



UNIVERSIDAD TÉCNICA DE MANABÍ
FACULTAD DE CIENCIAS VETERINARIAS
CARRERA DE INGENIERÍA EN ACUICULTURA Y
PESQUERÍAS

TESIS DE GRADO

PREVIO A LA OBTENCION DEL TITULO DE INGENIERO EN
ACUICULTURA Y PESQUERÍAS

"EVALUACIÓN DE PRIMERS EN LA IDENTIFICACIÓN DEL
GEN PEPT1 EN DIFERENTES TEJIDOS DE JUVENILES
HÍBRIDOS DE TILAPIA RED FLORIDA"

AUTORES:

HIDALGO SANTOS MIGUEL ÁNGEL

REYES MERO ANDRÉS MARCELO

DIRECTOR:

BIÓL. JUAN MANUEL VERA DELGADO, M.Sc.

BAHÍA DE CARAQUÉZ

2016

TABLA DE CONTENIDO

| | |
|---------------------------------------|-------------------------------|
| DEDICATORIA | ¡Error! Marcador no definido. |
| AGRADECIMIENTO..... | ¡Error! Marcador no definido. |
| CERTIFICACIÓN | ¡Error! Marcador no definido. |
| AUTORÍA..... | ¡Error! Marcador no definido. |
| TABLA DE CONTENIDO | II |
| RESUMEN..... | VII |
| ABSTRACT..... | VIII |
| ABREVIATURAS | IX |
| 1. INTRODUCCIÓN | 17 |
| 2. ANTECEDENTES Y JUSTIFICACIÓN | 19 |
| 3. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA | 22 |
| 4. OBJETIVOS DE LA INVESTIGACIÓN..... | 23 |
| 4.1. OBJETIVO GENERAL | 23 |
| 4.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS | 23 |
| 5. MARCO TEÓRICO..... | 24 |
| 5.1. DIGESTIÓN DE PROTEÍNAS | 24 |
| 5.2. PEPT1..... | 25 |
| 5.3. EXTRACCIÓN DE ADN | 28 |
| 5.4. PCR..... | 29 |
| 5.4.1. COMPONENTES DE LA PCR..... | 30 |
| 5.4.2. ETAPAS DE LA PCR | 31 |
| 5.5. ELECTROFORESIS | 33 |
| 6. HIPOTESIS..... | 35 |
| 7. VARIABLES | 36 |
| 8. DISEÑO METODOLÓGICO..... | 38 |
| 8.1. TIPO DE ESTUDIO | 38 |
| 8.2. ÁREA DE ESTUDIO..... | 38 |
| 8.3. MANTENIMIENTO DE LOS PECES | 38 |

| | |
|--|----|
| 8.4. DISECCIÓN Y CONSERVACIÓN DE MUESTRAS DE TEJIDOS | 39 |
| 8.5. EXTRACCIÓN DE ÁCIDOS NUCLEICOS A PARTIR DE TEJIDOS | 41 |
| 8.6. USO DE INICIADORES (JUEGOS DE PRIMERS) | 43 |
| 8.7. AMPLIFICACIÓN POR PCR | 44 |
| 8.7.1. COMPONENTES DE LA PCR..... | 45 |
| 8.7.2. PROGRAMACIÓN DEL TERMOCICLADOR..... | 46 |
| 8.8. ELECTROFORESIS DE PRODUCTOS DE LA PCR EN GEL DE AGAROSA..... | 47 |
| 8.8.1. PREPARACIÓN DEL TAMPÓN DE ELECTROFORESIS..... | 47 |
| 8.8.2. PREPARACIÓN DEL GEL DE AGAROSA | 47 |
| 9. EQUIPOS, MATERIALES Y RECURSOS | 50 |
| 9.1. EQUIPOS | 50 |
| 9.2. MATERIALES..... | 50 |
| 9.2.1. MATERIALES DE LABORATORIO DE BIOTECNOLOGÍA | 50 |
| 9.2.2. MATERIALES DE LABORATORIO DE ACUICULTURA Y PESQUERÍAS. | 51 |
| 9.2.3. REACTIVOS..... | 51 |
| 9.3. RECURSOS | 52 |
| 9.3.1. ECONÓMICOS | 52 |
| 9.3.2. HUMANOS..... | 52 |
| 10. ANÁLISIS E INTERPRETACIÓN DE RESULTADOS | 53 |
| 10.1. CONSERVACIÓN DE MUESTRAS DE TEJIDO | 53 |
| 10.2. EVALUACIÓN Y AMPLIFICACIÓN DE PRIMERS | 55 |
| 11. DISCUSION | 59 |
| 12. CONCLUSION Y RECOMENDACIONES | 62 |
| 12.1. CONCLUSIONES..... | 62 |
| 2.2. RECOMENDACIONES | 64 |
| 13. PRESUPUESTO | 65 |
| 14. CRONOGRAMA..... | 68 |
| 15. BIBLIOGRAFÍA..... | 69 |
| ANEXO 1..... | 76 |
| ANEXO 2..... | 77 |
| ANEXO 3..... | 78 |

ÍNDICE DE TABLAS

| | |
|---|-----|
| Tabla 1. Variables y su operacionalización..... | 366 |
| Tabla 2. Rotulos de muestras | 400 |
| Tabla 3. Lista de iniciadores “primers”, utilizados para el estudio de la identificación del gen péptido trasportador 1 (PepT1)..... | 444 |
| Tabla 4. Iniciadores utilizados en el proceso de PCR para la amplificación de PepT1. | 455 |
| Tabla 5. Programación del termociclador | 555 |
| Tabla 6. Presupuesto del proyecto..... | 654 |
| Tabla 7. Cronograma de actividades. | 687 |

ÍNDICE DE FIGURAS

| | |
|--|-----|
| Figura 1. Peces en los que se ha estudiado gen PepT1 | 266 |
| Figura 2. Función de PepT1 (Mecanismo electrogénico) | 27 |
| Figura 3. Mapa genético del gen péptido transportador (PepT1) en tilapias(Motte, E. 2013) | 28 |
| Figura 4. Etapas de la PCR para la amplificación de ADN | 311 |

ÍNDICE DE FOTOGRAFÍAS

| | |
|--|----|
| Fot. 1. Tanques donde se mantuvieron los juveniles de tilapia Red Florida. | 39 |
| Fot. 2 y 3. Disección y extracción de muestras de tejidos de tilapias..... | 39 |
| Fot. 4, 5 y 6. Conservación y transporte de muestras de tejidos de tilapia..... | 41 |
| Fot. 7, 8, 9, 10. Mini Kits y Proceso de extracción de ADN de juveniles de tilapia..... | 43 |
| Fot. 11. Termociclador, máquina que calienta y enfría la reacción en temperaturas precisas para que se den las reacciones de PCR. | 46 |
| Fot. 12, 13, 14, 15, 16, 17. Proceso de electroforesis con gel de agarosa. | 49 |
| Fot. 18 y 19. Muestras de tejidos conservados a temperatura ambiente y ultraconelación a -18 °C..... | 53 |
| Fot. 20. Gel de agarosa con muestras de tejidos de tilapia conservados a temperatura ambiente y ultra congelación utilizando Fw2 – Re2..... | 54 |
| Fot. 21. Gel de agarosa con amplicones migrados resultantes de 11Fw – 6bRev | 55 |
| Fot. 22 y 23. Gel de agarosa con amplicones migrados resultantes de primers FW2 – Rev2.. | 56 |
| Fot. 24 y 25. Gel de agarosa con amplicones migrados resultantes de primer Fw2 – Rev 3.. | 57 |
| Fot. 26. Gel de garosa con amplicones migrados resultantes de primer 16Fw – 6bRev.. | 58 |

RESUMEN

En la presente investigación se utilizaron juegos de primers para la identificación en el gen PepT1 en diferentes tejidos de juveniles híbridos de tilapia Red Florida. El objetivo fue encontrar, dentro cuatro pares de primers diseñados mediante bioinformática, el par de primers específico en la amplificación del gen PepT1. El procesamiento de las muestras se inició con la fijación en etanol al 96% de los tejidos de las tilapia de juveniles bajo dos condiciones de temperatura: ambiente y ultracongelación a -18°C. El protocolo de extracción de ADN que se utilizó fue el de Mini Kit PureLink® Genomic DNA (Catalog Numbers K1820-01, K1820-02, K1821-04) INVITROGEN®. Para la amplificación por PCR de las diferentes regiones pertenecientes al gen PepT1, se realizó varias modificaciones de la programación del termociclador. Los amplicones fueron analizados por electroforesis en gel de agarosa. El juego de primers con mayor efectividad fue el 11 Fw – 6bRev pues se visualizó una sola banda en electroforesis, los demás presentaron doble banda, adicionalmente la condición de conservación ideal fue la de temperatura en ambiente por su mejor observación en el gel. Este estudio ayudará en investigaciones nutricionales posteriores de cría de tilapia, pues permite abaratar costos y menor tiempo requerido para análisis por la utilización de este primer específico, asimismo la medición de expresión del gen PepT1 evidencia la asimilación de nutrientes ligado al mismo.

ABSTRACT

In the present investigation primer sets for identification in the PepT1 gene in different tissues of juvenile hybrid tilapia Red Florida were used. The goal was to find, within four primer pairs designed by bioinformatics, the pair of specific primers in the amplification of gene PepT1. The sample processing began with ethanol fixation in 96% of tissue juvenile tilapia temperature under two conditions: Ambient and deep freezing at -18 ° C. The DNA extraction protocol used was that of Genomic DNA Mini Kit PureLink® (Catalog Numbers K1820-01, K1820-02, K1821-04) Invitrogen®. For PCR amplification of different regions belonging to PepT1 gene, various modifications of the programming performed thermocycler. The amplicons were analyzed by agarose gel electrophoresis. Primer set was more effectively Fw 11 - 6bRev as a single band in electrophoresis was visualized, the other had double band, additionally the condition ideal holding temperature was room for its better observation gel. This study will help in later investigations nutritional tilapia, allowing lower costs and shorter time required for analysis by use of this first specific also measuring gene expression evidence PepT1 nutrient assimilation linked thereto.

ABREVIATURAS

ADN. Ácido desoxirribonucleico

ATP. Adenosin trifosfato

ARN. Ácido ribonucleico

EDTA. Ácido etilendiaminotetraacético

dNTPs. Deoxinucleótidos trifosfato

g. Gramo

L. Litro

mg. Miligramo

mL. Mililitro

nt. Nucleótido

pb. Pares de bases

PCR. Reacción en Cadena de la Polimerasa

PHT. Polihistidina

TAE. Tris, Ácido Acético y EDTA

TBE. Tris-borato-EDTA

sp. Especie

μL. Microlitros

**"EVALUACIÓN DE PRIMERS EN LA IDENTIFICACION DEL
GEN PEPT1 EN DIFERENTES TEJIDOS DE JUVENILES
HÍBRIDOS DE TILAPIA RED FLORIDA"**



1. INTRODUCCIÓN

La absorción de aminoácidos, hidratos de carbono y ácidos grasos provee requerimientos nutricionales para la vida de un organismo. Se sabe que el transporte de aminoácidos a través de la membrana plasmática en los enterocitos está mediada por varias clases de transportadores de aminoácidos (**Broer, 2008**), pero el transporte de di- y tripéptidos es impulsado únicamente por el péptido transportador intestinal (PepT1). Este transportador es exclusivo del borde en cepillo de la membrana de la mucosa intestinal, identificado en la familia de solutos Carrier 15 miembro A1 (SLC15A1), teniendo una afinidad relativamente baja y alta capacidad transportadora (**Daniel, 2004**).

PepT1 tiene un papel importante en la nutrición de los peces (**Dabrowski et al., 2005**), al transportar grandes cantidades de aminoácidos en forma de péptidos y proporciona nutrientes esenciales para el crecimiento de los peces, y la energía necesaria para el metabolismo y reproducción. En estos organismos se expresa principalmente en el intestino y se encuentra en un grado mucho menor en una variedad de otros órganos/tejidos, incluyendo riñón, hígado, bazo y otros (**Barca et al., 2013**).

Se han realizado investigaciones sobre la expresión de PepT1 en el intestino de lubina (*Dicentrarchus labrax*) tras la privación de alimento, observándose la sobreexpresión del péptido transportador después de un corto periodo de ayuno (7 días) (**Hakim et al., 2009**), aunque esto no se ha observado permanentemente (**Terova et al., 2009**). Independientemente, la privación prolongada de alimento (20-35 días) resultó en una baja regulación de la expresión de PepT1 en peces (**Hakim et**

al., 2009; **Terova et al.**, 2009). Curiosamente, se ha demostrado que los niveles de RNAm de PepT1 aumentan más allá de los parámetros de control tras la reanudación de la alimentación, lo cual se correlaciona con un periodo de crecimiento aumentado y de consumo de alimento (**Terova et al.**, 2009).

El cultivo de tilapia posee una gran importancia en la producción de proteína animal en todo el mundo, particularmente en los países en vía de desarrollo (**Lara - Flores et al.**, 2002). Es fundamental un aporte de conocimientos moleculares a nivel genómico y transcriptómico del gen PepT1, como herramienta en los estudios nutricionales de cría de tilapia y de otros peces de interés comercial.

La importancia de este estudio radica en evaluar pares de cebadores (primers) que sean específicos en la amplificación de un fragmento de ADN genómico del gen PepT1, en diferentes tejidos de juveniles de tilapia Red Florida (*O. mossambicus* X *O. uroleptis hornorum*), utilizando un pool de juegos de primers diseñados con anterioridad por bioinformática para evaluar la expresión de PepT1 (**Vera, 2014**); siendo esto una puerta a siguientes investigaciones en las que se puede aprovechar ciertas funciones del péptido transportador, para mejorar la producción piscícola de la región y el país.

En la investigación se utilizó la técnica de extracción de ADN de los tejidos (intestino, músculo, bazo, branquias, hígado y aleta caudal) de juveniles del citado pez a través de un kit, se procedió a la PCR y su posterior análisis de amplificación sobre que par de primers es eficaz al visualizar los fragmentos obtenidos mediante gel de electroforesis.

2. ANTECEDENTES Y JUSTIFICACIÓN

El péptido transportador 1 (PepT1), miembro de la familia de transportadores de soluto 15 (SLC15), es una proteína de membrana que facilita la captación de di/tri péptidos en el intestino. Después de la primera información de la clonación de PepT1 que se hizo en intestino de conejo (**Fei *et al.*, 1994**), numerosos estudios se han llevado a cabo del transportador y se ha encontrado ahora en un gran número de animales y en diferentes órganos (**Meredith y Boyd, 2000**).

La expresión se limita al borde del cepillo de la membrana de los enterocitos maduros que hace de PepT1 un marcador de diferenciación del enterocito terminal (**Chen *et al.*, 2002; Li *et al.*, 2007**). La expresión en otros tejidos es siempre menor que en el intestino. El papel funcional de PepT1 en otros tejidos es todavía desconocida en peces (**Barca *et al.*, 2013**).

Los estudios en los peces se han dirigido a la secuencia, estructura, función, expresión, localización (tejido/órgano) y/o aspectos de la regulación de PepT1 por los tratamientos dietéticos, hormonales y/o factores ambientales (**Bakke *et al.*, 2010**).

En los peces teleósteos, PepT1 se expresa principalmente en el intestino y se ha encontrado en un grado mucho menor en una variedad de otros órganos/tejidos; incluyendo el riñón, el hígado, el bazo y otros. El análisis de la expresión de ARNm a lo largo del canal alimentario indica que la expresión de PepT1 es invariablemente limitada al intestino (**Verri *et al.*, 2003**). Sin embargo, el patrón de expresión puede diferir significativamente de peces (un grupo) a peces (otro grupo). Así, mientras que en el pez cebra y carpas la expresión de PepT1 se limita estrictamente a la porción proximal del intestino, en el bacalao (orden Gadiformes) y mummichog (*Fundulus*

heteroclitus, orden Cyprinodontiformes) *PepT1* se expresa de forma ubicua en toda la extensión del canal intestinal. Entre estos extremos, están el salmón y la trucha (orden Salmoniformes), que muestran una disminución constante en la expresión de *PepT1* junto a segmentos proximal a distal adyacentes del canal intestinal; y la lubina, la dorada y el draco rayado (orden Perciformes) en que la caída de la expresión proximal a distal parece más pronunciada que en los salmónidos. El ciego pilórico siempre expresa *PepT1* a niveles muy altos, lo que sugiere fuertemente que esta especialización del órgano participa en gran medida en la absorción de di/tripéptidos derivados de la dieta de proteínas (**Barca et al., 2013**).

Vera, (2014), realizó el establecimiento de la técnica RT-qPCR para análisis de expresión del Péptido Transportador 1 (*PepT1*) en células del epitelio intestinal de juveniles de Tilapia (*Oreochromis sp.*). Para el gen se dispuso de dos secuencias de referencia, pero la secuencia XM_003459630 fue considerada para la búsqueda de posibles iniciadores usando el programa Primer-BLAST, el alineamiento de las secuencias usando el programa ClustalW permitió establecer que *PepT1* en tilapia está constituido por 21 exones, cubriendo una región genómica de unos 8938 nucleótidos (nt) y la región codificante corresponde a solo 2274 nucleótidos (nt). Los diferentes iniciadores diseñados y las secuencias seleccionadas mediante el análisis de las regiones con mayor homología en los alineamientos ClustalW, permitieron seleccionar once iniciadores para el análisis de la expresión. El tejido utilizado para la extracción del material genético fue intestinos de juveniles de tilapia, a los cuales se realizó la extracción del ARN, procediendo a la retrotranscripción para obtener el ADNc. Utilizando seis pares de iniciadores en los experimentos de RT-qPCR, se obtuvo los amplicones

esperados. En el establecimiento de la técnica de RT-qPCR, para el desarrollo de las pruebas (curvas de fusión y ploteos de amplificación) los iniciadores seleccionados fueron Fw2-Rev2, Fw2-Rev3 y 11Fw-5Rev. Para la evaluación de la eficiencia de la RT-qPCR, se realizó diluciones (10^{-1} a 10^{-5}) de un amplicón purificado de PepT1 y EF1a (Factor de elongación de peces) (obtenidos de una reacción de RT), para poder comparar la eficacia de la técnica desarrollada; se estableció las curvas de fusión, los ploteos de amplificación y la curva estándar para ambos genes; para evaluar la amplificación de PepT1 se utilizó el juego de iniciadores Fw2-Rev2 por haber presentado un mejor perfil de funcionamiento global y para EF1a se utilizó el par Fw-Rev, que amplifican fragmentos de 223 pb y 189 pb respectivamente (**Vera, 2014**).

Las investigaciones sobre este gen se han dirigido a un grupo de peces (pez cebra, carpa, bacalao, mummichog, lubina dorada y draco rayado) (**Barca et al., 2013**); en cambio los estudios de PepT1 en tilapia son escasos. Es fundamental obtener información de este péptido transportador en el citado pez, debido a que se puede utilizar el conocimiento molecular funcional de este gen en aspectos relacionados con la nutrición.

Obteniendo el par de cebadores específico para la amplificación del gen PepT1 en tilapia Red Florida, se tendrá una herramienta en cuanto a futuros trabajos referentes a la expresión y ventajas del gen en procesos de nutrición, sometiendo a los peces a estrés alimenticios entre otros ensayos y evaluar si existe una ganancia de peso.

3. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Existen diversos estudios del gen PepT1 dirigidos en vertebrados superiores, inclusive en un grupo de peces teleósteos, sin embargo la información en tilapia es escasa.

La presente investigación pretende obtener resultados sobre que par de cebador es específico en la amplificación de un fragmento de ADN del gen transportador, en diferentes tejidos de juveniles híbridos de tilapia Red Florida, utilizando un pool de juegos de primers diseñados con anterioridad por bioinformática para evaluar la expresión de PepT1, siendo este estudio una herramienta en investigaciones nutricionales de cría de tilapia a futuro.

Entre los inconvenientes que existen en relación al tema de investigación, es la falta de trabajos sobre PepT1 en tilapias y no tener información sobre que par de cebador es específico en la amplificación genómica del péptido transportador en este pez.

Por lo antes descrito se formula la siguiente pregunta:

¿Qué par de primers o cebadores dará una mejor amplificación del gen PepT1 en juveniles híbridos de tilapia Red Florida?

4. OBJETIVOS DE LA INVESTIGACIÓN

4.1. OBJETIVO GENERAL

- ❖ Evaluar juegos de primers en la identificación del gen PepT1 en diferentes tejidos de juveniles híbridos de tilapia Red Florida.

4.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- ❖ Extraer ADN genómico de diferentes tejidos de juveniles de tilapia roja híbrida (intestino, músculo, bazo, branquias, hígado y aleta caudal) conservados en alcohol al 96% bajo dos condiciones de temperatura (ambiente y ultra congelación a -18 °C).
- ❖ Validar los juegos de primers que permitan amplificar por PCR diferentes regiones del gen PepT1 en en diferentes tejidos de tilapia Red Florida.

5. MARCO TEÓRICO

5.1. DIGESTIÓN DE PROTEÍNAS

La digestión de los alimentos es un proceso complejo que implica la degradación mecánica y enzimática, a partir de la ingesta de alimentos hasta la absorción de nutrientes en el intestino. En contraste con los vertebrados superiores, donde el desglose mecánico de la comida empieza en la boca, la mayoría de los peces tienen una capacidad limitada para masticar por lo que la primera etapa de degradación es en el estómago. El aumento del volumen del estómago estimula la secreción de ácido clorhídrico, agua y la enzima digestiva pepsina en el lumen. Contracciones musculares, junto con el agua ingerida y las secreciones desde el estómago ayuda a descomponer y mezclar la comida en una masa homogeneizada llamado quimo (**Bakke, 2008**).

La pepsina es la primera enzima implicada en la proteólisis de proteínas ingeridas y se secreta a partir de células parietales como su precursor inactivo, el pepsinógeno. El bajo pH en el estómago activa al pepsinógeno y comienza un proceso autocatalítico que generará pepsina, que luego pueden hidrolizar proteínas de la dieta en grandes polipéptidos (**Ganapathy et al., 2006**). Además las condiciones ácidas también contribuirán directamente a la degradación de proteínas. A medida que el quimo entra en el intestino, más condiciones alcalinas causa la neutralización de la digestión ácida (**Rust, 2002**).

Proteína (y lípidos) en el quimo, estimulan la liberación de la hormona colecistoquinina, que estimula aún más la secreción de enzimas pancreáticas o sus

precursores inactivos en el lumen intestinal (**Buddington y Krogdahl, 2004**). Las formas activas de estas enzimas digestivas son la tripsina, quimotripsina, elastasa y carboxipeptidasa, que a través de su actividad proteolítica rompen polipéptidos en el quimo a péptidos más cortos. El paso final de la hidrólisis de proteínas se completa en el borde en cepillo de la membrana con peptidasas, que descomponen la proteína en aminoácidos absorbibles y cortan péptidos (dos a tres aminoácidos de longitud) (**Ganapathy et al., 2006**). Aunque los aminoácidos se absorben, una proporción importante de proteínas son transportadas sobre el borde en cepillo de la membrana como di y tripéptidos (**Adibi, 1997; Bakke, 2008**).

5.2. PEPT1

PepT1 (SLC15A1; portador de soluto) es un transportador de péptidos dependiente de protones y pertenece a la familia de transportadores de membrana SLC15, que también incluye el péptido transportador renal isoforma PepT2 (SLC15A2) y dos proteínas PHT que transportan histidina y seleccionan péptidos (**Daniel y Kottra, 2008**). El gradiente electroquímico de protones a través de la membrana, permite la absorción de di y tripéptidos contra un gradiente de concentración, lo que permite mayor concentraciones de péptidos intracelular que extracelular, y es estrictamente dependiente de la función del intercambiador de sodio-protón NHE3 en la membrana apical (**Watanabe et al., 2005; Kennedy et al., 2010**). Con su mecanismo de absorción gradiente-dependiente de protones, los transportadores de péptidos pertenecen al grupo de los transportadores "arcaicos". Están presentes en todos los organismos vivos y desarrollados a principios de la evolución, varias isoformas están presentes en las membranas celulares de las procariotas y células eucariotas simples (**Daniel et al., 1994**). En eucariotas multicelulares con una definida distribución de

tejidos, la separación en las formas como *PepT1* intestinal y como *PepT2* renal, se pueden encontrar desde gusanos (*Caenorhabditis elegans*) (Fei *et al.*, 2006 ; Meissner *et al.*, 2012), en peces (*Danio rerio*, *Gadus morhua*) (Verri *et al.*, 1999 ; Ronnestad *et al.*, 1999) y aves (*Gallus gallus domesticus*) (Chen *et al.*, 2008) (*Figura 1*), hasta los mamíferos (*Oryctolagus cuniculus*, *Mus musculus*, *Homo sapiens*) (Liang *et al.*, 2002).

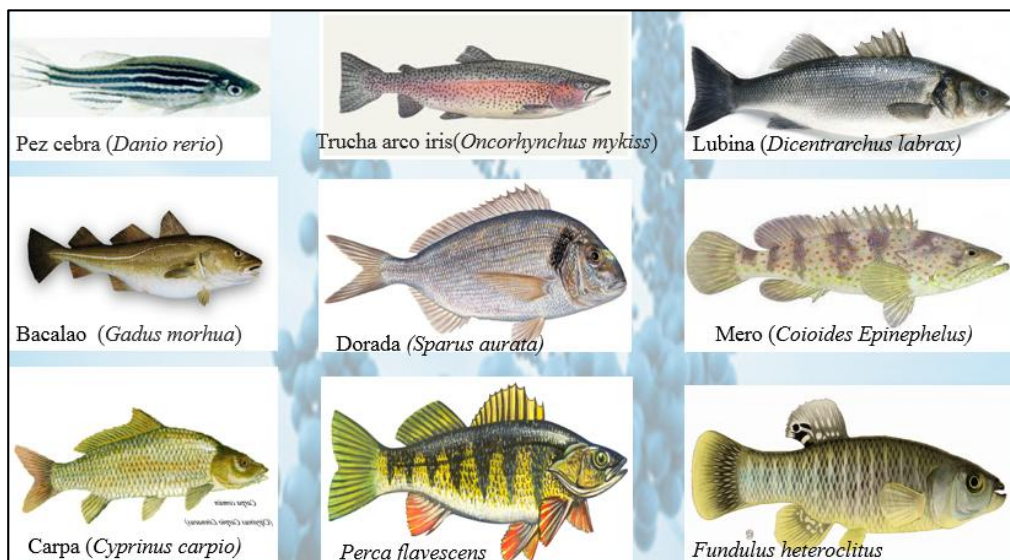


Figura 1. Peces en los que se ha estudiado el gen *PepT1*

Ambas isoformas *PepT* tienen un amplio sustrato patrón, que incluye casi todo; di y tripéptidos formados a partir de aminoácidos L -alfa, así como una gran variedad de derivados, incluyendo medicamentos tales como antibióticos beta-lactámicos, inhibidores de enzima convertidora de angiotensina seleccionada (seleccionando angiotensina convirtiendo inhibidores de enzima), inhibidores de proteasa y antivirales (Rubio y Daniel, 2010; Spanier, 2014).

La vía de transporte de péptidos *PepT1* se realiza de la siguiente manera: Los péptidos son transportados desde el lumen intestinal en las células a través de la

membrana apical. Una vez dentro de las células, los péptidos pueden ser hidrolizados por enzimas celulares y atraviesan la membrana basolateral como aminoácidos o pueden ser fluidos a la sangre a través de un sistema de transporte péptido basolateral. Un gradiente de protones a través de la membrana apical es mantenido por la actividad de un intercambiador Na^+/H^+ , que a su vez es activado por el basolateral $\text{Na}^+/\text{K}^+ -\text{ATPasa}$ (**Figura 2**). El gradiente de protones apical mejora la absorción de sustratos peptídicos (**Brodin et al., 2002**).

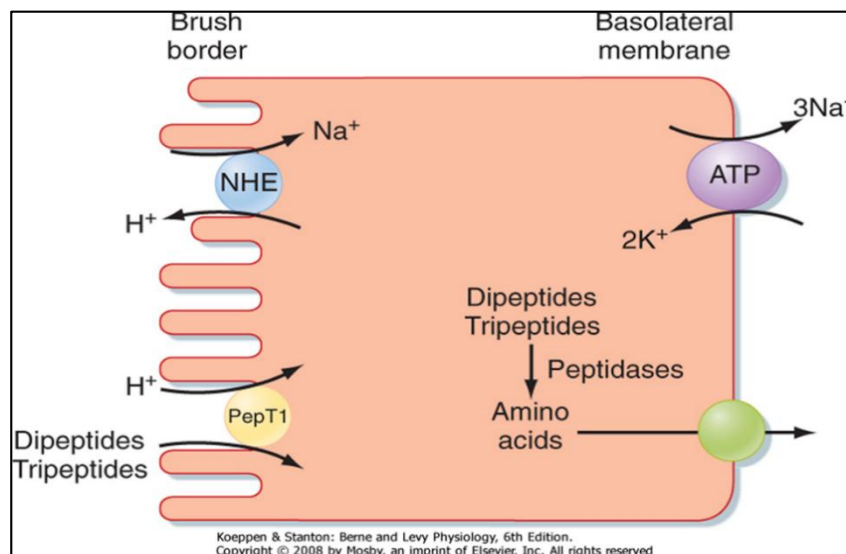


Figura 2. Función de PepT1 (Mecanismo electrogénico)

En la **figura 3** se observa el mapa genético del gen péptido transportador (*PepT1*) en tilapias.

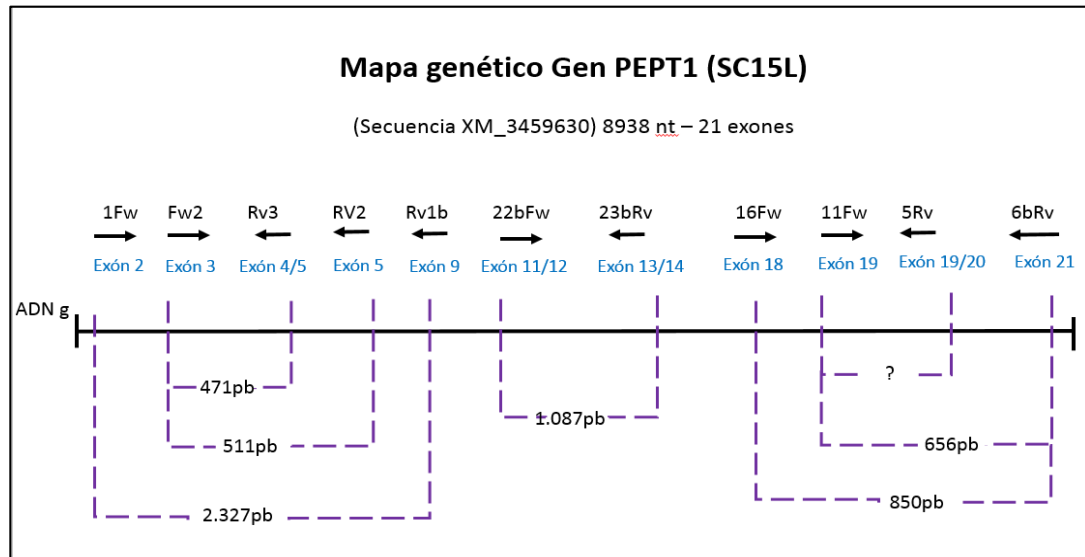


Figura 3. Mapa genético del gen *PepT1* en tilapias (Motte, E. 2013)

5.3. EXTRACCIÓN DE ADN

La extracción de ácidos nucleicos constituye la primera etapa de la mayoría de los estudios de biología molecular y de todas las técnicas de recombinación de ADN. En este caso, los métodos de extracción permiten obtener ácidos purificados a partir de diversas fuentes, para después realizar análisis específicos de modificaciones genéticas mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR). La calidad y la pureza de los ácidos nucleicos son dos de los elementos más importantes en ese tipo de análisis. Si se desea obtener ácidos nucleicos muy purificados, que no contengan contaminantes inhibidores, es preciso aplicar métodos de extracción adecuados (Somma y Querci, 2007).

Para extraer los ácidos nucleicos del material biológico es preciso provocar una lisis celular, inactivar las nucleasas celulares y separarlos de los restos celulares. El procedimiento de lisis idóneo suele consistir en un equilibrio de técnicas y ha de ser suficientemente fuerte para romper el material inicial complejo (un tejido, por ejemplo), pero suficientemente suave para preservar el ácido nucleico diana. Entre los procedimientos usuales de lisis figuran los siguientes:

- Rotura mecánica (trituration, lisis hipotónica, etc.);
- Tratamiento químico (detergentes, reducción con tioles, etc.);
- Digestión enzimática (Proteínasa K, etc.).

Es posible romper la membrana celular e inactivar las nucleasas intracelulares al mismo tiempo. Por ejemplo, una misma solución puede contener detergentes que solubilizan las membranas celulares y sales caotrópicas fuertes que inactiven las enzimas intracelulares. Tras la lisis celular y la inactivación de las nucleasas, los restos de células se eliminan fácilmente por filtración o precipitación (**Somma y Querci, 2007**).

5.4. PCR

La técnica de PCR (reacción en cadena de la polimerasa) por sus siglas provenientes del inglés Polymerase Chain Reaction, fue desarrollada por Kary Mullis en 1985.

Es una técnica científica en biología molecular para amplificar una sola o unas pocas copias de un fragmento de ADN a través de varios órdenes de magnitud, generando miles de millones de copias de una secuencia particular de ADN (**Mohini y Deshpande, 2010**).

5.4.1. COMPONENTES DE LA PCR

5.4.1.1. ADN POLIMERASA

La ADN polimerasa se encarga de la catálisis de la reacción, sintetizando las nuevas cadenas de ADN que llevan la secuencia blanco. La enzima más usada con frecuencia se llama Taq ADN polimerasa, que proviene de una bacteria termófila llamada *Thermus aquaticus*, la cual vive en condiciones de temperatura muy altas y por eso su ADN polimerasa es capaz de soportar ese tipo de temperaturas. El rasgo que distingue a esta enzima bacteriana de otras ADN polimerasas de otros organismos es su capacidad para mantener su funcionalidad a temperaturas altas, por lo que se le considera una enzima termoestable (**Ibarra et al., 2013**).

5.4.1.2. NUCLEÓTIDOS

Se añaden en forma de desoxirribonucleósidos trifosfato (dNTPs: adenina, timina, citosina y guanina), los cuales sirven como sustrato.

5.4.1.2. ADN MOLDE

Es la porción del ADN (ácido desoxirribonucleico) que se quiere amplificar, es decir ADN a partir del cual se obtiene una copia de un fragmento.

5.4.1.3. PRIMER

Primer, iniciador o cebador es un oligonucleótido, es decir, una molécula de ácido nucleico de una sola cadena que se usa para iniciar una reacción de PCR. El primer se pega a la secuencia complementaria y eso permite que la polimerasa en la cadena de ADN comience la elongación o extensión de la molécula de ADN. Son secuencias

cortas, de entre 10-30 nucleótidos, que son reconocidos por la polimerasa permitiendo iniciar la reacción. Estos deben estar enfrentados uno en cada hebra del ADN, para delimitar el fragmento a amplificar (Cortazar y Silva, 2004).

La especificidad de los primers es en parte dependiente de su longitud. Los primers deben ser elegidos de modo que tengan una secuencia única dentro del DNA que será amplificado. Un primers diseñado con una secuencia altamente repetida dará lugar a productos no deseados. Sin embargo, el mismo primers puede dar una sola banda si se amplifica un solo clon de una biblioteca genómica (Cortazar y Silva, op. cit.).

5.4.2. ETAPAS DE LA PCR

La técnica de PCR consiste en una serie de cambios repetidos de temperatura llamados ciclos, las temperaturas usadas y el tiempo aplicado en cada ciclo, dependen de algunos parámetros en los que se incluye, la enzima usada para la síntesis de ADN, la concentración de iones y dNTPs en la reacción (Figura 4); así como la temperatura de unión de los cebadores o primers (Somma y Querci, 2007).

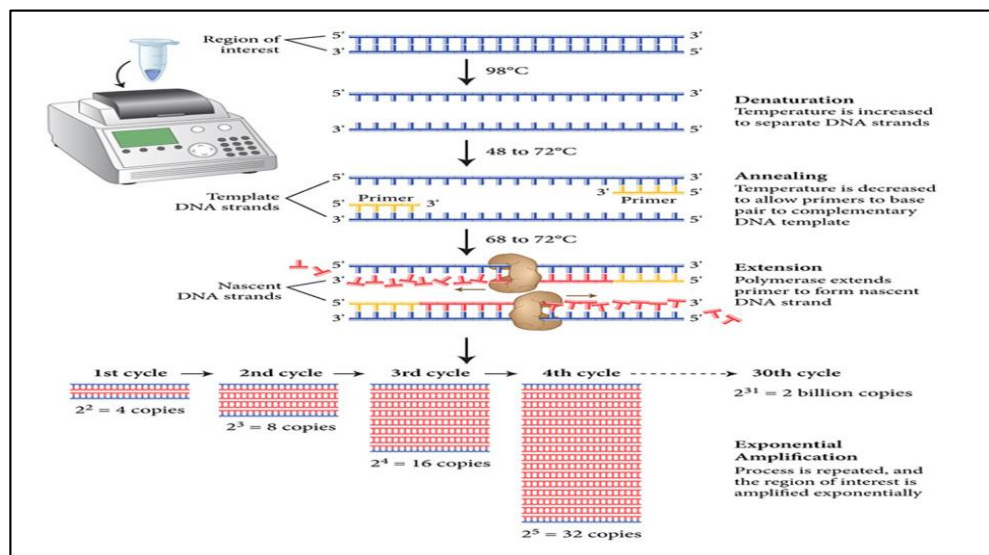


Figura 4. Etapas de la PCR para la amplificación de ADN.

5.4.2.1. DESNATURALIZACIÓN DEL ADN MOLDE

Durante la desnaturalización, la hebra doble se funde, abriéndose para dar ADN monocatenario, y se detienen todas las reacciones enzimáticas (es decir, la extensión de un ciclo anterior). Las dos cadenas complementarias se separan por el aumento de la temperatura, lo que se denomina desnaturalización. Para obtener la desnaturalización del ADN, la temperatura suele aumentarse hasta unos 93 - 96°C (Somma y Querci, 2007).

5.4.2.2. ANILLAMIENTO DEL CEBADOR (HIBRIDACIÓN)

La unión o rehibridación de las hebras de ADN se efectúa a una temperatura inferior (generalmente, entre 55 y 65 ° C). Una vez se ha reducido la temperatura, las dos hebras complementarias de ADN monocatenario tienden a formar de nuevo una molécula de ADN bicatenario. En esta fase, los cebadores se mueven libremente y es continua la formación y la ruptura de puentes de hidrógeno entre el cebador monocatenario y el ADN molde también monocatenaria. Los enlaces más estables duran un poco más (los cebadores que se corresponden exactamente con el ADN molde) y es en ese pequeño fragmento de ADN bicatenario (ADN molde con cebador) donde puede fijarse la polimerasa y empezar a copiar el ADN molde. Cuando se han introducido unas cuantas bases, el enlace iónico entre el ADN molde y el cebador es tan fuerte que ya no se rompe (Somma y Querci, op. cit.).

5.4.2.3. EXTENSIÓN DEL CEBADOR (POLIMERIZACIÓN)

En esta fase, los cebadores se extienden a lo largo de la secuencia diana utilizando una ADN polimerasa termoestable (frecuentemente se trata de la ADN *Taq*

polimerasa) en presencia de dNTPs, lo que produce la duplicación del material diana inicial. La temperatura de trabajo ideal para la ADN polimerasa *Taq* es de 72 °C (Somma y Querci, 2007).

Cuando los cebadores se han extendido unas cuantas bases, ejercen una atracción iónica más fuerte sobre el ADN molde, lo que reduce la probabilidad de que se invierta el proceso. Los cebadores que no se corresponden exactamente se vuelven a soltar (debido a la temperatura elevada) y no dan lugar a la extensión del fragmento. Las bases (complementarias del ADN molde) se unen al cebador en el extremo 3' (la polimerasa añade dNTPs desde 5' hacia 3', leyendo el ADN molde desde 3' hacia 5'). La duración del tiempo necesario para las fases de extensión del cebador puede aumentar si es larga la región de ADN que se va a amplificar; sin embargo, en la mayoría de experimentos de PCR es suficiente un tiempo de 1 minuto para conseguir una extensión completa. (Somma y Querci, *op. cit.*).

5.5. ELECTROFORESIS

La electroforesis consiste en la separación de grandes moléculas como los ácidos nucleicos a través de una matriz sólida que funciona como un filtro para separar las moléculas en un campo eléctrico de acuerdo a su tamaño y carga eléctrica. Esta separación se hace bajo un buffer o tampón que puede ser TAE o TBE (Ibarra *et al.*, 2013).

En el caso de los ácidos nucleicos, el grupo fosfato les proporciona la carga negativa, por lo que durante la electroforesis migran hacia el polo positivo. Para ello, se prepara un gel diluyendo una cantidad de agarosa en el buffer, se calienta hasta que la agarosa hierva lo suficiente y posteriormente se vacía a un recipiente que sirve de

base para que solidifique. Generalmente el porcentaje al que se prepara el gel es al 1,2% aunque, dependiendo del tamaño de las moléculas, puede ser de hasta el 2%. Otro ingrediente que se agrega al gel es un compuesto conocido como bromuro de etidio, una molécula intercalante capaz de unirse al ADN de doble cadena. Cuando es excitado con luz UV emite una señal que permite la visualización de los amplicones en forma de bandas. Es importante manipular con mucho cuidado este compuesto porque se sabe que es mutagénico y teratógeno (**Ibarra et al., 2013**).

Cuando los amplicones son corridos en el gel, éstos deben ser cargados junto con un marcador molecular que contenga un número determinado de segmentos de ADN conocidos, lo que facilita la identificación de los amplicones y si su tamaño corresponde con el esperado. El tamaño está dado por el número de pares de bases del amplicón. Finalmente, la visualización de los amplicones se lleva a cabo tomando una foto digital al gel de agarosa expuesto a luz UV (**Ibarra et al., op. cit.**).

6. HIPOTESIS

¿Qué par de primers o cebadors dará una mejor amplificación del gen PepT1 en juveniles híbridos de tilapia Red Florida?

7. VARIABLES

Tabla 1. Variables y su operacionalización

| CONCEPTUAL | INDICADOR | OPERACIONAL |
|--|---|--|
| <p>Disección de organismos</p> <p>Procedimiento útil en la obtención de tejidos.</p> | <p>Tejido (musculo, branquias, intestino, bazo, hígado y aleta caudal)</p> | <p>Se realizó la técnica de disección para la obtención de los diferentes tejidos de juveniles de tilapia.</p> |
| <p>Conservación de tejidos</p> <p>Temperaturas y sustancias a las que se expondrán los tejidos “muestras”.</p> | <p>Tipo de modalidad de conservación</p> | <p>Se conservó el tejido en Alcohol al 96 %, en temperaturas de ultra congelación y al ambiente.</p> |
| <p>Extracción de ADN genómico</p> <p>Técnica para la extracción del material genético</p> | <p>Material genético (ADN)</p> | <p>Se utilizó un Mini Kits PureLinkR Genomic DNA, el cual permitió la Extracción de ADN genómico.</p> |
| <p>Amplificación del gen</p> <p>Técnica que permite la amplificación de una secuencia de ADN en particular en un número</p> | <p>Amplificones</p> | <p>Se programó el termociclador en base a las propiedades termodinámicas de los primers y el tamaño</p> |

| | | |
|---|----------------------------|---|
| <p>muy elevado de copias. Se utilizara la técnica de PCR.</p> | | <p>esperado de los amplicones.</p> |
| <p>Evaluación de primer (Electroforesis)</p> <p>La técnica de electroforesis migrara al ADN dando una observación cualitativa y la selección del par de iniciador idóneo para la identificación de un fragmento del gen PepT1.</p> | <p>Tamaño del gen (pb)</p> | <p>Se realizó la técnica de electroforesis en gel de agarosa, la cual migró el fragmento del gen PepT1.</p> |

8. DISEÑO METODOLÓGICO.

8.1. TIPO DE ESTUDIO

La presente investigación corresponde a un estudio experimental, debido a que se basó fundamentalmente en la evaluación de primers para la identificación de fragmentos del gen *PepT1* en diferentes tejidos de juveniles híbridos de tilapia Red Florida.

8.2. ÁREA DE ESTUDIO

La primera etapa de bioensayo de este trabajo, se realizó en la Carrera de Ingeniería en Acuicultura y Pesquerías (Bahía de Caráquez, Cantón Sucre) y los estudios moleculares se hicieron en el Laboratorio de Biotecnología Molecular del Instituto de Investigación de la Universidad Técnica de Manabí.

8.3. MANTENIMIENTO DE LOS PECES

Se obtuvo juveniles de tilapia Red Florida (*O. mossambicus* X *O. uroleptis hornorum*), procedentes de un cultivo del cantón San Vicente. Los peces fueron trasladados a los laboratorios de cultivo a pequeña escala de la Escuela de Ingeniería en Acuicultura y Pesquerías de la Universidad Técnica de Manabí, manteniéndolos en tanques circulares de 60 L., alimentándolos 3 veces al día rutinariamente con balanceado de uso comercial (28% de proteína), hasta obtener 5 gramos promedio de peso (*Fot. 1*).



Fot. 1. Tanques donde se mantuvieron los juveniles de tilapia Red Florida.

8.4. DISECCIÓN Y CONSERVACIÓN DE MUESTRAS DE TEJIDOS

Los tejidos de interés fueron: branquias, bazo, hígado, aleta caudal, músculo e intestino. Los especímenes fueron sacrificados mediante disección, cortando la cavidad abdominal y el opérculo, y en relación a los intestinos se vaciaron de cualquier resto de material alimenticio, se extrajo cada muestra de tejido conservandose en alcohol al 96 % y colocandose en tubos eppendorf (**Fot. 2 y 3**).



Fot. 2 y 3. Disección y extracción de muestras de tejidos de tilapias

Se rotuló cada muestra según se indica en la **Tabla 2**

Tabla 2. Rotulos de muestras

| SIMBOLOGÍA | DESCRIPCIÓN |
|-------------------|---------------------|
| T1BR | tanque 1, branquias |
| T1MUSC | tanque 1, músculo |
| T1INT | tanque 1, intestino |
| T2BR | tanque 2, branquias |
| T2MUSC | tanque 2, músculo |
| T2INT | tanque 2, intestino |
| P1BAZ | Pez 1, bazo |
| P1COLA | Pez 1, cola |
| P1HIG | Pez 1, hígado |
| P1BRAN | Pez 1, branquias |
| P1INT | Pez 1 intestino |
| P1MUSC | Pez 1, músculo |
| P2BAZO | Pez 2, bazo |
| P2 COLA | Pez 2, cola |
| P2HIG | Pez 2, hígado |
| P2BRA | Pez 2, branquias |
| P2INST | Pez 2, intestino |
| P2MUS | Pez 2, músculo |

Las muestras de los tejidos se conservaron bajo dos condiciones de temperatura: temperatura ambiente y ultra congelación a -18°C ., estas fueron llevadas al laboratorio de biotecnología para los posteriores estudios (**Fot. 4, 5 y 6**).



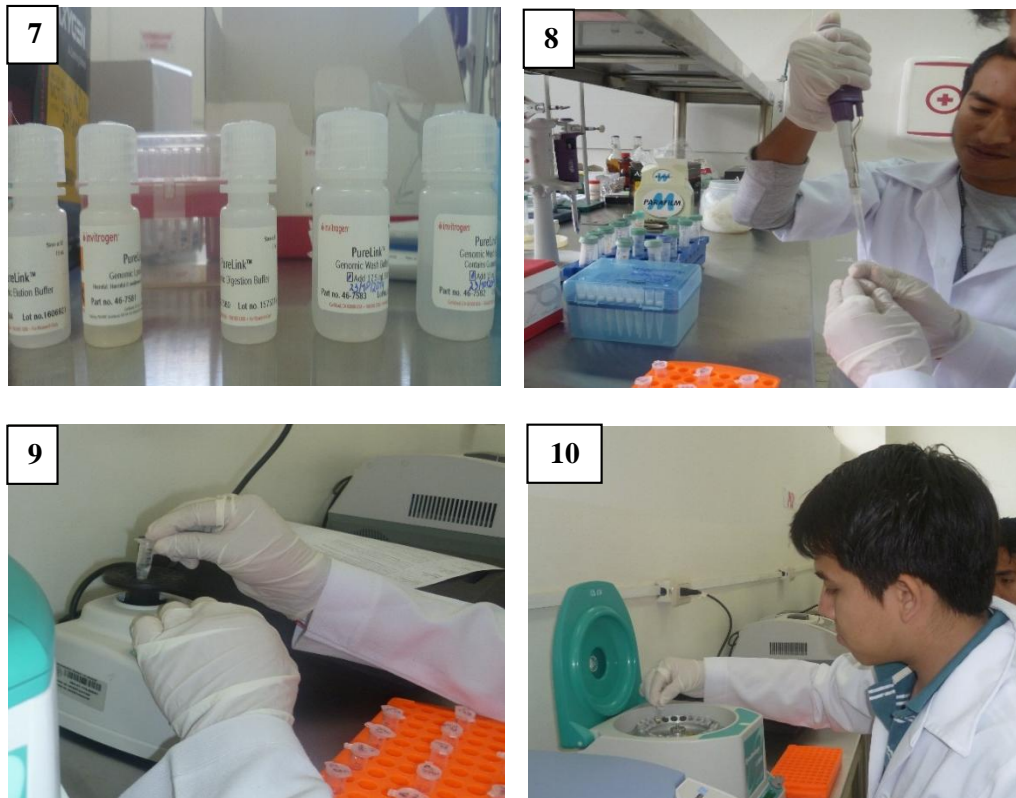
Fot. 4, 5 y 6. Conservación y transporte de muestras de juveniles de tilapia.

8.5. EXTRACCIÓN DE ÁCIDOS NUCLEICOS A PARTIR DE TEJIDOS

Para realizar la extracción de ADN de los tejidos de juveniles de tilapia se trabajó con Mini Kit PureLink® Genomic DNA (Catalog Numbers K1820-01, K1820-02, K1821-04) INVITROGEN®, pues este permite la extracción rápida y eficaz de ADN genómico (**Fot. 7, 8, 9 y 10**).

El protocolo de extracción de ADN utilizando este Mini Kits fue el siguiente:

- 1) Lavar el tejido con agua
- 2) Maceración de la muestra 20 (mg)
- 3) Agregar 180 μ L de buffer de digestión y 20 μ L de pk (serina proteasa).
- 4) Incubar a 50 °C por 3 horas.
- 5) Centrifugar a revolución max (13000) por 3 minutos.
- 6) Se transfiere el sobrenadante a otro tubo eppendorf.
- 7) Agregar 20 μ L de ARNasas.
- 8) Incubar 2 minutos a temperatura ambiente
- 9) Agregar 20 μ L de genomic binding/lysis buffer
- 10) Homogenizar la muestra con el vortex a menor revolución.
- 11) Agregar 200 μ L de etanol 96-100 %.
- 12) Homogenizar la muestra con el vortex a menor revolución.
- 13) Verter todo el contenido en la columna.
- 14) Centrifugar a 10000 g/1 min.
- 15) Adicionar 500 μ L de buffer lavado.
- 16) Centrifugar a 10000 g/1 min.
- 17) Eliminar el líquido y añadir 500 μ L de buffer de lavado 2.
- 18) Centrifugar a revolución máxima por 3 minutos, eliminar el líquido.
- 19) Agregar 50 μ L de buffer de elusión.
- 20) Incubar 1 minuto en temperatura ambiente.
- 21) Centrifugar a revolución máxima por 1 minuto.
- 22) Usar o conservar a -20°C.



Fot. 7, 8, 9 y 10. Mini Kit y proceso de extracción de ADN de juveniles de tilapia.

- En el Anexo 1 se observa la figura del proceso de extracción y amplificación de ADN.

8.6. USO DE INICIADORES (JUEGOS DE PRIMERS)

Vera, (2014), diseñó diferentes iniciadores usando el programa Clustal W, para el análisis de la expresión del gen *PepT1* en intestinos de juveniles de tilapia, de los cuales se realizó la extracción de ARN, procediendo a la retrotranscripción para obtener el ADNc. Con esto se procedió a evaluar los diversos juegos de primers que inicialmente amplifican ADNc, para verificarlos en PCR convencional sobre fragmentos de ADN genómico del gen *PepT1*.

En la **Tabla 3** se observan los primers diseñados por el citado investigador, que se utilizaron para evaluar su capacidad de amplificación genómica sobre *PepT1*.

Tabla 3. Lista de iniciadores “primers”, utilizados para el estudio de la identificación del gen péptido trasportador 1 (*PepT1*).

| Iniciador | Secuencia | # nt | Ubicación |
|-----------|-----------------------------|------|------------|
| Fw 2 | 5'ACCACACAWTTGTGGCTCT 3' | 18 | Exón 3 |
| Rev 2 | 5' GGAGACCCACC ATRGACA-3 ' | 18 | Exón 5 |
| Rev 3 | 5'CWACRTGWAAGGTCATGTTGTC 3' | 22 | Exón 4 – 5 |
| Fw 16 | 5'CTGGGCTTTGGCAGYTCWTA 3' | 20 | Exón 18 |
| 6bRev | 5'TARGTGTAARAAATAGSCCAT 3' | 20 | Exón 21 |
| 11 Fw | 5'TGCACATGGCCYKGCAGAT 3' | 19 | Exón 19 |

Fuente: Vera, J. 2014.

8.7. AMPLIFICACIÓN POR PCR

El análisis de las muestras para la identificación del gen *PepT1* fue realizado por PCR, utilizando los iniciadores Fw2-Rev2; Fw2-Rev3; 16Fw-6bRev y 11Fw- 6bRev; escogidos de los juegos de primers diseñados por bioinformática por Vera, (2014), que evaluó la expresión del mencionado gen (*Tabla 4*).

Tabla 4. Iniciadores utilizados en el proceso de PCR para la amplificación de *PepT1*.

| Primer 1 | Primer 2 | Tamaño (pb) |
|-----------------|-----------------|--------------------|
| Fw 2 | Rev 2 | 511 |
| Fw 2 | Rev 3 | 471 |
| 16Fw | 6bRev | 850 |
| 11Fw | 6bRev | 656 |

Fuente: Vera, J. 2014.

8.7.1. COMPONENTES DE LA PCR

Los componentes básicos de la solución madre de la PCR y su cantidad, fueron los siguientes:

- Agua Ultra Pura: **18,3 µL**
- Solución Buffer (10x) Cl₂Mg: **2,5 µL**
- dNTPs (Desoxyribonucleotides Tri-Phosphate) 10 mM: **1 µL**
- Primer 1 (20 p mol/ µl): **1 µL**
- Primer 2 (20 p mol/ µl): **1 µL**
- Taq (enzima/ADN polimerasa): **0,2 µL**

La cantidad de cada componente se determinó a través de la fórmula:

$$C1.V1 = C2.V2,$$

Cada componente es por muestra individual.

8.7.2. PROGRAMACIÓN DEL TERMOCICLADOR

Una vez que se realizó la mezcla con todos los reactivos de la PCR, se adicionó el ADN correspondiente a cada muestra en su tubo respectivo. El siguiente paso fue el de colocar los tubos en el termociclador, este equipo automatizado es capaz de variar las temperaturas y mantenerlas según una programación previa. (**Fot. 11**).



Fot. 11. Termociclador, máquina que calienta y enfría la reacción en temperaturas precisas para que se den las reacciones de PCR.

La reacción de PCR tiene lugar por los cambios de temperatura que constituyen la base para que se completen los pasos necesarios. La programación del termociclador fue definida en base a las propiedades termodinámicas de los primers y el tamaño esperado de los amplicones. Por lo cual el proceso se llevó a cabo de la siguiente manera, teniendo como ejemplo una de las programaciones utilizadas:

1. Desnaturalización inicial: 6 min a 94 - 96 °C
2. Ciclos: 35
 - 2.1. Desnaturalización: 30 seg a 94 – 96 °C
 - 2.2. Hibridación: 30 seg a 50 - 70 °C
 - 2.3. Polimerización: 30 seg a 72 °C

3. Post desnaturalización: 10 min a 72 °C
4. Conservación: ∞ 4°C

En el anexo 3 se visualiza la programación del termociclador para cada juego de primers con ciertas variaciones realizadas en cuanto a la temperatura y tiempo.

8.8. ELECTROFORESIS DE PRODUCTOS DE LA PCR EN GEL DE AGAROSA

Para verificar la existencia del fragmento del gen PepT1, los productos obtenidos por PCR fueron visualizados por electroforesis en gel de agarosa y el uso de un marcador de peso molecular. Este sistema permite discriminar entre moléculas de diferentes tamaños.

8.8.1. PREPARACIÓN DEL TAMPÓN DE ELECTROFORESIS

El tampón de electroforesis TAE (Tris, acetato, EDTA) se encuentra en una solución concentrada 10x. Se usó el tampón TAE 1x, necesitando un volumen total de unos 500 mL para una cubeta de electroforesis y 100 mL para la preparación del gel de agarosa. Para preparar 600 mL de TAE-1x a partir de TAE-10x, se añadió 60 mL de TAE-10x en 540 mL de agua destilada.

8.8.2. PREPARACIÓN DEL GEL DE AGAROSA

La preparación de gel de agarosa se realizó de la siguiente manera:

Se colocaron 2 gramos (g) de agarosa en polvo en un matraz Erlenmeyer de 500 mL con 100 mL de TAE-1x (la agarosa se debe preparar con tampón de electroforesis, no con agua); se disolvió la agarosa en un plato calentador a 300 °C, agitando constantemente el matraz en forma circular. Para evitar que se formen burbujas en la

solución hasta su completa disolución. Posteriormente se dejó enfriar y se agregó 5 μL de bromuro de etidio.

Luego se preparó la cubeta de electroforesis, depositando la agarosa al molde e introduciendo el peine para formar los pozos.

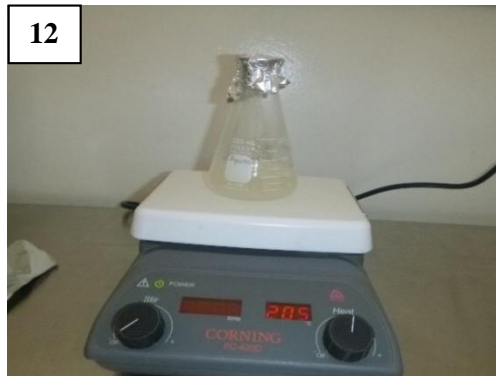
Se dejó reposar durante 10-20 minutos para que el gel se solidifique a temperatura ambiente (teniendo un aspecto opaco cuando estuvo listo para su uso).

Se colocó el molde o soporte en la cubeta de electroforesis, situando los pocillos en el cátodo (negro). Se rellenó la cubeta con tampón TAE 1x hasta cubrir el gel, usando aproximadamente 275 mL de tampón. Las muestras de ADN se migraron hacia el ánodo (rojo) durante la electroforesis.

Se colocó 2 μL de tampón de carga en papel parafina en forma de puntos y se mezcló con 10 μL de ADN de cada muestra de tejido. Después utilizando una punta de micropipeta diferente para cada muestra, se cargó el volumen indicado de cada muestra en los pocillos del gel.

Se colocó la tapa en la cubeta de electroforesis, se conectó a la fuente de alimentación, se encendió y se dejó por unos 30 minutos a 100 V. Cuando la electroforesis finalizó se colocó el gel de agarosa con el producto final (migración) en el transiluminador (luz UV) para su lectura.

En las **Fot. 12, 13, 14, 15, 16 y 17** se observa el proceso de electroforesis.



Fot. 12, 13, 14, 15, 16 y 17. Proceso de electroforesis con gel de agarosa.

9. EQUIPOS, MATERIALES Y RECURSOS

9.1. EQUIPOS

- Equipo de disección
- Balanza analítica (OHAUS- SCOUT)
- Agitador Vortex (LABNET S-0200)
- Microcentrifuga (LABNET - SPECTRAFUGE 24D)
- Fluorómetro (INVITROGEN QUBIT 2.0)
- Termociclador (LABNET –MULTIGENE OPTIMAX)
- Cámara de electroforesis (LABNET -E0160)
- Transiluminador (LABNET UV)
- Cabina de flujo laminar para PCR (ESCO SRC-2A2)
- Cámara digital
- Computadora
- En el anexo 2 se observan fotografías de los equipos utilizados en el Laboratorio de Biotecnología Molecular.

9.2. MATERIALES

9.2.1. MATERIALES DE LABORATORIO DE BIOTECNOLOGÍA

- Tubos eppendorf (1,5 mL)
- Microtubos eppendorf (20 uL)
- Juego de pipetas automáticas (LABNET BIOPETTE)
- Puntas de pipeta estériles (20, 100, 200, 1000 uL)
- Matraz Erlenmeyer de 500 mL

- Papel Parafilm
- Caja de guantes
- Caja de mascarilla
- Gradillas

9.2.2. MATERIALES DE LABORATORIO DE ACUICULTURA Y PESQUERÍAS.

- Tanques de 60 L.
- Mangueras de aireación
- Útiles de oficina (hojas, lapiceros, corrector, entre otros).

9.2.3. REACTIVOS.

- PurelinkR Genomic DNA Mini Kits.
- Etanol al 96%
- Agua ultrapura destilada x 500mL (INVITROGEN)
- Agarosa ultra pure x 100 g (AXIGEN).
- Enzima *Taq* polimerasa x 500 u (INVITROGEN).
- Solución de dNTPs MIX x100 uL (INVITROGEN)
- TAE X10 (10x Tris-acetato-EDTA).
- Marcador de Peso Molecular TRACKIT 100 bp DNA LADDER x 100aplicaciones (INVITROGEN).
- Primers o cebadores (IDT – INTEGRATED DNA TECHNOLOGIES).
- 10x Blue juice loading buffer 3 x 1 mL (INVITROGEN).
- Buffer de PCR (INVITROGEN)
- RNase A (20 mg/mL) x 180 mL (INVITROGEN)

- Bromuro de etidio (SIGMA)
- SYBR safe (INVITROGEN)

9.3. RECURSOS

9.3.1. ECONÓMICOS

Los recursos económicos para la presente investigación fueron proporcionados una parte por la Escuela de Ingeniería en Acuicultura y Pesquería en relación al mantenimiento y desarrollo de los juveniles híbridos de tilapia Red Florida, los equipos y laboratorio de Biotecnología fueron facilitados por el Instituto de Investigación de la Universidad Técnica de Manabí.

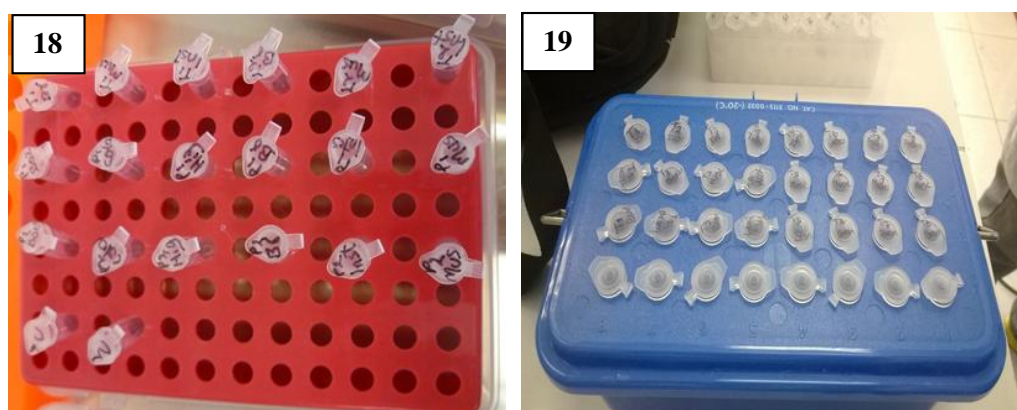
9.3.2. HUMANOS.

Los recursos humanos involucrados en la investigación fueron: dos tesis y el director de tesis (docente de la Escuela de Ingeniería en Acuicultura y Pesquerías).

10. ANÁLISIS E INTERPRETACIÓN DE RESULTADOS

10.1. CONSERVACIÓN DE MUESTRAS DE TEJIDO

En la conservación de los tejidos bajo dos condiciones de temperatura: ambiente y ultra congelación a -18°C , en etanol al 96%; no se mostró una notable alteración en el ADN genómico, teniendo en cuenta que el tiempo de conservación en que se mantuvieron las muestras para realizar la investigación fue de 3 meses (*Fot. 18 y 19*).



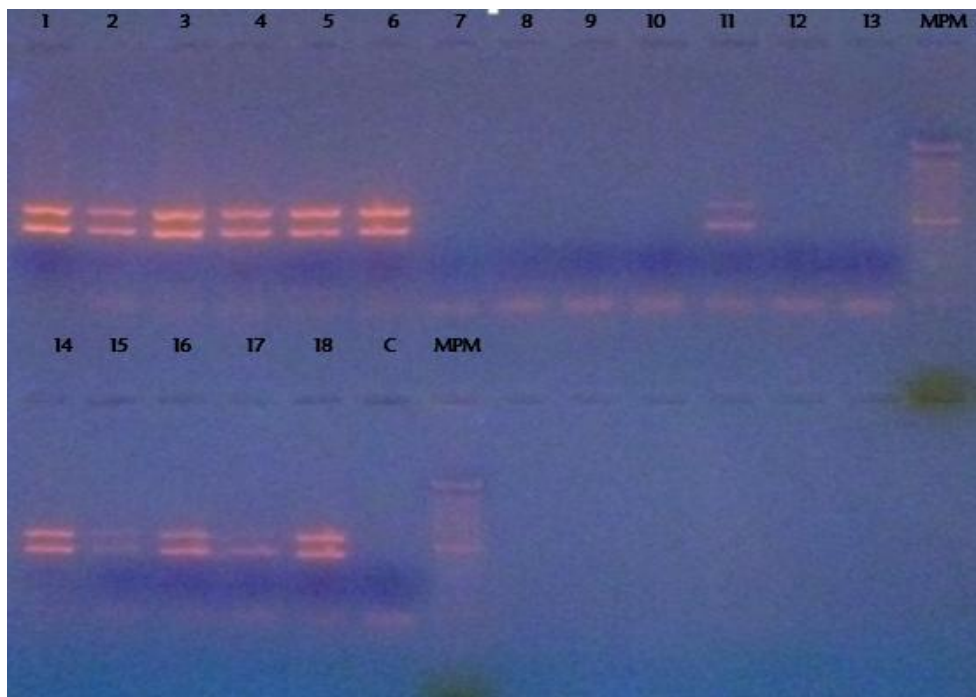
Fot. 18 y 19. Muestras de tejidos de tilapia conservados a temperatura ambiente y ultracongelación a -18°C

Específicamente se observó la presencia de ADN genómico en los diferentes tejidos sometidos a los métodos de conservación en la migración en gel de agarosa o proceso de electroforesis; pero con mayor resolución de lectura los tejidos conservados al ambiente, motivo por el cual se eligió dichas muestras para el proceso de evaluación de primers a través de PCR (*Fot. 20*).

Para la identificación de los fragmentos de ADN de los tejidos se utilizó la siguiente nomenclatura: *T1BR*, *T1MUSC*, *T1INT*, *T2BR*, *T2MUSC*, *T2INT*, *P1BAZ*, *P1COLA*,

P1HIG, P1BRAN, P1INT, P1MUSC, P2BAZO, P2 COLA, P2HIG, P2BRA, P2INST, P2MUS (Tabla 2).

En la **Fot. 20**, se visualiza el gel de agarosa con las bandas migradas de los fragmentos del gen *PepT1* con el juego de primer Fw2 – Re2, de las muestras de tejido conservadas a temperatura ambiente y ultracongelación.

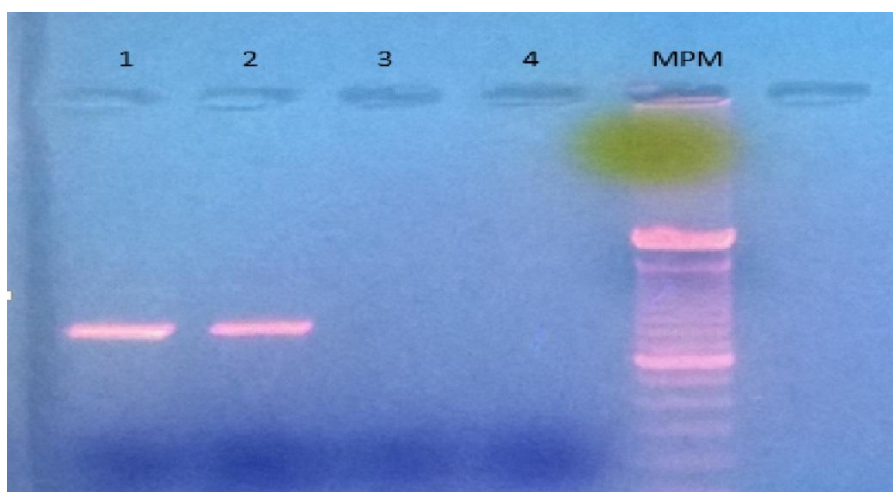


Fot. 20. Gel de agarosa con muestras de tejidos de tilapia conservados a temperatura ambiente y ultra congelación utilizando Fw2 – Re2.

Temperatura ambiente: pozo 1 T1BR pozo 2 T1MUSC; pozo 3 T1INT; pozo 4 T2BR; pozo 5 T2MUSC; pozo 6 T2INT. **Ultra congelación:** pozo 7 P1BAZ; pozo 8 P1COLA; POZO 9 P1HIG; POZO 10 P1BRAN; POZO 11 P1INT; POZO 12 P1MUSC; POZO 13 P2BAZO; POZO MPM (100 pb); POZO 14 P2COLA; POZO 15 P2HIG; POZO 16 P2BRA; POZO 17 P2INST; POZO 18 P2MUS; POZO CONTROL NEGATIVO; POZO MPM (100 pb).

10.2. EVALUACIÓN Y AMPLIFICACIÓN DE PRIMERS

Ejecutado el proceso de PCR usando los diferentes juegos de primers, se demuestra que el juego de iniciadores con mayor efectividad fue 11Fw – 6bRev (**Fot. 21**), obteniendo una sola banda (800 pb) bajo la adecuada programación del termociclador (**Tabla 5**).



Fot. 21. Gel de agarosa con amplicones migrados resultantes de 11Fw – 6bRev.

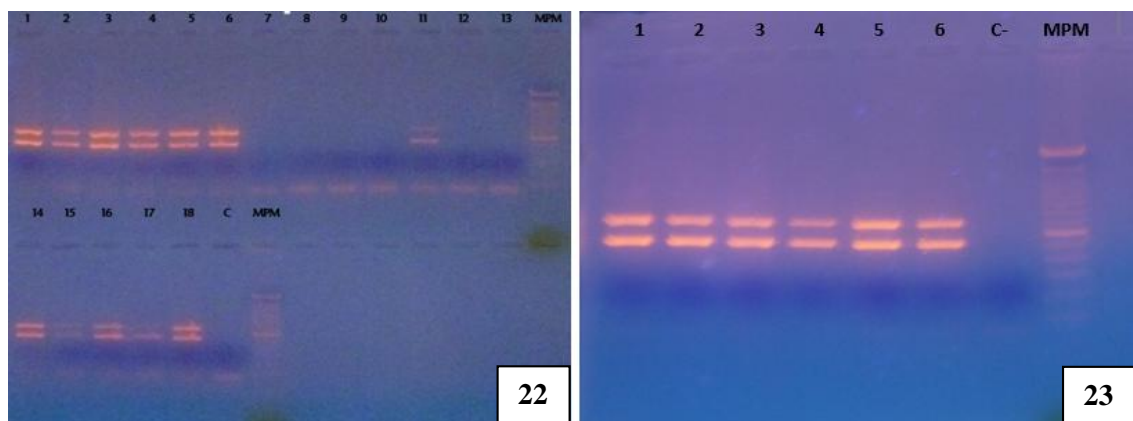
Iniciadores 11Fw – 6bRev (800 pb), pozo 1 INT, pozo 2 MUSC, pozo 3 control negativo PCR, pozo 4 control negativo extracción ADN, pozo MPM (100 pb).

Tabla 5. Programación del termociclador

| Juego de primers | Programación del termociclador | | |
|------------------|--------------------------------|-------------|--------|
| | Etapas | Temperatura | Tiempo |
| 11Fw – 6bRev | Desnaturalización inicial | 95 °C | 10´ |
| | Amplificación 40 ciclos | 95 °C | 30´´ |
| | | 58 °C | 30´´ |
| | | 72 °C | 45´´ |

| | | | |
|--|----------------------------|-------|-----|
| | Extensión final amplicones | 72 °C | 10´ |
| | Conservación | 4 °C | ∞ |

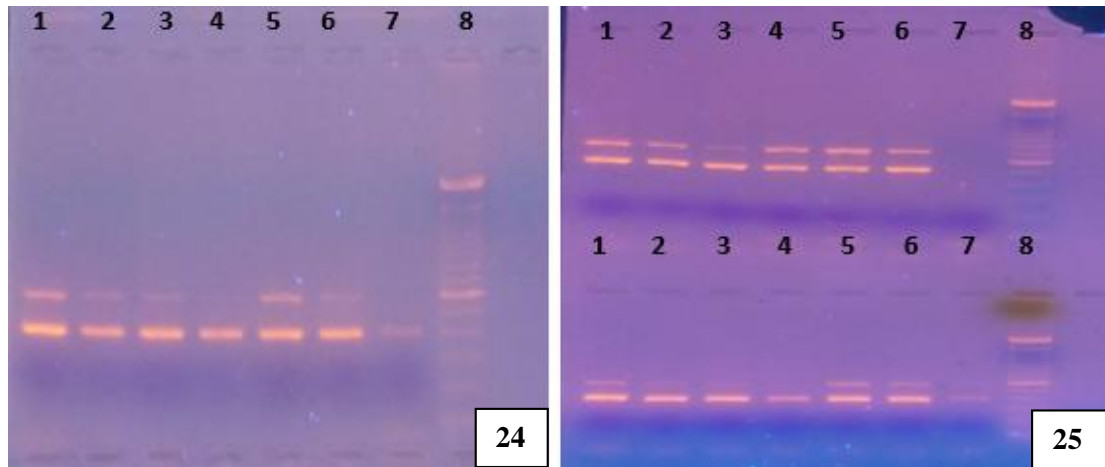
La evaluación de los juegos de primers FW2 – Rev2 (511 pb) (*Fot. 22 y 23*) y Fw2 – Rev 3 (471 pb) (*Fot. 24 y 25*), muestran doble banda de amplificación en el gel de electroforesis, presentando una banda correspondiente a fragmentos del gen en estudio y una banda extra, la programación del termociclador fue diferentes para cada juego de primers (*ANEXO 3*).



Fot. 22 y 23. Gel de agarosa con amplicones migrados resultantes de primers FW2 – Rev2.

Primers FW2 – Rev2 (511 pb): **IZQUIERDA:** pozo 1 T1BR; pozo 2 T1MUSC; pozo 3 T1INT; pozo 4 T2BR; pozo 5 T2MUSC; pozo 6 T2INT; pozo 7 P1BAZ; pozo 8 P1COLA; pozo 9 P1HIG; pozo 10 P1BRAN; pozo 11 P1INT; pozo 12 P1MUSC; pozo 13 P2BAZO; pozo MPM (100 pb); pozo 14 P2COLA; pozo 15 P2HIG; pozo 16 P2BRA; pozo 17 P2INST; pozo 18 P2MUS; pozo Control negativo; pozo MPM (100 pb). **DERECHA:** pozo 1 T1BR; pozo 2 T1MUSC; pozo 3 T1INT;

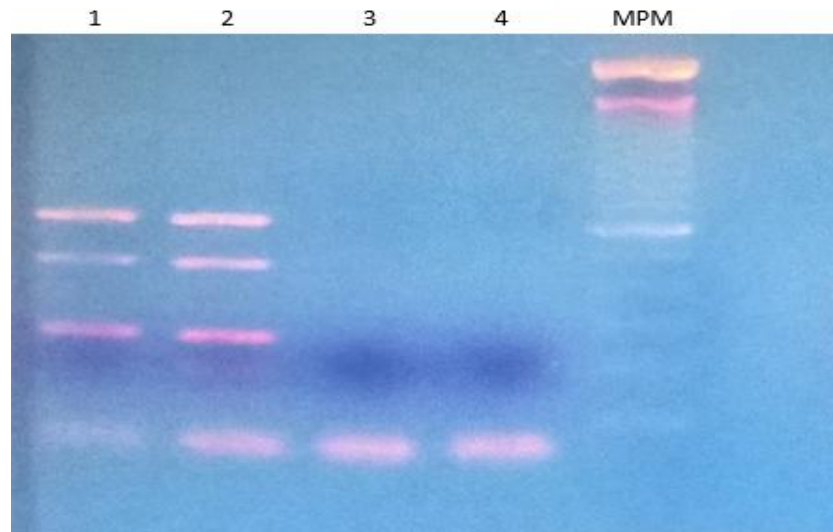
pozo 4 T2BR; pozo 5 T2MUSC; pozo 6 T2INT; pozo Control negativo; pozo MPM (100 pb).



Fot. 24 y 25. Gel de agarosa con amplicones migrados resultantes de primer Fw2 – Rev 3.

Cebadores Fw2 – Rev 3 (471 pb): **IZQUIERDA:** pozo 1 T1BR; pozo 2 T1MUSC; pozo 3 T1INT; pozo 4 T2BR; pozo 5 T2MUSC; pozo 6 T2INT; pozo 7 Control negativo; pozo 8 MPM (100 pb). **DERECHA:** SUPERIOR: pozo 1 T1BR; pozo 2 T1MUSC; pozo 3 T1INT; pozo 4 T2BR; pozo 5 T2MUSC; pozo 6 T2INT; pozo 7 Control negativo; pozo 8 MPM100 pb. INFERIOR: pozo 1 T1BR; pozo 2 T1MUSC; pozo 3 T1INT; pozo 4 T2BR; pozo 5 T2MUSC; pozo 6 T2INT; pozo 7 Control negativo; pozo 8 MPM (100 pb).

El juego de primers 16 Fw – 6bRev (850 pb), fue el de más bajo rendimiento, presentando tres bandas en la revelación de electroforesis (**Fot. 26**).



Fot. 26. Gel de garosa con amplicones migrados resultantes de primer 16Fw – 6bRev.

Primers 16Fw – 6bRev (850 pb): pozo 1 INT; pozo 2 MUSC; pozo 3 Control negativo PCR; pozo 4 Control negativo extracción ADN; pozo MPM (100 pb).

11. DISCUSION

El gen PepT1 tiene un papel importante en la nutrición de los peces (**Dabrowski et al., 2005**), al transportar grandes cantidades de aminoácidos en forma de péptidos y proporciona nutrientes esenciales para el crecimiento de los peces, y la energía necesaria para el metabolismo y reproducción.

La importancia de este estudio radica en evaluar juegos de primers en la identificación del gen PepT1 en diferentes tejidos de juveniles híbridos de tilapia Red Florida. Primer, iniciador o cebador es una molécula de ácido nucleico de una sola cadena que se usa para iniciar una reacción de PCR (**Cortazar y Silva, 2004**). La especificidad de los primers es en parte dependiente de su longitud. Los primers deben ser elegidos de modo que tengan una secuencia única dentro del DNA que será amplificado. Un primer diseñado con una secuencia altamente repetida dará lugar a productos no deseados (**Cortazar y Silva, op. cit.**).

Los metodos de conservación utilizados en esta investigación en los tejidos de juveniles de tilapia híbrida fijados en alcohol al 96%, son métodos viables para su utilización, pero el de mayor eficacia debido a los resultados obtenidos es el de conservación al ambiente. Objetando en este trabajo la eficacia de la modalidad de conservación al ambiente en etanol, lo cual sería un aspecto a tomar en cuenta en futuras investigaciones.

Actualmente se sabe que los mejores métodos para la preservación de ADN son criogénicos (sea en nitrógeno líquido o en etanol a temperaturas inferiores a -20°C) para jornadas de muestreo inferiores a tres días (**Zhang y Hewitt, 1998**), pero si la

fase de muestreo en campo es mayor, la criopreservación no es posible ni operativa y requiere métodos no criogénicos como el de conservación al ambiente.

En las difíciles condiciones del medio marino, se ha mostrado como una eficiente metodología la preservación de muestra de especies marinas en etanol absoluto a temperatura ambiente (**Quintero et al. 2012**).

La extracción de ADN se realizó mediante los reactivos y el protocolo del mini kit PureLink® Genomic DNA, el cual permitió realizar una rápida y eficaz extracción de ADN genómico de las muestras de tejidos de tomados, además se trabajó de una manera sencilla en cuanto a la metodología. **Yue y Orban, (2001)**, mencionan que el uso del protocolo de extracción con fenol-cloroformo ha sido el método más usado para obtener ADN genómico de peces, Sin embargo, es un método lento, laborioso y contaminante.

En este estudio la eficacia de los juegos de primers seleccionados fue baja debido a la presencia de más de una banda en los revelados de electroforesis, acentuando el juego de primers Fw11 – 6bRev que amplificó un fragmento de 800 pb, pero este tamaño obtenido varió con respecto al establecido que corresponde a 656 pb. **Vera, (2014)**, mencionó que el alineamiento de las secuencias usando el programa ClustalW permitió establecer que PepT1 en tilapia está constituido por 21 exones, cubriendo una región genómica de unos 8938 nucleótidos (nt) y la región codificante corresponde a solo 2274 nucleótidos (nt). Reseña que podría abogar la aparición de doble banda en los revelados de electroforesis, por la interferencia y amplificación de zonas no codificantes en la región genómica, teniendo en cuenta que el presente estudio se basó en ADN genómico [*gen o*

segmento de un gen que incluye las secuencias de ADN que no codifican (intrones), así como las regiones codificantes (exones)] y no en un estudio de expresión como el realizado por el citado investigador.

12. CONCLUSION Y RECOMENDACIONES

12.1. CONCLUSIONES

Como resultado de la investigación presentada sobre la evaluación de juegos de primers en la amplificación del gen PepT1 en diferentes tejidos de juveniles híbridos de tilapia Red Florida es posible concluir lo siguiente:

De los métodos de conservación de las muestras de tejidos (intestino, músculo, bazo, branquias, hígado, y aleta caudal) de los juveniles de tilapia fijadas en alcohol al 96%, se deduce que: tanto la conservación al ambiente como la ultracongelación a -18 °C son métodos viables sin embargo en la conservación al ambiente durante 3 meses que se mantuvieron las muestras, se obtuvo mejores resultados al mostrar mejor efectividad en las pruebas moleculares (extracción de ADN, amplificación, y sobre todo revelado de electroforesis) que se realizaron posteriormente.

La extracción de ADN que se realizó mediante los reactivos y el protocolo del mini kit PureLink® Genomic DNA permitió realizar una rápida y eficaz extracción de ADN genómico de las muestras de tejidos de tomados.

Conforme los resultados obtenidos se estableció que de los 4 pares de primers (Fw2-Rev2; Fw2-Rev3; 16Fw-6bRev y 11Fw- 6bRev) utilizados, 11Fw- 6bRev es el de mayor efectividad en la amplificación del gen PepT1 en tilapias, al visualizarse mediante la electroforesis en gel de agarosa una sola banda de la cual se obtuvo un tamaño de 800 pares de bases, aunque este tamaño vario con respecto al establecido de manera predictiva y que debía ser 656 pares de bases sobre ARNm pudiendo asumir la presencia de un intrón. Los demás pares de primers mostraron en la

electroforesis doble manda de amplificación, por lo cual no son convenientes para su uso en ADN genómico.

La mejor optimización para la amplificación del gen PepT1 con el par de primers 11Fw- 6bRev se obtuvo a la siguiente temperatura y tiempo del termociclador en la PCR: Desnaturalización inicial: 95 °C, 10'; 40 ciclos; desnaturalización: 95 °C, 30''; hibridación: 58°C, 30''; polimeración: 72 °C, 45''; Post desnaturalización: 72 °C, 10'; y Conservación: 4 °C, ∞.

2.2. RECOMENDACIONES

- Seguir con investigaciones futuras concernientes a este tema, ya que deja la puerta abierta para futuros estudios referentes a la capacidad que tiene el gen PepT1 en cuanto a la asimilación de nutrientes en peces.
- Realizar el diseño de primers que puedan ser evaluados para la amplificación de ADN del gen PepT1, para aumentar los conocimientos genómicos del mismo; de igual manera diseñar nuevos iniciadores para nuevas pruebas de expresión del citado gen.
- Realizar experimentaciones con juveniles de tilapia sometidos a estrés alimenticio, para poder evaluar la expresión por RT-qPCR y tratar de establecer los tiempos idóneos de ayuno y realimentación, que sería de suma importancia en la actividad piscícola de esta especie para optimizar costos de alimentación en los cultivos.
- Utilizar el protocolo de extracción de ADN mencionado en este trabajo, debido a que permite una purificación y extracción rápida y eficaz de ADN genómico.
- Realizar pruebas para comprobar la eficiencia del método de conservación con etanol a temperatura ambiental de tejidos con mayor presencia y expresión del gen PepT1.
- Secuenciar el fragmento correspondiente a 11Fw- 6bRev de PepT1, para comprobar vía simulación computacional la presencia o no de un intron.

13. PRESUPUESTO

Tabla 6. Presupuesto del proyecto

| DENOMINACIÓN | CANTIDAD | PRECIO UNITARIO USD | VALOR TOTAL USD |
|-------------------------------|----------|---------------------------|--------------------|
| Mantenimiento de peces | | | |
| Compra de alevines de tilapia | 60 | \$ 0,06 | \$ 3,60 |
| Tanques de 60 L | 2 | \$10,00 | \$20,00 |
| Mangueras de aireación | 6 | \$ 0,50 | \$ 3,00 |
| Equipos | | | |
| Balanza electrónica | 1 | \$ 200,00 | \$ 200,00 |
| Equipo de disección | 1 | \$ 10,00 | \$ 10,00 |
| Agitador Vortex | 1 | \$ 260,00 | \$ 260,00 |
| Microcentrífuga | 1 | \$ 1.700,00 | \$ 1.700,00 |
| Termociclador | 1 | \$ 5.865,00 | \$ 5.865,00 |
| Cámara de electroforesis | 1 | \$ 486,00 | \$ 486,00 |
| Transiluminador | 1 | \$ 1.800,00 | \$ 1.800,00 |
| Cabina de flujo laminar | 1 | \$ 2.900,00 | \$ 2.900,00 |
| Cámara digital | 1 | \$ 250,00 | \$ 250,00 |
| Computadora | 1 | \$ 700,00 | \$ 700,00 |
| Materiales | | | |

| | | | |
|------------------------------------|---|-----------|-----------|
| Tubos eppendorf | 1 | \$ 46,00 | \$ 46,00 |
| Microtubos eppendorf | 1 | \$34,00 | \$34,00 |
| Juego de Pipetas automáticas | 1 | \$ 690,00 | \$ 690,00 |
| Puntas de pipetas estériles 20uL | 1 | \$100,00 | \$100,00 |
| Puntas de pipetas estériles 100uL | 1 | \$100,00 | \$100,00 |
| Puntas de pipetas estériles 200uL | 1 | \$100,00 | \$100,00 |
| Puntas de pipetas estériles 1000uL | 1 | \$100,00 | \$100,00 |
| Caja de guantes | 1 | \$ 4,00 | \$ 4,00 |
| Caja de mascarilla | 1 | \$ 4,00 | \$ 4,00 |
| Matraz Erlenmeyer 500 mL | 1 | \$ 5,70 | \$ 5,70 |
| Reactivos | | | |
| PurelinkR Genomic DNA Mini Kits | 1 | \$ 195,00 | \$ 195,00 |
| Agua ultrapura destilada (500mL) | 1 | \$ 24,00 | \$ 24,00 |
| Agarosa (100 g) | 1 | \$ 197,00 | \$ 197,00 |
| Taq ADN polimerasa (500u.) | 1 | \$ 100,00 | \$ 100,00 |
| Solución de dNTPs MIX x100uL. | 1 | \$ 111,00 | \$ 111,00 |
| Tae 10X buffer x 1L. | 2 | \$ 56,00 | \$ 112,00 |
| Marcador de Peso Molecular | 1 | \$ 154,00 | \$ 154,00 |
| RNase A (20 mg/mL) x 180mL. | 1 | \$ 180,00 | \$ 180,00 |
| Blue juice loading buffer | 1 | \$ 51,00 | \$ 51,00 |
| Útiles de oficina | | | |

| | | | |
|---------------------------|-----|-----------|--------------|
| Papel bond remas | 2 | \$ 5,50 | \$ 11,00 |
| Lapices y lapiceros | 10 | \$ 0,30 | \$ 3,00 |
| Marcador liquido borrable | 3 | \$ 1,00 | \$ 3,00 |
| Libreta | 2 | \$ 1,20 | \$ 2,40 |
| Calculadora | 1 | \$ 15,00 | \$ 15,00 |
| Flash memory | 1 | \$ 14,00 | \$ 14,00 |
| CD | 7 | \$ 0,50 | \$ 3,50 |
| Impresiones | 700 | \$ 0,15 | \$ 105,00 |
| Encuadernado y empastado | 7 | \$ 30,00 | \$ 210,00 |
| Copias | 400 | \$ 0,03 | \$ 12,00 |
| Imprevistos | 1 | \$ 100,00 | \$ 100,00 |
| Total | | | \$ 16.984,20 |

14. CRONOGRAMA

Tabla 7. Cronograma de actividades.

| ACTIVIDADES | MESES 2015-2016 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
|----------------------------------|-----------------|---|---|---|--------|---|---|---|------------|---|---|---|---------|---|---|---|-----------|---|---|---|-----------|---|---|---|-------|---|---|---|---------|---|---|---|
| | JULIO | | | | AGOSTO | | | | SEPTIEMBRE | | | | OCTUBRE | | | | NOVIEMBRE | | | | DICIEMBRE | | | | ENERO | | | | FEBRERO | | | |
| | 1 | 2 | 3 | 4 | 1 | 2 | 3 | 4 | 1 | 2 | 3 | 4 | 1 | 2 | 3 | 4 | 1 | 2 | 3 | 4 | 1 | 2 | 3 | 4 | 1 | 2 | 3 | 4 | 1 | 2 | 3 | 4 |
| 1.Búsqueda Bibliográfica | ■ | ■ | ■ | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 2.Redacción del anteproyecto | | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 3.Presentación del Anteproyecto | | | | | | ■ | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 4.Aprobación de anteproyecto | | | | | | | | | ■ | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 5.Inicio del experimento | | | | | | | | | | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ | | | | | | | | | | | | | | | |
| 6.Procesamientos de datos | | | | | | | | | | | | | | | | | ■ | ■ | ■ | ■ | | | | | | | | | | | | |
| 7.Análisis de datos y resultados | | | | | | | | | | | | | | | | | | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ | | | | | | | | | | |
| 8.Revisión del director | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ | | | | | |
| 9.Preparación de tesis | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | ■ | ■ | | |

15. BIBLIOGRAFÍA

- Adibi, S. 1997.** The oligopeptide transporter (PepT1) in human intestine: Biology and function. *Gastroenterology* 113(1): 332-340.
- Barca, A., Romano, A., Storelli, C., y Verri, T. 2013.** Teleost fish models in membrane transport research: the PepT1 (SLC15A1) H⁺ – oligopeptide transporter as a case study. *Annu Rev. Physiol*: 3-19.
- Bakke, S; Jordal, A; Gómez-Requeni, P; Verri, T; Kousoulaki, K; Aksnes, A. y Ronnestad, I. 2010.** Dietary protein hydrolysates and free amino acids affect the spatial expression of peptide transporter PepT1 in the digestive tract of Atlantic cod (*Gadus morhua*). *Comp. Biochem. And Physiol. B.* 156: 48-55.
- Bakke, S. 2008.** Dietary inclusion of peptides and the effect on the regional expression of the oligo-peptide transporter PepT1 (Slc15a1) in the intestine of juvenile Atlantic cod (*Gadus morhua*). Master Thesis University of Bergen, Norway.
- Broer, S. 2008.** Amino acid transport across mammalian intestinal and renal epithelia. *Annu. Rev. Physiol.* 88: 249-286.
- Brodin, B., Nielsen, CU, Steffansen, B. y Frokjaer, S. 2002.** Transport of Peptidomimetic Drugs by the Intestinal Di/tri-peptide Transporter, PepT1. *Farmacología y Toxicología*, 90: 285-296.
- Buddington, R. y Krogdahl, A. 2004.** Hormonal regulation of the fish gastrointestinal tract. *Comparative Biochemistry and Physiology - Part A: Molecular & Integrative Physiology* 139(3): 261-271.

- Cortazar, A. y Silva, E. 2004.** Métodos físico-químicos en biotecnología Y PCR. Universidad Nacional Autónoma De México, Instituto de Biotecnología. Mexico: 5-6.
- Chen YH, YF Lu, Ko TY, Tsai MI, Lin CY, Lin CC, Hwang SP. 2002.** Zebrafish *cdx1b* regulates differentiation of various intestinal cell lineages. *Dev Dyn* 238: 1021-1032.
- Chen H, Pan Y, Wong EA, Bloomquist JR, Webb KE., Jr. 2008.** Molecular cloning and functional expression of a chicken intestinal peptide transporter (cPepT1) in *Xenopus* oocytes and Chinese hamster ovary cells. *J Nutr.*; 132 : 387–393.
- Daniel, H. 2004.** Molecular and integrative physiology of intestinal peptide transport. *Annu. Rev. Physiol.* 66: 361–384.
- Daniel, H., Spanier, B., Kottra, G. y Weitz, D. 1994.** From bacteria to man: archaic proton-dependent peptide transporters at work. *Physiology* (Bethesda) 21:93–102.
- Daniel, H. y Kottra, G. 2008.** The proton oligopeptide cotransporter family SLC15 in Physiology and pharmacology. *Pflugers Arch.* 447: 610–618.
- Dabrowski, K; Terjesen, BF; Zhang, Y; Phang, JM & Lee, KJ. 2005.** A concept of dietary dipeptides: a step to resolve the problem of amino acid availability in the early life of vertebrates. *J Exp Biol.* 208: 2885-2894.

- Fei, Y., Kanai, Y., Nussberger, S., Ganapathy, V., Leibach, F., Romero, M., Singh, S., Boron, W. y Hediger, M. 1994.** Expression cloning of a mammalian proton-coupled oligopeptide transporter. *Nature*. 368: 563–566.
- Fei YJ, Fujita T, Lapp DF, Ganapathy V. y Leibach FH. 2006.** Two oligopeptide transporters from *Caenorhabditis elegans*: molecular cloning and functional expression. *J Biol chem*. 332: 565–572.
- Ganapathy, V., Gupta, N. y Martindale, R.G. 2006.** Protein digestion and absorption. In L. R. Johnson, K. E. Barrett, F. K. Ghishan, J. L. Merchant, H. M. Said and J. D. Wood, *Physiology of the Gastrointestinal Tract*. 4: 1667-1692.
- Hakim, Y., Harpaz, S. y Uni, Z. 2009.** Expression of brush border enzymes and transporter in the intestine of European sea bass (*Dicentrarchus labrax*) following food deprivation. *Aquaculture*. 290: 110–115.
- Kennedy, DJ; Leibach, FH; Ganapathy, V. y Thwaites, DT. 2010.** Optimal absorptive transport of the dipeptide glycylsarcosine is dependent on functional Na⁺/H⁺ exchange activity. *Pflugers Arch*. 445: 139–146.
- Ibarra, C.; Tamay de Dios L. y Velasquillo, C. 2013.** Fundamentos de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y de la PCR en tiempo real. México. *Investigación en discapacidad*. 2 (2): 71-72.
- Lara-Flores, M., Olvera –Novoa, M., Guzmán- Méndez, B. y López- Madrid, W., 2002.** Use of the bacteria *Streptococcus faecium* and *Lactobacillus*

acidophilus, and the yeast *Saccharomyces cerevisiae* as growth promoters in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Aquaculture*. 216: 193-201.

Liang R, Fei YJ, Prasad PD, Ramamoorthy S, Han H, Yang Feng-TL, Hediger MA, Ganapathy V, Leibach FH. 2002. Cotransportador de H⁺ / péptido intestinal humano. .. Clonación, expresión funcional y localización cromosómica. *J Biol Chem*; 270: 6456-6463.

Li IC, Chan CT, Lu YF, Wu YT, Chen YC, Li GB, Lin CY, Hwang SP. 2007. Zebrafish *kruppel-like factor 4a* represses intestinal cell proliferation and promotes differentiation of intestinal cell lineages. *PLoS One*; 6 : e20974.

Mohini, J. y Deshpande, J. 2010. Polymerase Chain Reaction: methods, principles and application. *International Journal of Biomedical Research*: 81-87.

Meissner, B; Boll, M; Daniel, H. y Baumeister, R. 2012. Supresión del transportador de péptido intestinal afecta a la insulina y la señalización de TOR en *Caenorhabditis elegans*. *J Biol Chem* ; 279: 36739-36745.

Meredith, D. y Boyd, C. 2000. Structure and function of eukaryotic peptide transporters. *Cellular and Molecular Life Sciences*. 57: 754-778.

Quinteros, J. Manent, P. Assuncao, 2012. Guía de procedimientos y protocolos genéticos de especies marinas. BANGEN, Macaronesia.

Rønnestad I; Gavaia PJ; CS, Viegas; Verri, T; Romano, A; Nilsen, A; Jordal, AE; Kamisaka, Y. y Cancela, ML. 1999. Cloning, tissue expression and comparative aspects of the Atlantic cod (*Gadus morhua* L.) oligopeptide transporter *PepT1*. *J Exp Biol*; 210:3883–3896.

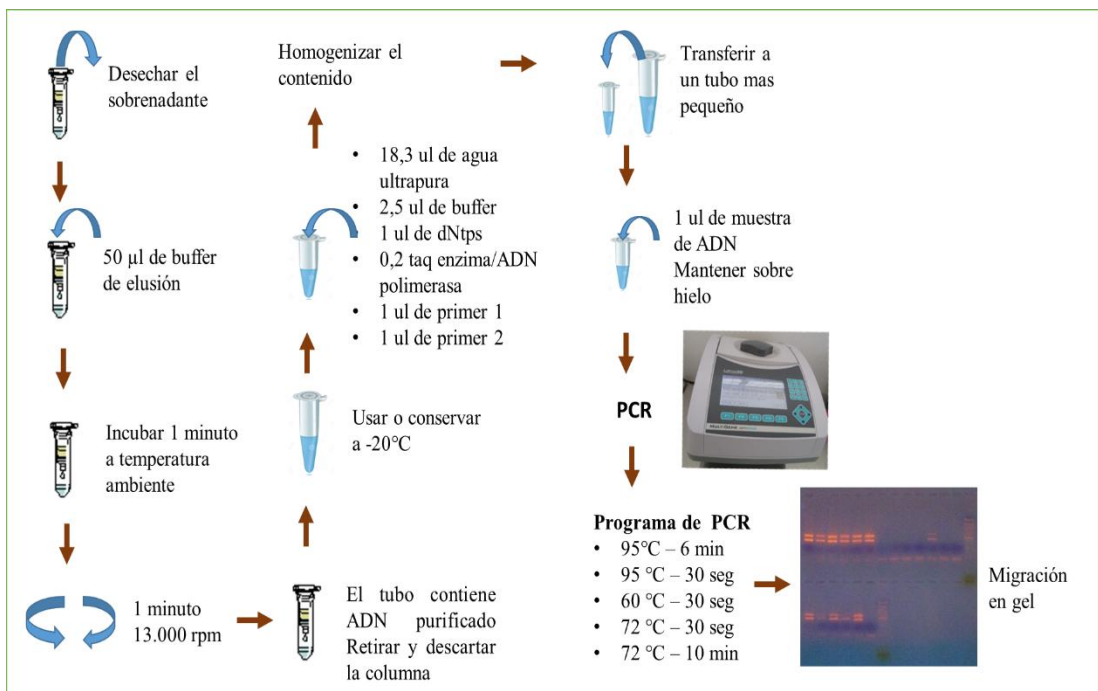
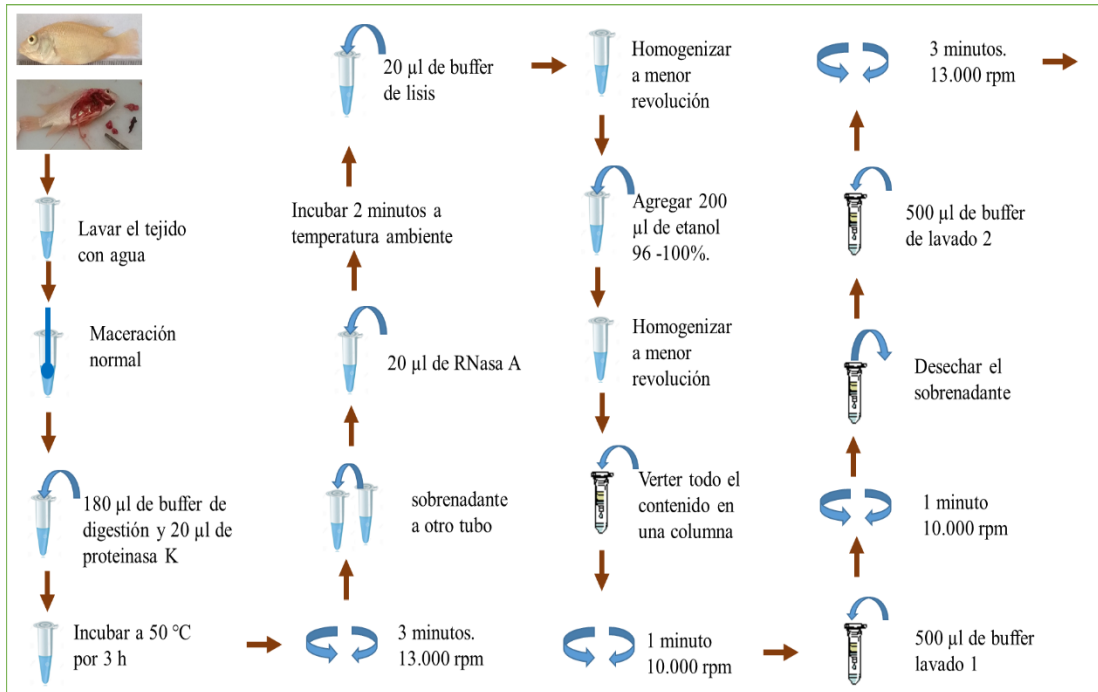
- Rubio-Aliaga, I & Daniel, H. 2010.** Peptide transporters and their roles in physiological processes and drug disposition. *Xenobiotica* 38: 1022–1042.
- Rust, M. 2002.** Nutritional physiology. Fish Nutrition. J. E. Halver and R. W. Hardy. San Diego, CA., Academic Press: 367–452.
- Somma y Querci, 2007.** Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR). Análisis de la Presencia de Organismos Genéticamente Modificados en Muestras de Alimentos. European Comision. Italia.
- Spanier, B. 2014.** Transcriptional and functional regulation of the intestinal peptide transporter PEPT1. *Annu Rev. Physiol.* 592 (5): 871-879.
- Terova, G., Cora, S., Verri, T., Rimoldi, S., Bernardini, G. & Saroglia, M. 2009.** Impact of feed availability on *PepT1* mRNA expression levels in sea bass (*Dicentrarchus labrax*). *Aquaculture*. 294: 288–299.
- Vera, J. 2014.** Establecimiento de la técnica RT-qPCR para análisis de expresión del Péptido Transportador 1 (*PepT1*) en células del epitelio intestinal de juveniles de Tilapia (*Oreochromis sp.*). *Revista La Técnica*. 13: 54-63.
- Verri, T; Romano, A; Barca, A; Kottra, G; Daniel, H. y Storelli, C. 2003.** Transport of di- and tripeptides in teleost fish intestine. *Aquacult Res.* 41: 641–653.
- Verri, T; Kottra, G; Romano, A; Tiso, N; M, Peric; Maffia, M; M, Boll; Argenton, F; Daniel, H. y Storelli, C. 1999.** Molecular and functional characterisation of the zebrafish (*Danio rerio*) *PepT1*-type peptide transporter. *FEBS Lett.*; 549: 115-122.

- Watanabe, C; Kato, Y; Ito, S; Kubo, Y; Sai, Y, y Tsuji, A. 2005.** Na⁺/H⁺ exchanger 3 affects transport property of H⁺/oligopeptide transporter 1. *Drug Metab Pharmacokinet*; 20: 443-451.
- Yue, G.H. y L. Orban. 2001.** Rapid Isolation of DNA from Fresh and Preserved Fish Scales for Polymerase Chain Reaction. *Marine Biotechnology* 3:199-204.
- Zhang, D-X & G.M. Hewitt. 1998.** Field collection: animals. En: Karp, A., Isaac P.G & D.S. Ingram (Eds). *Molecular tools for screening biodiversity*. Chapman & Hall, London.

ANEXOS

ANEXO 1

Protocolo de extracción y amplificación de ADN



ANEXO 2

Equipos utilizados en la investigación



Agitador Vortex (LABNET S-0200).



Microcentrifuga (LABNET - SPECTRAFUGE 24D).



Termociclador (LABNET - MULTIGENE OPTIMAX).



Cámara de electroforesis (LABNET -E0160).



Cabina de flujo laminar para PCR (ESCO SRC-2A2).



Transiluminador (LABNET UV).

ANEXO 3

Programación del termociclador para cada juego de primers

| Juegos de primers | Programación del termociclador | | |
|-------------------|--------------------------------|-------|------|
| Fw2 – Rev2 | Desnaturalización inicial | 95 °C | 6´ |
| | Amplificación 35 ciclos | 95 °C | 30´´ |
| | | 58 °C | 45´´ |
| | | 72 °C | 45´´ |
| | Extensión final amplicones | 72 °C | 10´ |
| | Conservación | 4 °C | ∞ |
| Fw2 – Rev2 | Desnaturalización inicial | 95 °C | 6´ |
| | Amplificación 35 ciclos | 95 °C | 30´´ |
| | | 60 °C | 30´´ |
| | | 72 °C | 30´´ |
| | Extensión final amplicones | 72 °C | 10´ |
| Conservación | 4 °C | ∞ | |
| Fw2 – Rev2 | Desnaturalización inicial | 95 °C | 6´ |
| | Amplificación 40 ciclos | 95 °C | 30´´ |
| | | 60 °C | 25´´ |
| | | 72 °C | 25´´ |
| | Extensión final amplicones | 72 °C | 10´ |
| Conservación | 4 °C | ∞ | |
| Fw2 – Rev2 | Desnaturalización inicial | 95 °C | 6´ |

| | | | |
|--------------|----------------------------|-------|------|
| | Amplificación 40 ciclos | 95 °C | 30'' |
| | | 60 °C | 25'' |
| | | 72 °C | 18'' |
| Fw2 – Rev3 | Extensión final amplicones | 72 °C | 10' |
| | Conservación | 4 °C | ∞ |
| | Desnaturalización inicial | 95 °C | 10' |
| 16Fw – 6brev | Amplificación 40 ciclos | 95 °C | 30'' |
| | | 58 °C | 30'' |
| | | 72 °C | 45'' |
| 11Fw – 6brev | Extensión final amplicones | 72 °C | 10' |
| | Conservación | 4 °C | ∞ |

GLOSARIO DE TERMINOLOGIA

Aminoácido.- Es una molécula orgánica con un grupo amino (-NH₂) y un grupo carboxilo (-COOH). Sustancia química orgánica que constituye el componente básico de las proteínas.

Amplificación.- Es aumento en el número de copias de un fragmento de ADN particular.

Amplicón.- Es un pedazo de ADN o ARN que es la fuente y / o el producto de los eventos de amplificación o replicación naturales o artificiales.

Bromuro de etidio.- Es un agente intercalante usado comúnmente como aclarador de ácidos nucleicos en laboratorios de biología molecular para procesos como la electroforesis en gel de agarosa. Cuando se expone esta sustancia a luz ultravioleta, emite una luz roja-anaranjada, que se intensifica unas 20 veces después de haberse unido a una cadena de ADN.

Desnaturalización.- Es un cambio estructural de las proteínas o ácidos nucleicos, donde pierden su estructura nativa, y de esta forma su óptimo funcionamiento y a veces también cambian sus propiedades físico-químicas.

Expresión.- Es el proceso por medio del cual todos los organismos procariontas y células eucariotas transforman la información codificada por los ácidos nucleicos en las proteínas necesarias para su desarrollo y funcionamiento.

Enzima.- Son moléculas de naturaleza proteica y estructural que catalizan reacciones químicas.

Gen.- Partícula de material genético que, junto con otras, se halla dispuesta en un orden fijo a lo largo de un cromosoma, y que determina la aparición de los caracteres hereditarios en los seres vivos.

Hormona.- Son sustancias secretadas por células especializadas, localizadas en glándulas de secreción interna o glándulas endócrinas (carentes de conductos), o también por células epiteliales e intersticiales cuyo fin es el de influir en la función de otras células.

Hibridación.- Es la construcción artificial de ácidos nucleicos bicatenarios a partir de dos monocatenarios usando la complementariedad de bases. Se trata, por tanto, de un proceso de unión de dos cadenas complementarias de ADN, ARN o de ADN y ARN para formar una molécula de ácido nucleico de doble cadena.

Hidrólisis.- Es una reacción química entre una molécula de agua y otra molécula, en la cual la molécula de agua se divide y sus átomos pasan a formar parte de otra especie química.

Ion.- Es una partícula cargada eléctricamente constituida por un átomo o molécula que no es eléctricamente neutral.

Lisis.- Es el proceso de ruptura de la membrana celular que produce la salida del material intracelular.

Nucleótido.- Son moléculas orgánicas formadas por la unión covalente de un monosacárido de cinco carbonos (pentosa), una base nitrogenada y un grupo fosfato.

Marcador.- (ADN) fragmento de tamaño conocido que se usa para calibrar un gel de electroforesis.

Par de bases (pb).- Es un apareamiento de A con T o de C con G en una doble hélice de ADN; se pueden formar otros pares en el ARN bajo determinadas circunstancias.

PCR (Reacción en cadena de polimerasa).- Describe una técnica en la que se utilizan ciclos de desnaturalización, primer y extensión con ADN polimerasa para amplificar el número de copias de una secuencia blanco de ADN hasta $> 10^6$ veces.

Pepsinógeno.- Es una proenzima, precursora de la pepsina. Es secretada por las células principales o zimogénicas, halladas en las glándulas fúndicas u oxínticas del estómago, que se encuentran principalmente en el cuerpo y fondo del mismo.

Polimerasa.- Es una enzima capaz de transcribir o replicar ácidos nucleicos.

Polimerización.- Es un proceso químico por el que los reactivos, monómeros (compuestos de bajo peso molecular) se agrupan químicamente entre sí, dando lugar a una molécula de gran peso, llamada polímero, o bien una cadena lineal o una macromolécula tridimensional.

Polipéptido.- Es el nombre utilizado para designar un péptido de tamaño suficientemente grande; como orientación, se puede hablar de más de 10 aminoácidos.

Péptido.- Son un tipo de moléculas formadas por la unión de varios aminoácidos mediante enlaces peptídicos.

Proteína.- Son moléculas formadas por cadenas lineales de aminoácidos. Sustancia química que forma parte de la estructura de las membranas celulares y es el constituyente esencial de las células vivas; sus funciones biológicas principales son la de actuar como biocatalizador del metabolismo y la de actuar como anticuerpo.

Primers.- Es una cadena de ácido nucleico o de una molécula relacionada que sirve como punto de partida para la replicación del ADN. Es una secuencia corta de ácido nucleico que contiene un grupo 3'hidroxilo libre que forma pares de bases complementarios a una hebra molde y actúa como punto de inicio para la adición de nucleótidos con el fin de copiar la hebra molde.

Retrotranscripción.- Es un proceso de la biología molecular que implica la generación de una cadena de ácido desoxirribonucleico (ADN) de doble cadena a partir de un ácido ribonucleico (ARN) de cadena simple.

Termoestable.- Que no se altera fácilmente por la acción del calor.