



Universidad Autónoma de Baja California
Facultad de Ingeniería, Arquitectura y
Diseño



BIOINGENIERÍA

Determinación de fertilidad y madurez sexual en adultos de abulón rojo *Haliotis rufescens* mediante la expresión de los genes de las hormonas GnRH y ELH.

TESIS PARA OBTENER EL GRADO DE

BIOINGENIERO

P R E S E N T A

LUIS ALONSO TOSCANO SALGADO

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE BAJA CALIFORNIA
FACULTAD DE INGENIERÍA, ARQUITECTURA Y DISEÑO

DETERMINACIÓN DE FERTILIDAD Y MADUREZ SEXUAL EN ADULTOS DE ABULÓN ROJO *Haliotis rufescens* MEDIANTE LA EXPRESIÓN DE LOS GENES DE LAS HORMONAS GNRH Y ELH.

TESIS

PARA CUBRIR LOS REQUISITOS NECESARIOS PARA OBTENER EL TÍTULO DE
BIOINGENIERO

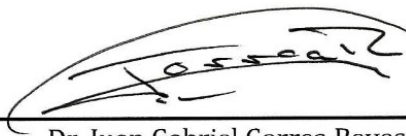
PRESENTA:
LUIS ALONSO TOSCANO SALGADO

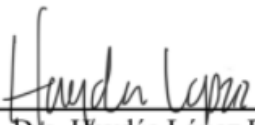
Aprobada por:


Dra. Tatiana Nenetzen Olivares Bañuelos
Director


Dra. Claudia Mariana Gómez Gutiérrez
Sinodal


Dr. Dante Alberto Magdaleno Moncayo
Sinodal


Dr. Juan Gabriel Correa Reyes
Sinodal


Dra. Haydée López Rodríguez
Sinodal

El presente trabajo de investigación fue realizado en el

LABORATORIO DE GENÉTICA

Del Instituto de Investigaciones Oceanológicas, UABC.

Bajo la Dirección y Tutoría de la

DRA. TATIANA NENETZEN OLIVARES BAÑUELOS

AGRADECIMIENTOS

En primer lugar quiero agradecer a mi directora de tesis, Doctora Tatiana Nenetzen Olivares Bañuelos, por apoyarme con sus conocimientos y a lo largo de la elaboración de este trabajo. Además de permitirme realizar esta tesis bajo su tutela.

En segundo lugar, quiero agradecer a toda mi familia. En especial, quiero hacer mención de mi madre Jacqueline Salgado Avilés, a quien me ha brindado apoyo incondicional no solo en el desarrollo de esta tesis, sino a través de cada etapa de mi vida.

A mis amigos y compañeros de clase, en especial a Isaac González, Karla León, Samantha Figueroa y Carolina Valenzuela, por cada momento que compartimos dentro y fuera del salón de clases que hizo la universidad una experiencia inolvidable.

Finalmente, agradecer a mi actual pareja Daniela Franco Redona, por siempre apoyar mis ideas e impulsarme a realizar mis metas.

Muchas gracias a todos.

ÍNDICE DE FIGURAS	7
ÍNDICE DE TABLAS	8
ABREVIATURAS.....	9
1. INTRODUCCIÓN	10
2. ANTECEDENTES	11
3. JUSTIFICACIÓN.....	15
4. HIPÓTESIS.....	16
5. OBJETIVOS	16
5.1. OBJETIVO GENERAL	16
5.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	16
6. METODOLOGÍA.....	17
6.1. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA DE HORMONAS RELACIONADAS CON LA REPRODUCCIÓN Y SUS SECUENCIAS. 17	
6.2. COMPARACIÓN DE SECUENCIAS.	17
6.3. DISEÑO DE PRIMERS.	18
6.4. ANÁLISIS DE PRIMERS	18
6.5. OBTENCIÓN DE TEJIDO DE ABULÓN ROJO <i>HALIOTIS RUFESCENS</i> Y TRATAMIENTO.	18
6.6. PROTOCOLO DE EXTRACCIÓN DE RNA TOTAL.....	18
7. RESULTADOS.....	20
7.1. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA	20
7.2. SECUENCIAS DE HORMONAS	21
7.2.1. <i>GnRH</i>	21
7.2.2. <i>ELH</i>	22
7.2.3. <i>GIH</i>	22
7.2 BÚSQUEDA DE SECUENCIAS DE HORMONAS SELECCIONADAS.	23
7.3 COMPARACIÓN DE SECUENCIAS.....	23
7.3.1 <i>GnRH</i>	23
7.4.2 <i>ELH</i>	24
7.5 PRIMERS PARA GENES DE <i>GnRH</i> Y <i>ELH</i>	25
7.5.1 <i>Análisis de primers forward</i>	25
7.5.1.1 Hairpins.....	25
7.5.1.2 Homodímeros	27
7.5.2 <i>Análisis de primer reverse</i>	30
7.5.2.1 Hairpins.....	30
7.5.2.2. Homodímeros	31
7.5.3 <i>Heterodímeros</i>	33
7.5.3.1 <i>GnRH</i>	33
7.5.3.2 <i>ELH</i>	35
7.6 OBTENCIÓN DE TEJIDO DE ABULÓN ROJO <i>HALIOTIS RUFESCENS</i>	37
7.7 EXTRACCIÓN DE RNA TOTAL	38
7.7.1 <i>Calidad y rendimiento de RNA total</i>	38
7.8 RESUSPENSIÓN PRIMERS	40
8 DISCUSIÓN	40
8.1 PRIMERS	40
8.2 RNA TOTAL	42

9	CONCLUSIONES	42
10	PERSPECTIVAS.....	42
11	REFERENCIAS.....	43

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1.-Comparación de secuencias de hormona GnRH de diferentes organismos.	21
Figura 2.-Comparación de secuencias de hormona ELH de diferentes organismos.....	22
Figura 3.- Comparación de secuencias de hormona GIH de diferentes organismos.	22
Figura 4.- Región altamente conservada de gen GnRH entre <i>Haliotis discus hannai</i> y <i>Aplysia californica</i>	23
Figura 5.-Región conservada de gen ELH entre <i>Charonia tritonis</i> y <i>Aplysia californica</i>	24
Figura 6.- Hairpin generado en primer forward de gen GnRH.....	25
Figura 7.- Hairpin generado en primer forward de gen ELH.	26
Figura 8.- Homodímeros generados con primer forward de GnRH.	27
Figura 9.- Homodímeros generados con primer forward de ELH.	28
Figura 10.- Hairpin generado en primer reverse de gen ELH.....	30
Figura 11.- Homodímeros generados con primer reverse de GnRH.	31
Figura 12.- Homodímeros generados con primer reverse de ELH.	31
Figura 13.- Homodímeros generados con primer reverse de ELH.	32
Figura 14.- Heterodímeros generados entre primer forward y primer reverse de GnRH.	34
Figura 15.- Heterodímeros generados entre primer forward y primer reverse de GnRH.	34
Figura 16.- Heterodímeros generados entre primer forward y primer reverse de GnRH.	35
Figura 17.- Heterodímeros generados entre primer forward y primer reverse de ELH.....	35
Figura 18.- Heterodímeros generados entre primer forward y primer reverse de ELH.....	36
Figura 19.- Heterodímeros generados entre primer forward y primer reverse de ELH.....	37
Figura 20.- Abulones utilizados para obtención de muestra.....	38
Figura 21.- Electroforesis para 4 muestras de abulón.....	39

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1.- Información relacionada con las fuentes bibliográficas investigadas para la obtención de hormonas.	20
Tabla 2.- Características de primers forward diseñados de las hormonas GnRH y ELH.	28
Tabla 3.- Características de primers reverse diseñados de las hormonas GnRH y ELH.	32
Tabla 4.- Características físicas de los organismos adultos de abulón rojo <i>Haliotis rufescens</i> a partir de los cuales se obtuvieron muestras de tejido.....	37
Tabla 5.- Resultados cuantitativos de las muestras de RNA total a partir de organismos adultos de abulón rojo <i>Haliotis rufescens</i>	39
Tabla 6.-Resuspensión de primers.	40

ABREVIATURAS

RNA	Ácido Ribonucleico
CONAPESCA	Comisión Nacional de Acuacultura y Pesca
ELH	Hormona Liberadora de óvulos (Egg Laying Hormone)
GC%	Porcentaje de guaninas y citosinas en primer
GIH	Hormona inhibidora de gónadas (Gonad-inhibiting hormone)
GnRH	Hormona liberadora de gonadotropina (Gonadotropin-releasing hormone)
INAPESCA	Instituto Nacional de Pesca
NCBI	Centro Nacional de Información Biotecnológica (National Center for Biotechnology Information)
ng	Nano gramo
nt	Nucleótidos
qPCR	Reacción en Cadena de la Polimerasa en tiempo real (Real-time polymerase chain reaction)
SAGARPA	Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación
T _m	Temperatura de fusión
°C	Grados centígrados
μL	Micro litro

1. Introducción

Mollusca es un grupo de animales con al menos 50,000 especies vivas (Bunje, 2003). Los moluscos son invertebrados con cuerpos blandos que típicamente están cubiertos por un exoesqueleto duro (Bunje, 2003). Dentro de este grupo se encuentran los abulones, moluscos gasterópodos comestibles de concha ligeramente aplanada en forma de espiral, forrada de nácar (Abalone Definition of Abalone by Merriam-Webster, s.f.). Actualmente el abulón es uno de los productos pesqueros más caros en el mundo, se produce en muchos países, incluyendo México, generando aproximadamente ingresos de poco más de 102 millones de pesos al año (GLOBEFISH Food and Agriculture Organization of the United Nations, s.f.). En México el abulón se obtiene casi al 100% en los estados de Baja California y Baja California Sur y representa una de las especies más importantes de la pesca (Comisión Nacional de Acuacultura y Pesca, 2017). Sin embargo, en las últimas dos décadas la pesquería ha colapsado sustancialmente, como se refleja en la caída de toneladas de captura del 2009 al 2018, pasando de 675 a 277 toneladas (Comisión Nacional de Acuacultura y Pesca, 2017). Por esto, la tendencia en la producción de abulón ha llevado a desarrollar nuevas metodologías enfocadas a incrementar la productividad mediante técnicas de acuacultura, y con esto reducir las capturas (Bigot et al., 2012; Conapesca, 2016). En nuestro país en los últimos años la producción del abulón mediante acuacultura haciendo uso de diferentes estrategias biotecnológicas, ha incrementado un 21% entre 2016 y 2017, mientras que la captura disminuyó un 17% (Comisión Nacional de Acuacultura y Pesca, 2017). Sin embargo, aún es necesario innovar en estrategias de reproducción que conlleven a mejoras en el cultivo del abulón. Esto no es tan sencillo, ya que la reproducción de este molusco cambia de acuerdo con la especie, las características fisicoquímicas del medio en donde se encuentre y de la densidad de reproductores maduros en cada hábitat (INAPESCA, 2018; Catton et al., 2016; Instituto Latinoamericano de la Comunicación Educativa, s.f.; Instituto Latinoamericano de la Comunicación Educativa, s.f.).

Para la acuicultura es importante contar con información relacionada con la fecundidad de los abulones y/o su proceso de maduración gonadal, gracias a esto se puede contribuir al mejoramiento de métodos de cultivo (García Domínguez, 2018). En este sentido, los neuropéptidos representan moléculas de gran importancia para durante la gametogénesis en los moluscos, ya que estos moduladores químicos organizan eventos fisiológicos complejos, incluidos los asociados con el crecimiento y la reproducción (Burbach, 2011; Bose et al., 2017). Entre los neuropéptidos identificados en abulones y otros invertebrados marinos se encuentran la hormona liberadora de gonadotropina (GnRH, por sus siglas en inglés) en moluscos marinos, un neuropéptido clave que regula la reproducción en especies vertebradas e invertebradas (Kim et al., 2017). La hormona liberadora de huevos (ELH, por sus siglas en inglés), la cual juega un papel crucial en la inducción de la actividad de desove de los moluscos gasterópodos, entre otras (Morishita & Minakata, 2016). Considerando lo anterior, el presente proyecto de investigación tiene como objetivo utilizar un enfoque molecular para identificar en abulón estas neurohormonas y en un futuro, relacionarlas con los procesos de maduración de las gónadas de aquellos organismos que puedan ser utilizados como reproductores para el cultivo de esta especie de importancia comercial.

2. Antecedentes

Mollusca es uno de los grupos de animales más diversos del planeta, con al menos 50,000 especies vivas, incluye organismos como caracoles, pulpos, calamares, almejas, vieiras, ostras y abulones (Bunje, 2003). Los moluscos son invertebrados protostomados, triblásticos, con simetría bilateral y no segmentados (Rios et al., 2016); tienen cuerpos blandos que típicamente tienen una región de "cabeza" y "pie", y a menudo sus cuerpos están cubiertos por un exoesqueleto duro (Bunje, 2003). Muchos de éstos moluscos son utilizados desde tiempos prehistóricos como alimento (Rios et al., 2016).

La diversidad de moluscos marinos en México se estima en 4643 especies, de las cuales 2576 corresponden a la costa del Pacífico y 2067 a la del golfo de México y Caribe mexicano. (Castillo-Rodríguez, 2014). Uno de los moluscos más explotados y producidos en el mundo es el abulón. Son moluscos gasterópodos comestibles que se aferran a las rocas, cuentan con una concha aplanada ligeramente en forma de espiral, forrada de nácar y con una fila de aberturas a lo largo de su borde exterior (Abalone Definition of Abalone by Merriam-Webster, s.f.).

Actualmente el abulón es uno de los productos pesqueros más caros en el mundo y se consume a nivel mundial (GLOBEFISH Food and Agriculture Organization of the United Nations, s.f.). El abulón en México se vende aproximadamente por 25 dólares/kg (INAPESCA, 2018), gracias esto en 2017 la producción de abulón generó ingresos de 102.685 millones de pesos (CONAPESCA, 2018). Dado que el abulón se consume mundialmente, su cultivo se lleva a cabo en muchos países; los dos principales productores de abulón son China y la República de Corea con 127 mil y 10 mil toneladas generadas, respectivamente. Otros países importantes en su producción y exportación son Australia, Chile, Estados Unidos, entre otros (GLOBEFISH | Food and Agriculture Organization of the United Nations, s.f.).

En México, el abulón se posiciona en el lugar 50 de producción pesquera marina, por su valor está en el lugar 39 y en exportación en el número 13 (Comisión Nacional de Acuacultura y Pesca, 2017). Además de sus usos como alimento, el abulón sirve para la fabricación de porcelanas, cementos y cosméticos mediante la utilización de su concha (Conapesca, 2016). En nuestro país, la producción de abulón se encuentra casi en su totalidad en los estados de Baja California y en Baja California Sur, estados que producen más del 98% de la producción total anual (Comisión Nacional de Acuacultura y Pesca, 2017). Los sitios de mayor productividad se encuentran en la Costa occidental de la Península, desde la línea divisoria internacional con Estados Unidos, hasta arroyo El Conejo, BCS (Conapesca, 2016).

Se conoce que la reproducción de los abulones consiste en liberar los espermatozoides y óvulos en el agua a través de poros, por lo que la fertilización dependerá de las altas densidades de óvulos y espermatozoides (INAPESCA, 2018). Además de lo anterior, se requiere que los machos y las hembras estén cerca (<3 m) para garantizar altas tasas de fertilización (Catton et al., 2016). Se debe considerar que la época de reproducción cambia de acuerdo con la especie y las características fisicoquímicas del medio (Instituto Latinoamericano de la Comunicación Educativa, s.f.). Dependiendo de la especie de abulón, el desarrollo larval se encuentra entre 7 a 10 días, durante este periodo larva mide entre las 100 y 180 micras de longitud (Leighton, 2008).

En México el abulón azul y el abulón amarillo son las especies más importantes para la pesquería, sin embargo, su pesca ha colapsado sustancialmente a partir del siglo pasado (García Domínguez, 2018). Estas no son las únicas especies que han disminuido sus poblaciones, también existen reportes sobre abulón blanco en el sur de California que presentan una disminución en sus densidades desde 2002 (Catton et al., 2016). A nivel nacional se ha presentado una disminución en la producción de abulón, pasando de 744 a 273 toneladas (63.3%) y, a nivel estatal también se ha visto muy afectada la captura del abulón, bajando la producción de Baja California de 243 a 111 toneladas, lo cual representa un decremento de casi el 55% (Comisión Nacional de Acuacultura y Pesca, 2017).

El estudio de abulón se ha incrementado en los últimos años porque es de gran importancia económica el manejo de la fertilidad de especies acuícolas (Bigot et al., 2012; Conapesca, 2016). En años pasados, la producción de abulón ha cambiado de metodología, utilizando métodos de acuacultura en lugar de capturarlo en un ambiente natural (GLOBEFISH | Food and Agriculture Organization of the United Nations, s.f.). Por esto ha aumentado la obtención de abulón mediante este proceso y entre 2016 y 2017 se obtuvo un aumento del 21%, mientras que la captura disminuyó un 17% (Comisión Nacional de Acuacultura y Pesca, 2017).

Diferentes estrategias se han desarrollado con el propósito de convertir el cultivo en una biotecnología para no depender de las poblaciones marinas (INAPESCA, 2018). En Baja California Sur se hace uso de laboratorios operados por cooperativistas pesqueros de acuacultura (SAGARPA, 2016), producción de criaderos y el almacenamiento de abulón cultivado (Catton et al., 2016), mientras que en Baja California se opta por la creación de laboratorios de semillas de abulón (INAPESCA, 2018).

A pesar de estos avances, actualmente los métodos convencionales para estimar la fecundidad de especies marinas son muy inciertos, por lo que es importante contar con información relacionada con su fecundidad que conlleve al mejor desarrollo del cultivo de moluscos de importancia comercial (García Domínguez, 2018). Un avance clave para este tipo de desarrollo en acuacultura es el estudio de neuropéptidos.

Los neuropéptidos son pequeñas sustancias proteicas producidas y liberadas por las neuronas a través de la ruta secretora regulada y actúan sobre sustratos neurales (Burbach, 2011). Estos moduladores químicos organizan eventos fisiológicos complejos, incluidos los asociados con el crecimiento y la reproducción (Bose et al., 2017). En el pasado, la identificación de neuropéptidos fue a partir de extractos de tejido neuronal purificados; actualmente se obtienen con tecnología de secuenciación de siguiente generación combinada con bioinformática. Entre los neuropéptidos identificados se encuentran algunos que están involucrados en la reproducción y el crecimiento de moluscos y su estudio podría proporcionar la base para la manipulación reproductiva y ayudar en la recuperación de poblaciones (Bose et al., 2017). Con estos avances, fue posible localizar la hormona liberadora de gonadotropina (GnRH) en moluscos marinos. Este es un neuropéptido clave que regula la reproducción en humanos y otros vertebrados (Kim et al., 2017). En un estudio Sharker y colaboradores (2020), describen como la GnRH podría estar involucrada en el control de la maduración gonadal y la gametogénesis de *Haliotis discus hannai*. Además de la GnRH, se ha identificado a la hormona

liberadora de huevos (ELH, por sus siglas en inglés) que juega un papel crucial en la inducción de la actividad de desove de los moluscos gasterópodos (Saitongdee et al., 2005). Además, existe evidencia de que la ELH induce la puesta de huevos cuando se inyecta en *Aplysia* y otros gasterópodos (Morishita & Minakata, 2016).

3. Justificación

Como se conoce, durante muchos años el ser humano ha abusado de los recursos naturales que se encuentran en el planeta, siendo utilizados como alimentos, materia prima para productos, etc. En el caso de los recursos marinos, la sobreexplotación ha provocado un gran desabasto de poblaciones enteras, dejando diferentes especies al borde de la extinción y en casos más extremos, totalmente extintas. Bajo esta premisa, en los pasados años la producción de animales marinos se ha realizado mediante acuicultura. Este proceso ha generado una manera de controlar más las poblaciones, evitando su pesca descontrolada y por lo tanto una posible extinción. Sin embargo, existen aún problemas para conocer bien los ciclos reproductivos y la madurez sexual de diferentes especies como la del abulón rojo *Haliotis rufescens*. Este organismo es sacrificado cada vez que se requiere saber si está listo o no para su reproducción, generando pérdida de reproductores en cada proceso. Considerando esto, es de gran importancia mejorar los métodos para determinar la etapa de reproducción en el abulón rojo *Haliotis rufescens*, buscando una alternativa más económica y que no implique el sacrificio de los organismos. Para lograrlo, se plantea realizar una búsqueda de marcadores moleculares, como los neuromoduladores, que nos permitan conocer el estado gonadal en que se encuentran los abulones y saber si están o no listos para su reproducción. Específicamente se realizará el análisis de las hormonas GnRH y ELH reportadas en abulón y en otros invertebrados marinos. Diferentes estudios demuestran que la GnRH sintetizada a partir de los ganglios cerebrales, pleuropedales, los testículos y ovarios, participa en la maduración gonadal, gametogénesis y

regular la secreción de otras hormonas reproductivas en especies de invertebrados como el abulón del pacífico *Haliotis discus hannai*. Al igual que la GnRH, se ha demostrado que la ELH estimula el desove en especies de invertebrados, como el abulón de labio verde *Haliotis laevigata*.

4. Hipótesis

La fertilidad y madurez sexual en adultos de abulón rojo *Haliotis rufescens* se determina mediante el análisis de la expresión de los genes de las hormonas GnRH y ELH los cuales están directamente relacionados con el ciclo reproductivo de la especie.

5. Objetivos

5.1. Objetivo general

Determinar la fertilidad y madurez sexual en adultos de abulón rojo *Haliotis rufescens* mediante la expresión de los genes de las hormonas GnRH y ELH.

5.2. Objetivos específicos

- Revisión de literatura para encontrar marcadores moleculares que puedan ser utilizados como indicadores de la fertilidad en abulón rojo *Haliotis rufescens*, utilizando principalmente las bases de datos Uniprot y Pubmed
- Revisión de literatura las hormonas GnRH y ELH para invertebrados marinos, utilizando las bases de datos Uniprot y Pubmed
- Análisis de las secuencias de las neurohormonas GnRH y ELH para encontrar sitios altamente conservados entre diferentes especies de invertebrados marinos mediante el programa Clustal Omega

- Diseñar primers para las neurohormonas GnRH y ELH de abulón rojo *Haliotis rufescens* a partir de secuencias reportadas de *Haliotis discus hannai* y *Aplysia californica*, entre otros moluscos marinos, utilizando la herramienta PrimerQuest Tool de Integrated DNA Technologies
- Analizar la viabilidad de los primers diseñados para las neurohormonas GnRH y ELH de abulón rojo *Haliotis rufescens*, mediante herramientas bioinformáticas para determinar estructuras secundarias, hetero y homodimerización.

6. Metodología

6.1. Revisión bibliográfica de hormonas relacionadas con la reproducción y sus secuencias. Se realizó investigación bibliográfica sobre hormonas relacionadas con la madurez sexual y gonadal de invertebrados marinos, esto por medio de diferentes sitios de buscadores, Google Scholar (<https://scholar.google.com/>), PubMed (<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/>) de NCBI y Science Direct (<https://www.sciencedirect.com/>), obteniendo acceso a diversos artículos. Se investigaron las secuencias de hormonas de invertebrados marinos en las bases de datos NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucleotide/>) y UniProt (<https://www.uniprot.org/>), buscando obtener las secuencias que permitirá realizar una comparación entre ellas para su posterior obtención de primers.

6.2. Comparación de secuencias.

Las secuencias seleccionadas de las especies marinas, se compararon para localizar las regiones altamente conservadas de las hormonas de interés, esto mediante la herramienta Clustal Omega del Instituto Europeo de Bioinformática (<https://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/>).

6.3. Diseño de primers.

A partir de la comparación de secuencias se obtuvieron diferentes fragmentos conservados para la obtención de primers de las hormonas, estos fueron elaborados mediante la herramienta PrimerQuest Tool de Integrated DNA Technologies (<https://www.idtdna.com/pages>), la cual permitió realizar los primers con las siguientes especificaciones: entre 17 y 25 bases por primer, el tamaño del amplicón deberá ser entre 50 y 150 pares de bases, el porcentaje de citosinas y guaninas deberá de ser aproximadamente 55%, la diferencia de T_m entre el primer forward y reverse no deberá sobrepasar 1 °C, la posición 3' de cada primer deberá terminar en adenina o en timina.

6.4. Análisis de primers

Para la verificación de primers se utilizó la herramienta PrimerQuest Tool de Integrated DNA Technologies (<https://www.idtdna.com/pages>), la cual permitió observar cualquier estructura secundaria que los primers pueden presentar, así como lo son homodímeros, heterodímeros y harpins.

6.5. Obtención de tejido de abulón rojo *Haliotis rufescens* y tratamiento.

Se obtuvo tejido de abulón a partir de tentáculos de cuatro muestras distintas, para la selección de muestras se determinó que dos muestras serían machos y hembras. Este proceso fue realizado con tijeras de disección que facilitaron el corte, cada muestra fue introducida en un tubo eppendorf individual y fue colocada en hielo para evitar descomposición de cada muestra. A partir de la obtención de estos tejidos se busca extraer el RNA total de cada muestra.

6.6. Protocolo de extracción de RNA total.

Se extrajeron ARN total con el reactivo TRIzolTM siguiendo las instrucciones del fabricante (Invitrogen, Carlsbad, CA). A continuación la serie de pasos realizados:

Lisado y homogenización de muestras en TRIzolTM

- Se añadieron 250 µL de TRIzolTM a cada muestra de abulón.
- Centrifugado durante 5 minutos a 14 rpm a 4° C, y se transfirió sobrenadante a nuevo tubo.
- Se agregaron 50 µL de cloroformo y agitó.
- Se centrifugó durante 15 minutos a 14 rpm a 4° C.
- Se transfirió fase acuosa a nuevo tubo.

Precipitación de ARN

- Se agregaron 125 µL.
- Se incubó 10 minutos a 4°C.
- Se centrifugó 10 minutos a 4°C a 14 rpm.
- Se desechó sobrenadante.

Lavado de ARN

- Resuspendido de sedimento en 250 µL de etanol al 75%.
- Se centrifugó 5 minutos a 10 rpm a 4°C.
- Se desechó sobrenadante.
- Se dejó secar ARN durante 5 minutos.

Análisis de ARN

- Se resuspendió cada muestra en 25 µL de agua inyectable.

- Se tomó 2 µL de los 25 µL para cuantificar en NanoDrop ND-1000 (Biolab, Mulgrave, VIC, Australia).
- Se tomó 2 µL de los 23 µL para determinar calidad en electroforesis, añadir:
 - 6 µL de agua inyectable.
 - 2 µL de colorante 6X.
 - 2 µL de agua SYBER.

7. Resultados

7.1. Revisión bibliográfica

En la búsqueda de información respecto a la reproducción de la especie *Haliotis rufescens*, se investigaron diversos artículos que hablaran de hormonas que están involucradas en la fertilidad y madurez sexual de diferentes moluscos acuáticos. De esta investigación se obtuvieron las hormonas GnRH, ELH y GIH. En la tabla 1 se puede observar información sobre los artículos investigados, incluyendo el nombre de las especies con las que están relacionados, las hormonas involucradas, su cita y la dirección de la obtención del gen.

Tabla 1.- Información relacionada con las fuentes bibliográficas investigadas para la obtención de hormonas.

Especie	Hormona	Cita	doi	Obtención gen
<i>Haliotis discus hannai</i>	GnRH	(Kim et al., 2017)	10.1016/j.cbpa.2017.04.001	https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucleotide/MK089558.1
<i>Uroteuthis edulis</i>	GnRH	(Onitsuka et al., 2009)	10.2108/zsj.26.203	https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucleotide/219687547
<i>Octopus</i>	GnRH	(Di Cristo et al.,	10.1016/j.peptid	https://www.ncbi

<i>vulgaris</i>		2009)	es.2008.07.007	i.nlm.nih.gov/nuccore/AB185200.1
<i>Crassostrea gigas</i>	GnRH	(Bigot et al., 2012)	doi.org/10.1016/j.peptides.2012.01.017.	https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/HQ712119.1
<i>Sepiella japonica</i>	GnRH	(Yan et al., 2016)	10.1002/jez.2030	https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/KP982885.1
<i>Aplysia californica</i>	GnRH	(Zhang et al., 2008)	10.1016/j.ygcen.2007.11.015	https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/NM_001204553.1
	ELH	(Garden et al., 1998)	10.1073/pnas.95.7.3972	http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/M29345.1
<i>Mizuhopecten yessoensis</i>	ELH			https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/MH045216.1
<i>Charonia tritonis</i>	GnRH	(Bose et al., 2017)	10.1016/j.peptides.2017.01.004.	https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/KY287981.1
	ELH			https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/KY287968.1

7.2. Secuencias de hormonas

7.2.1. GnRH

<i>Strongylocentrotus purpuratus</i>	---ATGGCCCGGTGAAA---G-----CGTCAATGGCCCGGTGTAAGCGTCAATATC	743
<i>Homo sapiens</i>	G-----GGTAAGGTAATGAATC--TCTCCATCTGGGAATGATTAACACA	1085
<i>Octopus vulgaris</i>	TGGATAGATGTTT-----TGCCATCCTCTCGCCAATGAGCCGCAGT-----	918
<i>Haliotis discus hannai</i>	-----CTCA-----	655
<i>Aplysia californica</i>	CGACAAG-----AAAAAAAAGTTATCAG-CA--CAACAGCACCCGGGGGTCA-----	761
<i>Crassostrea gigas</i>	TGGATGGCAGCCCGGCAAGAGAAGCTACCGAGG-----	161
<i>Charonia tritonis</i>	CGGCTGGCACCCCTGGCAAGCGAGGGAACGGGGCACTCAACAAG--GCAACATTCT----	431
<i>Uroteuthis edulis</i>	CGGATGGCACCCCTGGCGGCAACGTAAGT-GG-A-----ATTCC-----	140
<i>Sepiella japonica</i>	TGGATGGCACCCCTGGTGGTAAACGAAGT-GG-A-----CTTCC-----	234

Figura 1.-Comparación de secuencias de hormona GnRH de diferentes organismos.

En la figura 1 se puede observar la comparación de la secuencias de la hormona GnRH de los organismos investigados, los cuales se encuentran especificados en la tabla 1. Se puede distinguir fragmentos similares entre especies muy cercanas al abulón rojo *Haliotis rufescens*, como lo es *Haliotis discus hannai*, *Aplysia californica*, etc., también se encuentra la comparación con la hormona de GnRH presente en *Homo sapiens*.

Para el siguiente proceso se decidió trabajar con las secuencias de *Haliotis discus hannai* y *Aplysia californica*, siendo estas las especies más cercanas al abulón rojo *Haliotis rufescens*.

7.2.2. ELH

<i>Aplysia californica</i>	-----TATGACGATAATGGCGAGGACGTATTTAGCAACGAGAAAAGGAGATTACGGTT	527
<i>Charonia</i>	AGGCTT-ACACAAGGTCACGGCCAGGTCTT---CAG----GGGTCAAGG-----CTT	528
<i>Mizuhopecten yessoensis</i>	ACTTTTGGAAACAACATCATT-CTGGGAAC---CAG----GCGTAAATG----TAC-CTT	145
	* * * * *	

Figura 2.-Comparación de secuencias de hormona ELH de diferentes organismos.

En la figura 2 se puede observar la comparación de las secuencias de la hormona ELH de los organismos investigados, los cuales se encuentran especificados en la tabla 1. Se puede distinguir fragmentos similares entre especies cercanas al abulón rojo *Haliotis rufescens*.

Para el siguiente proceso se decidió trabajar con las secuencias de *Charonia tritonis* y *Aplysia californica*, siendo estas las especies más cercanas al abulón rojo *Haliotis rufescens*.

7.2.3. GIH

<i>Macrobrachium</i>	GAGTCATGGGAAATCGTGACTTGTACGAATACGTCGTCAGGATATGCGACGACTGCGAAA	628
<i>Panulirus</i>	GGATATTCGGCAATCGAGACGCGTACGACAAAGTGGAACAAGTCTGTGATGACTGCTACA	425
<i>Metapenaeus</i>	GCGCCATGGGGAACAGGGACATCTACAACAAAGTGTCCTGTGTGCGACGACTGTGCCA	179
<i>Litopenaeus</i>	GTGCAATGGGAAATCGTGACATGTACAGGAAGGTAGAGCGAGTTTGCGAGGACTGCACCA	192
<i>Penaeus</i>	GTGCAATGGGTAATCGGGATATGTACAACAAGGTGGAGCGTGTTTGCGAGGACTGCACCA	229
<i>Fenneropenaeus</i>	GTGCAATGGGAAACCGTGACATGTACAGAAAGGTGGAACGTGTTTGCGAGGACTGCACCA	194
	* * * * *	

Figura 3.- Comparación de secuencias de hormona GIH de diferentes organismos.

En la figura 3 se puede observar la comparación de las secuencias de la hormona GIH de los organismos investigados, se logra apreciar fragmentos similares entre especies de crustáceos.

Finalmente se descarta trabajar con esta hormona porque no se encontró evidencia suficiente para determinar que esta hormona está presente en abulones.

7.2 Búsqueda de secuencias de hormonas seleccionadas.

Al decidir trabajar con las hormonas GnRH y ELH, se investigó en las bases de datos mencionadas en el punto 7.1, obteniendo las secuencias en mRNA de diferentes especies, como *Haliotis discus hannai*, *Aplysia californica*, *Uroteuthis edulis*, *Octopus vulgaris*, *Crassostrea gigas*, entre otras.

7.3 Comparación de secuencias

7.3.1 GnRH

Haliotis_discus_hannai	AGGAAAGACATCCTCATGCTTGTCATCGTCCGCCTCCCTCCTCCGCCAGAGCTCTCG	407
Aplysia_californica	GGCAAAAA-----GAGATCGTCCGCCTCCCTCCTCCGCCAGAGCTCTCG	331
	* * * *	
Haliotis_discus_hannai	GAAGCAGCAGCAGTAGTAGCAGTAACAGTGGCTTGGACGTCACAGACGCCGACAGCAGCA	467
Aplysia_californica	GAAGCAGCAGCAGTAGTAGCAGTAACAGTGGCTTGGACGTCACAGACGCCGACAGCAGCA	391

Haliotis_discus_hannai	GGGGAGGTGTCAGCAGCTTGAGTGGGCGTGGTTTCGGCGTTGGTGAGCTCCGATTGCAAC	527
Aplysia_californica	GGGGAGGTGTCAGCAGCTTGAGTGGGCGTGGTTTCGGCGTTGGTGAGCTCCGATTGGTCG	451

Figura 4.- Región altamente conservada de gen GnRH entre *Haliotis discus hannai* y *Aplysia californica*.

Se realizó comparación de las secuencias investigadas de GnRH, como se puede observar en la figura 4, se logró identificar gracias a este proceso una región altamente conservada (color verde) que consta de 151 bases, esta secuencia se encuentra entre las bases 372 y 524 de *Haliotis discus hannai* y entre las bases 296 y 448 de *Aplysia californica*, a partir de esta secuencia se realizaron los primers para llevar a cabo el trabajo de PCRq de este gen.

7.4.2 ELH

Charonia	CTTTGCGACTGTTTAAAAGACTGAGTGAGTGGTTTCGTCGTTTTTGCTGAGTTTCGGGAC	265
Aplysia_californica	ATTTCACAA- GCCAAAGCCTACGTAATGAA--GCG-----CCCAATAACCGGCC	254
	*** * ** * * * * * * * * * * * * * * *	
Charonia	TTGAATCG----TTCTCTCTGTCTGTCTCTC--TCTCCTGCAGCTGTTGCTGAGTGGT	319
Aplysia_californica	GACAAACACAATGTCTCTCATCTGTGCCTCACCTCTCCTC--TCTGT-GCGTAATGTC	311
	* * * * * * * * * * * * * * * * * * * *	
Charonia	TGGGTG----T-TTTTCGTTTGAAGAGATTCTAAGATAAAAGAAGAATGACGACCATG	374
Aplysia_californica	ACAATCTGCCTCTGTACACGGGAAAACTTCGCCACCAACAGAGCAGTAAAATCGTCATC	371
	* * * * * * * * * * * * * * * * * * * *	
Charonia	GCCT-TCTTGC-----TCCCCATCCTAGCGGCCTTTTCTCTCCTGGGCCTCTCATCAG	426
Aplysia_californica	ACCTTTCGTGGTACTTTCCCCGACGACAACGTGGTCAGT-----ATGTCTGGAG	421
	*** * * * * * * * * * * * * * *	
Charonia	TTCAAGGCCTCCCCACCTCTAAGGCCTCCACGTCACCTCCG-----GGGTGGCGCCAGA	481
Aplysia_californica	AGAATG-----GCTACCGCTCGGCTCTCCG-CGAAGCGTTCGACAAAAGCTCGCGAGATT	475
	* * * * * * * * * * * * * * * * * *	
Charonia	ACGAGGCTTACACAAGGTCACGGCCAGGT---CTTC-----AGGGGTCAAGGC	526
Aplysia_californica	ATG-----ACGATAATGGCGAGGACGTATTAGCAACGAGAAAAGGAGATTACGG	525
	* * * * * * * * * * * * * * * * * *	
Charonia	TTTAACATAACGAGACATCTCTCTGAATCAAGATCTGAAGAGTCTCGCTAATATGCTCCT	586
Aplysia_californica	TTCCACAAAAGGAGACTCCGATTTCGACAGGAGAGATCAAGATGAA-GGTAACTTTCGGC-	583
	* * * * * * * * * * * * * * * * * * *	

Figura 5.-Región conservada de gen ELH entre *Charonia tritonis* y *Aplysia californica*.

Se realizó comparación de las secuencias investigadas de ELH, como se puede observar en la figura 5, se logró identificar gracias a este proceso una región altamente conservada (color verde), la cual consta de 379 bases, esta secuencia se encuentra en entre las bases 205 y 586 de *Charonia tritonis* y entre las bases 194 y 583 de *Aplysia californica*, a partir de esta secuencia se realizaron los primers para llevar a cabo el trabajo de PCRq de este gen.

7.5 Primers para genes de GnRH y ELH

7.5.1 Análisis de primers forward

7.5.1.1 Hairpins

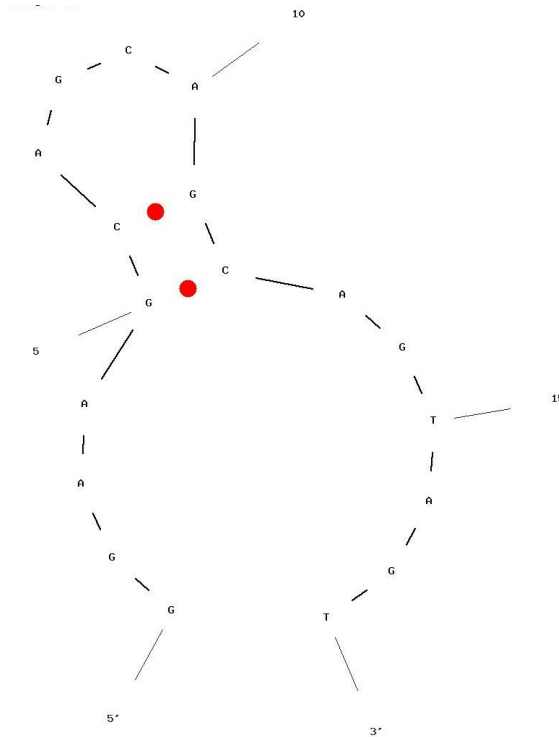


Figura 6.- Hairpin generado en primer forward de gen GnRH

En la figura 6 se puede observar una estructura que forma el primer forward diseñado para el gen GnRH, el cual cuenta con una T_m de 52.1, el cual se encuentra por debajo de la temperatura a la cual se llevará el qPCR, por lo cual no existe problema por la existencia de esta posible estructura.

7.5.1.2 Homodimeros



Figura 8.- Homodimeros generados con primer forward de GnRH.

En la figura 8 se puede observar las uniones que puede tener el primer forward de GnRH con otro primer forward de GnRH, dando un total de 6 posibles uniones, este número es considerado alto, aun así se planea trabajar con él.

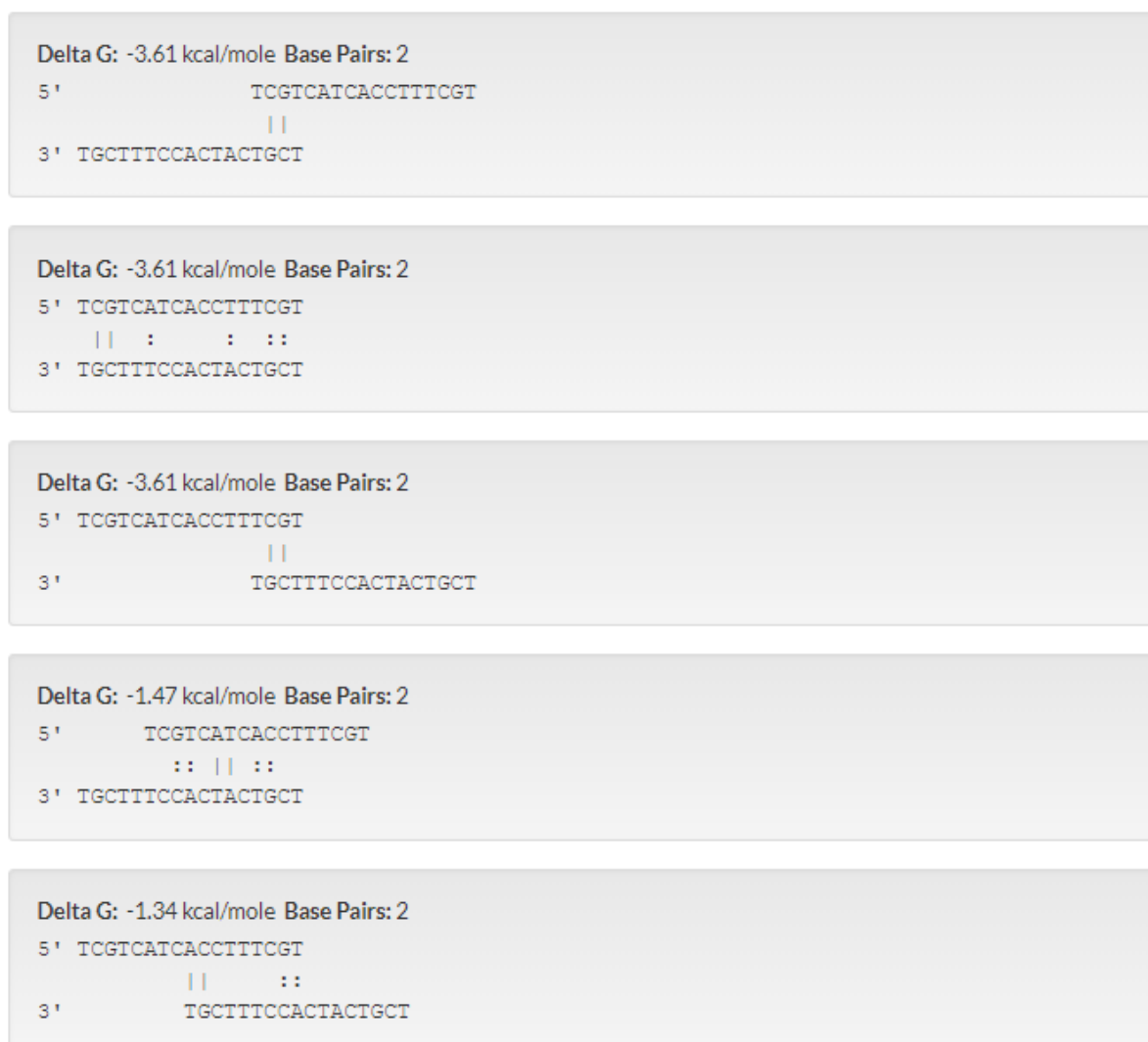


Figura 9.- Homodimeros generados con primer forward de ELH.

En la figura 9 se puede observar las uniones que puede tener el primer forward de ELH con otro primer forward de ELH, dando un total de 5 posibles uniones, este número es considerado alto, aun así se planea trabajar con él. En la tabla 2 se puede observar la información de los resultados en el análisis de los primers forward diseños, así como la secuencia de cada uno de ellos.

Tabla 2.- Características de primers forward diseñados de las hormonas GnRH y ELH.

Primer Forward							
Hormona	No. nt.	Tm	GC %	No. Hairpin	Tm Hairpin	No. Homodí	Secuencia
GnRH	19	62	55.6	1	52.1	5	5'GGAAGCAGCAGCAGTAGTA3'
ELH	17	58	47.1	1	24.2	5	5'TCGTCATCACCTTTCGT3'

Abreviaturas: No. nt.: número de nucleótidos de primer; Tm: temperatura de fusión; GC% porcentaje de guaninas y citosinas en primer; No. Hairpin: número de estructuras secundarias formadas en un primer con el mismo; Tm Hairpin: temperatura de fusión de hairpin; No. Homodí: número de homodímeros, número de posibles uniones entre un primer y otro primer.

7.5.2 Análisis de primer reverse

7.5.2.1 Hairpins

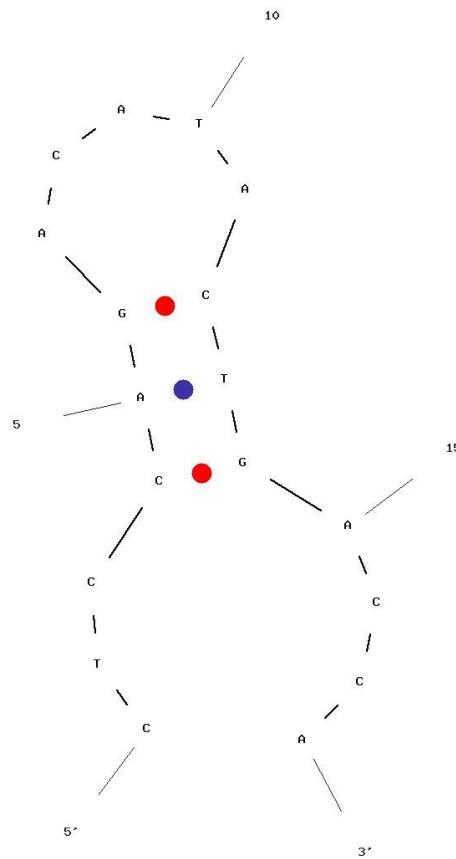


Figura 10.- Hairpin generado en primer reverse de gen ELH.

En la figura 10 se puede observar una estructura que forma el primer forward diseñado para el gen GnRH, el cual cuenta con una Tm de 28.8, el cual se encuentra por debajo de la temperatura a la cual se llevará el qPCR, por lo cual no existe problema por la existencia de esta posible estructura.

No se generó un posible hairpin en la estructura del primer reverse de GnRH, es por eso que no se presenta tal información.

7.5.2.2. Homodimeros



Figura 11.- Homodimeros generados con primer reverse de GnRH.

En la figura 11 se puede observar las uniones que puede tener el primer forward de GnRH con otro primer forward de GnRH, dando un total de 2 posibles uniones, este número es considerado ideal para este trabajo.



Figura 12.- Homodimeros generados con primer reverse de ELH.

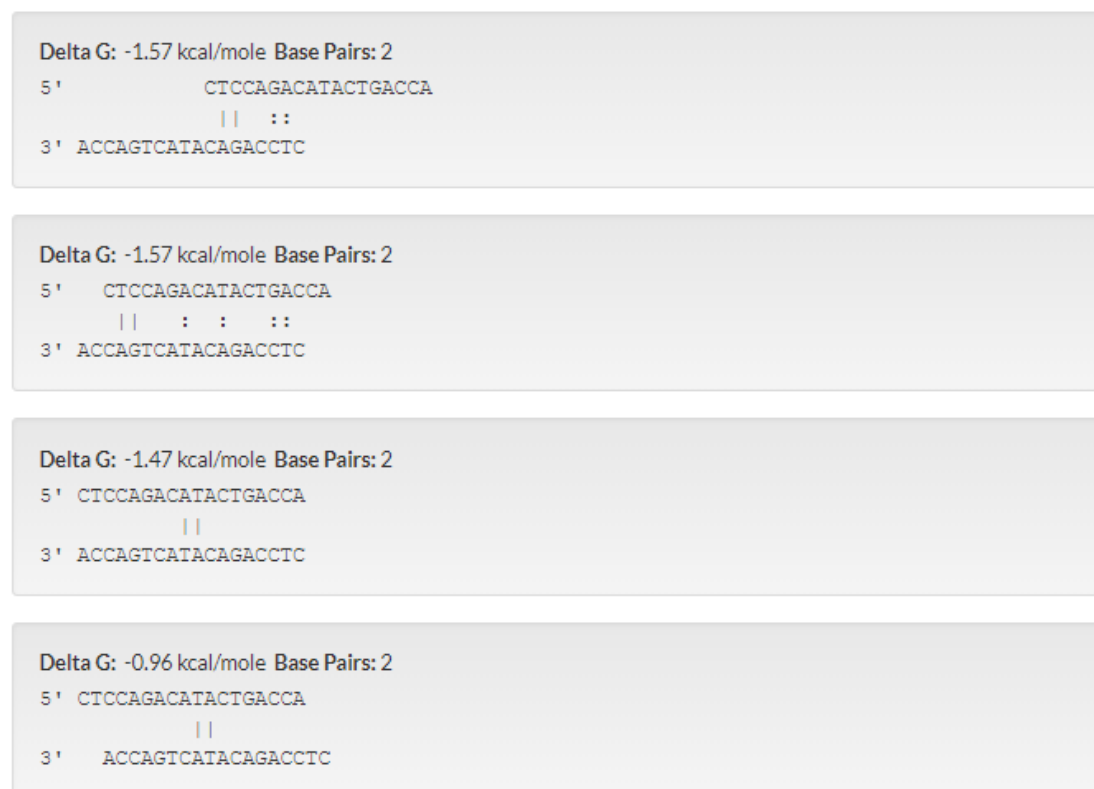


Figura 13.- Homodimeros generados con primer reverse de ELH.

En la figura 12 y 13 se puede observar las uniones que puede tener el primer forward de ELH con otro primer forward de ELH, dando un total de 8 posibles uniones, este número es considerado alto para este trabajo, sin embargo, se planea trabajar con él.

Tabla 3.- Características de primers reverse diseñados de las hormonas GnRH y ELH.

Primer Reverse							
Hormona	No. nt.	Tm	GC %	No. Hairpin	Tm Hairpin	No. Homodí	Secuencia
GnRH	17	62	52.9	0	-	2	5'AAACCACGCCCCACTCAA3'
ELH	18	57	50	1	46.4	8	5'CTCCAGACATACTGACCA3'

Abreviaturas: No. nt.: número de nucleótidos de primer; Tm: temperatura de fusión; GC% porcentaje de guaninas y citosinas en primer; No. Hairpin: número de estructuras secundarias

formadas en un primer con el mismo; Tm Hairpin: temperatura de fusión de hairpin; No. Homodí: número de homodímeros, número de posibles uniones entre un primer y otro primer.

En la tabla 3 podemos observar la información de los resultados en el análisis de los primers reverse diseños, así como la secuencia de cada uno de ellos.

7.5.3 Heterodímeros

7.5.3.1 GnRH

En la figura 14, 15 y 16 se puede observar las uniones que puede tener el primer forward de GnRH con un primer reverse de GnRH, dando un total de 11 posibles uniones, este número es considerado alto para este trabajo, sin embargo se planea trabajar con él.

Delta G: -3.14 kcal/mole **Base Pairs:** 2

```
5'      AAACCACGCCCACTCAA
      ||
3' ATGATGACGACGACGAAGG
```

Delta G: -3.14 kcal/mole **Base Pairs:** 2

```
5'      AAACCACGCCCACTCAA
      :  ||  ::
3' ATGATGACGACGACGAAGG
```

Delta G: -3.14 kcal/mole **Base Pairs:** 2

```
5' AAACCACGCCCACTCAA
   :  ||  :
3' ATGATGACGACGACGAAGG
```

Delta G: -3.07 kcal/mole **Base Pairs:** 2

```
5'      AAACCACGCCCACTCAA
      ||
3' ATGATGACGACGACGAAGG
```

Figura 14.- Heterodímeros generados entre primer forward y primer reverse de GnRH.

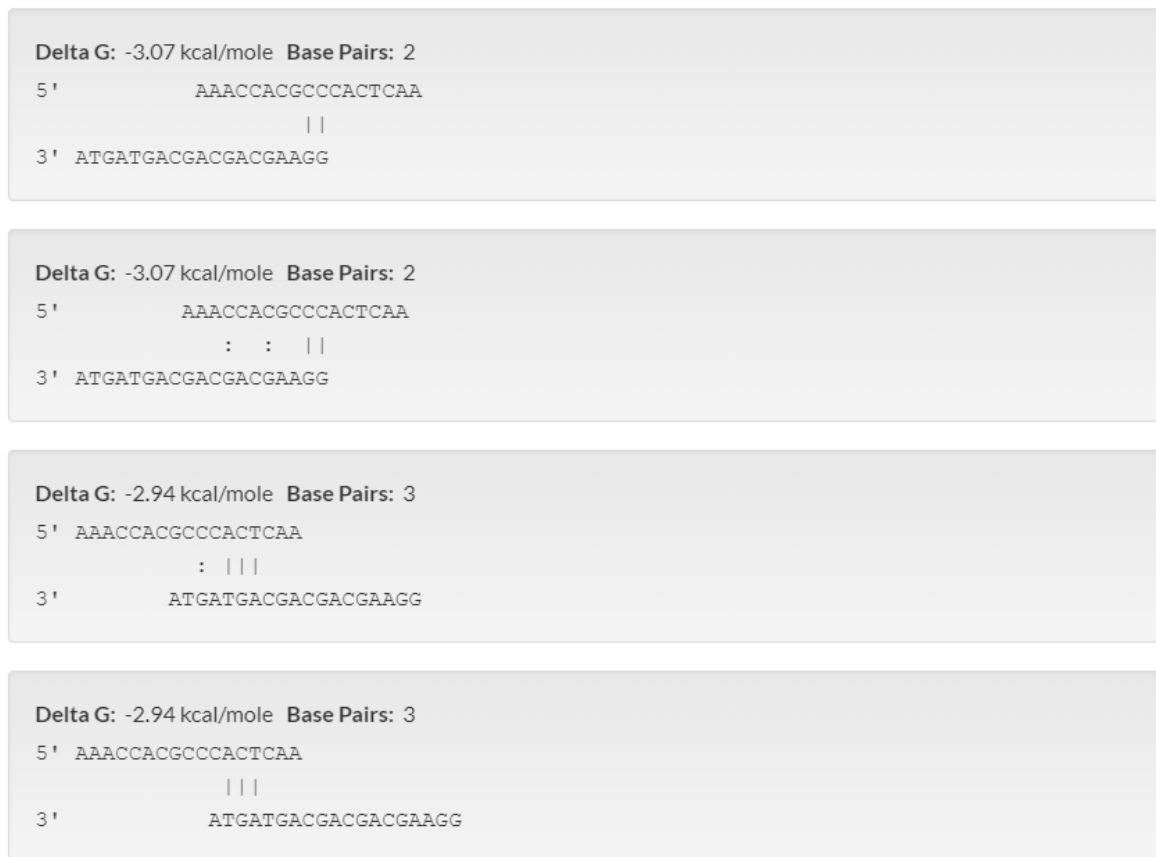


Figura 15.- Heterodímeros generados entre primer forward y primer reverse de GnRH.

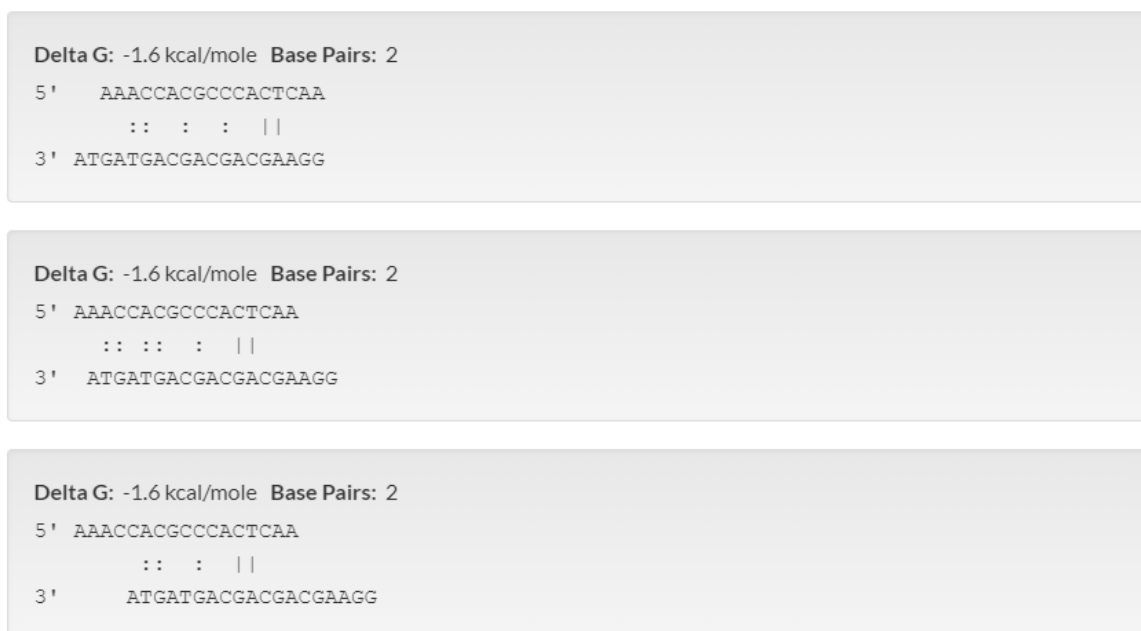


Figura 16.- Heterodímeros generados entre primer forward y primer reverse de GnRH.

7.5.3.2 ELH

En la figura 17, 18 y 19 se puede observar las uniones que puede tener el primer forward de ELH con un primer reverse de ELH, dando un total de 13 posibles uniones, este número es considerado alto para este trabajo, sin embargo se planea trabajar con él.



Figura 17.- Heterodímeros generados entre primer forward y primer reverse de ELH.



Figura 18.- Heterodímeros generados entre primer forward y primer reverse de ELH.



Figura 19.- Heterodímeros generados entre primer forward y primer reverse de ELH.

7.6 Obtención de tejido de abulón rojo *Haliotis rufescens*.

Se obtuvieron cuatro muestras de tejido de abulón con las características presentadas en la tabla 4.

Tabla 4.- Características físicas de los organismos adultos de abulón rojo *Haliotis rufescens* a partir de los cuales se obtuvieron muestras de tejido.

Muestra	Sexo	Peso húmedo de abulón (g)	Peso muestra(μg)	Largo(cm)	Ancho(cm)
1	Hembra	125.51	100	9.5	7
2	Hembra	131.97	100	10	7
3	Macho	129.78	100	9.5	7
4	Macho	141.05	100	10.5	7.5

Se puede observar en la tabla 4, que se obtuvieron 100 μg por cada muestra de 4 distintos organismos. También es importante recalcar que no presentan mucha diferencia de

dimensiones entre ellos. En la figura 20 se observan los organismos utilizados para la obtención de los tejidos muestra para la realización de este procedimiento.



Figura 20.- Abulones utilizados para obtención de muestra.

7.7 Extracción de RNA total

7.7.1 Calidad y rendimiento de RNA total

En la figura 21 se puede observar el resultado de la electroforesis de las muestras recolectadas de abulones. Se logran apreciar diferentes bandas, las cuales representan el RNA total. En otro proceso fue utilizado un espectrofotómetro NanoDrop ND-1000, con el cual se obtuvieron los resultados de la tabla 5.

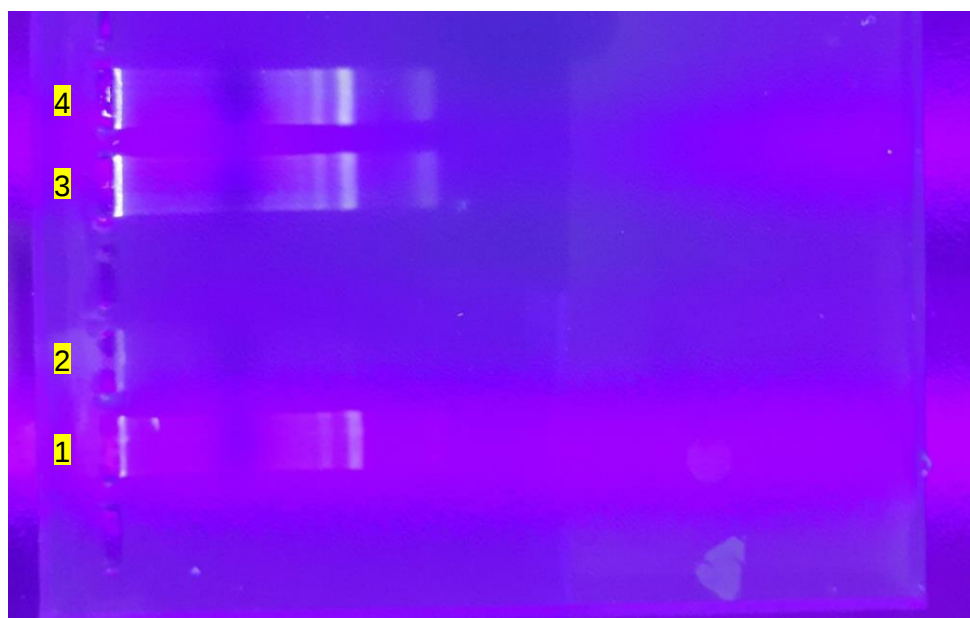


Figura 21.- Electroforesis para 4 muestras de abulón.

Tabla 5.- Resultados cuantitativos de las muestras de RNA total a partir de organismos adultos de abulón rojo *Haliotis rufescens*.

Muestra	Lectura de NanoDrop (ng/μL)	μL de muestra utilizados para lectura	Concentración de muestra (ng/μL)	Nanodrop 230/280
1	104.2	2	208.4	1,47
2	125.6	2	251.2	1,87
3	104	2	208	1,78
4	67.5	2	135	1,6

En la tabla 5, se puede observar que existe un buen rendimiento de RNA total para las muestras analizadas, esto certifica los resultados con la electroforesis.

7.8 Resuspensión primers

Los primers elaborados mediante la herramienta PrimerQuest Tool de Integrated DNA Technologies (<https://www.idtdna.com/pages>), fueron sintetizados por el laboratorio T4 OLIGO. Siguiendo el protocolo otorgado por el laboratorio, los primers se resuspendieron de la siguiente manera:

Tabla 6.-Resuspensión de primers.

Nombre de primer	Cantidad de oligo (µg)	Agua agregada (µL)	Concentración final (µM)
GnRH forward	151.06	255.6	100
GnRH reverse	249.6	126.74	100
ELH forward	126.82	249.3	100
ELH reverse	136.26	251.7	100
RPL-5 forward	168.71	231.7	100
RPL-5 reverse	169.92	237.5	100

8 Discusión

8.1 Primers

El método que se establece en este trabajo para la elaboración de los primers para PCR tiempo real especificaba que los primers cumplieran con las siguientes características:

- Contar con al menos entre 17 y 25 bases por primer.
- El tamaño del amplicón deberá ser entre 50 y 150 pares de bases.
- El porcentaje de citosinas y guaninas deberá de ser aproximadamente 55%.
- La diferencia de T_m entre el primer forward y reverse no deberá sobrepasar 1 °C.
- La posición 3' de cada primer deberá terminar en adenina o en timina.

En la tabla 2 y tabla 3, se observan las propiedades con las que cuentan los primers diseñados, estos cumplen con la mayoría de las especificaciones para ser utilizados en un protocolo de PCR tiempo real. Existen pequeñas variantes comparado con el protocolo original, el T_m de los primers del gen ELH se encuentra 3°C por debajo de los primers del gen GnRH, a continuación se presentan las características más específicas para cada primer.

El primer GnRH forward con longitud de 19 nucleótidos, presenta un número elevado de homodimeros (5 posibles formaciones), sin embargo, al observar la figura 8 podemos determinar que la fuerza de estos enlaces es muy pequeña, además que no presentará problema ya que el T_m de estos enlaces secundarios es inferior al T_m del primer.

El primer ELH forward con longitud de 17 nucleótidos, presenta un número elevado de homodimeros (5 estructuras), sin embargo, al observar la figura 9 podemos determinar que la fuerza de estos enlaces es muy pequeña, además que no presentará problema ya que el T_m de estos enlaces secundarios es inferior al T_m del primer.

El primer GnRH reverse con longitud de 17 nucleótidos, es el primer que más se acerca a las características ideales para el protocolo de PCR en tiempo real, al contar con solo 2 estructuras secundarias, al igual que los primers mencionados anteriormente, estas estructuras secundarias cuentan con fuerza de enlace muy pequeña y a su vez no presentará problema ya que el T_m de estos es inferior al T_m del primer.

El primer ELH reverse con longitud de 18 nucleótidos, es el que primer presenta el mayor número de homodimeros (8 estructuras) comparado con los otros primers diseñados, sin embargo, al observar la figura 15 y 16, se determina que la fuerza de estos enlaces es muy pequeña, además que no presentará problema ya que el T_m de estos enlaces secundarios es inferior al T_m del primer.

8.2 RNA total

Los resultados son favorables, en la figura 21 se observa el desplazamiento en 3 de las 4 ranuras con las que se trabajó, esto fue un error al momento de cargar la segunda muestra, el pozo número dos fue perforado por la punta de la pipeta y la muestra no logró entrar al pozo de manera correcta. A pesar de eso se determina que, si se logró aislar de manera correcta el RNA total para cada muestra, esto al analizar por espectrofotometría con el NanoDrop ND-1000 (Biolab, Mulgrave, VIC, Australia). En el análisis de los resultados de este método se determina que las concentraciones de RNA total son muy similares entre sí.

9 Conclusiones

- El uso de herramientas bioinformáticas facilita el proceso de búsqueda de información
- Los primers de acuerdo a los Blast serán específicos para las hormonas GnRH y ELH
- El uso de la herramienta PrimerQuest Tool de Integrated DNA Technologies permite analizar de manera más rápida y eficiente primers propuestos
- Los primers diseñados pueden ser utilizados para PCR tiempo real
- Se logró obtener de manera exitosa RNA total a partir de tejido de abulón

10 Perspectivas

- La especificidad de los primers tiene que ser comprobada por PCR punto final
- Es necesario hacer análisis con PCR Tiempo Real utilizando tejido de abulón rojo de adultos y de juveniles, con la finalidad de ver si existen o no cambios en la expresión de las neurohormonas GnRH y ELH de acuerdo a la etapa reproductiva de los abulones
- Secuenciar los fragmentos amplificados con los primers para las neurohormonas GnRH y ELH con el objetivo de corroborar que las secuencias amplificadas corresponden a los genes para los cuales fueron diseñados los primers

- Si los resultados anteriores corroboran el trabajo, hacer recomendaciones sobre el uso de estos marcadores moleculares de abulón rojo a los productores de Baja California y de México

11 Referencias

- | GLOBEFISH | Food and Agriculture Organization of the United Nations. (s.f.). Recuperado en Junio, 2020, de <http://www.fao.org/in-action/globefish/marketreports/resource-detail/es/c/902592/>
- Abalone | Definition of Abalone by Merriam-Webster. (s.f.). Recuperado en Junio, 2020, de <https://www.merriam-webster.com/dictionary/abalone#h1>
- Bigot, L., Zatylny-Gaudin, C., Rodet, F., Bernay, B., Boudry, P., & Favrel, P. (2012). Characterization of GnRH-related peptides from the Pacific oyster *Crassostrea gigas*. *Peptides*, 34(2), 303–310. <https://doi.org/10.1016/j.peptides.2012.01.017>
- Bose, U., Suwansa-ard, S., Maikaeo, L., Motti, C. A., Hall, M. R., & Cummins, S. F. (2017). Neuropeptides encoded within a neural transcriptome of the giant triton snail *Charonia tritonis*, a Crown-of-Thorns Starfish predator. *Peptides*, 98, 3–14. <https://doi.org/10.1016/j.peptides.2017.01.004>
- Bunje, P. (2003). The mollusca. <https://ucmp.berkeley.edu/taxa/inverts/mollusca/mollusca.php>
- Burbach, J. P. H. (2011). Chapter 1 What Are Neuropeptides? (Vol. 789, Issue 1). <https://doi.org/10.1007/978-1-61779-310-3>
- Castillo-Rodríguez, Z. G. (2014). Biodiversidad de moluscos marinos en México. *Revista Mexicana de Biodiversidad*, 85(SUPPL.), 419–430. <https://doi.org/10.7550/rmb.33003>
- Catton, C. A., Stierhoff, K. L., & Rogers-Bennett, L. (2016). Population Status Assessment and Restoration Modeling of White Abalone *Haliotis sorenseni* in California. *Journal of Shellfish Research*, 35(3), 593–599. <https://doi.org/10.2983/035.035.0304>

Comisión Nacional de Acuacultura y Pesca. (2017). Anuario Estadístico de Acuacultura y Pesca Publicación 2017. 300. www.conapesca.gob.mx

Conapesca. (2016). El abulón es apreciado por el nácar de su concha y su sabor | Comisión Nacional de Acuacultura y Pesca | Gobierno | gob.mx.
<https://www.gob.mx/conapesca/articulos/el-abulon-es-apreciado-por-el-nacar-de-su-concha-y-su-sabor>

García Domínguez, F. A. (2018). Fecundity in ripe gonad of *Haliotis fulgens* and *Haliotis corrugata* (Vetigastropoda). *Hidrobiológica*, 28(3), 295–300.
<https://doi.org/10.24275/uam/izt/dcbs/hidro/2018v28n3/garcia>

INAPESCA. (2018). Acuacultura | Abulón rojo | Instituto Nacional de Pesca | Gobierno | gob.mx. <https://www.gob.mx/inapesca/acciones-y-programas/abulon-rojo>

Instituto Latinoamericano de la Comunicación Educativa. (s.f.). PESQUERÍA DEL ABULÓN. Recuperado el Junio 30, 2020, de http://bibliotecadigital.ilce.edu.mx/sites/ciencia/volumen2/ciencia3/087/htm/sec_12.htm

Kim, T. H., Kim, M. A., Kim, K. S., Kim, J. W., Lim, H. K., Lee, J. S., & Sohn, Y. C. (2017). Characterization and spatiotemporal expression of gonadotropin-releasing hormone in the Pacific abalone, *Haliotis discus hannai*. *Comparative Biochemistry and Physiology -Part A : Molecular and Integrative Physiology*, 209(Enero), 1–9.
<https://doi.org/10.1016/j.cbpa.2017.04.001>

Leighton, P. (2008). Abalone Hatchery Manual - Aquaculture Explained No. 25. Irish Sea Fisheries Board, 25, 1–89.

Morishita, F., & Minakata, H. (2016). Egg-Laying Hormone. In *Handbook of Hormones*. Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-801028-0.00451-7>

Rios, E., Galvan, C., & Hermosillo, A. (2016). Moluscos marinos (Mollusca). Junio, 14. https://www.researchgate.net/publication/303719422_Moluscos_marinos_Mollusca

SAGARPA. (2016). Avances en producción acuícola de abulón | Secretaría de Agricultura y Desarrollo Rural | Gobierno | gob.mx. <https://www.gob.mx/agricultura/es/articulos/avances-en-produccion-acuicola-de-abulon>

Saitongdee, P., Apisawetakan, S., Anunruang, N., Poomthong, T., Hanna, P., & Sobhon, P. (2005). Egg-laying-hormone immunoreactivity in the neural ganglia and ovary of *Haliotis asinina* Linnaeus. *Invertebrate Neuroscience*, 5(3–4), 165–172. <https://doi.org/10.1007/s10158-005-0032-5>

Sharker, M. R., Sukhan, Z. P., Kim, S. C., Lee, W. K., & Kho, K. H. (2020). Molecular Identification, Characterization, and Expression Analysis of a Gonadotropin-Releasing Hormone Receptor (GnRH-R) in Pacific Abalone, *Haliotis discus hannai*. *Molecules*, 25(12), 2733. <https://doi.org/10.3390/molecules25122733>