridación *in situ* (ISH), detallada en el anexo X. Para este punto se seleccionaron 3 organismos por estadio de ambas ploidías y de ellos se hicieron cortes histológicos, en total se hicieron 10 cortes por cada muestra, aplicando la técnica para la sonda sentido y antisentido a cortes del mismo organismos paralelamente.

6.9.1 Diseño de ribosondas para Hibridación *In Situ* (ISH)

Para el diseño de la sonda a usar, se partió de la secuencia *p33*, se seleccionó una región de 554pb, una vez establecida la región de la cual se sintetizó la sonda, se hizo una PCR en punto final con los cebadores que flanquean la región de interés: sqPCR-F: 5'-ACATGGGAGGCTTTTCTCGG-3' (Tabla III) y *p33*-R3 antisentido: 5'-CAATCGTCATCAGGGTCTTT-3' (Tabla I), utilizando el equipo C1000 Touch™ Thermal Cycler, con y las siguientes concentraciones de reactivos: 1 mM de GoTaq^R Flexi Buffer, 2.5 mM de MgCl₂, 0.2 mM de dNTP's Mix, 0.2 μM de cebadores ISH-F1 y R3, 1U/μL de GoTaq^R Flexi DNA Polymerase (Promega) y 1 μL de cDNA. Las condiciones de amplificación fueron: desnaturalización inicial a 94°C por 3 min seguida de 30 ciclos de 94°C por 30 s (desnaturalización), 60°C por 30 s (alineamiento) y 72°C por 1 min (extensión), con una extensión final a 72°C por 10 min. Con estos productos se hizo una electroforesis en gel de agarosa 1%, con TBE 1X, a 90 volts, por 60 min, y los productos fueron teñidos con GelRed (Life Technologies), usando como referencia de tamaño el marcador Direct Load Wide Range DNA Marker (SIGMA) de 50 a 10000 pares de bases, visualizándolos y documentándolos en un transiluminador UV BioDoc -It Imaging System (UVP BioImaging Systems).

Los productos de amplificación se ligaron al vector pGEM-T Easy Vector (Promega) (protocolo de ligación descrito en el anexo V), y se transformaron bacterias competentes de la cepa JM109 siguiendo el protocolo descrito en el anexo VI, para después extraer el ADNp (anexo VII). Al finalizar la extracción de ADNp se llevó a cabo una PCR punto final con los cebadores universales M13-F y M13-R pUC (Tabla II) y se envió a secuenciar a Macrogen en Corea del Sur para verificar que la sonda a sintetizar fuese del gen de interés y conocer la dirección en que se insertó para el correcto uso de las sondas antisentido y sentido. La síntesis de las sondas marcadas con digoxigenina se realizó utilizando el Kit comercial DIG RNA Labeling SP6/T7 de Roche Applied Science, siguiendo la metodología descrita en el anexo X-B).

Para la hibridación de las ribosondas se utilizaron cortes transversales de la parte central de

la gónada en los diferentes estadios de desarrollo gonádico, los cuales fueron previamente preservados en paraformaldehído al 4% y procesados histológicamente. Como se describe en el anexo X-Cy D, la hibridación para las sondas sentido y antisentido se realizó utilizando 3 μL de la sonda más 67 μL de solución de hibridación; el total de esta mezcla (70 μL) se agregó a cada laminilla cargada con Poly-L-lisina, permitiendo que la hibridación ocurriera durante un periodo de 18 horas a 42°C. Una vez concluido el tiempo de hibridación, se continuó con el protocolo. La detección de hibridación positiva se realizó utilizando el anticuerpo anti-DIG (1 h a temperatura ambiente), seguido del revelado con el sustrato NBT/BCIP (1 h a temperatura ambiente en la oscuridad), y la contra-tinción de los tejidos con café de Bismarck al 0.5%. Finalmente las muestras se deshidrataron con etanol a diferentes concentraciones y se montaron con resina para facilitar su análisis y documentación.

7. RESULTADOS

7.1 Caracterización del transcrito del gen *p33* en almeja mano de león (*Nodipecten subnodosus*)

Para llevar a cabo la caracterización del transcrito *p33Nsub* se utilizó ARN de gónadas de organismos de todos los estadios de desarrollo gametogénico. Aplicando la técnica descrita en la sección 6.5 se extrajo ARN, al finalizar con el protocolo fue necesario comprobar la correcta obtención del ARN y verificar su integridad, por medio de electroforesis, en la Fig. 6 se puede apreciar un ejemplo de las muestras extraídas, y un aproximado de las subunidades ribosomales.

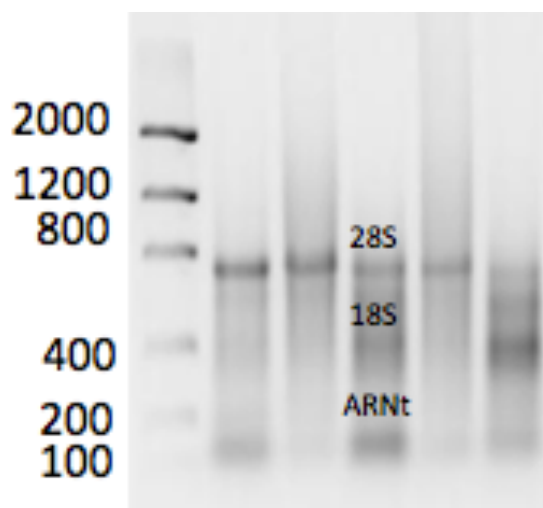


Figura 6. Electroforesis en agarosa-TAE 1% de ARN total de gónada de *Nodipecten subnodosus*. En el primer carril el marcador de peso molecular y concentración, en el resto de los carriles imágenes del ARN extraído, en el carril 3 se desglosan las unidades ribosomales.

Posteriormente de la verificación de la integridad del ARN, este se cuantificó y se procedió con la síntesis de cDNA-RACE, partiendo de 260mg de ARN-polyA y empleando

SMARTer™ RACE cDNA Amplification Kit de Clontech, Una vez finalizada la síntesis de cDNA-RACE, se hizo una PCR punto final usando como referencia de amplificación el gen de β -actina y con los productos de esta amplificación cDNA-RACE 3' y cDNA-RACE 5' se hizo una electroforesis (Fig. 7) carriles 2 y 3, para verificar la adecuada síntesis de cada cadena. Una vez confirmada la correcta síntesis de cDNA-RACE 5 y 3' se hizo una amplificación, en esta ocasión usando los cebadores diseñados para RACE de *p33Nsub* (sección 6.6.1), con los productos de esta electroforesis (Fig. 8) carriles 5' y 3', se hizo una PCR-RACE anidada, carriles 5'N y 3'N de la Fig. 8, estos productos de PCR-RACE anidada se ligaron y clonaron, la ligación del producto de PCR al vector de clonación se comprobó con una PCR de colonia (Fig. 9), en el primer se aprecia el marcador de peso molecular, los siguientes carriles corresponden a las diferentes colonias seleccionadas como presuntamente positivas, es decir con inserto, finalmente en el último carril el control negativo de la reacción.

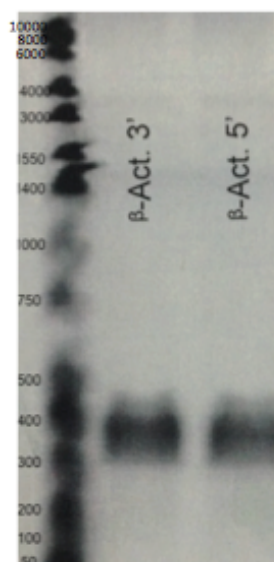


Figura 7. Verificación de cDNA. Electroforesis en agarosa-TBE 1% de cDNA-RACE de gónada de *Nodipecten subnodosus*. En el primer carril el marcador de peso molecular, en carril central la comprobación del cDNA 3' y en el carril de la derecha la comprobación del cDNA 5'.

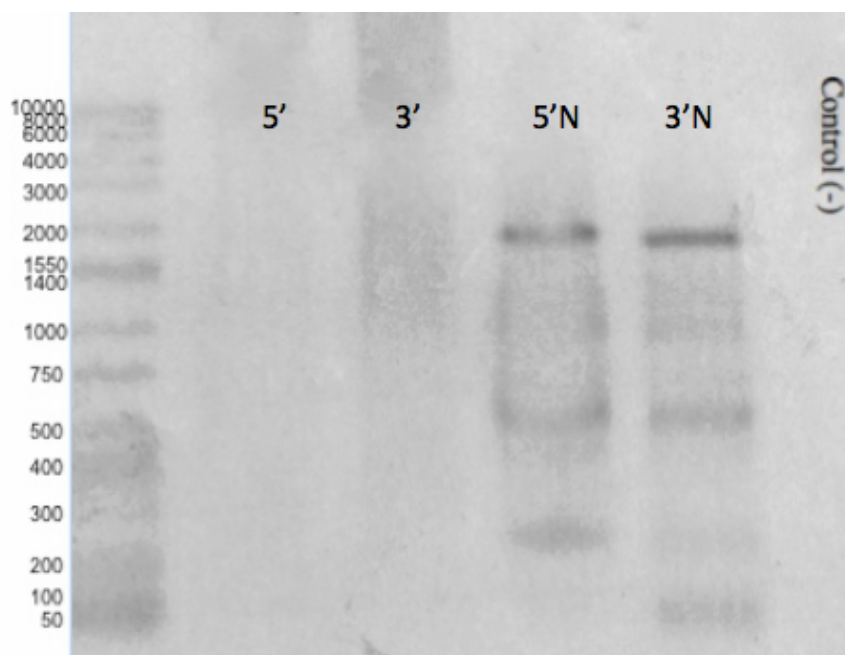


Figura 8. Electroforesis en agarosa-TBE 1% de productos PCR-RACE y PCR-RACE anidada, de gónada de *Nodipecten subnodosus*. En el primer carril el marcador de peso molecular, en los siguientes dos carriles los productos 5' y 3', los siguientes dos carriles marcados con 5'N y 3'N corresponde a los productos PCR-RACE anidada, al final el control negativo de la reacción.

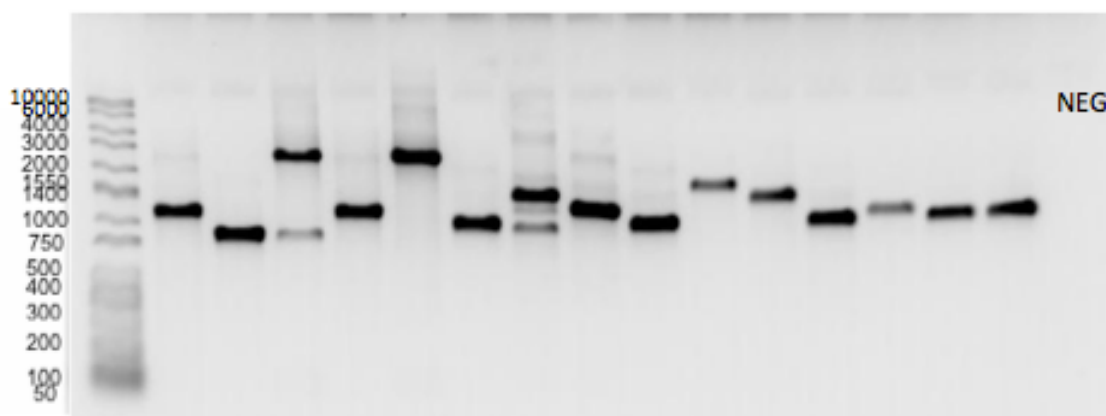


Figura 9. Electroforesis en agarosa-TBE 1% de productos PCR-M13 de ADNp, en el primer carril el marcador de peso molecular, los carriles antes del control negativo corresponden a las amplificaciones de las diferentes colonias, al final el control negativo de la reacción.

Finalmente, la secuenciación de los extremos 5' y 3' por medio de la técnica RACE del transcrito completo del gen *p33Nsub* permitió obtener una secuencia única de 1288 pares de bases (pb) (Fig. 10), con una región no codificante (UTR) en el extremo 5' (UTR-5') de 64 pb y una UTR-3' de 207pb incluyendo el extremo poli-A. La región codificante del marco de lectura abierto (+2) es de 1017 pb y codifica para una proteína de 338 aminoácidos.

El análisis *in silico* de la secuencia *p33Nsub* con la herramienta BLASTp (Basic Local Alignment Search Tool protein) en la base de datos de proteínas no redundantes (http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PROGRAM=blastp&PAGE_TYPE=BlastSearch&LINK_LOC=blasthome). Los resultados muestran que la secuencia obtenida para la proteína p33 de *Nodipecten subnodosus* pertenece a la familia de proteínas RINGO/Speedy, dado que se encontró el dominio de esta familia dentro de la secuencia. Los resultados de blastp-nr indicaron una identidad de 64% con la proteína hipotética Speedy protein 1-B de *Crassostrea gigas* [Genbank EKC24735.1] y de 63% con la proteína parcial e hipotética LOTGIDRAFT_66401 de *Lottia gigantea* [Genbank ESO86814.1], ambas de la familia RINGO/Speedy. Como complemento de la caracterización proteica, se realizó la predicción estructural de la proteína p33Nsub RINGO/Speedy (Fig. 11), y con fines comparativos adicionalmente se modelaron las proteínas ortólogas de *Xenopus tropicalis* [Genbank NP_001106435.1] (Fig. 12) dado que en esta especie fue donde se reportó originalmente esta familia de proteínas, la de *Crassostrea gigas* [Genbank EKC24735.1] (Fig. 13) por ser el pariente evolutivo más cercano a la almeja mano de león, y las 4 isoformas encontradas en el molusco gasterópodo *Aplysia californica* [Genbank XP_005090813.1, XP_005090814.1, XP_005090815.1 y XP_005090816.1] (Figs. 14, 15 y 16 respectivamente). El análisis de comparación estructural por superposición de la proteína p33Nsub de *Nodipecten subnodosus* contra la secuencia proteica Speedy 1-B [NP_001081976.1] de *Xenopus leavis* (Fig. 14A) con un score de 193.79 y un valor de significancia P-value de 2.28e-01 no son significativamente similares, y la comparación estructural entre p33Nsub y Speedy protein 1-B [EKC24735.1] de *Crassostrea gigas* (Fig. 14 B) resultó de igual manera en proteínas significativamente no similares con un score de

193.7 y un valor de significancia P-value de $2.28e-01$. La comparación con las cuatro isoformas encontradas en *Aplysia californica* de igual manera resultó en proteínas significativamente diferentes con un score de 216.37 y un valor de significancia P-value de $1.39e-01$ para la isoforma X1, para X2 el score fue de 212.11 y el valor de significancia P-value de $1.41e-01$, para X3 el score fue de 212.72 y el valor de significancia P-value de $3.38e-01$, por último para la isoforma X4 el score fue de 192.69 y el valor de significancia P-value de $1.92e-01$, todas estructuralmente diferentes a p33Nsub a un valor de significancia del 95% (Fig. 19 A, B, C y D respectivamente).

El análisis de las propiedades de la proteína p33Nsub inferidas por su secuencia, nos dice que es una proteína inestable con una carga neutra o punto isoeléctrico teórico a un pH de 9.66, que tiene un peso molecular de 41.8 kDa y una vida media en el citoplasma celular de aproximadamente 30 horas.

```

-----|-----|-----|-----|-----|-----|
1  TGGAAGTTCGATTAAGCAGTGGTATCAACGCAGAGTACATGGGAGGCTTTCTCGGGAAC 60
-----|-----|-----|-----|-----|-----|
61  AGGGatgaaatgttctacaacaggcctatgccaatatcggaagtaaacaggtcaacgca 120
1   M K C S T N R P M P I S E V N Q S T Q 19
-----|-----|-----|-----|-----|-----|
121 acagtgtttcgttgcacaaagggaatgactgccttttttaacttatgaatgatga 180
20  Q C F V V K E R E M T A F F K L M N D E 39
-----|-----|-----|-----|-----|-----|
181 gcatctgcaagatttctttacatggacaagtgtaaaagaatttctgacaagtatctgat 240
40  H L Q D F L Y M D K C K R I S D K Y L I 59
-----|-----|-----|-----|-----|-----|
241 tgccatgggtgtttgccttttttaaagagcacaattaaagattagagagtacaccaagat 300
60  A M V F A F F K R A Q L K I R E Y T K M 79
-----|-----|-----|-----|-----|-----|
301 gaacttcttcattggtttatatttggcaaatgacatggaagaagatgacgaagggtctaa 360
80  N F F I G L Y L A N D M E E D D E E A K 99
-----|-----|-----|-----|-----|-----|
361 atatgaaattttccatgggctcttgggtcacaatggagagacagatttccagatttct 420
100 Y E I F P W A L G H K W R D R F P R F L 119
-----|-----|-----|-----|-----|-----|
421 tcgaagaagagacttgttctgggctaagatcggttacaaagctgttctgagcaacgga 480
120 R R R D L F W A K I G Y K A V V S K R C 139
-----|-----|-----|-----|-----|-----|
481 ctgtgaagagataatggaatagacaaggaatctctattatggatgaggaatcgccact 540
140 C E E I M E I D K E S L L W M R N R P L 159
-----|-----|-----|-----|-----|-----|
541 tcatcatggtggagcggtaaggagttaacaataaagaccctgatgacgatggaatcactag 600
160 H H G G A V R S Y N K D F D D D G I T S 179
-----|-----|-----|-----|-----|-----|
601 tgaatccaagaatctgaagcgtcatcaagggtccttttcagactgcaacaagctaacaat 660
180 E S K N L K R H Q G P F Q T A T K L T M 199
-----|-----|-----|-----|-----|-----|
661 ggcaatcaactcaccaggtatgttctatgcgactatcaaatctaccttccaaaaaac 720
200 A I N S P G M F Y A T I K F Y L S K N T 219
-----|-----|-----|-----|-----|-----|
721 tatacaaaattgtgaaaataaaatcttttctcagaaatgccccatgtactctgcgtg 780
220 I Q N C E N K I F F F R N A P C T L R G 239
-----|-----|-----|-----|-----|-----|
781 ataccactgcttatatcatatggtataccggaatgtatacagaggtattttaaaccggtta 840
240 Y H C L Y H M L Y R E C I Q R Y L N R Y 259
-----|-----|-----|-----|-----|-----|
841 tattctttatcgtatggtataccggaacctatacagagatattttaaaccggttatattct 900
260 I L Y R M L Y R E P I Q R Y L N R Y I L 279
-----|-----|-----|-----|-----|-----|
901 atatcgtatggtataccggaacctatacagagatattttaaaccggttatattctatata 960
280 Y R M L Y R E P I Q R Y L N R Y I L Y S 299
-----|-----|-----|-----|-----|-----|
961 tatggtataaccggaacctatacagagatatttcaaactggttatattttatcgtatctt 1020
300 M L Y R G R I H R Y S N R Y I L Y R I F 319
-----|-----|-----|-----|-----|-----|
1021 ttaccggaatataatagagagataacttaaacggtttcctcatccgcattccatttaattg 1080
320 Y R E Y I E R Y L N R F L I R I P F N * 338
-----|-----|-----|-----|-----|-----|
1081 aCGTAAATAATCCAAGTTAAAAATTTAGATAATAATGGACATTATAAATACACTAGTGC 1140
-----|-----|-----|-----|-----|-----|
1141 CAATAATGCAGTTGAAACGGGAACCTTTATCTAACTCGGTATGTTCAAATTTGTATGTA 1200
-----|-----|-----|-----|-----|-----|
1201 GTGAGAGGCCGAAATTATGCAATTTGTAACCTTCTGTTTATGAGCTGATGATATATATA 1260
-----|-----|-----|-----|-----|-----|
1261 TTCACCCCTAAAAAATAAAAAAAAAAAAAAAAAA 1288

```

Figura 10. Transcrito del gen *p33Nsub* obtenido por RACE y su traducción conceptual a proteína. El ORF se denota en minúsculas, la proteína codificada se indica en mayúsculas y con el color rojo-sepia se señala el dominio SPY conservado en la proteína. Las regiones 5'UTR y la 3'UTR se indican en mayúsculas. Los cebadores usados en RACE, ISH y PCR semicuantitativo se señalan subrayados (ver Tabla I y III).



Figura 11. Predicción estructural p33Nsub *Nodipecten subnodosus*.



Figura 12. Predicción estructural Speedy/RINGO protein *Xenopus tropicalis*.

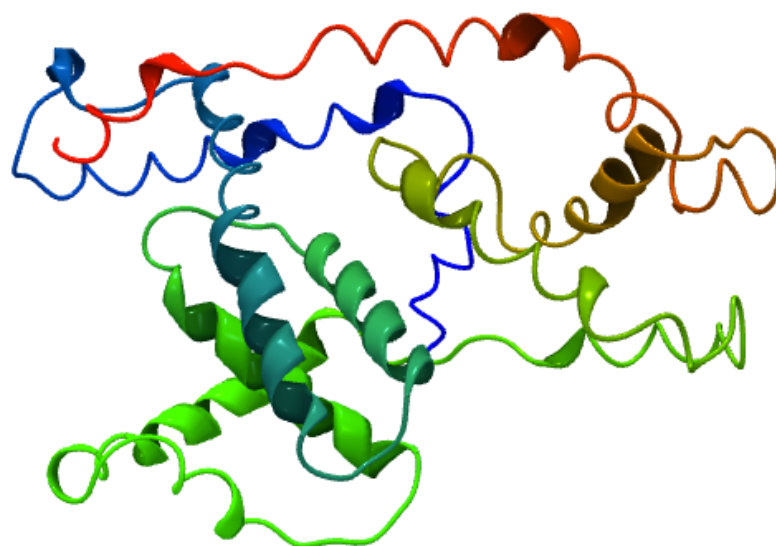


Figura 13. Predicción estructural Speedy 1-B *Crassostrea gigas*.

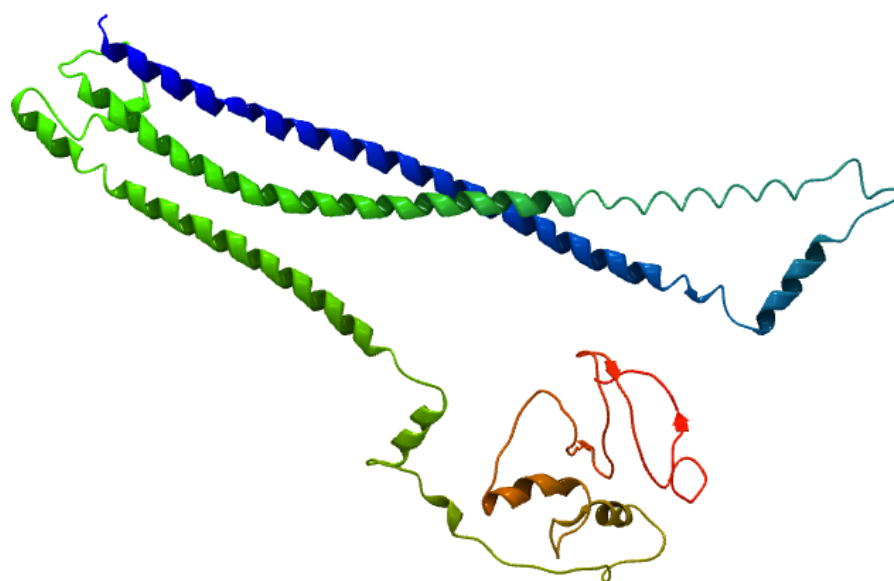


Figura 14. Predicción estructural X1 *Aplysia californica*.

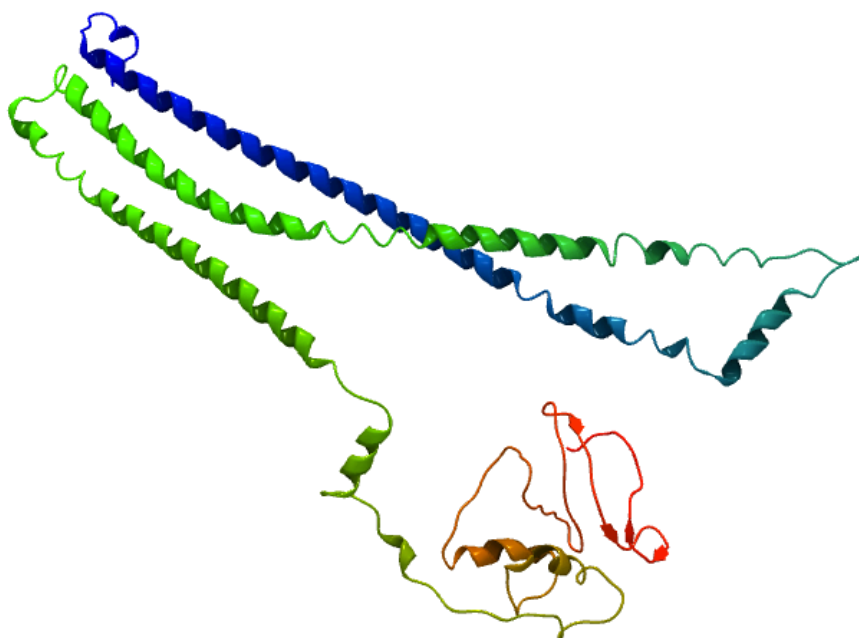


Figura 15. Predicción estructural X2 *Aplysia californica*.

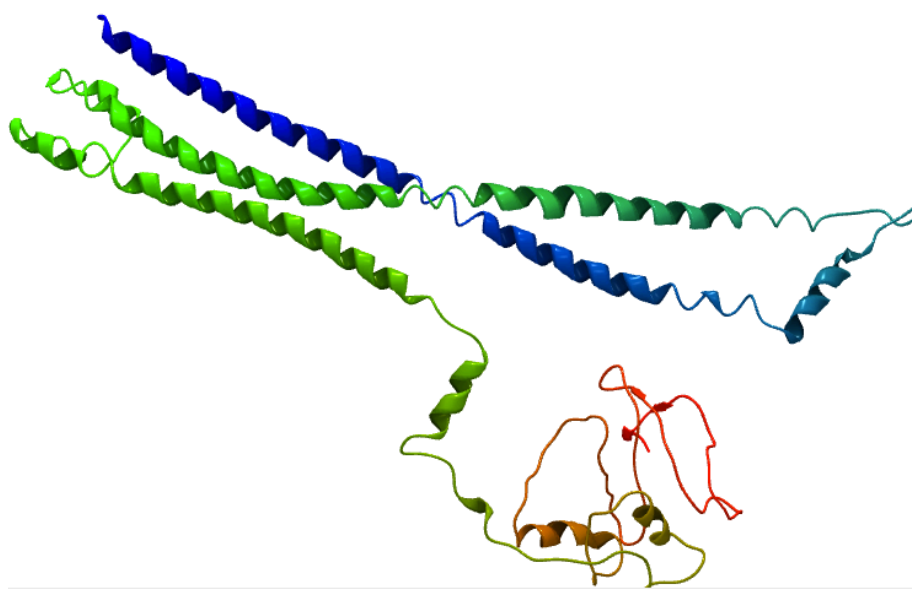


Figura 16. Predicción estructural X3 *Aplysia californica*.

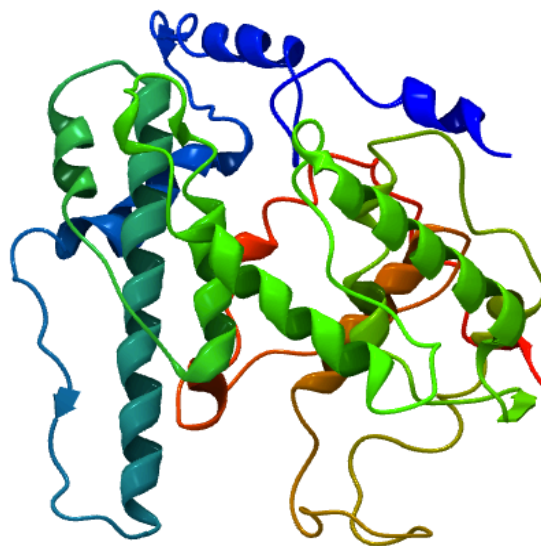


Figura 17. Predicción estructural X4 *Aplysia californica*.

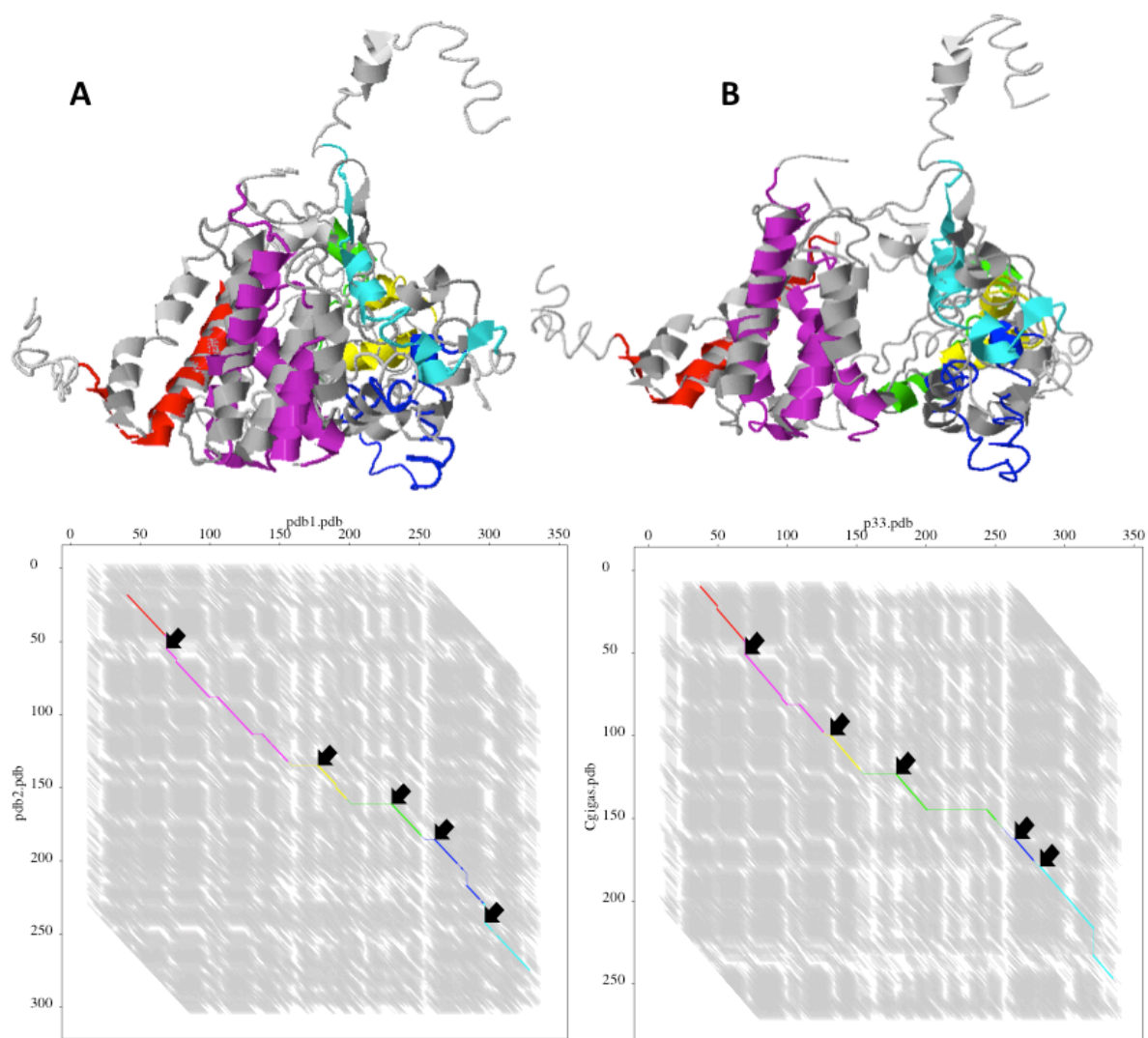


Figura 18. Alineamientos estructurales, en A) El modelo proteico de p33Nsub contra Speedy 1-B de *Xenopus leavis*, en B) la comparación estructural entre p33Nsub y Speedy protein 1-B de *Crassostrea gigas*.

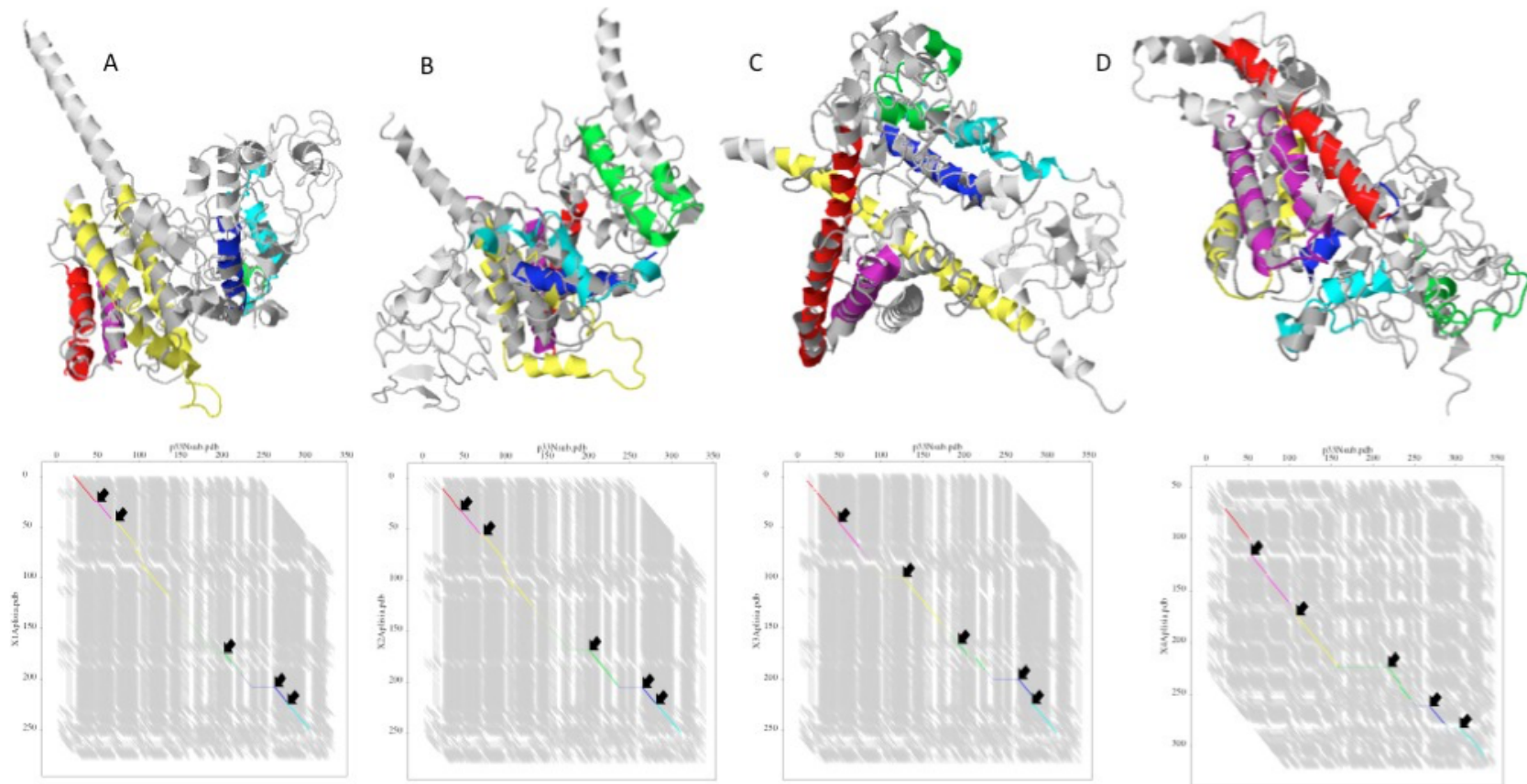


Figura 19. Alineamientos estructurales de p33Nsub contra las 4 isoformas de PREDICTED: speedy protein A-like en *Aplysia californica*; en A) El modelo proteico de p33Nsub contra X1, en B) la comparación estructural entre p33Nsub y X2, en C) el modelo proteico de p33Nsub contra X3 y en D) la comparación estructural entre p33Nsub y X4 (entendiéndose que X1, X2, X3 y X4, corresponden cada una a una de las 4 isoformas de la proteína Speedy encontradas en *Aplysia californica*).

7.2 Descripción de las relaciones filogenéticas de p33 en invertebrados.

Tomando como referencia un alineamiento múltiple de las secuencias proteicas ortólogas a la proteína p33^Nsub RINGO/Speedy en otras especies de vertebrados e invertebrados y en el cual también se incluye la secuencia de *Nodipecten subnodosus* (Fig. 20 y anexo XI), se generó un árbol filogenético (Fig. 21) usando una región conservada en todas las secuencias proteicas (Tabla IV). En el árbol se puede ver que la proteína de mano de león se agrupó junto con las proteínas inferidas de los gasterópodos *Lottia gigantea* (LOTGIDRAFT_66401) y *Aplysia californica* (Speedy protein A-like isoform X1 y X4), y con las proteínas del bivalvo *Crassostrea gigas* (Speedy protein 1-B), todas pertenecientes a los moluscos, y si se observa con mayor atención, se ve que la proteína de *Nodipecten subnodosus* y la de *Crassostrea gigas*, ambos organismos pertenecientes a la clase bivalva, están colocadas en el mismo subclado.

Este clado de los moluscos se agrupó a su vez en el conjunto de proteínas Speedy tipo A tanto de equinodermos (*Strongylocentrotus purpuratus*), hemicordados (*Saccoglossus kowalevskii*), cordados amphioxiformes (*Branchiostoma floridae*), como cordados vertebrados.

	K-motif	L-motif
Rat_SpeedyB3	VDRIEGTKLIMNKKRRPSYRPEDLEAFYRLEDPVQNF	LAADIFFRVTDKYL
Mouse_SpeedyB3 (D)	VNRIEGBMKLILNKKRRASYPEDLEAFYRLEDPVQNF	LAADIFFRVTDKYL
Mouse_SpeedyB1b	VETPCGLRMTLQRQCVSTVRPEHHKVFTRKLEDPVVK	FLTWDKMLRVSDKYL
Rat_SpeedyB1	VETLCGLRMLKRRRVSTVRPEHHKVFTRKLEDPVVK	FLTWDKMLRVSDKYL
Mouse_SpeedyB1a	VEMLCGLRMLKRRRVSTVRPEHHKVFTRKLEDPVVK	FLTWDKMLRVSDKYL
Chimp_SpeedyB1	VEMLCGLKMKLKRKRASSVLP	PEHHEAFNRLGDPVVK
Human_SpeedyB1	VETLCGLKMKLKRKRASSVLP	PEHHEAFNRLGDPVVK
Human_SpeedyB2-like1	AEMLCGLKMKLKRKRASSVLP	PEHHEAFNRLGDPVVK
Human_SpeedyB2-like2	AEMLCGLKMKLKRKRASSVLP	PEHHEAFNRLGDPVVK
Chimp_SpeedyB2	AETLCGLKMKAKRRRVSLVLP	PEYYEAFNRLGDPVVK
Human_SpeedyB2	AETLCGLKMKAKRRRVSLVLP	PEYYEAFNRLGDPVVK
Eshark_SpeedyB	-----PLDGFPA	PDP
Chimp_SpeedyB4 (C)	-----SRQGGG	GFLRFRQHQEVQAF
Human_SpeedyB4 (C)	-----SRQGGG	GFLRFRQHQEVQAF
Ciona_Speedy	-----EKLKNVTK	PCLHITINEIDAFF
Eshark_SpeedyA	-----SKPKHARG	PCLIIQRQEMAAFF
Chicken_SpeedyA	-----GTYGH	PAASCLVVRQEMTAFF
Human_SpeedyA	-----NKS	KRPGPCLVIQRQDMTAFF
Chimp_SpeedyA	-----NKS	KRPGPCLVIQRQDMTAFF
Human_SpeedyAL	-----NKS	KRPGPCLVIQRQDMTAFF
Rat_SpeedyA	-----NKS	KRPGPCLIIQRQEMTAFF
Mouse_SpeedyA	-----NKS	KRPGPCLIIQRQEMTAFF
Mouse_SpeedyAL	-----NKS	KRPGPCLIIQRQEMTAFF
Stickleback_SpeedyA	-----FRAQ	TMPPTIIVIQRQEMSS
speedy_protein_A-like_Strongyloc	-----SCFR	RKQPKMIVTSEEITAFF
speedy_protein_Branchiostoma_flo	-----PLAK	MKKPSLIVKTT
Zebrafish_SpeedyA	-----QPRT	KTPGPTLLIQRQEMAAFF
Tetraodon_SpeedyA	---ICCA	KRSKSVARTFAIDSQEMAF
Nsubp33_Ringo/Speedy_Nodipecten	-----SEVN	QSTQCFCVVKEREMTAFF
Xenopus_SpeedyA	-----VKP	KMVRNTHLNLQPQERQAF
Xenopus_SpeedyB	-----AKP	KITRITHLNLQPQERQAF
speedy_protein_A-like_Saccogloss	RMSPLFSP	PKRAKNSTVTVKSKEMA
speedy_protein_A-like_isoform_X1	PQKSV-SEQAS	NNNSRFIVKLEKEL
speedy_protein_A-like_isoform_X4	PQKSV-SEQAS	NNNSRFIVKLEKEL
Speedy_protein_l-B_Crassostrea_g	-----SEHV	VSTRHHFAVKRTE
LOTGIDRAFT_66401	-----VKP	KEMKAFGLLAD

Figura 20. Alineamiento múltiple de la región conservada usada para la construcción del árbol filogenético con los homólogos y ortólogos de p33Nsub en vertebrados e invertebrados.

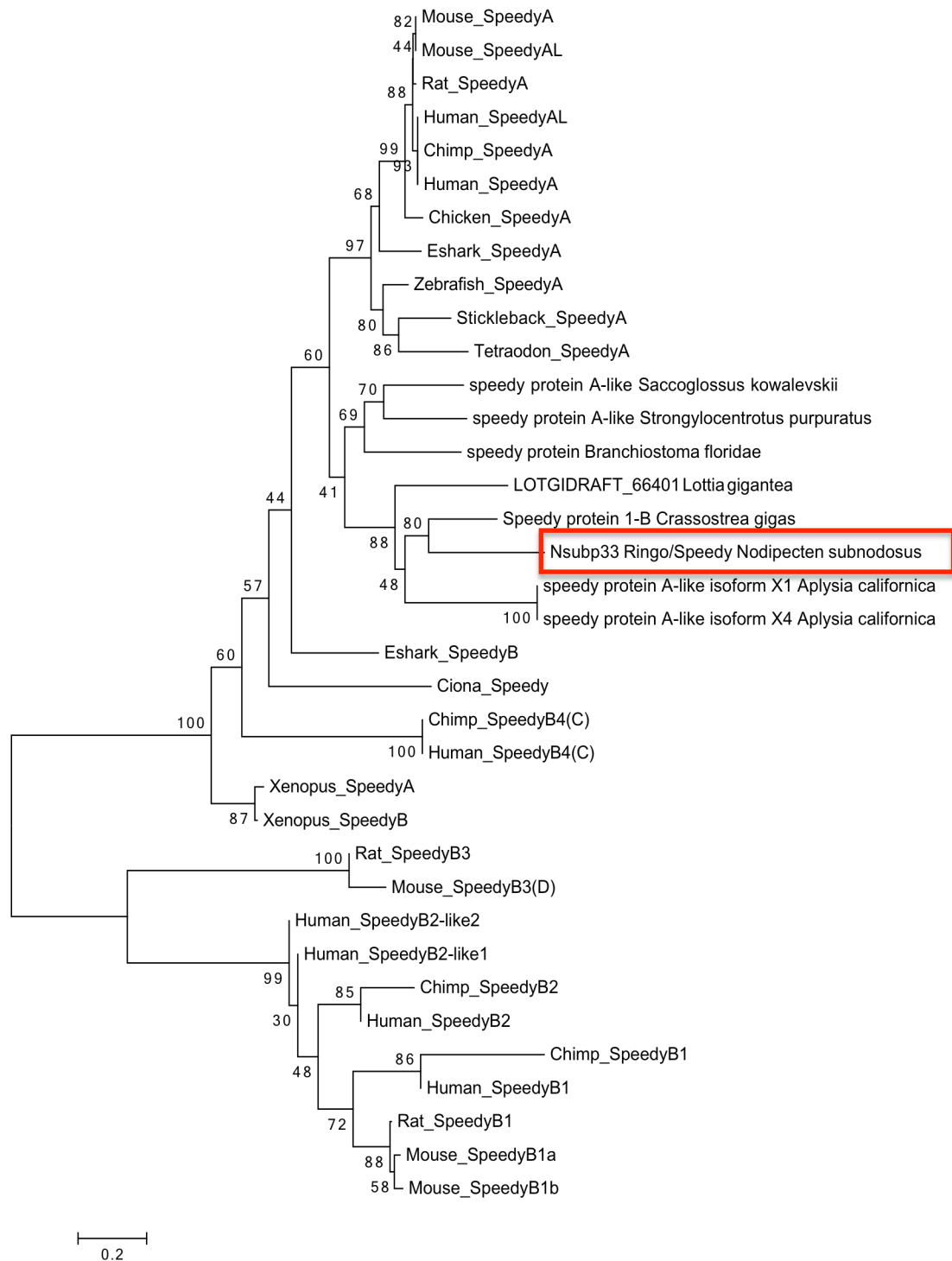


Figura 21. Árbol filogenético de los homólogos y ortólogos de p33Nsub en vertebrados e invertebrados.

7.3 Evaluar la expresión diferencial del gen *p33Nsub* de almeja mano de león diploide y triploide durante la gametogénesis

La obtención de material genético para el análisis de expresión diferencial y evaluación de la ubicuidad de la expresión del gen *p33Nsub*, fue la primer tarea realizada para retar este objetivo, en la figura 22 se aprecian algunos ejemplos de las extracción de ARN realizadas: en primer carril se muestra el marcador de peso molecular y concentración, en el segundo carril un desglose de las unidades ribosomales y en el resto de los carriles más ejemplos de extracciones tanto de tejidos somáticos (músculo, manto, glándula digestiva, branquia y pie) como gónada. El ARN purificado con LiCl 8M (Fig. 22) fue posteriormente tratado con DNAsa para eliminar todo el ADN de origen genómico que pudiese interferir en los análisis de expresión diferencial (Fig. 23) dando lugar a falsos positivos: en el primer carril de la figura 23 se muestra el marcador de peso molecular en los siguientes los productos de PCR-RNA, las muestras enmarcadas son aquellas en las que el tratamiento con DNAsa no eliminó todo el ADN presente, en estos casos se repitió el tratamiento hasta la completa eliminación del ADN. Con las muestras libres de ADN comprobado por PCR, se hizo la síntesis de cDNA, una vez culminado el protocolo de síntesis de cDNA o retrotranscripción se hizo una PCR de punto final para comprobar la adecuada obtención del mismo (Fig. 24): en el primer carril se muestra el marcador de peso molecular, al centro las amplificaciones que comprueban la obtención del cDNA y en el último carril el control negativo de la reacción.

Una vez que se obtuvo el cDNA de todos los tejidos a evaluar, se estimó el número de ciclos de amplificación por PCR a utilizar como patrón para el análisis de semicuantificación (Fig. 25): en el primer carril se muestra el marcador de peso molecular y concentración, en el segundo carril el producto obtenido con 20 ciclos de amplificación, en el tercer carril el producto obtenido con 23 ciclos de amplificación, en el cuarto carril el producto obtenido con 25 ciclos de amplificación, en el quinto carril el producto obtenido con 28 ciclos de amplificación, en el sexto carril el producto obtenido con 30 ciclos de

amplificación, en el séptimo carril el control positivo de amplificación de la reacción también con 30 ciclos, y en el último el control negativo de la reacción a 30 ciclos usando como referencia al gen de la β -actina para los controles de amplificación negativo y positivo. En este caso y como se muestra en la figura 25 se usaron 28 ciclos como patrón de ciclos de amplificación para todo el análisis de semicuantificación de la expresión.

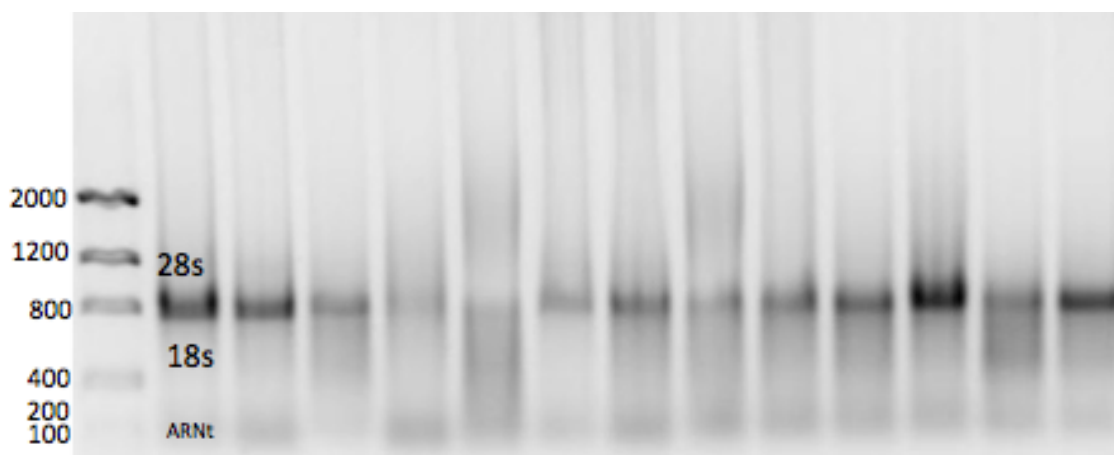


Figura 22. Electroforesis en agarosa-TAE 1% de ARN de diferentes tejidos de *Nodipecten subnodosus* purificado con LiCl8M, en el primer carril el marcador de peso molecular y concentración, en el resto de los carriles imágenes del ARN purificado, en el carril 2 se desglosan las unidades ribosomales.

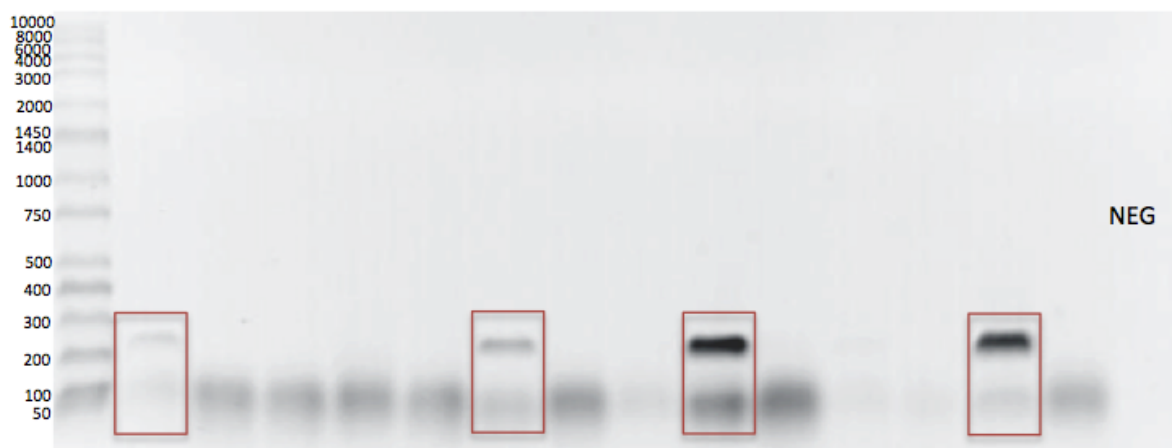


Figura 23. Electroforesis en agarosa-TBE 1% de productos PCR con RNA de los diferentes tejidos de *Nodipecten subnodosus* tratado con DNAsa. En el primer carril el marcador de peso molecular, en los siguientes dos carriles los productos (los carriles marcados con rojo denotan aquellas muestras con resultado negativo al tratamiento), al final el control negativo de la reacción.

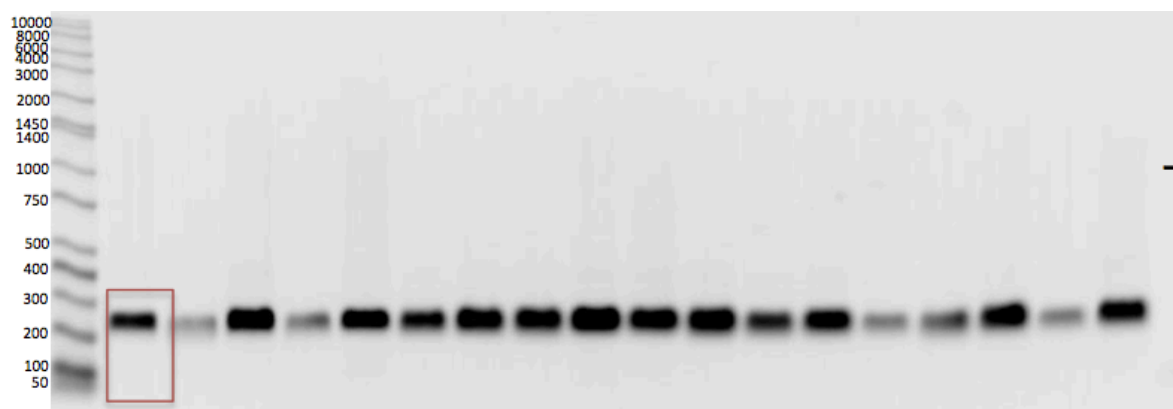


Figura 24. Electroforesis en agarosa-TBE 1% de productos PCR con cDNA de los diferentes tejidos de *Nodipecten subnodosus*. En el primer carril el marcador de peso molecular, en los siguientes carriles los productos de PCR con el gen β -actina, al final el control negativo de la reacción.

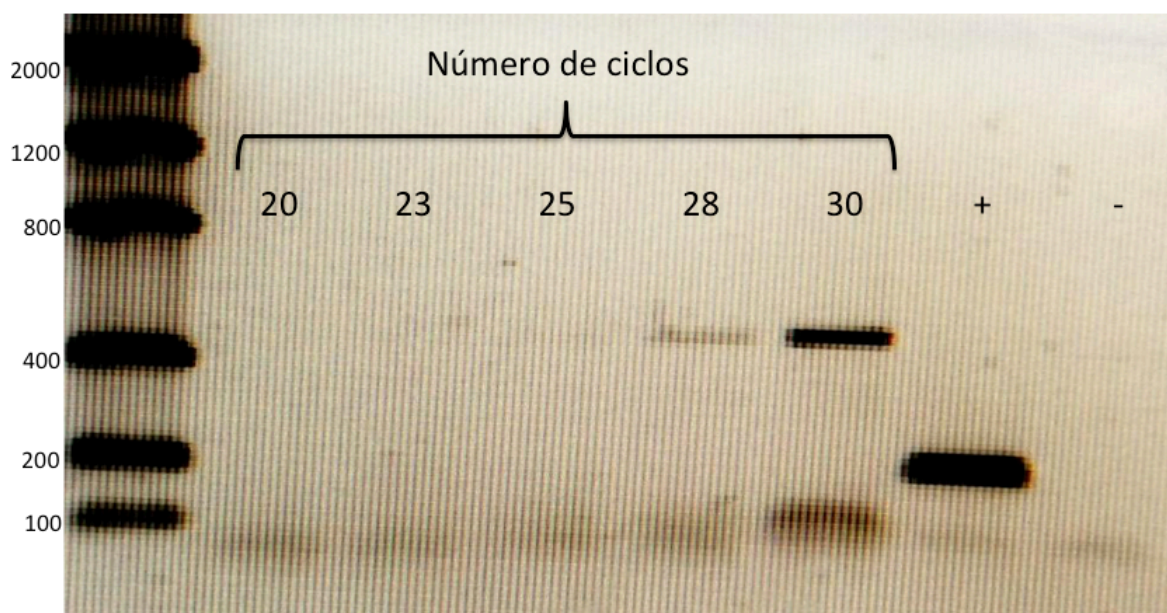


Figura 25. Electroforesis para evaluar el número de ciclos para el análisis de semicuantificación, en el primer carril el marcador de peso y concentración Low DNAMass Ladder (Invitrogen), al centro marcados con los números 20, 23, 25, 28, 30 son el número de ciclos de amplificación y finalmente los controles positivo y negativo de la reacción para los que se usó el gen de la β -actina.

El análisis de expresión diferencial del gen *p33Nsub* se realizó con la técnica de PCR-semicuantitativo. En esta técnica en primera instancia se debe buscar un gen de referencia con el cual comparar los datos obtenidos con el gen blanco (*p33Nsub*). La búsqueda bibliográfica de trabajos publicados con mano de león en donde se hayan buscado genes de referencia y además se hayan evaluado condiciones de gametogénesis, llevó a un trabajo realizado por Llera-Herrera *et al.* (2012) en el cual además de otros genes se evaluó *factor de elongación (Ef)* con resultados satisfactorios. Basado en lo anterior se probó (*Ef*) para nuestras condiciones y con nuestros organismos la amplificación de este gen en todos los estadios gametogénicos de estudio en diploides: gametogénesis inactiva-inicial, gametogénesis avanzada femenina y masculina, y desove de la región femenina y masculina respectivamente, y en los tres grupos de estudio en triploides a la misma edad que los diploides en cada uno de esos estadios gametogénicos. Además este gen de referencia se evaluó en los tejidos de manto, músculo, glándula digestiva, branquia y pie

para el análisis de ubicuidad de la expresión para los organismos diploides y triploides. Con los resultados preliminares de estas amplificaciones se decidió usar a *Ef* como gen de referencia.

En la figura 26 se muestran los resultados de las amplificaciones obtenidas para la semicuantificación de la expresión del gen *p33Nsub* en organismos diploides en 26A están organismos en gametogénesis inactiva-inicial en la cual se observó expresión de *p33Nsub*, lo que nos dice que este gen se expresa en las primeras etapas de la gametogénesis; lo anterior contrasta con 26B y 26C, donde están los organismos en gametogénesis avanzada femenina (26B) y masculina (26C), y en los cuales no se observó expresión del gen *p33Nsub*. En la misma figura 26, pero en 26D y 26E se muestran los resultados de la expresión observada para los organismos en estadio de desove: en la región femenina (26D) no se observa expresión, mientras que en la región masculina (26E) sí se observó expresión del gen *p33Nsub*. Las amplificaciones o la expresión del gen de referencia (*EFv*) para los mismos estadios gametogénicos en diploides se muestran al lado derecho del marcador de peso molecular y concentración.

Como los organismos triploides no maduran sus gónadas no es posible usar la misma clasificación que con los diploides, por lo que se usó la edad o el tiempo como referencia para conformar los grupos de triploides y estimar la expresión de *p33* (Fig. 26): el primer grupo, 26F, corresponde a la expresión de *p33* en organismos muestreados de febrero a abril (cuando los diploides estaban inactivos o iniciando la gametogénesis); el segundo grupo, 26G, a la expresión de *p33* para triploides muestreados los meses de mayo y junio (cuando los diploides estaban en gametogénesis avanzada); y por último el tercer grupo, 3H, muestra la expresión de *p33* en triploides muestreados en los meses de julio y agosto (cuando los diploides estaban en estadio de desove).

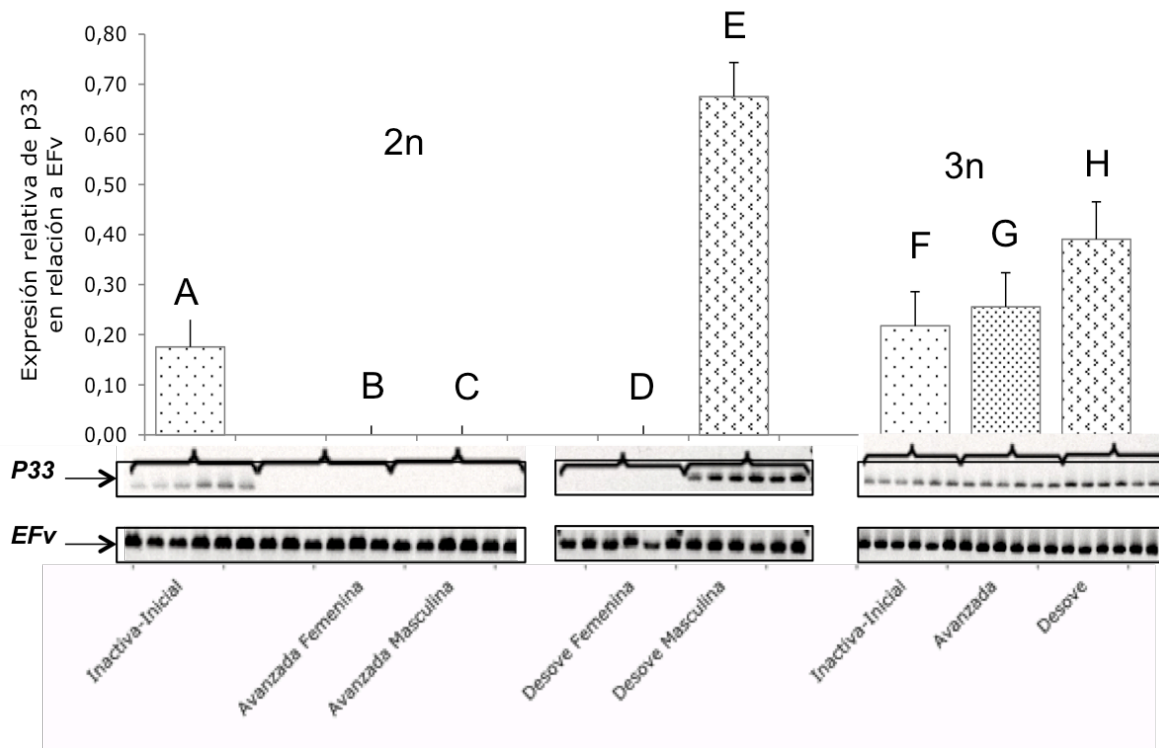


Figura 26. Electroforesis de productos PCR-semicuantitativo de gónadas, A, B, C, D y E son organismos diploides, mientras que F, G y H son organismos triploides. En A se muestra la amplificación de *p33* para diploides en gametogénesis inactiva-inicial, B) gametogénesis avanzada región femenina, C) gametogénesis avanzada región masculina, G) desove región femenina y H) desove región masculina; la amplificación del gen de referencia (*EFv*) para da uno de estos casos se muestra debajo de la amplificación del gen blanco (*p33*). En F se muestra la amplificación de *p33* para triploides en: K) triploides de la misma edad que los diploides del grupo A en gametogénesis inicial, G) triploides de la misma edad que los diploides del grupo B y C en gametogénesis avanzada, H) triploides de la misma edad que los diploides del grupo D y E en desove; las amplificaciones de gen de referencia (*EFv*) debajo de la amplificación de gen blanco (*p33*). Expresión relativa del gen *p33Nsub* en relación al gen control *EFv*, para organismos diploides (2N's) en los estadios de gametogénesis inactiva-inicial, avanzada y desove, y expresión relativa del mismo gen *p33Nsub* para triploides (3N's) en la misma edad que los diploides para los estadios gametogénicos observados en diploides. La barra de dispersión representa el intervalo de confianza al 95% y diferentes letras indican diferencias significativas entre estadios y/o ploidías resultantes del análisis comparativo de las medias utilizando un análisis post-hoc de Fisher.

En la Tabla IV se muestran los resultados del análisis de varianza utilizado para estimar el efecto del estadio gametogénico y de la ploidía sobre la expresión de *p33*. Tanto la ploidía

como el estadio gametogénico (o misma edad que diploides en caso de los triploides) anidado dentro de ploidías fueron significativos ($P < 0.05$).

Tabla IV. Resultados del análisis de varianza para estimar el efecto de la ploidía sobre la expresión relativa de *p33* con el modelo anidado.

	Grados de libertad	Cuadrados Medios	F	Valor de p
Ploidía	1	0.0499	7.27	0.0103
Estadio ⁽¹⁾ (Ploidía)	6	0.3447	50.17	0.0000
Error	39	0.0069		
Total	46			

⁽¹⁾ O, para el caso de los triploides, la misma edad que los diploides en esos estadios gametogénicos

El análisis para establecer qué medias difieren significativamente de otras medias en expresión relativa entre ploidías y dentro de ploidías se presenta en la Fig. 26, donde se muestran los resultados de los valores de expresión relativa de *p33Nsub* tanto para diploides (2N's) como triploides (3N's). En el caso de los diploides-2N's el gen *p33* se encontró expresado durante la gametogénesis inactiva o inicial así como en la gónada masculina en desove, aunque la expresión en este último estadio fue significativamente mayor que la observada en la gónada inactiva o inicial. Por otro lado, no hubo expresión de *p33* en la parte femenina de la gónada en desove, así como tampoco se observó expresión de *p33* en gametogénesis avanzada tanto de la parte femenina como masculina. En el caso de los organismos triploides-3N's la expresión de *p33* a la misma edad que cuando los diploides estaban en gametogénesis inactiva-inicial fue similar a los diploides, y aunque ligeramente mayor que en los diploides, no mostró diferencias significativas con los diploides en gametogénesis inactiva-inicial. Por otro lado, los triploides continuaron expresando *p33* a la misma edad que los diploides en gametogénesis avanzada no mostraron expresión de *p33*, y aun continuaron con mayor expresión a la edad en que los diploides estaban en desove, aunque la expresión fue significativamente menor que la observada para la parte masculina de la gónada de diploides en desove.

El análisis de expresión de *p33Nsub* en otros tejidos u órganos que la gónada de *N. subnodosus* se realizó utilizando los mismos pares de cebadores que para la cuantificación (Tabla III). Los productos esperados de la amplificación para el gen blanco son de 442 pares de bases, y para el gen de referencia de 401 pares, sin embargo, como se puede apreciar en las figuras 27 y 28, no se observó expresión de *p33* en tejidos somáticos (manto, músculo, glándula digestiva, pie y branquia) tanto en organismos diploides como triploides.

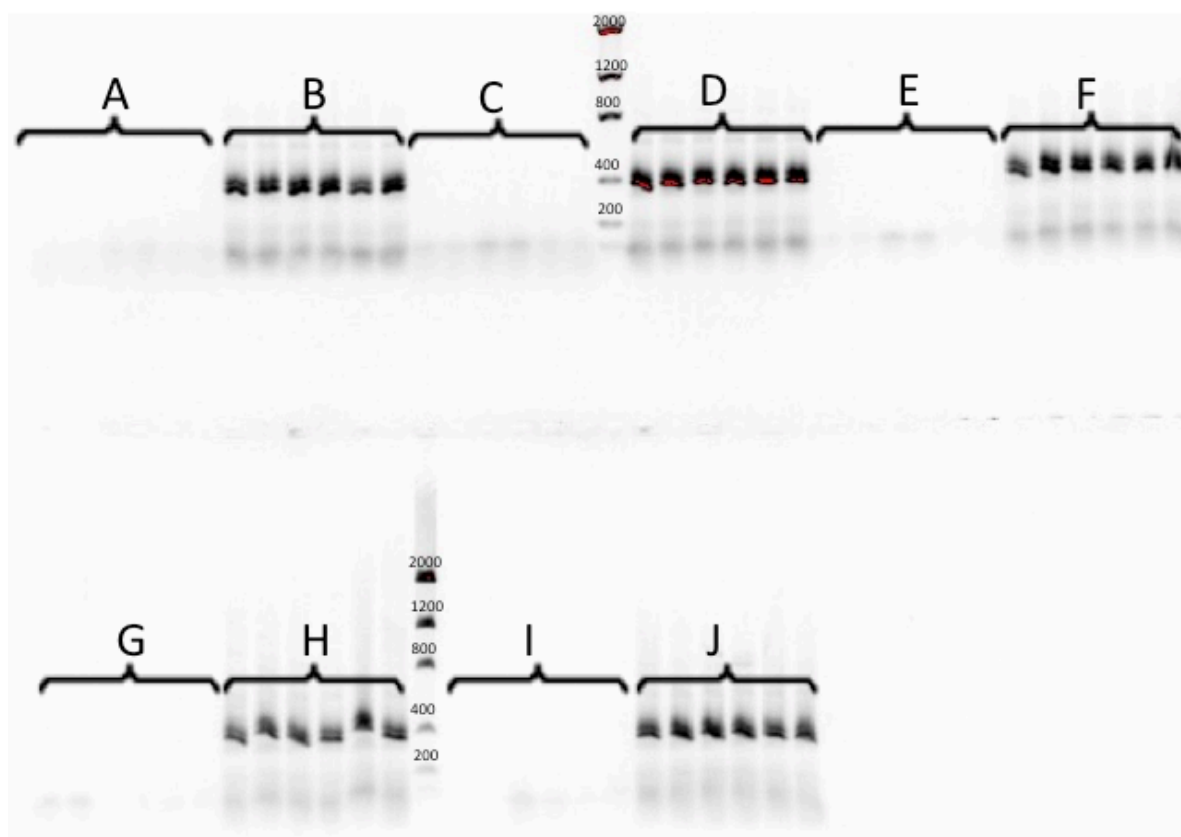


Figura 27. Electroforesis de productos PCR-Ubicuidad de la expresión del gen *p33Nsub* en diploides y el gen control EFv: A) *p33* manto, B) control positivo EFv manto, C) *p33* músculo, D) control positivo EFv músculo, E) *p33* glándula digestiva, F) control positivo EFv glándula digestiva, G) *p33* branquia, H) control positivo EFv branquia, I) *p33* pie, J) control positivo EFv pie. Al centro de las dos filas de carriles el marcador de concentración y peso molecular.

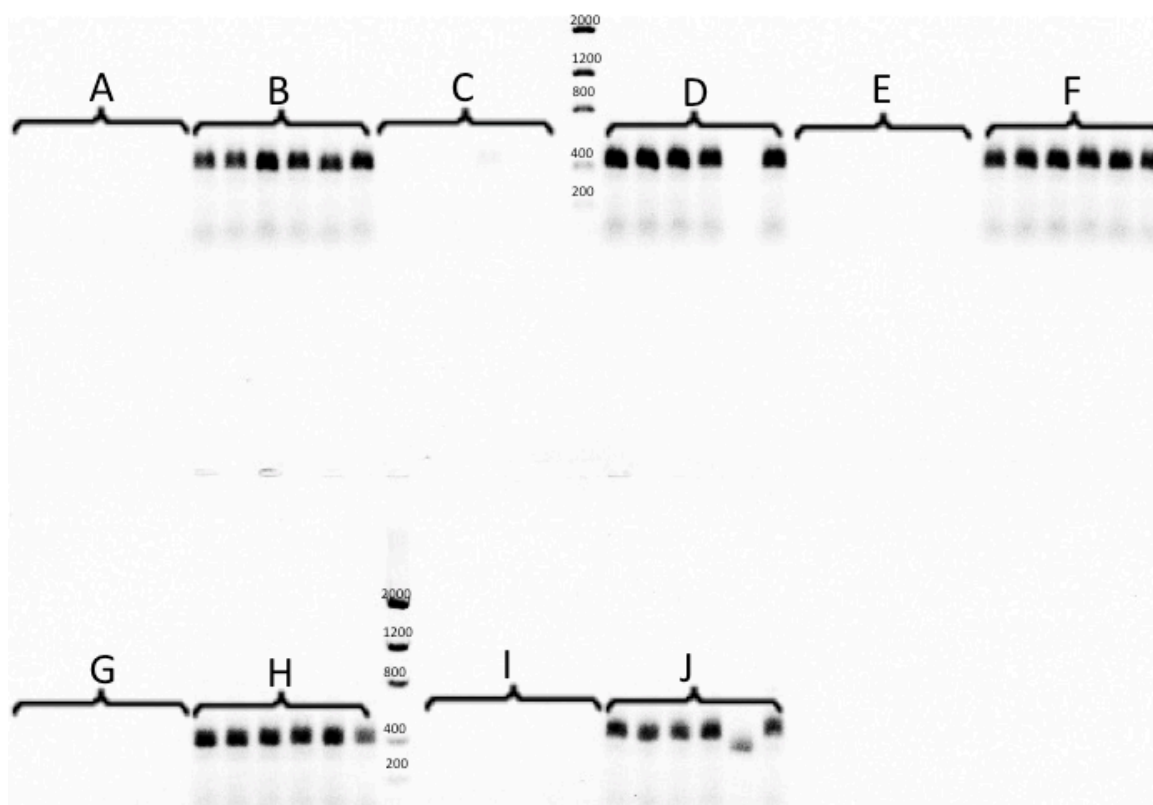


Figura 28. Electroforesis de productos PCR-Ubicuidad de la expresión de *p33Nsub* en triploides y el gen control EFv: A) *p33* manto, B) control positivo EFv manto, C) *p33* músculo, D) control positivo EFv músculo, E) *p33* glándula digestiva, F) control positivo EFv glándula digestiva, G) *p33* branquia, H) control positivo EFv branquia, I) *p33* pie, J) control positivo EFv pie. Al centro de las dos filas de carriles el marcador de concentración y peso molecular.

7.4 Localización de las células de expresión

Los resultados de la hibridación *in situ* con la sonda antisentido *p33Nsub* en cortes transversales de gónada de mano de león *Nodipecten subnodosus* diploides y triploides se presentan en las figuras 29 y 30 respectivamente. Se localizó al transcrito de este gen en gónadas de organismos diploides durante el desarrollo gametogénico temprano además de la parte masculina de la gónada desovada.

En la figura 29A perteneciente al grupo de los diploides, se observa una señal fuerte y clara

de la sonda antisentido en las gonias de los acinos en estadios inactivos-iniciales, y esta señal desaparece en los organismos en gametogénesis avanzada (Fig. 29-B) donde no se aprecia hibridación, y finalmente la señal reaparece pero solamente en la parte masculina de la gónada de organismos desovados (Fig. 29-C). A diferencia de los diploides, en los organismos triploides la hibridación de la sonda *p33* se observó en todas las muestras correspondientes a las mismas edades que los diploides en estadios de inactivo-inicial, avanzado y desove. Al igual que en los diploides la señal de hibridación con la sonda antisentido ocurre en las gonias de todas las edades sin presentar señal en ningún otro tipo de célula (Fig. 30).

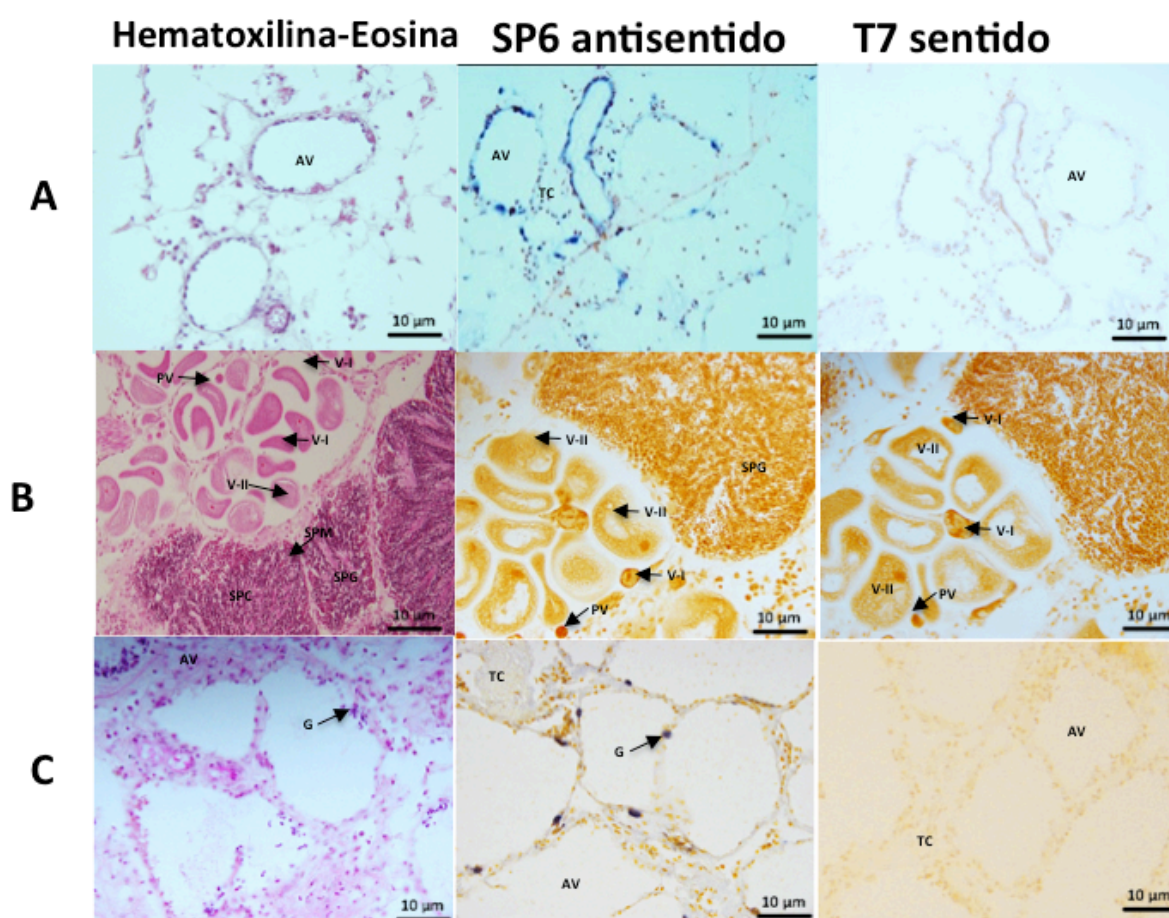


Figura 29. Hibridación con ribosonda marcada con digoxigenina en gónadas de diploides; A) Gametogénesis inactiva-inicial, B) Gametogénesis avanzada y C) Desove. AV= acino vacío, TC= tejido conectivo, G= Gonias, PV= Ovocitos previtelogénicos, V-I= ovocitos

vitelogénicos primarios, V-II= ovocitos vitelogénicos secundarios, SPG= espermatogonia, SPC= Espermatocitos y SPM= Espermátida.

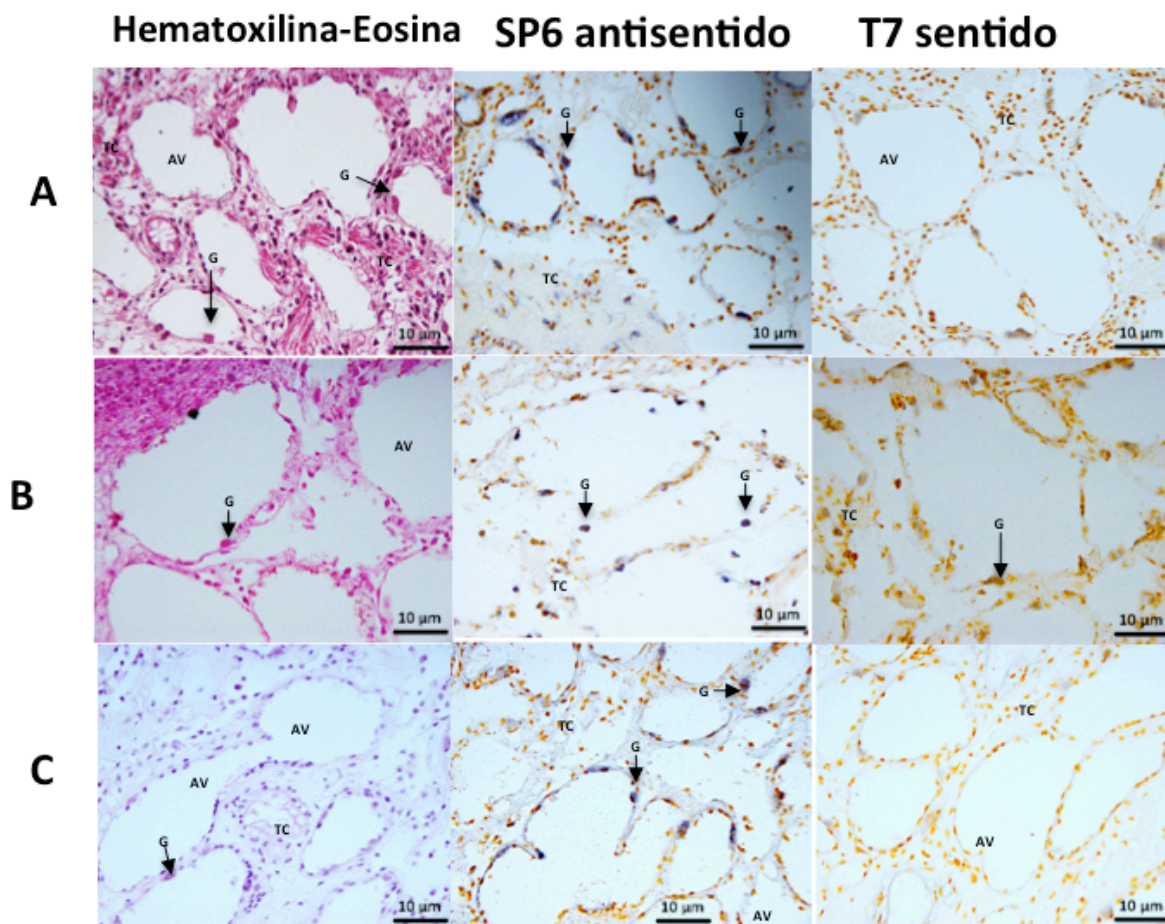


Figura 30. Hibridación con ribosonda marcada con digoxigenina en gónadas triploides; A) Grupo 1 de triploides, correspondiente a la edad en que los diploides se encontraron en gametogénesis inicial-inactiva; B) Grupo 2, correspondiente a la edad en que los diploides se encontraron en gametogénesis avanzada, C) Grupo 3, correspondiente a la edad en que los diploides estaban en desove. AV= acino vacío, TC= tejido conectivo, G= Gonía.

8. DISCUSIÓN

La secuencia de cDNA de 1288 pb aislada y caracterizada en este trabajo, a la cual se le nombró como *p33Nsub* traduce a una proteína de 337 aminoácidos con un codón de paro en el marco de lectura abierto (+2). El análisis *in silico* confirma su pertenencia a la superfamilia de proteínas RINGO/Speedy, proteínas identificadas originalmente en ovocitos de *Xenopus* capaces de unirse y activar a las cinasas dependientes de ciclinas 2 (CDK2) y que son las encargadas de la transición entre las fases G2-M durante el ciclo celular (Ferby *et al.*, 1999). La comparación de la longitud de las secuencias proteicas no indica una relación directa entre el tamaño de las secuencias con la pertenencia a la superfamilia de proteínas RINGO/Speedy ni su acción. Por ejemplo, la secuencia para *Crassostrea gigas*, el pariente evolutivo más cercano a *Nodipecten subnodosus*, en el cual se infirió esta proteína a partir del genoma, es de 272 residuos [Genbank EKC24735.1], lo cual resulta ser significativamente de menor tamaño que la caracterizada por RACE en este trabajo para almeja mano de león. Otras secuencias proteicas inferidas a partir de genoma para otros invertebrados, como *Aplysia californica*, un molusco gasterópodo que al igual que *Crassostrea gigas* y que también es evolutivamente cercano a *N. subnodosus*, incluyen un mayor número de isoformas que resultan por el diferente tamaño principalmente, las cuales van desde 323 [Genbank XP_005090816] hasta 353 aminoácidos [Genbank XP_005090813].

Independientemente de la posibilidad que existieran isoformas de p33 en almeja mano de león, el análisis filogenético de los homólogos y ortólogos a p33 en vertebrados e invertebrados usando la región conservada ‘Caja RINGO/Speedy’ agrupó a la proteína Nsubp33 junto con las proteínas inferidas de los gasterópodos *Lottia gigantea* (LOTGIDRAFT_66401), *Aplysia californica* (Speedy protein A-like isoform X1 y X4) y con la proteína del bivalvo *Crassostrea gigas* (Speedy protein 1-B), todas pertenecientes a los moluscos. En este mismo clado se agrupó a su vez en el conjunto de proteínas Speedy tipo A al equinodermo (*Strongylocentrotus purpuratus*), hemicordado (*Saccoglossus*

kowalevskii), cordado amphioxiforme (*Branchiostoma floridae*), como cordados vertebrados, lo cual es consistente con las observaciones hechas por Chahuan *et al.* (2012), quienes demostraron que de todos los genes pertenecientes a la familia *Speedy*, la variante *SpeedyA* se conserva entre invertebrados, hemicordados y cordados; mientras que en los vertebrados superiores *SpeedyA* está presente con dos isoformas generadas por splicing alternativo, *SpeedyA* y *SpeedyAL*. Aunque el nombre de la proteína de *Crassostrea gigas*, [Speedy protein 1-B] sugiere que se trata de una proteína del tipo B, la cual se piensa se ha perdido entre los invertebrados, su análisis revela que contiene el dominio K-motif (DKYLLxMxxxYFxR) seguido del dominio L-motif (FFxALYLANxxEED) lo cual es característico de las proteínas RINGO/Speedy tipo A, de aquí la importancia de este tipo de análisis, que nos ayudan a entender el origen y la historia evolutiva de los genes RINGO/Speedy y a hacerse una idea de sus funciones

Es importante señalar que a pesar de que el análisis filogenético colocó a la proteína Nsubp33 en el mismo clado que las de *C. gigas* y *A. californica*, la comparación de los modelos proteicos estructurales por superposición (Ye y Godzik, 2004) entre la estructura proteica modelada para Nsubp33 contra la de la proteína Speedy protein 1-B [EKC24735.1] de *C. gigas*, al igual que con las 4 isoformas reportadas en *A. californica*, resultó en un plegamiento estructural de las proteínas significativamente no similares. Una posible explicación para esto es que aunque existan varias formas de esta proteína, es la caja “RINGO/Speedy”, una pequeña región de aproximadamente 140 aminoácidos que se cree es esencial al momento de unirse a las CDK (Chahuan *et al.*, 2012), lo que define si una proteína es o no parte de esta familia. Independientemente de la falta de similitud estructural de p33Nsub con otras proteínas p33 en otros moluscos invertebrados, la traducción conceptual en aminoácidos en el marco de lectura +2 de 337 residuos contiene, como se mencionó antes, los dos dominios conservados dentro de la región de la caja “RINGO/Speedy”, K-motif seguido del dominio L-motif. Es esta configuración de los dominios lo que indica que esta secuencia pertenece a la familia RINGO/Speedy Tipo A, SpyA o Spy1. Por otro lado es importante mencionar que se desconoce si estos motifs (K y L) determinan las propiedades funcionales de estas proteínas y si la presencia y el

posicionamiento de estos pueden afectar la expresión y/o función de esta familia de proteínas (Chahuan *et al.*, 2012), de tal forma que a pesar de dos proteínas contener los mismos motifs no necesariamente implica que su función es regular el ciclo celular. Sin embargo, en el caso de la almeja mano de león, como se discutirá a continuación, los resultados tanto de ISH como de la semicuantificación de la expresión de *p33* en células germinales en proceso meiótico indican una función específica en ciclo celular, específicamente en gonias.

El análisis de expresión relativa del gen *p33Nsub* realizado con la técnica de PCR-semicuantitativo usando como referencia de amplificación y comparación al gen de *factor de elongación (Efv)* nos dice que este gen (*p33Nsub*) en mano de león diploide es específico para tejido gonadal, no habiendo encontrado expresión del mismo en otro tejido que la gónada en ambas regiones sexuales, y que se expresa en la región gonadal masculina en condición de desove y en las primeras etapas de la gametogénesis. Esto último concuerda con lo anteriormente reportado por Llera-Herrera *et al.* (2013), donde se encontró expresión de *p33* en las primeras etapas de la gametogénesis, más no se encontró en estadios gametogénicos avanzados, por lo que ellos sugieren que este gen sólo se expresa en la gametogénesis temprana o los primeros estadios gametogénicos.

La especificidad de la expresión de *p33* en gónada de almeja difiere de lo observado para *Spy1/RINGO* en mamíferos, ya que en estos últimos, a excepción de *Spy1/RINGO-B* que se encontró expresado exclusivamente en testis, se ha encontrado expresión de las otras formas de este gen (*Spy1/RINGO A* y *C*) en otros tejidos/órganos que gónadas (Cheng *et al.*, 2005) Interesantemente, en el presente trabajo donde adicionalmente a organismos en gametogénesis avanzada se evaluaron también organismos desovados, se encontró expresión de *p33* solamente en la región masculina de organismos diploides desovados, la cual fue significativamente mayor que la obtenida para los organismos en gametogénesis inicial, sin embargo se desconoce si el transcrito *p33* expresándose en gametogénesis inicial versus región masculina desovada sean el mismo, requiriéndose de más investigación para discernir esto.

La función de este gen ha sido estudiada en vertebrados mamíferos recientemente, encontrando que tiene un papel en la inhibición de la apoptosis o muerte celular ya que participa permitiendo la progresión del ciclo celular a pesar de ocurrir o presentarse daños al DNA, posiblemente permitiendo el desarrollo de tumores (Golipour *et al.*, 2008 y McAndrew *et al.*, 2009). Adicionalmente, Spy/RINGO ha sido reportado como un gen indispensable en la espermatogénesis de *Rattus norvegicus* (Fig. 31), en la cual participa específicamente en la regulación de las transiciones de G1/S y G2/M del ciclo celular, y su ausencia por *knockdown* resulta en la inhibición de la espermatogénesis y la expresión de genes participando en muerte celular o apoptosis (Cheng *et al.*, 2011).

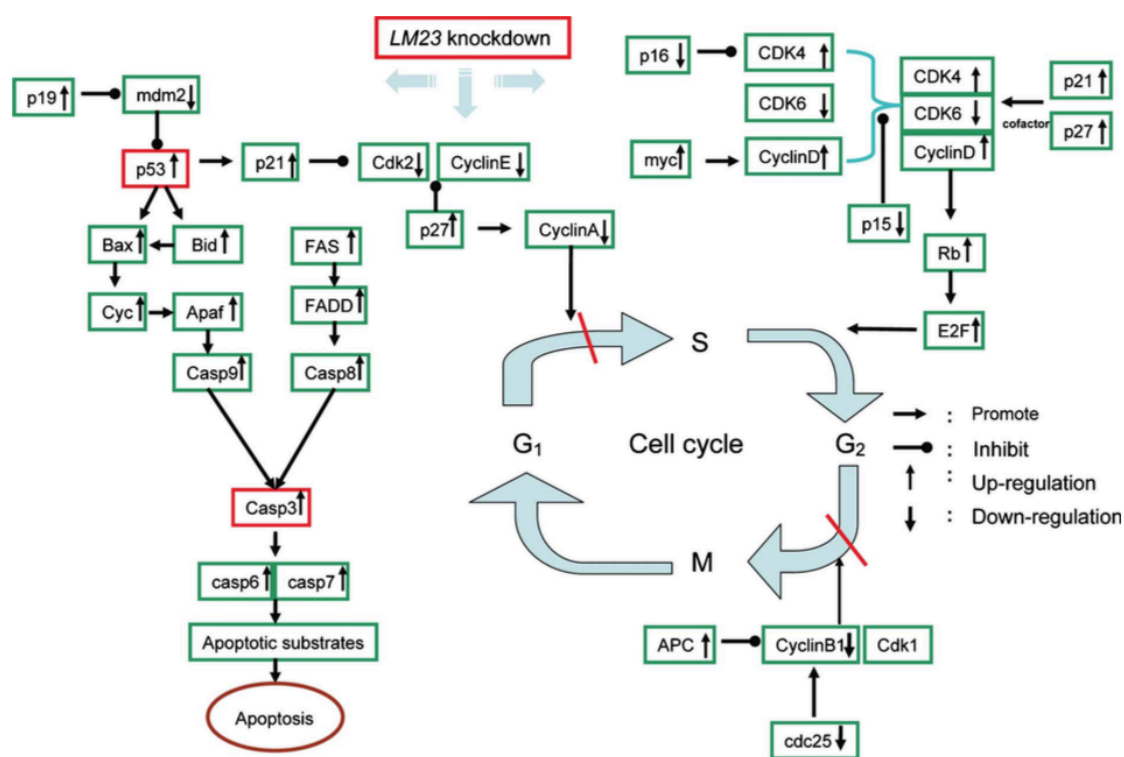


Figura 31. La expresión de LM23, un ortólogo de p33 en *Rattus norvegicus* y su relación con algunos genes del ciclo celular y la apoptosis. La expresión de algunos de ellos cambio significativamente después de la interferencia de LM23, como se muestra por el análisis de microarreglo. La regulación negativa de LM23 puede bloquear la transición entre las fases G1/S y G2/M de la célula en espermatogénesis (tomada de Cheng *et al.*, 2011).

Por otro lado la expresión de *p33* en organismos triploides de almeja mano de león de la misma edad que los diploides fue ligeramente mayor en organismos en gametogénesis inactiva-inicial, pero no significativamente mayor que en los diploides. Sin embargo, a diferencia de los diploides para los cuales no hubo expresión de *p33* en gametogénesis avanzada, en triploides se continuó expresando *p33* a la edad correspondiente a gametogénesis avanzada y desove en diploides, indicando potencialmente que este gen se sobreexpresó en triploides con posibles fines de inducir la progresión del ciclo meiótico. Se sabe que los organismos triploides de mano de león son estériles (Maldonado-Amparo et al., 2004), y la esterilidad observada en algunos pectínidos ha sido propuesta como resultado de un arresto en la meiosis I causado por mecanismos de *checkpoint* o mecanismos genéticos de control de la fidelidad del ciclo celular (Maldonado-Amparo & Ibarra, 2002a y 2002b). Dado lo anterior, así como el hecho de que se sabe que *p33* tiene una función importante para la maduración meiótica (Gastwirt et al., 2007) participando en la inducción de la transición G₂/M (Lenormand et al., 1999; Yamashita, 2000) y que puede inducir la progresión de la fase G₁/S y además puede evitar la activación de “*checkpoints*” (McAndrew et al., 2009), no es sorprendente que la expresión de *p33* en los triploides fuese continua si estos están arrestados en su desarrollo meiótico y este gen tiene en efecto una función en buscar inducir el ciclo celular a pesar de existir daños del DNA por ejemplo por la formación de trivalentes durante la sinapsis y recombinación (Cuñado et al., 2002). Más trabajo a futuro será necesario para establecer la función específica de este gen en la gametogénesis inicial de la almeja mano de león diploide y triploide.

La hibridación *in situ* del gen *p33* realizada en cortes transversales de gónadas de almeja mano de león *Nodipecten subnodosus* diploides y triploides permitió localizar al transcrito de este gen en ovogonias y espermatogonias de organismos diploides durante el desarrollo gametogénico temprano así como en espermatogonias en la región masculina de gónadas desovadas. Esto difiere de lo encontrado por Cheng et al. (2011) en *Rattus norvegicus*, ya que el transcrito de este gen se localizó en el núcleo de espermátidas y no en espermatogonias como en el presente caso. En los organismos triploides la localización de la expresión de este gen fue similarmente en gonias, aunque en este caso no es posible

discernir entre regiones sexuales de la gónada y por tanto inferir que se expresa ya sea en espermatogonias u ovogonias. En conclusión, este trabajo reafirma el hecho de que *p33* es exclusivo de meiosis como fue propuesto antes por Llera-Herrera *et al.* (2013), y que su función es como un gen regulador del ciclo celular meiótico.

9. CONCLUSIONES

Se caracterizó un cDNA de 1288pb que codifica a una proteína de 338 aa con 64% de identidad con genes de la familia RINGO/Speedy, éste gen se expresa exclusivamente durante la meiosis en ovogonias y espermatogonias durante la gametogénesis de *Nodipecten subnodosus*; en diploides en las primeras etapas de la gametogénesis y en la gónada masculina desovada, en triploides en toda la parte del ciclo de vida evaluado

10. RECOMENDACIONES

1. Realizar un ensayo para la búsqueda de isoformas en diferentes estadios de desarrollo gametogénico de la almeja mano de león.
2. Llevar a cabo un análisis de cuantificación de la expresión más sensible del tipo qPCR en los diferentes estadios de desarrollo gametogénico y las diferentes edades evaluadas en triploides
3. Realizar un experimento interferencia genética para verificar la función de este gen en la gametogénesis de la almeja mano de león.
4. Dirigir un análisis de mutagénesis de proteínas dirigido a los motifs típicos de estas proteínas para verificar si realmente estas regiones le dan su funcionalidad y la especificidad a los diferentes sustratos.

11. LITERATURA CITADA

- Allen Jr., S.K. 1983. Flow cytometry: assaying experimental polyploid fish and shellfish. *Aquaculture* 33: 317-328.
- Allen Jr S.K. & Downing S.L. 1986. Performance of triploid Pacific oysters, *Crassostrea gigas* (Thunberg). I. Survival, growth, glycogen content and sexual maturation in yearlings. *J Exp Mar Biol Ecol* 102:197–208
- Arellano-Martínez M., Racotta I.S., Ceballos-Vázquez B.P. & Elorduy-Garay J.F. 2004. Biochemical composition, reproductive activity and food availability of the lion's paw scallop *Nodipecten subnodosus* in the Laguna Ojo de Liebre, Baja California Sur, Mexico. *J. Shellfish Res.* 23(1): 15-23.
- Cheng A., Xiong W., Ferrel J.M. Jr. & Solomon M.J. 2005. Identification and comparative analysis of multiple mammalian Speedy/Ringo proteins. *Cell cycle* 4:1,155-165.
- Cheng Y.M., Liu M.L. & Jia M.C. 2011. LM23 is a novel member of the Speedy/Ringo family at the crossroads of life and death of spermatogenic cell. *Asian Journal of Andrology.* 13, 446-452.
- Chauhan S., Zheng X., Tan Y.Y., Tay B.H., Lim S., Venkatesh B. & Kaldis P. 2012. Evolution of the Cdk-activator Speedy/RINGO in vertebrates. *Cell Mol Life Sci* 69: 3835–3850
- Cuñado N., Terrones J., Sánchez L. Matínez P. & Santos J.L. 2002. Sex-dependent synaptic behaviour in triploid turbot, *Scophthalmus maximus* (Pisces, Scophthalmidae). *Heredity.* 89, 460-464.
- Dinarina A., Santamaria P.G. & Nebreda A.R. 2009. Cell cycle regulation of the mammalian CDK activator RINGO/Speedy A. *FEBS.* 583 2772-2778.

- Ferby I., Blázquez M., Palmer A., Eritja R. & Nebreda A.R. 1999. A novel p34cdc2-binding and activating protein that is necessary and sufficient to trigger G2/M progression in *Xenopus* oocytes. *Genes Dev.* 13: 2177-2189.
- Finn R.D., Bateman A., Clements J., Coghill P., Eberhardt R.Y., Eddy S.R., Heger, Hetherington A.K., Holm L., Mistry J., Sonnhammer, E.L.L., Tate J. & Punta M. 2014. The Pfam protein families database. *Nucleic Acids Research.* 42: D222-D230.
- Gastwirt R.F., Slavin D.A., McAndrew C. & Donoghue D.J. 2006. Spy1 expression prevents normal cellular responses to DNA damage: Inhibition of apoptosis and checkpoint activation. *The Journal of Biological Chemistry.* Vol. 281, 46: 35425-35435.
- Gastwirt R.F., McAndrew C.W. & Donoghue D.J. 2007. Speedy/RINGO Regulation of CDKs in Cell Cycle, Checkpoint Activation and Apoptosis. *Cell Cycle* 6:10 1188-1193.
- Golipour A., Myers D., Seagroves T., Murphy D., Evan G.I., Donoghue D.J., Moorehead R.A. & Porter L.A. 2008. The Spy1/RINGO Family Represents a Novel Mechanism Regulating Mammary Growth and Tumorigenesis. *Cancer Research* 68 (10): 3591–3600
- Gouletquer P., Jean-Pierre J., Gérard A., Le Gagneur E., Moriceau J., Peignon J.M., Heurtebise S. & Phelipot P. 1996 Performance of triploid Pacific Oysters *Crassostrea gigas* (Thunberg) reared in high carrying capacity ecosystem: survival) growth and proximate biochemical composition. *IFREMER. Haliotis* 25: 1-12.
- Ibarra A.M., 2006. Propuesta de investigación aplicada, CONVOCATORIA SEMARNAT 2006-01: Modelo biológico para alcanzar un balance entre la conservación y el aprovechamiento sustentable de los recursos marinos en reservas y parques naturales. Caso de estudio: almeja mano de león (*Nodipecten subnodosus*). Fondo S0010. Convocatoria S0010-2006-1. Proyecto 23397. México.

- Ibarra-Humphries A.M. & Ramírez-Arce J.L. 2008. Manual Práctico. Inducción a la Triploidía con Citocalacina-B en Ostión Japonés, *Crassostrea gigas*. Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste S.C. (CIBNOR) La Paz BCS, México. 19 pp.
- Ibarra A.M., Alfonsi C. & Pérez J.E. Capítulo 6: Genética y biotecnologías para el mejoramiento del cultivo y la conservación del recurso *Nodipecten spp.* En Maeda-Martínez A. N. Lodeiros-Seijo C. 2011. Biología y cultivo de los moluscos del genero *Nodipecten*. Limusa. México. 400 pp.
- Lenormand J.L., Deligner R.W., Knudsen K.E., Subramani S. & Donoghue D.J. 1999. Speedy: a novel cell cycle regulator of the G₂/M transition. *The EMBO Journal* Vol. 8 No. 7 1869-1867.
- Liu M.L., Pei K.Y., Shi X.Q., Liu D.Y. & Jia M.C. 2007. Identification and characterization of a novel spermatogenesis related gene LM23 in rat testis. ELSEVIER. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 356 576–581.
- Llera-Herrera R., García-Gasca A., Huvet A. & Ibarra A.M. 2012. Identification of a tubulin- α gene specifically expressed in testis and adductor muscle during stable reference gene selection in the hermaphrodite gonad of the lion's paw scallop *Nodipecten subnodosus*. *Marine Genomics* 6 (2012) 33–44.
- Llera-Herrera R. 2013. Genómica de la espermatogénesis en la almeja mano de león *Nodipecten subnodosus*. Tesis para el obtener el grado de Doctor en Ciencias en Uso Manejo y Preservación de los Recursos Naturales. CIBNOR. La Paz BCS. México.
- Llera-Herrera R., García-Gasca A., Abreu-Goodger C., Huvet A. & Ibarra A.M. 2013. Identification of male gametogenesis expressed genes from the scallop *Nodipecten subnodosus* by suppressive subtraction hybridization and next-generation-sequencing. *PLoS ONE* 8(9): e73176.

- López Cuadros Itzia. 2014. Caracterización y localización de la expresión de Sxl (Sex-lethal) en camarón blanco del pacífico *Litopenaeus vannamei* (Boone, 1931). Tesis para el obtener el grado de Maestro en Ciencias en Uso Manejo y Preservación de los Recursos Naturales. CIBNOR. La Paz BCS. México.
- Maeda-Martínez A. N. & Lodeiros-Seijo C. 2011. Biología y cultivo de los moluscos del genero *Nodipecten*. Limusa. México. 400 pp.
- Maldonado-Amparo R., Ramírez J.L., Ávila S. & Ibarra A.M. 2004. Triploid lion-paw scallop *Nodipecten subnodosus*: growth, gametogenesis and gametic cell frequencies. *Aquaculture*. *Aquaculture* 235: 185–205.
- Maldonado-Amparo R. & Ibarra A.M. 2002a. Ultrastructural characteristics of spermatogenesis in diploid and triploid catarina scallop (*Argopecten ventricosus* Sowerby II, 1842). *J. Shell. Res.* 21, 93–101.
- Maldonado-Amparo R. & Ibarra A.M. 2002b. Comparative analysis of oocyte type frequencies in diploid and triploid catarina scallop (*Argopecten ventricosus*) as indicators of meiotic failure. *J. Shell. Res.* 21, 597–603.
- Mazón-Suástegui J.M., Maeda-Martínez A.N., Robles-Mungaray M., de la Roche J.P., Rupp G.S., Mendes-de-Bem M., Velasco L.A. & Freites-Valbuena L.F. Capítulo 11: Avances en la reproducción de juveniles de *Nodipecten spp.* En Maeda-Martínez A. N. Lodeiros-Seijo C. 2011. Biología y cultivo de los moluscos del genero *Nodipecten*. Limusa. México. 400 pp.
- McAndrew C., Gastwirt R. & Donoghue D. 2009. The atypical CDK activator Spy1 regulates the intrinsic DNA damage response and is dependent upon p53 to inhibit apoptosis. *Cell Cycle* 8: 66–75.
- Morelos-Castro R.M. 2011. Aislamiento y caracterización del gen de la miostatina en la almeja mano de león *Nodipecten subnodosus* y análisis de su expresión en diploides y

triploides. Tesis para obtener el grado de Maestro en el Uso, Manejo y Preservación de los Recursos Naturales. CIBNOR. La Paz, BCS. México

Nebreda A.R. 2006. CDK activation by non-cyclin proteins. ELSEVIER. *Current Opinion in Cell Biology* 18:192–19.

Palacios E., Racotta I.S., Ibarra A.M., Ramírez J.L., Millán A. & Ávila S. 2004. Comparison of biochemical composition and muscle hypertrophy associated with the reproductive cycle of diploid and triploid scallops, *Argopecten ventricosus*. *J. Shell. Res.* 23 (2), 483-489.

Palacios E., Racotta I.S., Kraffe E., Marty Y., Moal J. & Samain J.F.. 2005. Lipid composition of the giant lion's-paw scallop (*Nodipecten subnodosus*) in relation to gametogenesis: I. Fatty acids. *Aquaculture* 250, 14 270-282.

Petersen J.L., Ibarra A.M. & May B. 2006. Mollusk triploid technologies: Production of sterile organisms to reduce genetic impact on natural populations. (Ponencia). International workshop on reproduction and nutrition of mollusks. 6-9 Noviembre 2006. La Paz, BCS, México.

Petersen J.L., Ibarra A.M., Ramírez J.L. & May B. 2008. An induced mass spawn of the hermaphroditic lion-paw scallop, *Nodipecten subnodosus*: genetic assignment of maternal and paternal parentage. *J. Hered.* 99, 337–348.

Racotta I. S., Ramírez J.L., Ibarra A.M., Rodríguez-Jaramillo M.C., Carreño D. & Palacios E. 2003. Growth and gametogenesis in the lion-paw scallop *Nodipecten (Lyropecten) subnodosus*. *Aquaculture* 217: 335-349.

Racotta I.S., Palacios E., Ibarra A.M., Ramírez J.L., Arcos F. & Arjona O. 2008. Comparative biochemical composition of ploidy groups of the lion-paw scallop (*Nodipecten subnodosus* Sowerby) supports the physiological hypothesis for the lack of advantage in triploid mollusk's growth in food-rich environments. *Mar. Biol.* 153: 1245-1256.

- Ramírez-Arce J.L. 2009. Evaluación de la ventaja productiva y grado de esterilidad en triploides de almeja mano de león *Nodipecten subnodosus* (Sowerby 1835) como una alternativa para el cultivo en el parque nacional Bahía de Loreto, Golfo de California. Tesis para el obtener el grado de Maestro en Ciencias en Manejo de Recursos Marinos. CICIMAR-Instituto Politécnico Nacional. La Paz BCS. México.
- Ruiz-Verdugo C.A., Ramírez J.L., Allen Jr S.K., Ibarra A.M. 2000. Triploid catarina scallop (*Argopecten ventricosus* Sowerby II, 1842): growth, gametogenesis, and suppression of functional hermaphroditism. *Aquaculture* 186: 13–32.
- Sifuentes-Romero I., Merchant-Larios H. & García-Gasca A. 2010. Hox gene expression in the embryonic genital system of the sea turtle *Lepidochelys olivacea* (Eschscholt, 1829), a species with temperature-dependent sex determination. *Gene Expression Patterns*. 10(6): 290-298.
- Tamura K., Stecher G., Peterson D., Filipski A. & Kumar S. 2013. MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 6.0. *Molecular Biology and Evolution* 30: 2725-2729.
- Untergasser A., Cutcutache I., Koressaar T., Ye J., Faircloth B.C., Remm M. & Rozen S.G. 2012. Primer3-new capabilities and interfaces. *Nucleic Acids Res.* Aug 1;40(15):e115.
- Yamashita M. 2000. Toward Modeling of a General Mechanism of MPF Formation during Oocyte Maturation in Vertebrates. *Zool. Sci.* 17: 841–851.
- Yamazaky Y. & Ward W.S. 2011. A New Speedy/RINGO Protein May Help Regulate Male Meiosis. *Asian J Androl* 13(3): 363.
- Ye Y., Godzik A. 2004. FATCAT: a web server for flexible structure comparison and structure similarity searching. *Nucleic Acid Research*. 32:W582-585.
- Zhang Y. 2008. I-TASSER server for protein 3D structure prediction. *BMC Bioinformatics*, 9:40.

ANEXOS

Anexo I. Extracción de ARN

Tomado de Morelos-Castro, 2011. Modificado

Previamente:

Las muestras fueron previamente preservadas en RNAlater y Trizol de manera individual a -20°C en tubos eppendorf.

Limpiar el área de trabajo con RNaseZAP[®] o cloro.

1. Pesar 100mg de perlas de cristal (SIGMA Glass beads, acid washed, 425-600 μm) y colocarlo en un tubo eppendorf.
2. Agregar 800 μL de TriPure Isolation Reagent (fenol guanidina tiocianato).
3. Maniobrar las muestras para evitar degradación mientras se pesa. Pesar no más de 100mg de gónada y colocar el tejido en el tubo eppendorf con perlas de cristal y TriPure. Mantener en hielo las muestras previamente pesadas.
4. Homogenizar el tejido en el equipo FastPrep[®]-24 durante 40 segundos a una velocidad de 6m/s. En caso de quedar tejido homogenizar nuevamente. Mantener en hielo las muestras. Repetir 2 veces.
5. Centrifugar las muestras 14,000 rpm por 5 minutos a 4°C . Mantener en hielo.
6. Transferir la fase superior a un nuevo tubo eppendorf evitando la matriz (perlitas) y el tejido restante (recuperar aproximadamente 850 μL).
7. Incubar las muestras 5min a temperatura ambiente.
8. Agregar 300 μL de cloroformo y 10s en el vortex.
9. Incubar 5min a temperatura ambiente.
10. Centrifugar a 14,000 rpm por 5 min a 4°C .
11. Transferir la fase acuosa (aproximadamente 450 μL) a un tubo de 1.5mL cuidando de no tomar la fase intermedia.
12. Agregar 500 μL de etanol al 100% y mezclar por inversión 5 veces.
13. Incubar 30min a -80°C o toda la noche a -20°C .

14. Centrifugar 14,000 rpm por 15min a 4°C.
15. Lavar el pellet de ARN con 500µL de etanol al 75% (para hacer 100mL: 75mL de etanol absoluto y 25mL de agua MiliQ).
16. Incubar en hielo por 10 minutos.
17. Centrifugar a 14,000 rpm por 5min a 4°C y descartar el sobrenadante.
18. Repetir el lavado del pellet con etanol al 75%, incubar en hielo por 10 minutos, centrifugar a 14,000 rpm por 5min a 4°C.
19. Descartar el sobrenadante y secar el pellet a temperatura ambiente hasta que se evapora todo el etanol.
20. Resuspender el ARN en agua MiliQ (el volumen dependerá del tamaño del pellet).
21. Cuantificar el ARN total en un NANODROP.

Anexo II. Tratamiento con DNAsa

(Morelos-Castro, 2011.)

1. Tomar 5 μ L (1.6 μ g/ μ L) de ARN y agregar:

RQ DNAsa 5 μ L

RQI Buffer de reacción 10x 1.5 μ L

H₂O libre de nucleasas 3.5 μ L

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

Anexo III. PolyA-Oligodt Celulosa

1. Al ARN total en solución agregar un volumen igual de Binding solution y mezclar.
2. Añadir esa mezcla a un tubo con Oligo-dt Celulosa y mezclar por inversión.
3. Incubar 5 minutos a 70 °C.
4. Calentar ARN Storage solution a 70°C (para usar en paso 18).
5. Incubar 60 minutos a temperatura ambiente con agitación.
6. Centrifugar 3 minutos a 3000rpm a temperatura ambiente.
7. Remover el sobrenadante con cuidado.
8. Añadir 0.5mL de Wash solution 1 y resuspender el pellet con ayuda de un vortex.
9. Colocar esa solución en una columna para centrifuga y centrifugar a 3000rpm por 3 minutos.
10. Reservar el sobrenadante en hielo, por si se desea una segunda ronda de purificación.
11. Añadir 0.5mL de Wash solution 1 en la columna y resuspender en vortex.
12. Centrifugar s 3000rpm por 3 minutos y descartar el sobrenadante.
13. Anadir 500mL de Wash solution 2 y solubilizar con vortex.
14. Centrifugar a 3000rpm por 3 minutos y descartar el sobrenadante
15. Repetir 2 veces más pasos 13 y 14 (para completar 3 lavados con Wash solution 2)
16. Colocar la columna para centrifuga en un tubo nuevo de los incluidos en el KIT.
17. Añadir 200µL de ARN Storage solution a 70°C y solubilizar en vortex.
18. Centrifugar 2 minutos a 4500rpm.
19. Repetir paso 18
20. Centrifugar 5 minutos a 4500rpm.
21. Descartar la columna (guardar rotulada con el tejido y la especie del organismo con la que utilizo)
22. Al producto recuperado en el tubo (aproximadamente 400µL) agregar: 40µL de acetato de amonio 5M, 1µL de glicógeno y 1.1mL de etanol absoluto.
23. Mezclar bien por inversión.
24. Precipitar 18 horas a -20°C.
25. Centrifugar 30 minutos a 14000rpm a 4°C.

26. Descartar el sobrenadante con mucho cuidado (de ser necesario utilice la punta de una micropipeta)
27. Centrifugar 1 minuto a 14000rpm a 4°C, y remover el sobrenadante con ayuda de una micropipeta.
28. Agregar 1mL de etanol 70% y mezclar.
29. Centrifugar 10 minutos a 14000rpm a 4°C.
30. Descartar el sobrenadante con mucho cuidado.
31. Centrifugar 1 minuto a 14000rpm a 4°C y eliminar todo el alcohol con ayuda de una micropipeta.
32. Secar 5 minutos en campana a temperatura ambiente.
33. Disolver pellet en 20-50µL de RNA Storage solution.
34. Cuantificar por espectrofotometría (Nanodrop 2000)
35. Almacenar a -80°C.

Anexo IV. Síntesis cDNA-RACE

Iniciar con RNA-polyA

1. Preparar el siguiente mix:

4.4 μ L 5x First-Strand Buffer

2.2 μ L DDT 20mM

1.0 μ L dNTP's mix 10mM

2. Preparar la siguiente reacción en tubos separados:

Tubo1. 5'RACE

Tubo2. 3'RACE

1-2 μ L de ARN-polyA

1-3.75 μ L de ARN-polyA

1.0 μ L de 5'CDS Primer A

1.0 μ L de 3'CDS Primer a1

3. Añadir H₂O a cada uno de los tubos para un volumen final de 3.75 μ L para el tubo 1, y 4.75 μ L para el tubo 2.

4. Mezclar y centrifugar ligeramente para asentar los reactivos.

5. Incubar 3 minutos a 72°C, luego 2 minutos a 42°C, también incubar mix del paso 1.

6. Centrifugar ligeramente.

7. Agregar 1 μ L de Smarter IIA Oligo al tubo 5'.

8. Preparar el siguiente mix:

8.8 μ L Buffer Mix (del paso 1)

0.27 μ L RNasa Inhibitor

2.2 μ L SmartScribe Reverse Transcriptase

9. Anadir 5.25 μ L del mix del paso 8 a cada tubo de los del paso 2 (que fueron incubados en el paso 5)

10. Mezclar con cuidado por pipeteo, centrifugar ligeramente.

11. Incubar a 42°C por 90 minutos y luego 10 minutos a 70°C (en termociclador).

12. Diluir el producto restante de la incubación en 250 μ L de Tricine-EDTA-Buffer.
13. Alícuotar y almacenar a -20°C.

Anexo V. Ligación con pGEM-T Easy Vector

NOTA: Este vector, en su forma lineal, posee un nucleótido de timina en sus extremos 3', los cuales actúan como extremos cohesivos con los fragmentos de DNA amplificados por PCR, ya que son generados con un nucleótido de adenina en los extremos 3', y la presencia de este nucleótido en los extremos 3' del vector impide su recircularización, aumentando así la eficiencia de la ligación. También ayuda a seleccionar las colonias positivas, ya que el sitio de inserción múltiple del vector se interrumpe la secuencia codificante del péptido α de la enzima β -galactosidasa, que es capaz de hidrolizar el sustrato 5-bromo-4-cloro-3-indolil- β -D-galactósido (X-gal), proporcionándole un color azul a las colonias, las cuales se identifican como negativas, y las blancas como positivas.

1. Preparar la siguiente reacción:

Buffer 2x ligation	5.0 μ l
pGEM T Vector	0.5 μ l
Fragmento purificado	4.0 μ l
DNA ligasa (T4)	0.5 μ l
<hr/>	
Total	5.0 μ l

2. Incubar por 3h a temperatura ambiente o toda la noche a 4°C.
3. Almacenar a -20°C.

Anexo VI. Transformación de ligación con pGEM-T Easy Vector

Nota: Antes de con la transformación verificar la suficiencia de material (tubos eppendorf, puntas de todas las denominaciones y tubos de vidrio estériles, placas, medio SOC, LB y LB-agar+ampicilina, etc.). Encender baño María a 42°C

1. Preparar el número de placas (LB-agar+ampicilina) que sean necesarias según el número transformaciones a realizar, con 7 μ L de IPTG y 40 μ L de X-Gal (distribuir uniformemente la placa con ayuda de una varilla de vidrio doblada en escuadra), conservar a 37°C en el horno de hibridación.
2. Mezclar suavemente la ligación y transferir a un tubo eppendorf de 1.5mL estéril y rotulado.
3. Agregar al mismo tubo 20 μ L de bacterias (JM109) y mezclar suavemente.
Descongelar las bacterias 5 minutos antes usarlas
4. Incubar en hielo por 20min.
5. Dar choque térmico en baño María a 42°C por 50 segundos, sin agitarlos.
6. Regresar rápidamente al hielo por 2min (Choque térmico).
7. Agregar 250 μ l de medio líquido SOC, e incubar 90 minutos a 37°C con agitación a 240rpm
8. Inocular en cajas Petri preparadas en el paso 1, incubar 18 horas a 37°C.
9. Marcar las colonias a levantar en la caja Petri y preparar el número de tubos con LB-ampicilina necesarios (1 por colonia).
10. Agregar 3mL de medio liquido LB-ampicilina en tubos de vidrio estériles, y con ayuda de palillo de madera colocar una colonia en cada tubo con medio LB-ampicilina.
11. Incubar a 37°C con agitación a 240rpm toda la 18 horas.

Anexo VII. Minipreps

1. Transferir 1.5ml de cultivo bacteriano en medio LB-ampicilina a un tubo eppendorf 1.5mL.
2. Centrifugar 1min a máxima velocidad y eliminar el sobrenadante totalmente.
3. Agregar 100µl de *Cell resuspension solution* (50mM Tris-HCl pH 8.0; 10mM de EDTA pH 8.0) y 80µg de *RNasa* y resuspender el pellet.
4. Agregar 100µl de buffer de lisis 200mM NaOH y SDS 1% (preparar en el momento a partir de soluciones 400mM NaOH y SDS 2%; medio volumen de cada una).
5. Inmediatamente después agregar 120µl de buffer de neutralización (Acetato de potasio 3M pH 5.5; ajustar pH con ácido acético) y mezclar por 3min.
6. Centrifugar por 1min a máxima velocidad y transferir sobrenadante a un tubo nuevo.
7. Agregar 200µl de isopropanol y mezclar.
8. Centrifugar por 1min a máxima velocidad y descartar sobrenadante.
9. Agregar 500µl de etanol al 70% mezclar.
10. Centrifugar por 1min a máxima velocidad y descartar sobrenadante, volver a centrifugar y eliminar sobrenadante con punta.
11. Secar el pellet por 30 minutos.
12. Agregar 25µl de H₂O Milli Q estéril y resuspender el pellet.

Anexo VIII. Purificación con LiCl 8M

1. Agregar 5 μ L de LiCl 8M por cada 15 μ L de ARN a purificar.
2. Incubar a -80°C al menos 2 horas.
3. Agregar 120 μ L de etanol absoluto por cada 5 μ L de LiCl 8M agregado.
4. Incubar dos horas a -80° C
5. Centrifugar 5min a 14000rpm a 4°C.
6. Eliminar el sobrenadante.
7. Agregar 100 μ L de etanol al 75% y resuspender el pellet.
8. Centrifugar 5min a 14000rpm a 4°C.
9. Eliminar el sobrenadante.
10. Centrifugar 1 min a 14000rpm a 4°C.
11. Eliminar el sobrenadante con mucho cuidado con ayuda de una micropipeta.
12. Secar el pellet.
13. Resuspender el H₂O MilliQ (15 μ L)
14. Cuantificar en Nanodrop 2000 y verificar integridad de los productos en electroforesis.

Anexo IX. Síntesis de ADNc

Tomado de Morelos-Castro, 2011.

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

CONTROL (+)

ARN (1 μg)	2 μL
Oligo (dT) (0.5 $\mu\text{g}/\text{rx}$)	1 μL
H ₂ O libre de nucleasas	2 μL
<hr/>	
<i>Total</i>	<i>5μL</i>

CONTROL (-) A (sin template)

Oligo (dT)	1 μL
H ₂ O nuclease free	4 μL
<hr/>	
<i>Total</i>	<i>5μL</i>

REACCIÓN CON ARN

Oligo (dT) (0.5 $\mu\text{g}/\text{rx}$)	1 μL
ARN libre de ADNg (mínimo 1 $\mu\text{g}/\text{rx}$)	5 μL
<hr/>	
<i>Total</i>	<i>6μL</i>

4. Incubar a 70°C por 5 minutos.
5. Colocar inmediatamente en hielo 5 minutos y centrifugar 10 segundos (para coleccionar lo condensado).
6. Colocar los tubos en hielo hasta la siguiente reaccion.
7. Preparar las siguientes mezclas (en hielo): realizar los calculos para el numero de reacciones.

REACCION CON ARN (1 Rx)

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

CONTROL (-) sin enzima

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

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

Anexo X. Hibridación *in situ* ISH

A) Tratamiento de laminillas con Poly-L-Lisina (modificado de HU 2004)

1. Sumergir laminillas en solución lavado (33g de NaOH, 133mL de etanol 95% y 133mL de agua MiliQ) durante 30min.
2. Sumergir las laminillas en agua MiliQ varias veces hasta eliminar la solución de lavado por completo.
3. Secar con papel limpio libre de residuos.
4. Sumergir las laminillas por completo en solución de Poly-L-lisina 10% (con agua MiliQ o DEPC) por 30min.
5. Sumergir una sola vez con agua MiliQ y retirar inmediatamente.
6. Sumergir una sola vez con etanol 100% y retirar inmediatamente.
7. Dejar secar a temperatura ambiente o en campana de extracción.
8. Almacenar en refrigeración hasta su uso no más de 14 días.

B) Transcripción y marcaje de ribosondas (Kit Dig RNA Labeling T7/SP6)

1. Hacer PCR a 30 μ l con ADNp de la clona a utilizar para la sonda, con los cebadores universales M13-F y M13-R pUC
2. Verificar el producto de la digestión por electroforesis en gel de agarosa al 1%, cortar cada banda con navaja estéril, purificar y verificar el producto de purificación.
3. Colocar 10 μ l de plásmido linearizado en dos tubos de 1.6mL y agregar 3 μ l de agua DEPC a cada uno, mezclar y colocar en hielo.
4. Preparar las siguientes reacciones:

	SP6 (Apa I) μ l	T7 (Pst I) μ l
10x NTP labeling mixture (vial 7)	2.0	2.0
10x transcription buffer (vial 8)	2.0	2.0

RNase inhibitor	1.0	1.0
RNA polymerase SP6	2.0	---
RNA polymerase T7	---	2.0
Total	7.0	7.0

5. Mezclar y centrifugar brevemente
6. Incubar por 2h a 37°C
7. Agregar 2 μ l de DNasa I (vial 9 del kit) e incubar por 15min 37°C
8. Detener la reacción con 2 μ l de EDTA 0.2M a pH 8 (preparar previamente ya que no lo incluye el kit)
9. Volumen final 21 μ l por sonda. Almacenar a 20°C.

C) Hibridación *in situ* con ribosonda marcada con Digoxigenina (Sifuentes-Romero et al. 2010)

Antes de empezar preparar paraformaldehído 4% en campana de extracción:

1. Calentar baño maría a 60-65°C (o un vaso de precipitados con agua)
2. 30mL de PBS 1x (DEPC), una vez alcanzada la temperatura
3. Agregar 1.6g del paraformaldehído (esta en refrigeración)
4. Mezclar y agitar constantemente, el paraformaldehído se solubilizará en unos minutos

Nota: Si el paraformaldehído no se disuelve, agregar 1 μ L de NaOH 10M, medir el pH y equilibrar a 7.4 con HCl

Hibridación

Desparafinar e hidratar los tejidos (laminillas) de la siguiente forma

Paso	Solución	Tiempo (minutos)
1	Xilol	10
2	Xilol	10
3	Etanol absoluto	5
4	Etanol 90%	5
5	Etanol 80%	5
6	Etanol 50%	5
7	H2O DEPC	5
8	PBS 1x (DEPC)	5

Nota: todas las soluciones deben estar preparadas con agua tratada con DEPC o libre de nucleasas

9. Drenar las laminillas y colocar en cámara húmeda con SSC 2x, agregar 100µl de Proteinasa K (10µg/mL) a cada laminilla (solución de trabajo = 0.5µl de proteinasa K 20mg/mL a 999.5ul de PBS 1x DEPC) y cubrir con parafilm evitando dejar burbujas, e incubar 15 minutos a 37°C.

10. Lavar las laminillas en PBS 1x (DEPC) durante 5 minutos.

11. Post-fijar las muestras en paraformaldehído al 4% pH 7.4 durante 20 minutos.

12. Lavar las laminillas en PBS 1x (DEPC) nuevo dos veces durante 5 minutos cada uno.

13. Lavar en agua DEPC durante 5 minutos

Deshidratar las muestras de la siguiente forma:

	Solución	Tiempo (minutos)
14	Etanol 50%	5
15	Etanol 80%	5
16	Etanol 90%	5
17	Etanol absoluto	5

Nota: todas las soluciones deben estar preparadas con agua tratada con DEPC o libre de nucleasas, es importante que el etanol 90 y 100% estén libres de Xilol.

18. Colocar laminillas en cámara húmeda (SSC 2x) Dejar secar las laminillas durante 20 minutos al aire libre (encender horno de hibridación a 42°C).

19. Preparar sondas de hibridación:

Tubo 1 = mezclar pipeteando varias veces 3µl de sonda sense con 67µl de solución de hibridación (por laminilla).

Tubo 2 = mezclar pipeteando varias veces 3µl de sonda antisense con 67µl de solución de hibridación (por laminilla).

20. Agregar 70µl de sonda de hibridación a cada laminilla y cubrir con papel parafilm evitando dejar burbujas de aire e incubar toda la noche a 42°C (verificar que la cámara húmeda este correctamente cerrada).

D) Post-hibridación y detección

21. Lavar dos veces con buffer de lavado 1 (SSC, SDS) durante 5 minutos cada uno a temperatura ambiente.

22. Lavar dos veces con buffer de lavado 2 (SSC, SDS) durante 5 minutos cada uno a 42°C

23. Lavar con buffer de lavado 3 (Ac. Maléico, tween 20) durante 5 minutos a temperatura ambiente.
24. Drenar las laminillas y colocar en cámara húmeda (SSC 2x), agregar 100µl de solución de bloqueo 1x (10ul solución de bloqueo 10x más 90ul de buffer de ácido maléico) por laminilla, cubrir con parafilm (sin dejar burbujas) e incubar durante 30 minutos a temperatura ambiente.
25. Drenar las laminillas, colocar en cámara húmeda (SSC 2x), agregar 100µl de solución de anticuerpo a cada laminilla (1ul de Anti-Dig mas 999ul PBS 1x 1:100), cubrir con parafilm e incubar durante 1 hora a temperatura ambiente.
26. Lavar dos veces con buffer de lavado 3 (Ac. Maléico, tween 20) durante 5 minutos cada uno a temperatura ambiente.
27. Drenar las laminillas, colocar en cámara húmeda (SSC 2x), agregar 100µl de buffer de detección a cada laminilla, cubrir con parafilm e incubar durante 10 minutos a temperatura ambiente.
28. Drenar las laminillas, colocar en cámara húmeda (SSC 2x), agregar 150µl de solución de revelado (3µL de NBT/BCIP más 147µl de buffer de detección) por laminilla, cubrir con parafilm e incubar durante 1 hora a temperatura ambiente y en oscuridad
29. Lavar las laminillas con agua destilada libre de nucleasas (5 minutos).
30. Contra-teñir con café de Bismark 0.5% durante 15 minutos.
31. Lavar con agua destila libre de nucleasas por 5 minutos.
32. Deshidratar con etanol al 50, 70, 90 % y absoluto. (5 minutos cada uno)
33. Pasar por dos xiloles, montar las laminillas colocando resina y cubreobjetos sin dejar burbujas. Dejar secar toda una noche a temperatura ambiente.

Anexo XI: Secuencias utilizadas para el análisis filogenético: en la columna Proteína se muestra el nombre con el que está registrada cada proteína en el *GenBank*, en la columna Acceso o *Genbank* se muestra el numero y/o código de acceso, en la columna Secuencia se muestra la secuencia completa de la proteína y en la columna Especie la especie animal de la cual se aisló, predijo o se caracterizó esta proteína

Proteína	Acceso a <i>GenBank</i>	Secuencia	Especie
Rat_SpeedyA	NP_620210	MRHNQMCCEPPTVTIVHVKSGSNRSHQTRKPVSLKRPILK DSWQASEKNAHNNKPKRPRGPCIHQEMTAFFKLFDDDD LIQDFLWMDCCCKIADKYLLAMTFVYFKRAKFTISEHTRIN FFIALYLANTVEEDEEEEAKYEIFPWALGKNWRKLFNFKL RDQLWDRIDYRAIVSRCCCEVMAIAPSHYIWQRERSVHHS GAARNYNRDEVHLPRGPSATPVDCSLCGKKGRYVRLGLSS SSSSSDIVELTGKRSQELHNSLSMDMIGDPSQANTYSQVA NDHQSKKENETNFVKKTKSMGWFAESEE	<i>Rattus norvegicus</i>
Rat_SpeedyB1	EDL89682.1	MGEETPGVDSARVQEEGGIDQSPGFVERGIQVGRIVTAGQL SLCSEEQSPQGITRPSGVVVDGEISGTAEPRVEARSQPPSS SPKRKRDLSSDSEDDLAELLEDPQPVWSVETLCGLRMRLK RRRVSTVRPEHHKVFTRLLEDPVVKKFLNWDKMLRVSDK YLLSMVIA YFSRAGLFSWQYRPIHFFLALYLANDMEEDNQ APKQDIFYFLYGKSYAQRPMFHKLRFQFIRSMGWRIWVSRE ECEEIQAYNPDLWVWARDRTNLT	<i>Rattus norvegicus</i>
Rat_SpeedyB3	NP_001019483.1	MSTPVASETQRLQPKKGGQKRKVPVKAMLAVTDRRSEM SPVSPKVSCKQNDGKQVPGDKVCLAQKAPQASSILASSDA SAGDVPEQRSKRKRGRQKRKLENIKTDPEACIVLASSDASA GDVPVQRTKRKRKHKTTLVDVKAATQENSMQASSTATP EAAPGTASELKFLRRGKRKSIWTVDRIEGTKLIMNKKRRPS YRPEDLEAFYRLEDPVVQNFLAADIFFRVTDKYLLSMVVE YFGRVGLPGLYNRIHFFLALYIACDMEEDDPISKRSIFQFL GRDTWQDLYKDFLKLQRDFQAMDYRAWVVTPEQCVEIQN QNP HHVVWSRVRQGT	<i>Rattus norvegicus</i>
Mouse_Speedy A	NP_001136103	MRHNQMYCETPPTVTIVHVKSGSNRSHQTRKPISLKRPILKDS WEASENNAQNNSKPRPRGPCIHQEMTAFFKLFDDDDLIQ DFLWMDCCCKIADKYLLAMTFVYFKRAKFTINEHTRINFFI ALYLANTVEEDEEEEAKYEIFPWALGKNWRKLFNFKLRLD QLWDRIDYRAIVSRCCCEVMAIAPTHYIWQRERSVHHS AVRNYNRDEVHLPRGPSATPVDCSLCGKKGRYVRLGLSS SSSSSDTGELMEKGSQELHSAFVSDTAGDPPHTYSQGM	<i>Mus musculus</i>
Mouse_Speedy AL	NP_083530	MRHNQMYCETPPTVTIVHVKSGSNRSHQTRKPISLKRPILKDS WEASENNAQNNSKPRPRGPCIHQEMTAFFKLFDDDDLIQ DFLWMDCCCKIADKYLLAMTFVYFKRAKFTINEHTRINFFI ALYLANTVEEDEEEEAKYEIFPWALGKNWRKLFNFKLRLD QLWDRIDYRAIVSRCCCEVMAIAPTHYIWQRERSVHHS AVRNYNRDEVHLPRGPSATPVDCSLCGKKGRYVRLGLSS SSSSSDTGELMEKDSQELHSAFVSDTAGDPPHTYSQVANDH QSNKENETNFVKKNKSVWFAESEE	<i>Mus musculus</i>

Continua →

Proteína	Acceso a GenBank	Secuencia	Especie
Mouse_Speedy B1a	NP_083324.3	MGEGTPGVDSARVQEEGGRDQSLGFVEGRIQVGRIVTAGQ LSLCSEEQSPQPGITRPSGTVVVDGESSGLAEPRVEATPQPPS SIQKRKRDESLDSEDDLAELFEPDPQPVWSVEMLCGLRMRL KRRRVSTVRPEHHKVFTKLEDPVVKKFLTWDKMLRVSD KYLMSMVIAYFSRAGLFSWQYRPIHFFLALYLANDMEEDN QAPKQDIFYFLYGKSYAQRPMFHKLRFQFIRSMGWKIWVS REECEEIQAYNPDLWVWARDRTNLT	<i>Mus musculus</i>
Mouse_Speedy B1b	NP_808548.1	MVMPWSSPLCTMPSKSAFFSQPRVEATPQPPSSIQKRKRDE SSDSEDDLAELFEPDPQPVWSVETPCGLRMTLQRQCVSTVR PEHHKVFTKLEDPVVKKFLTWDKMLRVSDKYLMSMVIAY FSRAGLFSWQYRPIHFFLALYLANDMEEDNQAPKQDIFYFL YGKSYAQRPMFHKLRFQFIRSMGWRIWVSQEECEEIQAYD PELWVWTRDRTKLTQNPVMDTRGHPPAIDPCA	<i>Mus musculus</i>
Mouse_Speedy B3	JQ_023159.6	MSTPVASDTPRLQKPTKGGKVKVPVKATIGVSSDRRSEMS PVSSKESCKQNDGKQVPADSVCLAKKAPQVTSILASSDGS AGDVPEQRSKRKKKGQRKRKLDNIKMDPEVCVTLASSDASA GDVPVQRTKRKRAHKTRTLVDVKAIIQEGSVLASSSTATPE AAPGATSKLKFPRRGKRSIWA VNRIEGMKILNKKRRASY RPEDLEAFYRLLEDVQNFVLAADIFFRVTDKYLMSMVEY FGRVGLPGHLYNRIYFFLALYIACDMEEDDPISKRSIFQFL GRDTWQGLYKDFLKLQDFILAMDYQAWVTPDQCAEIQN QNPQHVVWSRVRQGT	<i>Mus musculus</i>
Chimp_Speedy A	XP_515374	MRHNQMCCETPTTVTVYVKSNSRSHQPKKPITLKRPIFKD NWQAFEKNTNHNKSKRPKGPCLVIQRQDMTAFKLFDD DLIQDFLWMDCCCKIADKYLAMTFVYFKRAKFTISEHTRI NFFIALYLANTVEEDEEETKYEIFPWALGKNWRKLFNFK LRDQLWDRIDYRAIVSRRCCEEVMAIAPTHYIWQRERSVH HSGAVRNYNRDEVQLPRGPSATPVDCSLCGKKRRYVRLGL SSSSLSSTAGVTEKHSQDSYNLSMDIIGDPSQAYTGSEV VNDHQSNKGKKTNFLKDKSMEWFTGSEE	<i>Pan troglodytes</i>
Chimp_Speedy B1	XP_511850.2	MASGQARPPFEEESPQSTTVRSPEVVVDDEVPGPSAAWID PSVQPQLDLKRSWSESEEELELELERAPEPEDTWV VEMLCGLKMKLKRKRASSVLPPEHHKAFNRLLGDPVVQKF LAWDKDLRVSDKYLAMVIA YFSRAGLFSWQYQRIHFFLA LYV ASDMEEDNQAPKQDIFSFLYGKNYSQRPLFHKLRYQL LCSMRWRTWVSPEEMEENTGPRGDGNFQQEVYRDANARH QEGREEPPVQI	<i>Pan troglodytes</i>
Chimp_Speedy B2	XP_001149803	MGQILGKIMMSHQPPQEEQSPQRSTSGYPLQEVDDEVS GPSAPGVDPSPRRSLGWKRKRECLDESDEPEKELAPEPE ETWVAETLCGLKMKAKRRRVSLVLPPEYEA FNRLLEDVPI KRFLAWDKDLRVSDKYLAMVIA YFSRAGLPSWQYQRIHF FVALYLANDMEEDDEAPKQNIIFLYEETRSHIPLHELWF QLCRYMNPARKNCSQIALFRKHRFHFFCYMHCRAWVSLE ELEEEIQAYDPEHWVWRDRAHLS	<i>Pan troglodytes</i>

Continua →

Proteína	Acceso a GenBank	Secuencia	Especie
Chimp_Speedy B4	XP_508546.3	MLWAIPELGSFPCPISISYEMSDSQDSTTSPVTTQVDLGGCS RQGGGNGFLRFQHQEVQAFLSLEDSFVQEFLSKDPCFQI SDKYLLAMVLYVFQRAHLKLSEYTHSSLFLALYLANDMEE DLEGPKCEIFPWALGKDWCLRVGKFLHQRDKLWARMGFR AVVSRQCCEVMAKEPFHWAWTRDRRPHHGGVQRVCPQ VPVRLPRGPGLSPPHCSPGLPQHCSHLLKPVSSKCPSLTS ECHRPPSQNYLSRVKNAWGGDFLIVLPAQMQLPEPGSYSLRI FPKPPARPGH	<i>Pan troglodytes</i>
Human_Speedy A	NP_001008779.1	MRHNQMCCETPPTVTYVYKSGSNRSHQPKKPITLKRICKD NWQAFEKNTNHNKSKRPKGPCLVIQRQDMTAFKLFDD DLIQDFLWMDCCCKIADKYLAMTFVYFKRAKFTISEHTRI NFFIALYLANTVEEDEEETKYEIFPWALGKNWRKLFNFKL LRDQLWDRIDYRAIVSRRCCEEVMAIAPTHYIWQRERSVH HSGAVRNYNRDEVQLPRGPSATPVDCSLCGKRRRYVRLGL SSSSLSSTAGVTEKHSQDSYNLSMDIIGDPSQAYTGSE MI	<i>Homo sapiens</i>
Human_Speedy AL	NP_001136106	MRHNQMCCETPPTVTYVYKSGSNRSHQPKKPITLKRICKD NWQAFEKNTNHNKSKRPKGPCLVIQRQDMTAFKLFDD DLIQDFLWMDCCCKIADKYLAMTFVYFKRAKFTISEHTRI NFFIALYLANTVEEDEEETKYEIFPWALGKNWRKLFNFKL LRDQLWDRIDYRAIVSRRCCEEVMAIAPTHYIWQRERSVH HSGAVRNYNRDEVQLPRGPSATPVDCSLCGKRRRYVRLGL SSSSLSSTAGVTEKHSQDSYNLSMDIIGDPSQAYTGSEV VNDHQSNKGKKTNFKKDKSMEWFTGSEE	<i>Homo sapiens</i>
Human_Speedy B1	NP_001121548.1	MASGQARPPFEESQPSTTVRSPEVVVDDEVPGPSAPWIDP SPQPQSLGLKRRKSEWSESEEELELERAPEPEETWV ETLCGLKMKLKRKRASSVLEPHHEAFNRLGDPVQKFLA WDKDLRVSDKYLAMVIA YFSRAGLFSWQYQRIHFFLALY LASDMEEDNQAPKQDIFSFLYGKNYSQRPLFHKLRYQLLCS MRWRTWVSPEEMEEIQAYDPEHWVWARDRTLIS	<i>Homo sapiens</i>
Human_Speedy B2	NP_001004351.3	MTSHQPQPQEEQPQRSTSGYPLQEVVDDEVSGPSAPGVDP SPPRRSLGCKRKRRECLDESDDPEKELAPEPEETWVAETLC GLKMKAKRRRVSLVLPEYYEAFNRLAPGVDPSPRRSLG CKRKRRECLDESDDPEKELAPEPEETWVAETLCGLKMKAK RRRVSLVLPEYYEAFNRLAPGVDPSPRRSLGCKRKRRECL DESDDPEKELAPEPEETWVAETLCGLKMKAKRRRVSLVL PEYYEAFNRLAPGVDPSPRRSLGCKRKRRECLDESDDPE KELAPEPEETWVAETLCGLKMKAKRRRVSLVLPEYYEAFN RLLAPGVDPSPRRSLGCKRKRRECLDESDDPEKELAPEPE TWVAETLCGLKMKAKRRRVSLVLPEYYEAFNRLLEDPIK RFLAWDKDLRVSDKYLAMVIA YFSRAGLPSWQYQRIHFF LALYLANDMEEDDEAPKQKIFYFLYGKTHSHIPLRPKHWFQ LCRPMNPRARKNCSQIALFQKRRFQFFCSMRCRAWVSPPEL EEIQAYDPEHWVWARDRAHLS	<i>Homo sapiens</i>

Continua →

Proteína	Acceso a GenBank	Secuencia	Especie
Human_Speedy B2-like1	NP_001139682	MDRTETFRFRKRGQITGKITTSRQPHQNEQSPQRSTSGYPLQ EVVDDDEMLGPSAPGVDPSPPCRSLGWKRKREWSDESEEEP EKELAPEPEETWVVEMLCGLKMKLKQQRVSSILPEHHKDF NSQLAPGVDPSPPHRSFCWKRKMEWWDSESESESEEEPRKV LAPEPEEIWVAEMLCGLKMKLKRRRVSLVLPHEHEAFNRL LEDPVIKRFLAWDKDLRVSDKYLLAMVIAYFSRAGFPSWQ YQRIHFFLALYLANDMEEDDEDKQNIHFHLYRKNRSRIPLL RKRWFQLGHSMNPRARKNRSRIPLLRKRRFQLYRSTNPRA RKNRSRIPLLRKRRFQLYRSMNSRARKNRSQIVLFQKRRFH FFCSMSCRAWVSPPELEEIQA YDPEHWVWARDRAHLS	<i>Homo sapiens</i>
Human_Speedy B2-like2	NP_778234.2	MQKHYTVAWFLYSAPGVDPSPPCRSLGWKRKREWSDESE EEPEKELAPEPEETWVVEMLCGLKMKLKQQRVSPILLEHHK DFNSQLAPGVDPSPPHRSFCWKRKMEWWDKSESESEEEPRK VLAPEPEEIWVAEMLCGLKMKLKRRRVSLVLPHEHEAFNR LLEDPVIKRFLAWDKDLRVSDKYLLAMVIAYFSRAGFPSW QYQRLHFFLALYLANDMEEDDEDKQNIHFHLYGKNRSRIPL LLRKRFRFQLYRSMNPRARKNRSRIPLVRKRRFQLRRCMNP RARKNRSQIVLFQKRRFHFFCSMSCRAWVSPPELEEIQA YD PEHWVWARDRARLS	<i>Homo sapiens</i>
Human_Speedy B4	NP_001008778.1,	MLWAIPELGSPCIPISISYEMSDSQDPTTSPVTTQVELGGCS RQGGGNGFLRFQHQEVQAFSLLEDSFVQEFLSKDPFCQI SDKYLLAMVLYVFQRAHLKLSEYTHSSLFLALYLANDMEE DLEGPKCEIFPWALGKDWCLRVGKFLHQDKLWARMGFR AVVSRQCCEVMAKEPFHWAWTRDRRPHGGVQRCVCPQ VPVRLPRGGLSPPHCSPGLPQHCSHLLKPVSSKCPSLTS ECHRPPSQNYLSRVKNAWGGDFLIVLPPQMQLPEPGTYSRLI FPKPPARPGH	<i>Homo sapiens</i>
Xenopus_SpeedyA	NP_001081714.1,	MRHMQSVTRASSICGSGVKQVIGKGPHARVVGARKAQIP EREELSVKPKMVRNTHLNLQPQERQAFYRLENEQIQEFLS MDSCLRISDKYLIAMVLA YFKRAAGLYTSEYTTMNFVAL YLANDMEEDEEDYKYEIFPWALGDSWRELFQFLRLRDDF WAKMNYRAVVSRRCCDEVMSKDPHTWAWLRDRPMHHS GAMRGYLRNEDDFPRGPGLTPASCTLCHKAGVCDSSGGVS HNNSSPEQEIFHYTNREWSQELLMLPPELLLDPECTHDLHI LQEPLVGLPDGTALEWHHL	<i>Xenopus laevis</i>
Xenopus_SpeedyB	NP_001081976.1	MRHMQSATRATLVCGSGVKQIIAKGHPNTRVFGARKAKIP EREVLAAPKPKITRITHLNLQPQERQAFYRLENELIQEFLSM DSCLKISDKYLIAMVLA YFKRAGLYTSEYTTMNFVALYLA NDMEEDEEDYKYEIFPWALGDSWREFFQFLRLRDDFWAK MNYRAVVSRRCCDEVMAKDPHTWAWLRDRPIHHSALR GYLRNEDDFPRGPGLTPASCALCHKASVCDSSGGVSHDNSS PEQEIFHYTNREWSQELLMLPPELLLDPESTYDIHIFQEPLVGL EPDGAALEWHHL	<i>Xenopus laevis</i>

Continua →

Proteína	Acceso a GenBank	Secuencia	Especie
Zebrafish_SpeedyA	NP_001006091.1	MIKLSLPWLETAPSGAAHSLQIRRGPRKTRPGSAGRNSADS SQQPRTKTPGPTLLIQRQEMAAFFRLFDDDLIQDFLWMDCC CKLTDKYLAMTFVYFRRARFSIGEHSRINFFLALYLANTM EEDEEETKYEIFPWALGKSWRKHFPRFLKQRDQLWARIEYR AAVSRRCCEEVMAIVPSHFVWQRERAHEHSGAQRLQQNRE EILVPRGPAASPEPCFLCAKTSALVPRPSSAGPRSSSAPLER KASHRASKTTKAQHTCKYKPIAGSDVVSEMCHDHSMDWI NEE	<i>Danio rerio</i>
Eshark_SpeedyA	AEW46999.1	MRNNQLCCQTPPSITVHMKPGSRLNQQKKVTKLKQQPCI QKMRGKNTNVISKPKHARGPCLIIQRQEMAAFFKLFDDDLI QDFLWMDCCCKVSDKYLLAMTFVYFKRAGFQISDQTRMN FFVALYLANTMEEDEEEYKYEIFPWALGKQWKKVYPDFLK QRDQLWARINYRAAVSKRCCEEVMAIAPTHYIWQRGRPVH HSGAIRRYARNDVKLPRGPCDTPFHCSLGGQKEEFLGMYP SSSSCESQKDLCRNDLDEHLDGMEPDTCYSSAEHQSFKN GAKYCLAIKDRSMDWFIGNEE	<i>Callorhynchus milii</i>
Eshark_SpeedyB	AEW47000.1	MRHGQTHSHPHSSVTVQVKGVTRLPGPDGEMLGWTPCPR EGLAAEDSKPLDGFAPDPSSAAQRQLEAFRLRDDNVIQD FLWMDCCCRVADKYLLAMVLTIFYKRASLLTSDYSRNMFF LALYLANDMEEDEEQYKYEIFPWALGEDWRRHIPHFLSLR VELWAQMNFRAAVSRRCCEEVISEIPSHYIWHDRPVHHG GAVRSYLQKETVPYPTGPNGTTPHCTLCHPAHSYLSLNSHS SSSSPGSQTLLDWDWPQDLLILSPALLIDRSFEALQEVLGNG ESDGQDYSCCL	<i>Callorhynchus milii</i>
Chicken_SpeedyA	XP_419361.2	MSVLTLVRSFVQPLLAAMRHSLVYHTPPAAHLKPSASRPQ QQKLVPRKRRSSRNRETSEKRAPRGTYGHPAASCLVVVQ RQEMTAFKLFDDDLIQDFLWMDCCCKIADKYLLAMTFVY FKRANFTVDEHTRLNFFVALYLANTVEEDNEESKYEIFPWA LGKNWRKLFDFLKLDRDHLWSRIDYRAIVSRRCCEEVMAI APTHYIWQRERSVYHSGAIRNYNKDEAQLPRGPNNPIP CYLCGKKGRFVRLGLSSSSSSTGSLEVTELCSSQDLKGT FAIEKMLVDSPASSAQDCQSLSSKRRRDNTSNQDKSMDW FTSNEE	<i>Gallus gallus</i>
Stickleback_SpeedyA	AEW47002.1	MKLTRGRCQASPPVTVGKPGSSLSLQTRRGLRPRRANRQ DAKSQAGPRREEMFRAQKTMPTTIVIQRQEMSSFFRLDD VIHDFLWMDYCKLTDKYLLAMTFVYFKRACFTIAQYTRK NFFIALYLANTMEEDEEEGKYEIFPWALGKHWRKQFPRFLK QRDMFVARVEYRAAVSRRCCEEVMDIVPSHLAWQRERSE HHSGAQRQYGERDHTRIPRGPFPVPCSLCKRGAASDQGP GSAASPSRGSNTNHAFPPFNALSLEVTTPPRAAACLRRA AEAKYQTHPSVCCGKKVSQ	<i>Gasterosteus</i>

Continua →

Proteína	Acceso a GenBank	Secuencia	Especie
Tetraodon_SpeedyA	AEW47004.1	MKHKSRRHPPPYETVWVNPITGSHSVPIRRELGLRRADNC QRVGKSRPGLRQADICCAKRSKSVARTFAIDSQEMASFFNL FDDQLIRDFLFKDSCCKMTDKYLLAMTFVYFKRARFAVAE YTRKNFFIALYLANTMEEDEEEIKYEIFPWTGKNWKKKFP VFLKQRDELWARMEYRAAVSRHCCEEVMAIYPSHSLWQR ERSEHSGAQRQYGDHSLPFPRGSPASPVFCALCNRSSVSD QGSFSCSTSKENLIPVFNPFMTMDLIMLCTSLMLNYLVNS FDKHVQQRPLHGLVPDR GRAPWPAVH	<i>Tetraodon nigroviridis</i>
Ciona_Speedy	XP_002122378	MSKMNSNQVVTKYVLYLSNSQHKSRRRLGKQCQEAHDI CVPTKRSKESMEKLNKNTKPC LHITINEIDAFFSLFEDNTIQE FLALDSCFRISDKYLLAMVLT YFKRAHLHVSEYNVINFFTA LYLANDMAEDEEEFKYEIFPWALGEEWRDLYPGFLAQREK LWRKMKHRASVSRKCCCEAMEIQADHEIWSRERNEVHGG AKRNHLKSKEEKPFPRGPGRSPIPCSVKINSSGYYSDD SIISDDMNILHVSTDSPPDEYFTHRNIKSKPRLKSKDIERGDA EESSFDMKELWETLS	<i>Ciona intestinalis</i>
hypothetical protein LOTGIDRAFT_66401	XP_009062439.1	VKPKEMKAFFGLLADELIQDFLEADSCIKISDKYLLAMVFA YFKRACFSIREYTRTNFFMAL YLANDVEEDEDLKYEIFPW ALGRRWKDKYPQFLRRDRFLKRIGYRAVVSRRCCDEIMA LTPRNLYWNRERP VHHAGAIRNYMREPDDDGYPGPGASP RICRDC	<i>Lottia gigantea</i>
Speedy protein 1-B	EKC24735.1	MDEFEDSNEPHRVKRPRALIEERIPICKFTGTGFYSEHHVS TRHHFAVKRTEMRAYFRILLEDDVIQDFLQRDACQRISDKY LLAMVFAYFKRAQMKTKDYSRMNFLLALYLANDMEEDEE DDKYEIFPWALGNKWKDRFPFLRKKDLFWARISYRAVVS RRCCEEIMDIYPDHACWKRNRPAHHS GAIRSYVREAEGDD GYPRGNASPRPCALCEPCDSQYDASPDREEWILSNDDIFD NSQEESFDMKPLKKNLPDES DGRSVAEE	<i>Crassostrea gigas</i>
PREDICTED: speedy protein A-like isoform X1	XP_005090813.1	MQTMVSLACFRLENKFEDKETQLKLDVHHMILENCGQC YRDSCGDCNSTETHKICVKNKRRGKRYQPFTASSWRKFA AIGGHSLFPRDHRFLSLGTNQCKDPQKSVSEQASNNNSRFIV KLKELKEFFKLTDDKVIRDFLKADSCRRIADKYLAMVFAY FKRADFKVKDYTRMNFICLYLANDVEEDEEEIKYEIFPWV FGKKWKDKCVSFLKMRDLFLRRIDYKAIISRKCCDEIMAIE PDNSVWKRRERPLHHGGAFRSYMKSPDDDGWPRGPKGSPR FCSECNAPDSQYDSASTTSTCWYVSSRDSSPNSSAPSTGD SSDALQVQDLRRTL PKDVNDDVWPTAEE	<i>Aplysia californica</i>
PREDICTED: speedy protein A-like isoform X4	XP_005090816.1	MILENCGQCYRDSCGDCNSTETHKICVKNKRRGKRYQPF TASSWRKFAAIGGHSLFPRDHRFLSLGTNQCKDPQKSVSEQ ASNNNSRFIVKLKELKEFFKLTDDKVIRDFLKADSCRRIADK YLAMVFAYFKRADFKVKDYTRMNFICLYLANDVEEDEE EIKYEIFPWVFGKKWKDKCVSFLKMRDLFLRRIDYKAIISR KCCDEIMAIEPDNSVWKRRERPLHHGGAFRSYMKSPDDDG WPRGPKGSPFCSECNAPDSQYDSASTTSTCWYVSSRDSSP NNSSAPSTGDSSDALQVQDLRRTL PKDVNDDVWPTAEE	<i>Aplysia californica</i>

Continua →

Proteína	Acceso a GenBank	Secuencia	Especie
PREDICTED: speedy protein A-like	XP_002737181.1	MSVCVQKNPHFSPLYQFGEGYHNHLPSEKAFWTRNREHLE DLREPSTFSCRYSAHPPMYSGDSTLSESGCLQFFIDSKDSRP VFISRNKNQTQVVQRRENAGRKPKVVQAKRSRKESDSQEE DGRMSPLFSPPKRAKNSTVTVKSKEMAAFFRLFDDDDVIQDF MWMDKCAKIADRHLAMVFA YFKRANYSTKHYTRTNFFV ALYLAHDMEEDEEDYKYEIFPWALGKAWKDRYPNFKQR DKLWKSIDYRAAVSRKCCEEVISICPENDIWQRIRKNHHGG AIRSYNRSDDYDGYPRGPGVSPKCSECTNARQWNKSLVIT DSDSPVTTACLYLSSCTDTSSDSIEDHSEKDEDQILPGRFNM EDLKETLHTDPNDSFFWAHEEE	<i>Saccoglossus kowalevskii</i>
speedy protein	AEW47001.1	MEGQYEEWHKTAGPSPLVASKQETPILTRPLVPHVGKSLLS KRSRTPERPAPCPPLAKRMKKPSLIVKTTEMDAFFRLIDD DLIQDFLWMDRCCRIADKYLAMVFA YFKRVGYSVQQYN RMNFFVSLYLANDMEEDEDDMKYEIFPWALGVDWRSRYP RFLRRRDHLWEAMHYRAAVSRKCCEEIMLIAPLHNIWQRL RSDNHAGATRHYPKDEHDYEPRGPGYEPIYCALCQVEMIS	<i>Branchiostoma floridae</i>
PREDICTED: speedy protein A-like	XP_782631.3	MLSVRGAGGRSGTSRETVPDKLTGIENDEISAPVRFNSCFR RKQPQKMIVTSEEITAFFRLFDDDDVIQDFLWMDCCAKTAD KYLAMVFA YFKRAQYTIKLYTRMNFFVALYLASDMEEDE EDDKYNIFPWALGRNWRNTYPGLLRKRDRLLRTIQYRAAV SRKCCEEVMSLVPDHIIWKRDRMPHHAGAVRKYDPYDDD NEAIPMGPDATPVHCRACEKAGSFSFDVDIQQSPDSGFLYL SSCTDSSSTESVEEMDSSYSKLEVLPTKGLGGFNFEESIWA ARDE	<i>Strongylocentrotus purpuratus</i>
Nsubp33 Ringo/Speedy	sin acceso	MKCSTNRMPPISEVNQSTQQCFVVKEREMTAFFKLMNDEH LQDFLYMDKCKRISDKYLIAMVFAFFKRAQLKIREYTKMN FFIGLYLANDMEEDDEEAKYEIFPWALGHKWRDRFPRFLR RRDLFWAKIGYKAVVSKRCCEEIMEIDKESLLWMRNRPLH HGGAVRSYNKDPDDDGITSESKNLKRHQPFQTATKLTMA INSPGMFYATIKFYLSKNTIQCENKIFFFRNAPCTLRGYHC LYHMLYRECIQRYLNRILYRMLYREPIQRYLNRILYRML YREPIQRYLNRILYSMLYRGRIHRYSNRILYRIFYREYIER YLNRFILIRIPFN	<i>Nodipecten subnodosus</i>
