

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE BAJA CALIFORNIA

FACULTAD DE CIENCIAS MARINAS



TESIS

**Estandarización de la electroporación de esperma de *Haliotis rufescens*
con un vector de expresión de la proteína verde fluorescente.**

QUE PARA CUBRIR LOS REQUISITOS NECESARIOS PARA OBTENER EL
GRADO DE

MAESTRO EN CIENCIAS EN ECOLOGÍA MOLECULAR Y BIOTECNOLOGÍA

PRESENTA

EDGAR MANCILLA SÁNCHEZ

ENSENADA, BAJA CALIFORNIA, MÉXICO. AGOSTO DE 2015

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE BAJA CALIFORNIA

FACULTAD DE CIENCIAS MARINAS
POSGRADO EN ECOLOGÍA MOLECULAR Y BIOTECNOLOGÍA

Estandarización de la electroporación de esperma de *Haliotis rufescens* con un
vector de expresión de la proteína verde fluorescente.

TESIS

QUE PARA CUBRIR PARCIALMENTE LOS REQUISITOS NECESARIOS PARA
OBTENER EL GRADO DE

MAESTRO EN CIENCIAS EN ECOLOGÍA MOLECULAR Y BIOTECNOLOGÍA

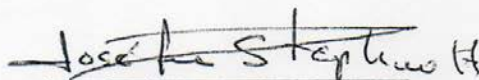
PRESENTA

EDGAR MANCILLA SÁNCHEZ

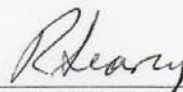
APROBADO POR



Dra. Amelia Portillo López
Directora de tesis



Dr. José Luis Stephano Hornedo
Sinodal



Dr. Ricardo Searcy Bernal
Sinodal

DEDICATORIA

A mi mamá que siempre me ha alentado a ser una mejor persona y superarme, por todo el amor, apoyo y consejo que me ha brindado, porque siempre ha sido un ejemplo de vida para mí. Tus palabras guiaron mis pasos, tu cariño suavizó mi carácter y tu amor ilumina mi vida. Gracias ma'!

A mi papá que me ha guiado en la vida transmitiéndome toda la sabiduría que solo él sabe brindar, por ser mi súper héroe y apoyarme en cada uno de los proyectos que he realizado, alentándome a seguir siempre mis sueños y darme la mano en todo momento, te estaré eternamente agradecido pa'!

A mi Nalle, tu ayuda ha sido fundamental y has estado conmigo incluso en las situaciones más difíciles, no fue fácil llegar hasta aquí, pero estuiste brindándome tu apoyo y motivación en todo momento, gracias por todas las horas de desvelo a mi lado ayudando a hacer este trabajo realidad, muchas gracias amor'!

AGRADECIMIENTOS

Al CONACyT por la beca brindada que hizo posible realizar el presente trabajo.

Al cuerpo académico “Biotecnología Integral” por su apoyo económico en la realización de esta investigación

A la Dra. Amelia Portillo López por todo lo que me enseñó, su paciencia, asesoría y dirección en la realización de este trabajo.

Al Dr. Jose Luis Stephano Hornedo, por el apoyo, consejos y la guía que me brindó en la elaboración de este proyecto

Al Dr. Ricardo Searcy Bernal, por sus atinadas correcciones, comentarios y el tiempo dedicado a este trabajo, contribuyendo al éxito de esta investigación.

A la Facultad de Ciencias y Facultad de Ciencias Marinas, UABC, por permitirme llevar a cabo este trabajo en sus instalaciones.

Le doy las gracias a las compañías: Abulones cultivados S de RL de C.V. y Productores Marinos Baja S.A. de C.V. por proporcionarme los gametos de los abulones, así como también por su apoyo en sus instalaciones.

Le doy las gracias al Depto de Microbiología de CICESE por permitirme tomar imágenes en el confocal.

A mi hermano Erick, por formar parte de ésta etapa de mi formación, ayudando a desestresarme cuando más lo necesitaba.

A mi camarada Eduardo Rojas, por alentarme a seguir y pasar hambres a mi lado.

A los posgrado-boys: Leggs, Javier y Carlos, por su participación activa en el proyecto ya que me permitieron crecer en conocimiento y sentir un poco más la vida.

Y a todas aquellas personas que de una u otra forma, colaboraron o participaron en la realización de esta investigación, hago extensivo mi más sincero agradecimiento.

RESUMEN

El abulón rojo *Haliotis rufescens*, es un molusco muy apreciado en el mercado Nacional e Internacional. Debido a la sobreexplotación natural, la acuicultura dedica su esfuerzo en su producción sin embargo, uno de los problemas que enfrenta el cultivo es la baja tasa de crecimiento, alcanzando la talla comercial de 7-8 cm de longitud de concha y 80 gr de peso en cuatro a cinco años. Es por ello la necesidad de incrementar el crecimiento utilizando la expresión de hormonas o factores de crecimiento. En este trabajo se presenta por primera vez la expresión de GFP-GH con el promotor CMV y la transgénesis vía espermatozoos. Se hizo la transfección del vector pAcGFP1-N, el cual contiene la GH del pez *Rachycentron canadum*. El espermatozoos fue electroporado con tres voltajes (0.5, 0.75 y 1.0). Se encontró que el voltaje de 0.75 v, fue el ideal ya que se obtuvo el mayor promedio de expresión (40%) de GFP-GH en larvas de 36 hrs. La tasa de fecundación no tuvo diferencias significativas ($p < 0.001$) entre los tratamientos y el control. Esta metodología servirá de base para la modificación y/o sobreexpresión de diferentes genes clave en la regulación del crecimiento así como de otros genes de interés del abulón rojo.

Palabras clave: Abulón, molusco, transgénico, proteína verde fluorescente, hormona de crecimiento, promotor de citomegalovirus

ÍNDICE.

I.	INTRODUCCIÓN.....	9
II.	ANTECEDENTES.....	15
III.	OBJETIVOS.....	20
	Objetivo general.....	20
	Objetivos particulares.....	20
IV.	HIPÓTESIS.....	21
V.	MATERIALES Y MÉTODOS.	22
	Síntesis y obtención del gen de la hormona de crecimiento.....	22
	Clonación de GH-pAcGFP1-N.	24
	Obtención de los gametos de abulón.	26
	Electroporación del esperma con pAcGFP1-N + GH y fertilización de los gametos.	27
	Detección de GFP por medio de microscopía de fluorescencia.	29
	Detección de la proteína expresada por la técnica de Western blot.	29
	Detección por PCR de la transfección de la GH-GFP en larvas.	30
	Análisis estadístico de los datos.....	30
VI.	RESULTADOS.	32
	Síntesis y obtención del gen de la hormona de crecimiento.....	32
	Clonación de GH-pAcGFP1-N.	33
	Corroboración de la presencia de GH-cobia mediante PCR y digestión enzimática.	35
	Electroporación del esperma con pAcGFP1-N + GH y fertilización de los gametos.	37
	Detección de GFP por medio de microscopía de fluorescencia.	39
	Análisis estadístico Fluorescencia.....	40
	Detección de la proteína expresada por la técnica de Western blot.	41
	Detección por PCR del gen GFP en larvas.	42
	Detección por PCR del gen GH.....	43
VII.	DISCUSIÓN.	45
VIII.	CONCLUSIONES.....	49
IX.	REFERENCIAS.....	50

<i>Número</i>	LISTA DE TABLAS	<i>Página</i>
<i>1</i>	Transferencia de genes mediada por esperma en organismos acuáticos.	<i>19</i>
<i>2</i>	Identificación y secuencias de los cebadores utilizados en las reacciones de PCR, dirección (5'-3').	<i>24</i>

<i>Número</i>	LISTA DE FIGURAS	<i>Página</i>
1	Mapa del plásmido pUC57 al cual se le clonó el gen sintético de GH-Cobia.	23
2	Mapa del plásmido pAcGFP1-N (Clontech®) donde se observa el promotor CMV (flecha blanca) y el gen AcGFP (flecha verde).	26
3	Fotografías de abulones machos (a) y hembras (b) desovando.	27
4	Fotografía de la incubación de los tratamientos a temperatura ambiente con aireación constante.	28
5	Alineaciones del gen GH del pez cobia con el gen GH de otros peces.	32
6	Fotografía de clonas positivas en cajas de Petri con Agar LB+ ampicilina.	34
7	Fotografía de clonas positivas en una caja de Petri con Agar LB+ kanamicina.	34
8	Electroforesis en gel de agarosa al 1.3% en el que se aprecia en los carriles a y b la escalera utilizada y en los carriles del número 1 al 10 los fragmentos del tamaño esperado (780 pb) de las clonas positivas, producto del PCR con los cebadores CMV Fwd y AcGFP R2.	36
9	Electroforesis en gel de agarosa al 1.3% de la digestión enzimática con EcoRI y Sall en el que se observa en los carriles a y b la escalera utilizada, en los carriles del 1 al 3 los controles negativos (pAcGFP1-N sin inserto), del 4 al 6 los controles positivos (pUC57 + GH-cobia) y del 7 al 10 las clonas cuya extracción plasmídica fue sometida a la digestión y de las cuales los números 8, 10, 11, 12,13,14 y 17 arrojaron el fragmento del tamaño esperado (630 pb), mientras que las clonas 15 y 16 mostraron la banda mucho más tenue.	37
10	Fotografías de un huevo sin fecundar (a), un huevo fecundado en división (b) y espermatozoides de abulón (c).	38
11	Gráfica del promedio de la tasa de fecundación obtenida con los tres voltajes aplicados.	39
12	Fotografías de la expresión in vivo de GFP observadas en microscopio de fluorescencia. Los incisos a) y b) muestran fotografías de una larva del tratamiento de 0.5 kV, los incisos c) y d) del tratamiento de 0.75 kV, los incisos e) y f) del tratamiento de 1 kV y los incisos g) y h) del grupo control.	40
13	Gráfica de los promedios de la fluorescencia obtenida con los tres voltajes aplicados.	41
14	Fotografía de la membrana PVDF revelada. En el carril 1 se observa la escalera utilizada (Biorad®), en el carril 2 el control negativo, mientras que los carriles 3, 4 y 5 muestran los tratamientos de 0.5 Kv, 0.75 Kv y 1 KV respectivamente.	42
15	Producto del PCR de la detección del gen de GFP en larvas en un gel de agarosa al 1.3% y visualizado bajo luz UV. Carril 1; escalera de DNA, carriles 2, 3 y 4 los tratamientos 0.5 kV, 0.75 kV y 1 kV, respectivamente, carril 5 el control positivo y en el carril 6 el control negativo.	43
16	Fotografía del gel de agarosa al 1.3% en el que se observa en el carril 1 la escalera utilizada, en los carriles 2 (únicamente cebadores) y 3 (plásmido sin inserto) los controles negativos, en los carriles 4, 5 y 6 los tratamientos 0.5 kV, 0.75 kV y 1 kV respectivamente, y en los carriles 7 (pUC57 +GH Cobia) y 8 (pAcGFP + GH Cobia) los controles positivos.	44

I. INTRODUCCIÓN.

Los abulones son gasterópodos univalvos de hábitat bentónico y marino, presentan simetría bilateral primitiva y se caracterizan por tener un pie aplanado (Mateus, 1986). Estos organismos pertenecen a la familia *Haliotidae*, el cual incluye el género *Haliotis* que, cuenta con 56 especies, distribuidas en regiones templadas y tropicales de todo el mundo (Geiger, 2000). Los organismos del género *Haliotis* viven generalmente en sustratos rocosos y ocasionalmente se pueden encontrar en arrecifes de coral. Son herbívoros, su nutrición durante la etapa post-larval y juvenil temprana se compone de la microflora bentónica (diatomeas, algas filamentosas sésiles y bacterias), mientras que, en la etapa juvenil avanzada y adulta, se alimenta de macroalgas (Leighton, 2000). En la península de Baja California se encuentran distribuidas cinco especies: *Haliotis rufescens* (abulón rojo), *Haliotis corrugata* (abulón amarillo), *Haliotis fulgens* (abulón azul), *Haliotis creacherodii* (abulón negro) y *Haliotis sorenseni* (abulón blanco) (Mateus, 1986, Leighton, 2000).

En el desarrollo de Baja California, los recursos marinos siempre han jugado un papel muy importante, y en particular, para ésta y muchas otras regiones la pesca del abulón es considerada como una actividad económica importante debido a su alto valor en el mercado (Ponce-Díaz et al., 2003, Fernández y Sáenz-Arroyo, 2012) En México, el abulón fue pescado durante más de 100 años, no obstante, debido a su gran demanda a nivel internacional, a mediados de los 70 la pesca de este organismo colapsó, hoy en día la colecta comercial sólo se puede realizar por cooperativas pesqueras. Tiempo después, en 1989 se creó la primera

granja comercial de abulón en México (Searcy-Bernal et al., 2013). La sobreexplotación sumada al lento desarrollo de los organismos tiene repercusiones negativas de tipo ecológico y económico, ya que afecta el desarrollo de las pesquerías y la acuicultura en Baja California (Caballero, 2010).

En cuanto al crecimiento del abulón rojo *H. rufescens*, se sabe que es un organismo que puede llegar a alcanzar longitudes mayores de 30 cm, y para su comercialización el tamaño mínimo deseable de estos moluscos es de 7 cm (Searcy-Bernal et al., 2010) sin embargo, la tasa de su crecimiento es usualmente de unos 2 cm por año, haciendo que el tiempo requerido por un abulón para alcanzar el tamaño comercial vaya desde los 3 a los 5 años (Hahn, 1989). Para solucionar este problema se han seguido diferentes estrategias para lograr un óptimo crecimiento, por ejemplo, se ha determinado que se requiere de cantidades de proteína mayores que las contenidas en su dieta normal (Mai et al., 1995a, Mai et al., 1995b), lo que ha llevado al desarrollo de dietas artificiales con un alto contenido de proteínas (20-50%), carbohidratos (30-60%), bajo en lípidos (1.5-5.3%), fibra (0-6%), con una alta cantidad de mezcla de minerales (4-5%) y vitaminas (0.5-2%), a pesar de esto, la mayoría de estas dietas no son capaces de mantener un crecimiento prolongado a tasas económicas viables (Fleming et al., 1996), lo cual a su vez ha despertado el interés en el desarrollo de técnicas para manipular el crecimiento somático del abulón (Moriyama et al., 2009).

Anteriormente se descubrió que los moluscos gasterópodos como los opistobranquios y el abulón poseen moléculas similares a la hormona de crecimiento (Elliott, 2000, Veenstra, 2010), por lo que se ha experimentado con éstas para acelerar su desarrollo suministrándolas de diferentes maneras. Se han

realizado pruebas con la hormona de crecimiento de salmón *Oncorhynchus keta* para lo cual fue añadida en el alimento en cantidades de 50 y 100 µg por cada 350 mg de gel de alginato de sodio, aumentando al doble el tamaño y peso tanto del cuerpo como de la concha con respecto al grupo control, además al incorporarla al agua de cultivo en la cual se realizaron inmersiones de una hora en intervalos de una o dos semanas durante 120 semanas a una concentración de 30mg/L se encontró que la hormona puede ser transportada tanto del agua como del alimento hacia el sistema circulatorio y así mejorar el crecimiento somático (Moriyama et al., 2008).

El hecho de que los moluscos poseen factores endocrinos involucrados en el control del crecimiento fue demostrado a inicios de los años 70 cuando se demostró que un factor producido por el ganglio cerebral del prosobranquio *Crepidula fornicata* estimula el crecimiento somático (Lubet, 1971), posteriormente en 1976 estudios en el gasterópodo *Lymnaea stagnalis* siguieron con la evidencia de factores de crecimiento en moluscos al caracterizar una hormona de crecimiento producida por el ganglio neuro-secretor que es estimulante del crecimiento tisular (Geraerts, 1976), misma que posteriormente se demostró que estimula el crecimiento de la concha y tiene efecto en ciertas vías metabólicas (Dogterom, 1980, Dogterom and van der Schors, 1980). La hormona de crecimiento de moluscos, que es un péptido similar a la insulina se conoce como MIP por sus siglas en inglés (molluscan insuline-like peptide) ha sido aislada y secuenciada, sin embargo estas moléculas no se encuentran disponibles comercialmente (Taylor et al., 1996).

En cuanto a métodos de manipulación genética, los avances han sido pocos en esta especie. Por un lado encontramos la producción de híbridos entre especies que es particularmente útil al reducir la heredabilidad de la característica buscada y que se ha realizado experimentalmente entre distintas especies de abulón, esto en beneficio de la producción comercial al tratar de conseguir un crecimiento más rápido, adaptabilidad a ciertas condiciones ambientales y una superior calidad del producto. Por ejemplo en 1982 se condujeron una serie de cruza experimentales con cuatro especies *H. rufescens*, *H. corrugata*, *H. fulgens* y *H. sorenseni*, de las cuales resultó que las cruza con mayor éxito fueron en las que se utilizaron huevos de *H. rufescens* y espermato de las otras tres especies de abulón, además de que la primera generación proveniente de huevos de *H. rufescens* y espermato de *H. fulgens* resultó ser fértil, y se obtuvieron mejores tasas de crecimiento al utilizar los huevos de *H. rufescens* y el espermato de *H. sorenseni* y *H. fulgens* (Leighton and Lewis, 1982). Posteriormente se logró mejorar la tolerancia a temperaturas bajas y la tasa de crecimiento en *H. discus hannai* cruzándolo con el abulón pinto de Alaska *H. kamtschatkana* utilizando el espermato de este último y los huevos de *H. discus hannai* (Hoshikawa et al., 1998).

Por otro lado también está la producción de triploides, que es llevada a cabo muy frecuentemente en acuicultura por las ventajas principales de obtener un crecimiento más rápido y animales infértiles, ésta área es quizás la más conocida en cuanto a la manipulación genética del abulón, con numerosos estudios reportando la producción de triploides mediante la inhibición de tanto el primero como del segundo cuerpo polar, lo que se ha logrado mediante choques de calor

y/o frío, el uso de citocalasina B, cafeína y 6-dimetilaminopurina (6-DMAP) (Zichen, 1990, Chen et al., 2001, Yan and Chen, 2001, Arai and Okumura, 2008).

En lo que respecta a la introducción de genes foráneos al abulón, Powers et al. (1995) introdujeron por primera vez y exitosamente un plásmido recombinante mediante electroporación en huevos fertilizados del abulón rojo (*Haliotis rufescens*) y, con ello se demostró que la electroporación es un método eficaz para transferir DNA foráneo a embriones de abulón. Un par de años después, mediante electroporación pero en esta ocasión utilizando espermatozoides de abulón japonés (*Haliotis diversicolor supertexta*) se probó que, el uso de esperma como estrategia de transferencia genética es posible (Tsai et al., 1997). Cabe mencionar que los espermatozoides al carecer de las funciones bioquímicas y moleculares básicas de las células somáticas habían sido tradicionalmente vistos como células metabólicamente inertes que no generaban interés más que en la biología del desarrollo; sin embargo, al demostrarse por primera vez en 1989 que DNA exógeno al ser incubado junto con espermatozoides de ratón y de erizo de mar podía ser detectado en tejidos de organismos ya adultos (Arezzo, 1989), se promovió el estudio del esperma como un medio viable de transferencia genética, lo que además se ha extendido para una gran diversidad de especies, ya sea para aclarar los mecanismos básicos moleculares de la transferencia de genes o para el desarrollo biotecnológico de generar animales genéticamente modificados (Chen et al, 2009., Smith, 2012).

Se sabe que los mecanismos de unión e internalización del DNA a los espermatozoides están altamente regulados y son muy específicos, en especies acuáticas al menos los factores IF-1 y la DNAsa dependiente de calcio previenen

la interacción entre el DNA exógeno y el esperma, y a pesar de que se sabe que la actividad de la DNAsa es muy elevada y ocurre en un amplio rango de temperaturas (8-56 °C), se ha logrado disminuir e incluso eliminar su actividad lavando el esperma para eliminar el plasma seminal, lo cual permite la interacción del esperma con el DNA foráneo y facilita su introducción a la célula (Smith, 2012).

A pesar de que en los últimos 20 años se han llevado a cabo muchos avances en lo que respecta a la transferencia genética mediada por esperma y han sido revelados diversos parámetros que afectan la integración de DNA exógeno al esperma, como son: la calidad de las células, tiempo y temperatura de incubación con el DNA, cantidad de DNA exógeno por célula y tipo de DNA exógeno utilizado (lineal o circular), no se han realizado estudios de estabilidad genética en los descendientes de los transgénicos de abulón, ni se ha evidenciado el mosaicismo celular, y los únicos estudios de continuidad de expresión que se han llevado a cabo han sido realizados durante las primeras divisiones celulares y la etapa larval de una forma indirecta, esto es, la evidencia de transgenesis se ha comprobado mediante análisis de PCR y la inserción en el genoma mediante la técnica de Southern blot (Elliot, 2000).

Por lo tanto, el objetivo de este estudio es estandarizar un método eficaz de transferencia genética mediante electroporación de espermatozoides de abulón con el gen de la proteína verde fluorescente (GFP) como marcador “in vivo” para corroborar la expresión del gen de la hormona de crecimiento del pez cobia en blastómeros y larvas de abulón rojo, nunca antes hecho en esta especie.

II. ANTECEDENTES.

En 1980 ocurrió un importante avance en la producción de animales transgénicos que marcó el curso de la investigación en este campo por al menos dos décadas, ya que se describió una técnica donde el DNA fue directamente micro inyectado en el pronúcleo de un ovocito de ratón recientemente fertilizado, el que posteriormente se transfirió a hembras receptoras sincronizadas. Este experimento demostró por primera vez que era posible utilizar un plásmido recombinante como vector para transferir genes foráneos directamente hacia el embrión. El DNA inyectado de esta forma se integró en el genoma y pudo ser heredado por la descendencia de los animales transgénicos padres. La micro inyección de embriones en el estadio de una célula fue clave para obtener una integración temprana del transgen, permitiendo al DNA foráneo integrarse en el genoma de todas las células somáticas y la línea germinal (Gordon et al., 1980). A partir de entonces la producción de animales transgénicos es cada vez más cotidiana, existiendo ya disponibles comercialmente animales transgénicos, principalmente vertebrados (peces, ratón, rata, conejo, cerdo, vaca, cabra, etc.) (Gandolfi, 1998, Chang et al., 2002, Zbikowska, 2003, Houdebine and Wiley, 2003).

La técnica de micro inyección es laboriosa y requiere de equipo y personal altamente calificado para realizarla, ante este problema, en 1993 se demostró que la electroporación de espermatozoides del salmón chinook es un método alternativo de transferencia genética que resulta viable, ya que en los huevos fecundados con espermatozoides electroporados se demostró la presencia del vector en peces

de 12 semanas, llegando a la conclusión de que las células espermáticas electroporadas con una intensidad de campo y longitud de pulso elevadas, (625 y 1000 V/cm con pulsos de 18.6 y 27.4ms) pueden ser utilizadas para transferir genes (Sin et al., 1993) .

En cuanto a métodos de transferencia genética en abulón, en 1995 se probó por primera vez la electroporación en óvulos con un vector que contenía un cassette de beta galactosidasa y el promotor de la β -actina de *Drosophila* y se reportó una retención del 70 al 100% del material genético insertado en juveniles de tres a siete meses (Powers et al., 1995). En ese mismo año Sin y colaboradores realizaron el primer trabajo de electroporación con espermatozoides de abulón (*Halotis iris*) en el que se efectuó la transfección de un constructo con el promotor de la beta actina de la carpa y la hormona de crecimiento de la trucha arcoíris (*Oncorhynchus mykiss*); sin embargo, sus análisis se centraron únicamente en la captación del material genético por el espermatozoides y los efectos de la electroporación, como es su vitalidad y motilidad; ellos aplicaron dos intensidades de voltaje, dos pulsos y dos longitudes de pulso diferentes (625 y 1000 V/cm, 18.6 y 27.4ms), encontrando que la motilidad en general era menor del 50% y se reducía hasta menos del 5% después de ser electroporado a 1000 V/cm con dos pulsos de 27.4 ms sin embargo, los ensayos de transformación mostraron que la integración del DNA al espermatozoides es mayor entre más elevada es la intensidad de campo y más largos los pulsos y tiempo de pulsación (Sin et al., 1995).

Continuando con los avances en electroporación con espermatozoides de abulón, en 1997 se realizó un estudio en el que se transfectó espermatozoides de abulón con un plásmido que contenía el promotor SV40 y la secuencia codificante para la enzima

cloranfenicol acetil transferasa (CAT), reportando un porcentaje de transgénesis de 65%, el cuál fue observado mediante PCR y Southern blot, además de analizar los efectos en la fertilidad y motilidad del espermatozoides tras someterlo al proceso con altos voltajes (hasta 10,000 V/cm), los cuales no produjeron efectos negativos en la motilidad ni fertilidad del espermatozoides (Tsai et al., 1997, Tsai, 2000) sin embargo, no se observó *in vivo* la expresión del gen. Otro estudio con electroporación utilizando espermatozoides en moluscos, es el caso del mejillón (*Mytilus galloprovincialis*), en el cual se realizó la transfección de la hormona de crecimiento bovina (bGH) reportando una asimilación del material genético exógeno exitosa, pero una disminución importante de la fertilidad espermática cuando el voltaje ascendió a 1000 V/cm (Kuznetsov et al., 2001).

En el año 2002, se estudió la producción del pez dorado transgénico (*Sparus sarba*) con la hormona de crecimiento de la trucha arcoíris (*Oncorhynchus mykiss*), mediante lipofección en gónadas y con electroporación de espermatozoides. Para la electroporación se aplicó, una intensidad de campo de 600 a 2000 V/cm, una longitud de pulso de 20 a 40 ms y un número de pulsos de 4 a 8 y como resultado, encontraron que entre el 56 y el 70 % de los animales tratados portaban el gen de la hormona de crecimiento, además de reportar una disminución del 50% de contenido de grasa debido al aumento de masa muscular en los organismos (Lu et al., 2002).

En otros invertebrados se reportó en el año de 2005, por primera vez la transfección mediante electroporación utilizando espermatozoides y GFP como marcador en el protocordado anfioxo (*Branchiostoma belcheri tsingtaoense*), en el que aplicaron un voltaje de .5 Kv y se encontró un porcentaje de expresión de GFP del

5% cuando se utilizó una concentración de DNA de 0.05 µg/mL y del 15% con una concentración de 0.5 µg/mL sin embargo, observaron únicamente una expresión temporal en el que no encontraron ningún patrón específico de expresión (Yu, 2005). Los datos y evidencias presentados previamente dejan claro que aún falta estandarizar un método eficaz de electroporación con esperma en invertebrados que permita observar el patrón de expresión del gen foráneo y así poder incorporar otros genes valiosos para el crecimiento y mejoramiento genético.

Posteriormente, en 2010 se realizó un estudio de transmisión del gen EGFP (Enhanced Green Fluorescent Protein) mediado por esperma en el pez gato sudamericano (*Rhamdia quelen*), en el cuál evaluaron cinco distintos métodos de transmisión genética: deshidratación y rehidratación (DR) del espermatozoide con el vector; deshidratación, rehidratación y electroporación de los espermatozoides con el vector (DRE), solamente electroporación de espermatozoides con el vector (E), incubación del vector con plasma seminal (INC) e incubación del vector con espermatozoides sin plasma seminal (INCSP)), además de evaluar la tasa de fertilización, de incubación y morfología del esperma después de aplicar los tratamientos, ellos encontraron que el método más efectivo para transferir el gen foráneo fue el de DRE, en el cuál obtuvieron un porcentaje de expresión de GFP de 63% y de 60% en la verificación de la transfección por PCR no obstante, no analizaron la integración del gen al genoma del pez. Con lo anterior demostraron que la transferencia genética mediada por esperma en pez gato es posible (Collares et al., 2010).

En general, en las especies acuáticas, todos los trabajos publicados reportan la incorporación de DNA por los espermatozoides, sin embargo la

integración, transmisión y principalmente la expresión del DNA foráneo por los embriones ha sido muy rara y hasta ahora, los eventos que ocurren después de la fertilización con espermatozoides transgénicos aún son pobremente comprendidos (Tabla1).

Tabla 1. Transferencia de genes mediada por espermatozoides en organismos acuáticos.

Especie	Técnica utilizada	Etapas examinadas	% de transgénesis	Integración	Expresión	Referencia
Trucha Arcoíris	Incubación con DNA	Larva	10.5 a 53.3%	No	No	(Chourrout and Perrot, 1992)
Pez gato africano	Incubación con DNA y electroporación	Larva	4%	Si	No determinada	(Müller et al., 1992)
Tilapia	Incubación con DNA y electroporación	Larva	3.20%	Sí	No determinada	(Müller et al., 1992)
Carpa común	Incubación con DNA y electroporación	Larva	2.60%	Sí	No determinada	(Müller et al., 1992)
Salmón	Electroporación	Larva	5 al 10%	No	No determinada	(Sin et al., 1993)
Salmón	Electroporación	Larva	39%	No determinada	No determinada	(Symonds et al., 1994)
Pez zebra	Incubación con DNA y electroporación	Larva	14.50%	Sí	No determinada	(Patil and Khoo, 1996)
Carpa catla	Electroporación	Larva	23%	Sí	No determinada	(Venugopal et al., 1998)
Erizo de mar	Incubación con DNA	Embrión	no determinado	No determinada	Si (CAT)	(Arezzo, 1989)
Ostión	Electroporación	Larva	50%	Sí	No determinada	(Hu et al., 2000)
Mejillón	Incubación con DNA y electroporación	Larva	65 al 70%	Sí	No determinada	(Kuznetsov et al., 2001)

III. OBJETIVOS.

Objetivo general.

Transfectar por medio de transferencia genética mediada por esperma utilizando la electroporación como estrategia, un vector que permita la expresión de la hormona de crecimiento (GH) y la proteína verde fluorescente (GFP) como marcador en el abulón *Haliotis spp.*

Objetivos particulares.

- 1.- Construcción de un vector que contenga el promotor de citomegalovirus (CMV), el gen GH y el marcador GFP.
- 2.- Estandarización de los parámetros de electroporación (intensidad de campo, longitud de pulsaciones y número de pulsaciones) necesarios para realizar la transfección.
- 3.- Transformación de esperma con el vector de expresión previamente construido
- 4.- Corroboración del modo de expresión de GFP en blastómeros y larvas por microscopía fluorescente y PCR.

IV. HIPÓTESIS

La transfección del vector pAcGFP1-N + GH mediante electroporación de esperma, permitirá la expresión de la proteína verde fluorescente y la hormona de crecimiento en blastómeros y larvas trocóforas de *Haliotis* spp.

V. MATERIALES Y MÉTODOS.

Síntesis y obtención del gen de la hormona de crecimiento.

Se seleccionó el gen de la hormona de crecimiento del pez cobia (*Rachycentron canadum*) debido a que este pez presenta una alta tasa de crecimiento (Gopakumar et al., 2010). Para determinar la similitud del cDNA GH de cobia con el de otros peces (*Tilapia sp.*, *Oncorhynchus mykiss* y *Salmo trutta caspius*) se realizó una alineación de secuencias del cDNA con los programas Clustal X2 y GeneDoc.

El cDNA de GH del pez cobia (*Rachycentron canadum*) tiene una longitud de 615 pb (banco de genes, NCBI, código de acceso: GQ861507.1), este se mandó sintetizar a la compañía Genscript (Nueva Jersey, Estados Unidos), el gen se envió por esta compañía clonado en el plásmido pUC57 y deshidratado (Figura 1). El plásmido se hidrató para quedar a una concentración de 100 ng por microlitro, posteriormente el plásmido fue transformado en células electrocompetentes de *E. coli* y cultivado en agar LB + ampicilina (60 µg/ml) por 18 hrs a 37°C. Al siguiente día se escogieron las clonas positivas y se resembraron en caldo LB+ ampicilina (60 µg/ml) por 18 hrs a 37°C. El DNA del plásmido fue purificado con el kit comercial miniprep (OMEGA biotek®). Las clonas positivas fueron verificadas por PCR con los cebadores específicos (Cobia GH3 F y GH5 Rev, Tabla 2). Se utilizó la mezcla comercial de PCR 2x Green master mix (PROMEGA®) y una concentración final de cebadores de 0.5 µM y 30 ng de DNA plasmidico. El termociclador fue programado de la siguiente forma: un

ciclo de 94°C por 3 min, 30 ciclos de; 94°C por 1 min, 64°C por 1 min, 72°C por 1 min, y una extensión final de 10 min a 72°C.

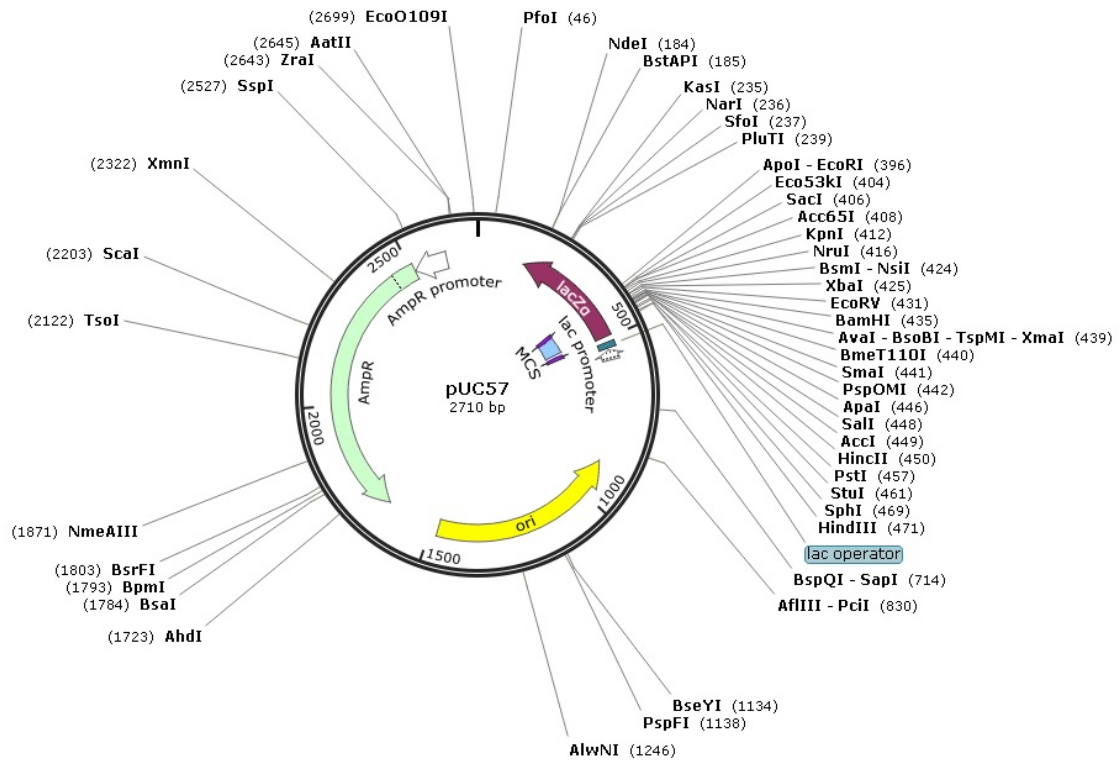


Figura 1. Mapa del plásmido pUC57 al cual se le clonó el gen sintético de GH-Cobia.

Tabla 2. Identificación y secuencias de los cebadores utilizados en las reacciones de PCR, dirección (5'-3').

Nombre	Secuencia
GH3F	ATG GAC AGA GTT GTC GTC C
GH5Rev	CAG GGT GCA GTT AGC TTC T
Cobia GH In-Fusion Fwd	AAG GCC TCT GTC GAC ATG GA
Cobia GH In-Fusion Rev	AGA ATT CGC AAG CTT CAG GGT
AcGFP 15F	GAG CAA GGG CGC CGA GC
AcGFP 10R	CTT GTA CAG CTC ATC CAT GC
CMV Fwd	CGC AAA TGG GCG GTA GGC GTG
AcGFP R2	GCT CGG CGC CCT TGC TCG

Clonación de GH-pAcGFP1-N.

Una vez corroborada la presencia del gen se procedió a realizar un segundo PCR utilizando el DNA plasmídico puro y los cebadores CMV Fwd y AcGFP R2 (Tabla 1) que sugirió la casa comercial donde se compró el plásmido pAcGFP1-N (Clontech®), el cual contiene el promotor de citomegalovirus (CMV) y como marcador de expresión la proteína verde fluorescente (AcGFP) (Figura 2), la cual al expresarse, lo hace fusionada con el gen de interés en la porción N-terminal de la proteína GH, por lo que su detección permite corroborar la presencia del gen de interés *in vivo*. El producto de este PCR fue purificado con el kit comercial QIAquick PCR purification kit (QIAGEN®). Después se procedió a realizar la clonación independiente de ligación de un solo paso (por sus siglas en

inglés: One-Step LIC) (Jeong et al., 2012). Para ello se preparó la siguiente reacción: 1 µg del vector pAcGFP1-N, 10 U de la enzima T4 DNA polimerasa (Promega ®), 1 µL de buffer T4 (Promega ®) y 6 µL del producto de PCR previamente purificado. La reacción se incubó durante 15 min a 37°C, posteriormente se detuvo elevando la temperatura a 75°C durante 10 min, después se enfrió en hielo y se incubó a 37°C durante 30 minutos, al finalizar esto se procedió a transformar el constructo pAcGFP1-N + GH cobia en células electro competentes de *E. coli*, las cuales posteriormente se sembraron en agar LB + kanamicina (65 mg/ml) y se cultivaron por 18 h a 37°C, para después realizar la selección de clonas y propagarlas en caldo LB + kanamicina (60 mg/ml) bajo las mismas condiciones. Se purificó DNA plasmídico de las clonas positivas y se verificó por PCR, utilizando los cebadores Cobia GH-In Fusion Fwd y Cobia GH-In Fusion Rev utilizados previamente para amplificar el gen y los cebadores CMV Fwd y AcGFP R2 (Tabla 1). Para verificar el marco de lectura abierto (ORF, por sus siglas en inglés) del constructo se envió a secuenciar el plásmido a la compañía Allele biotech, San Diego, California, E.U.

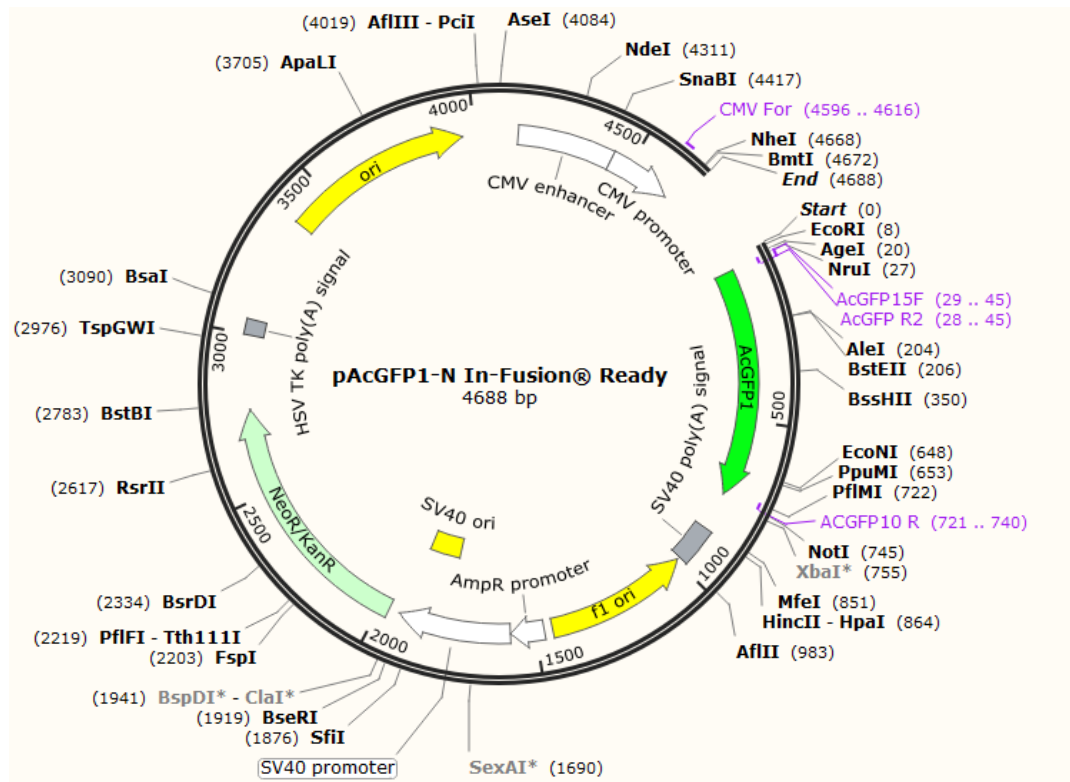


Figura 2. Mapa del plásmido pAcGFP1-N (Clontech®) donde se observa el promotor CMV (flecha blanca) y el gen AcGFP (flecha verde).

Obtención de los gametos de abulón.

La obtención de los gametos fue realizada en la compañía Abulones Cultivados y Productores Marinos Baja, ambas ubicadas en el ejido Eréndira, Baja California. Se eligieron hembras y machos maduros identificados por el color de la gónada verduzco-grisáceo de las hembras y amarillenta de los machos. Los individuos se colocaron en un recipiente de plástico con AMF (0.45 μ M) a una temperatura de $\sim 18^{\circ}\text{C}$. La liberación de gametos se indujo de acuerdo a la metodología descrita por (Riffell *et al.*, 2002). Brevemente, se adicionaron 6.6 mL/L de Tris 2 M al agua que contenía a los organismos y se dejaron reposar por

15 min. A continuación se agregaron 0.66 mL de H₂O₂ al 30 % por litro de AMF. Después, el contenedor fue tapado con una bolsa de plástico de color negro y agitado frecuentemente para estimular a los organismos. El esperma y los ovocitos fueron liberados de 2 a 3 h después de la adición del H₂O₂ (Figura 3). En cuanto los organismos empezaron a liberar los gametos, estos fueron removidos inmediatamente del contenedor, enjuagados con AMF y colocados rápidamente por separado en recipientes limpios conteniendo AMF para que terminaran la liberación de los gametos (Kopf *et al.*, 1983). Una vez obtenidos los gametos, estos fueron cuantificados, una muestra de espermatozoides fue fijada con formaldehído y teñida con azul de metileno para ser contada utilizando una cámara Neubauer, con lo que se ajustó su concentración 1000 huevos/ml con AMF. Los ovocitos fueron cuantificados en una cámara Sedgewick Rafter.

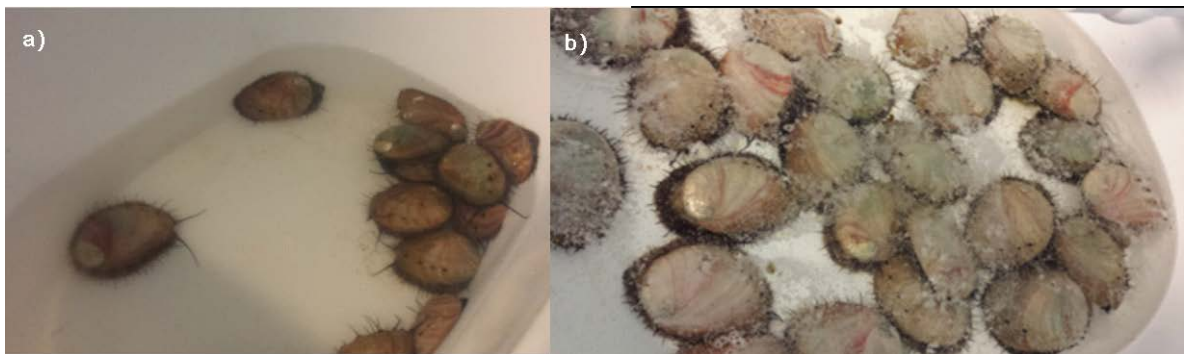


Figura 3. Fotografías de abulones machos (a) y hembras (b) desovando

Electroporación del esperma con pAcGFP1-N + GH y fertilización de los gametos.

Para introducir el constructo al esperma de abulón se utilizó el electroporador micropulser (Bio-Rad®) y cubetas de electroporación con 0.2 cm

de distancia entre los electrodos, con un volumen total de 1 mL, el esperma fue diluido 1:2 con AMF. La electroporación se realizó con 3 voltajes diferentes (0.5, 0.75 y 1 kV) y dos pulsaciones con una duración de 50 ms cada una. Se observó la motilidad de los espermatozoides en un microscopio óptico para determinar el movimiento. Se tomaron en cuenta como viables a los espermatozoides que tenían movimiento vigoroso y continuo en un 70-100%; medianamente, aquellos en un 40-70% y escaso de 1-40% y por ultimo sin viabilidad; aquellos sin movilidad.

Para realizar la electroporación se utilizó una concentración de DNA plasmídico de 500 ng/ mL, una vez realizada la transfección, se realizó la fertilización in vitro de los ovocitos en una proporción 1:100 ovocito-esperma, una vez hecha se incubaron a temperatura ambiente (18 a 20 °C), con aireación constante (Figura 4).

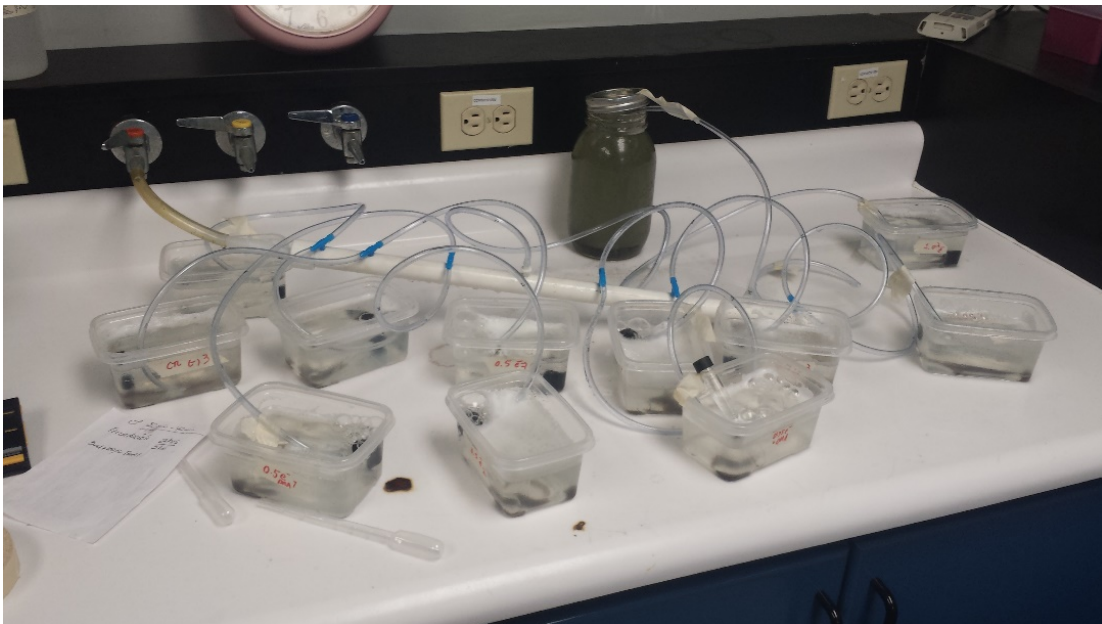


Figura 4. Fotografía de la incubación de los tratamientos a temperatura ambiente con aireación constante

Como control negativo se utilizó esperma sin electroporar. Cada tratamiento se realizó por triplicado. Para determinar la tasa de fecundación, se tomaron muestras después de dos horas de haber sido fecundados y se fijaron con formaldehído al 10%. Se realizó un conteo de 50 células de cada réplica en un microscopio óptico, para expresarse posteriormente como porcentaje de fecundación.

Detección de GFP por medio de microscopía de fluorescencia.

La detección *in vivo* de la expresión del marcador AcGFP en blastómeros y larvas trocóforas se realizó después de haber transcurrido 48 h de incubación. Las muestras fueron observadas bajo un microscopio confocal (Olympus, modelo IX81) bajo una excitación de luz de 450 a 500 nm y una emisión de 600 a 650 nm. Para realizar el conteo se utilizó un microscopio de epifluorescencia invertido (Olympus, modelo IX70), para ello se contaron 100 blastómeros y/o larvas de cada tratamiento para calcular el porcentaje de expresión.

Detección de la proteína expresada por la técnica de Western blot.

La presencia de la proteína GH se confirmó mediante una prueba de Western-blot, la cual fue realizada con 5 µL del botón de larvas congeladas y muestras control. Se añadieron 25 µL de buffer de muestra 2X (SGB 2.5 ml, glicerol 1 ml, 2-ME 0.5 ml, 10% SDS 3.2 ml, 0.001% azul de bromo fenol) a cada botón y se hirvieron durante 5 min. Posteriormente se realizó la electroforesis en geles de acrilamida al 14% en los que se cargaron 10 µL de cada muestra, las proteínas fueron electrotransferidas a membranas PVDF (Osmonics, Inc.) y la GH

fue detectada utilizando anticuerpos policlonales de conejo anti-GH de humano, seguido de un conjugado de IgG-peroxidasa de burro anti-conejo (Thermo Sci.®, ambos anticuerpos en una dilución 1:1000), como sustrato de la peroxidasa se usó TMB estabilizado para HRP (Promega ®). La escalera de proteína pre teñida utilizada fue de la marca Biorad® (Gallagher et al., 2008).

Detección por PCR de la transfección de la GH-GFP en larvas.

Se confirmó la presencia del gen GFP mediante PCR con los cebadores AcGFP15F y AcGFP10R, y del gen GH con los cebadores GH3F y GH5r (Tabla I), para la cual, el termociclador fue programado de la siguiente forma: un ciclo de 94°C por 3 min, 30 ciclos de; 94°C por 1 min, 58°C por 1 min, 72°C por 1 min, y una extensión final de 10 min a 72°C. Como control positivo se utilizó plásmido purificado extraído de las clonas positivas con el constructo Gh-GFP previamente identificadas, mientras que el control negativo fue DNA purificado de larvas y blastómeros no electroporados, los resultados fueron observados en un gel de agarosa al 1.3% y observados con un transiluminador con luz UV.

Análisis estadístico de los datos.

Para determinar las diferencias entre los tratamientos y el control se llevó a cabo un análisis de varianza por rangos con la prueba no paramétrica Kruskal Wallis con un nivel de significancia de 0.05 con los datos obtenidos de los conteos por triplicado de la fertilización y fluorescencia en los embriones y/o larvas, utilizando el programa STATISTICA 7.1 software (StatSoft, Inc. 1984-2005).

En caso de un resultado significativo en la prueba general, se hizo un segundo análisis de comparación múltiple con la prueba Z para determinar diferencias entre pares de tratamientos.

VI. RESULTADOS.

Síntesis y obtención del gen de la hormona de crecimiento.

Los resultados obtenidos de las alineaciones del cDNA de GH de cobia con el gen GH de *Tilapia sp.*, *Oncorhynchus mykiss* y *Salmo trutta caspius* muestran un grado de alto de conservación, como puede observarse en las bases marcadas de negro (Figura 5).

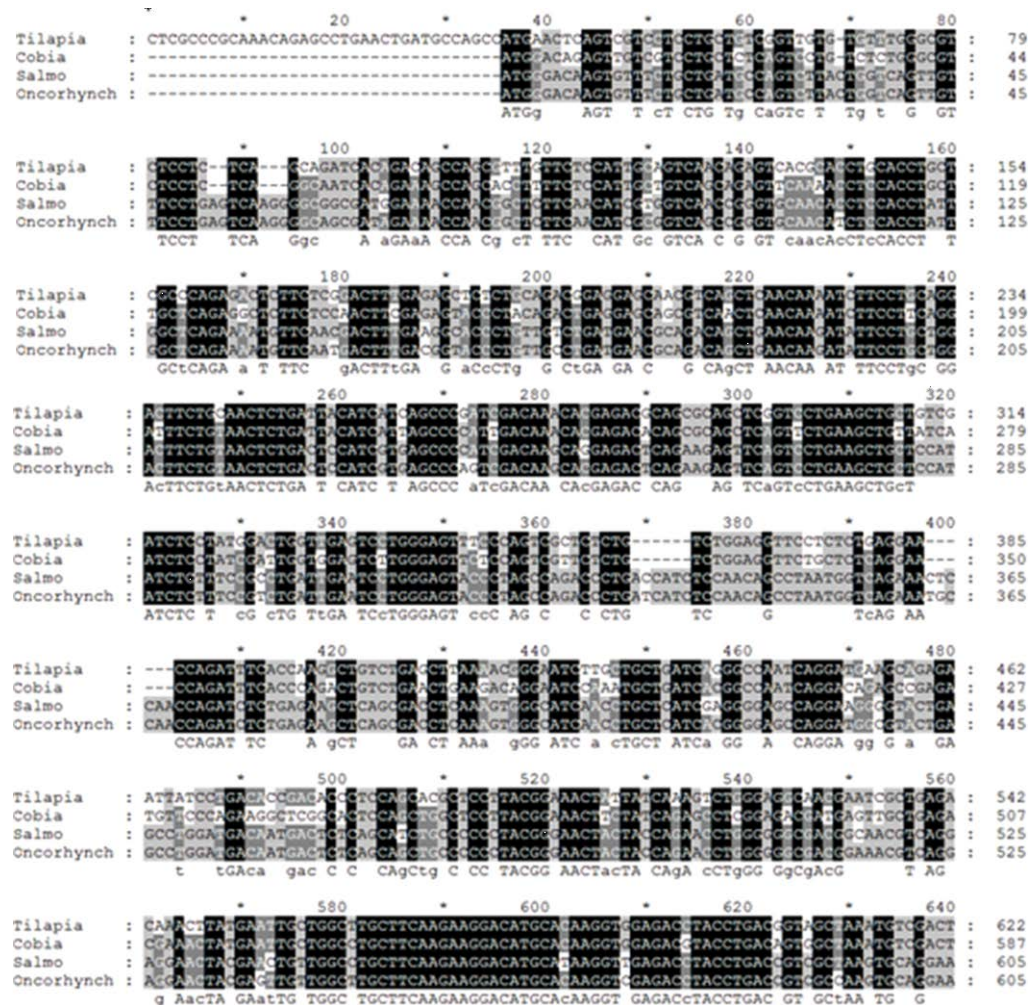


Figura 5. Alineaciones del gen GH del pez cobia con el gen GH de otros peces.

Del análisis de la secuencia de cDNA, se cambió la tercera base de un codón del aminoácido en la posición 600 para evitar el corte de la enzima Sal1 en ese sitio. A continuación se muestra la secuencia del gen GH-cobia sintetizado con 15 pares de bases adicionales (Mayúsculas) en los extremos 5' y 3' homólogas al sitio de clonación del plásmido pAcGFP1-N para efectuar la ligación independiente de clonación:

```
5'AAGGCCTCTGTCGACatggacagagttgtcgtcctgtctcagtcctgtctctgggcgtctcctcag
gcaatcacagaaagccagcacctttctccattgctgtcagcagagttcaaaacctccacctgcttgctcagagg
ctcttctccaacttcgagagtaccctacagactgaggagcagcgtcaactcaaaaaatcttcttcaggatttctg
taactctgattacatcattagccccattgacaaacacgagacacagcgcagctcagttctgaagctgttatcaatc
tcctatcgattggtggagcttgggagttctccagtcggttctgtctgagggtctgtctcaggaaccagatttcacc
cagactgtctgaactgaagacaggaatccaaatgctgatcacggccaatcaggacagagccgagatgttccc
agaaggctcggcactccagctggctccttacggaaacttctatcagagcctcggagacgatgagttgctgagac
gaaactatgaattgctggcctgcttcaagaaggacatgcacaaggtggagacgtacctgacagtggctaaatgt
cggctctctccagaagctaactgcaccctgAAGCTTGCGAATTCT-3'
```

Clonación de GH-pAcGFP1-N.

Para aumentar la concentración del constructo pUC 57 + GH-cobia, este fue transformado mediante electroporación en células electrocompetentes de *E. coli* (cepa DH5 α), aplicando un voltaje de 0.5 kV, con una duración de 0.5 msec en cubetas de electroporación con 0.1 cm de distancia entre los electrodos, posteriormente se sembraron en cajas de Petri con el medio LB-ampicilina (60 μ g/mL), al día siguiente se seleccionaron las clonas positivas (Figura 6)

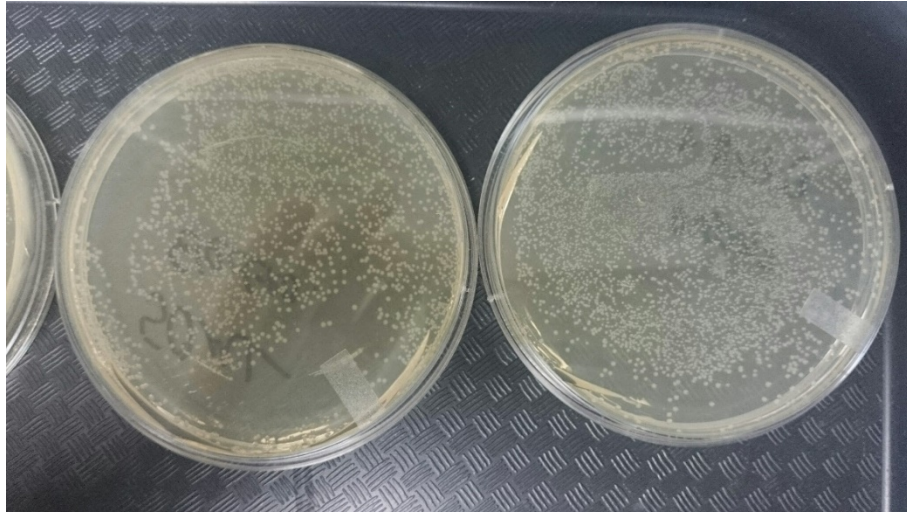


Figura 6. Fotografía de clonas positivas en cajas de Petri con Agar LB+ ampicilina.

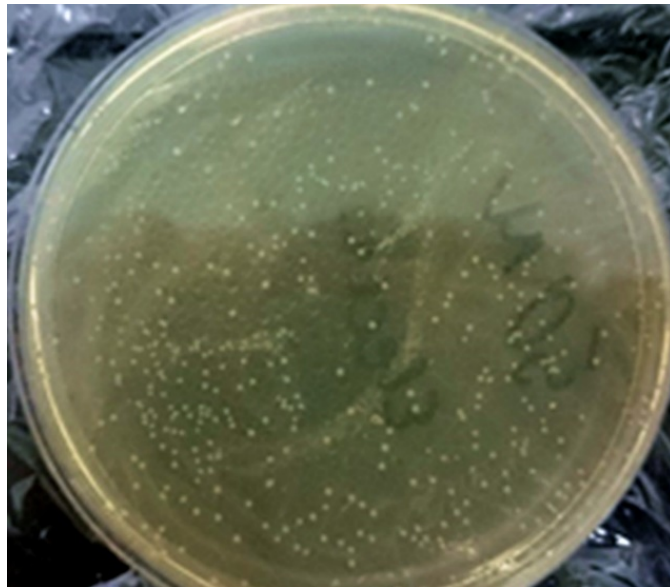


Figura 7. Fotografía de clonas positivas en una caja de Petri con Agar LB+ kanamicina.

El constructo pAcGFP1-N + GH-cobia resultante de la reacción LIC, fue transformado mediante electroporación en células electrocompetentes de *E. coli* (cepa DH5 α), aplicando un voltaje de 0.5 kV, con una duración de 0.5 mseg en cubetas de electroporación con 0.1 mm de distancia entre los electrodos, posteriormente se sembraron en cajas de Petri con el medio LB-kanamicina (60 μ g/mL), al día siguiente se seleccionaron las clonas positivas (Figura 7).

Corroboración de la presencia de GH-cobia mediante PCR y digestión enzimática.

Se confirmó la presencia del gen mediante PCR utilizando los cebadores CMV Fwd y AcGFP R2 (Tabla 1), el cual amplificó el fragmento del tamaño esperado (780 pb, figura 8), asimismo se realizó una confirmación del fragmento por digestión enzimática utilizando las enzimas EcoRI y Sall, tras lo cual, se puede observar también el fragmento esperado de 630 pb (Figura 9).

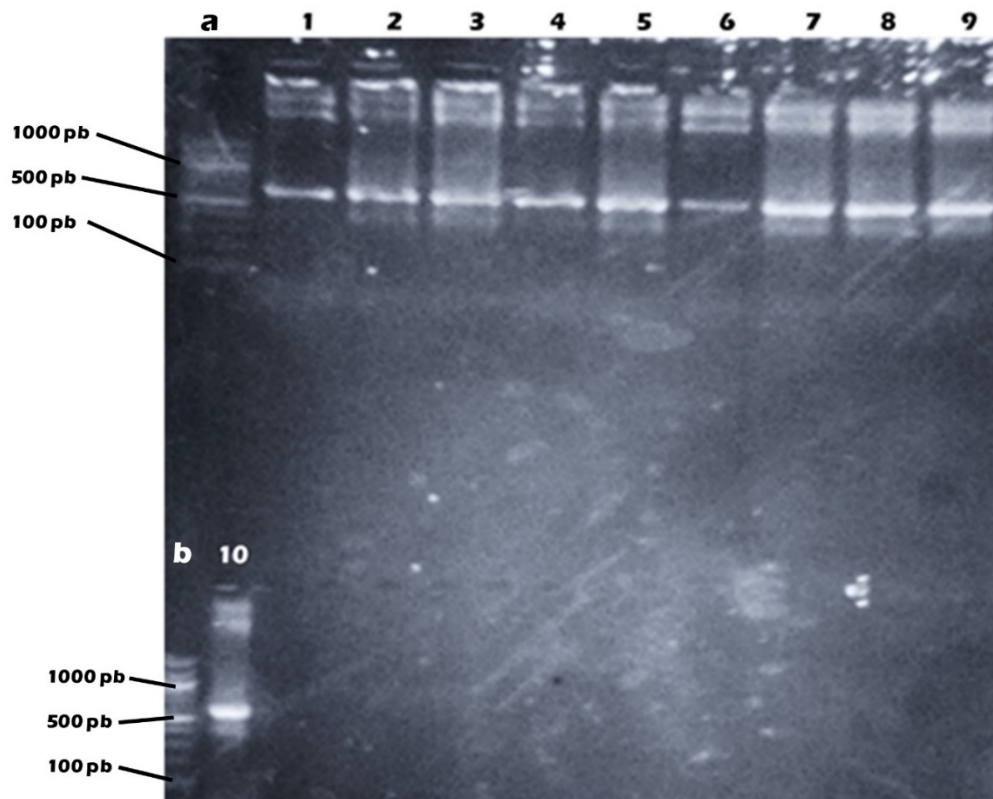


Figura 8. Electroforesis en gel de agarosa al 1.3% en el que se aprecia en los carriles a y b la escalera utilizada y en los carriles del número 1 al 10 los fragmentos del tamaño esperado (780 pb) de las clonas positivas, producto del PCR con los cebadores CMV Fwd y AcGFP R2.

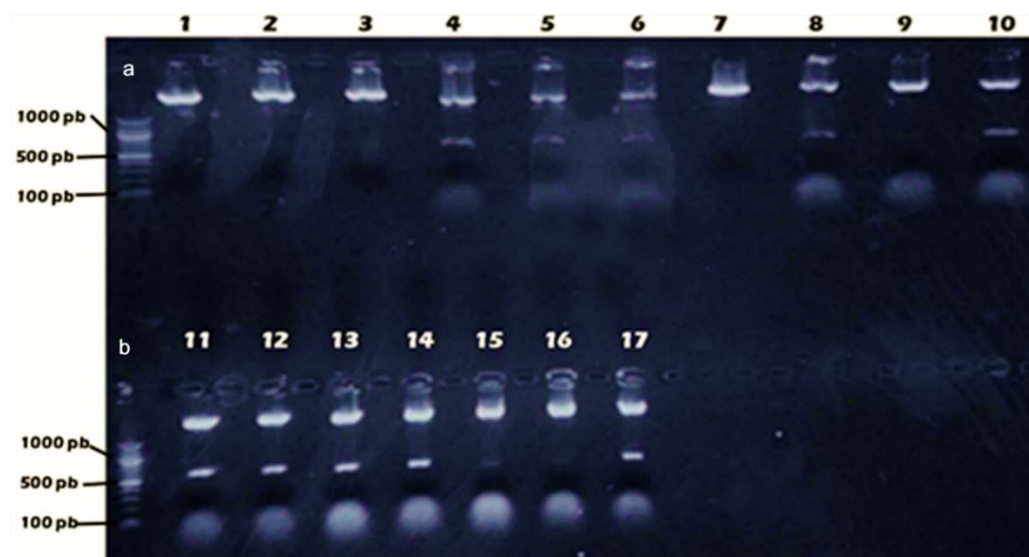


Figura 9. Electroforesis en gel de agarosa al 1.3% de la digestión enzimática con EcoRI y Sall en el que se observa en los carriles a y b la escalera utilizada, en los carriles del 1 al 3 los controles negativos (pAcGFP1-N sin inserto), del 4 al 6 los controles positivos (pUC57 + GH-cobia) y del 7 al 10 las clonas cuya extracción plasmídica fue sometida a la digestión y de las cuales los números 8, 10, 11, 12, 13, 14 y 17 arrojaron el fragmento del tamaño esperado (630 pb), mientras que las clonas 15 y 16 mostraron la banda mucho más tenue.

Electroporación del espermato con pAcGFP1-N + GH y fertilización de los gametos.

Tras electroporar el espermato con todos sus respectivos voltajes y pulsaciones, todos los tratamientos mostraron un movimiento que iba de medio a vigoroso, por lo cual se procedió a realizar la fertilización (Figura 10).

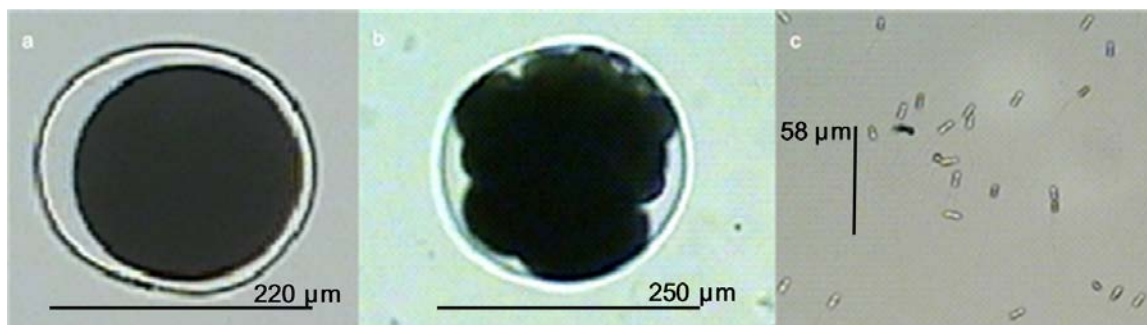


Figura 10. Fotografías de un huevo sin fecundar (a), un huevo fecundado en división (b) y espermatozoides de abulón (c).

En cuanto a las pruebas de fecundidad, los huevos fecundados con espermatozoides electroporados a un voltaje de 0.5 Kv mostraron una fecundidad en promedio de 73.2%, mientras que los tratados con un voltaje de 0.75 Kv tuvieron un promedio de 74.6%, y los fecundados con un voltaje de 1 Kv su promedio fue de 73%, en el tratamiento control (sin electroporación) se obtuvo un promedio de 78.6%. El análisis estadístico de Kruskal Wallis para la fecundidad no mostró diferencias significativas ($P= 0.9220$) entre los tratamientos y el control en los 3 voltajes de electroporación (Figura 11).

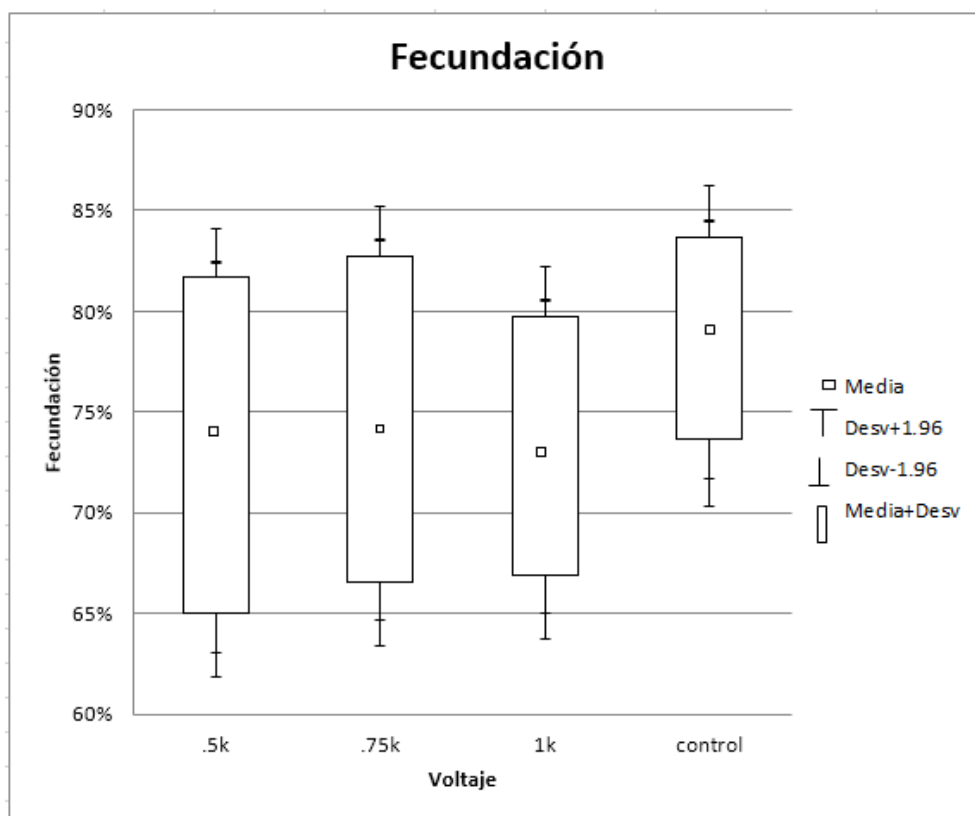


Figura 11. Gráfica del promedio de la tasa de fecundación obtenida con los tres voltajes aplicados.

En el análisis Kruskal-Wallis para la tasa de fecundación no se obtuvo diferencia significativa ($p=0.9220$) entre los tres tratamientos.

Detección de GFP por medio de microscopía de fluorescencia.

La observación de la expresión *in vivo* de GFP en larvas y blastómeros se realizó después de haber transcurrido 48 h post-fertilización, en la cual se encontró un porcentaje de expresión del 9.7% en el tratamiento de 0.5 Kv, 40% en el de 0.75 Kv y de 27.7% con el tratamiento de 1 Kv, mientras que el grupo control (sin electroporar) no presentó fluorescencia (Figura 12).

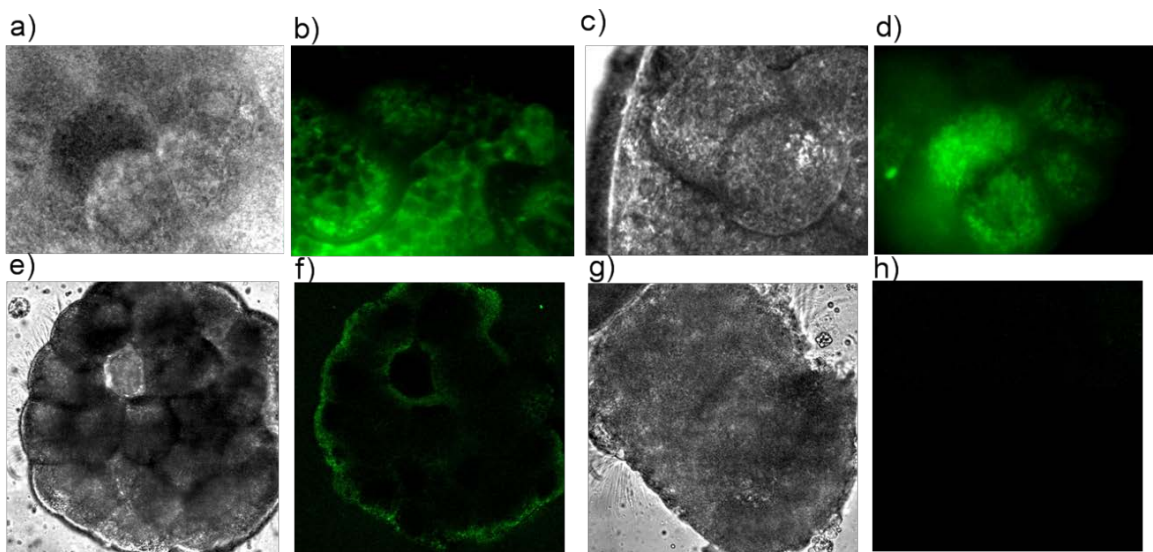


Figura 112. Fotografías de la expresión in vivo de GFP observadas en microscopio de fluorescencia. Los incisos a) y b) muestran fotografías de una larva del tratamiento de 0.5 kV, los incisos c) y d) del tratamiento de 0.75 kV, los incisos e) y f) del tratamiento de 1 kV y los incisos g) y h) del grupo control.

Análisis estadístico Fluorescencia.

Tras realizar el análisis de varianza por rangos con la prueba no paramétrica Kruskal Wallis, se determinó que si existen diferencias significativas en la fluorescencia entre los tratamientos ($P < 0.05$) (Figura 13).

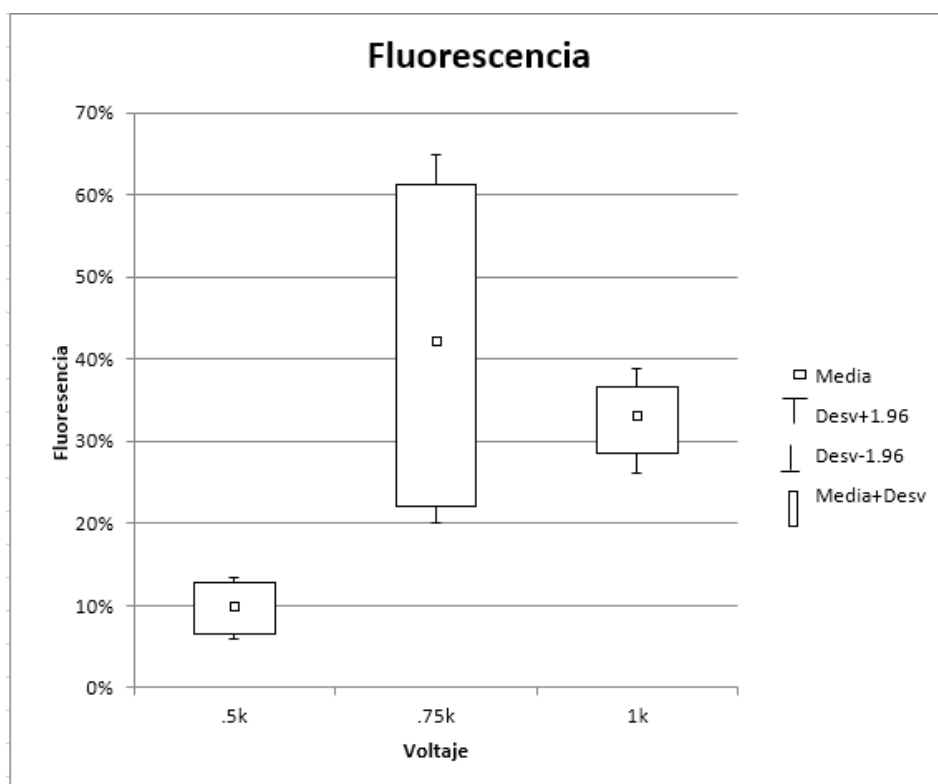


Figura 13. Gráfica de los promedios de la fluorescencia obtenida con los tres voltajes aplicados.

En el análisis Kruskal-Wallis para la fluorescencia se obtuvieron diferencias significativas entre el tratamiento de 0.5 kV y el tratamiento de 0.75 kV ($p=0.0338$), así como entre el tratamiento de 0.5 kV y el tratamiento de 1.00 kV ($p=0.0390$), sin embargo, no existe diferencia significativa entre el tratamiento de 1.00 kV y el de 0.75 kV ($p=0.8901$).

Detección de la proteína expresada por la técnica de Western blot.

La expresión de GH cobia (23.2 KDa) conjugada con AcGFP (26.6 KDa), valorada a través de la presencia de la proteína en las muestras fue observada con una banda positiva del tamaño esperado (49.8 KDa) en las muestras de

proteína de las larvas obtenidas de los tres tratamientos, mientras que en el control negativo no se obtuvo señal (Figura 14).

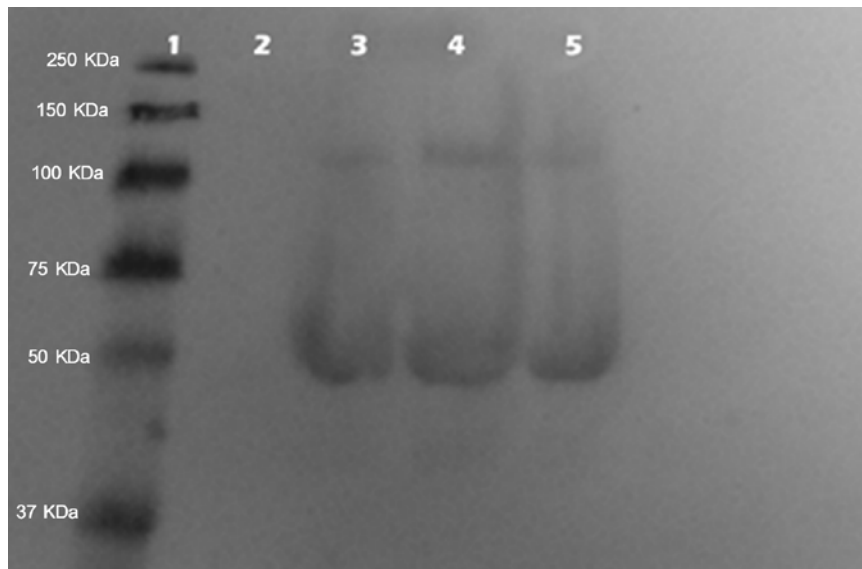


Figura 124. Fotografía de la membrana PVDF revelada. En el carril 1 se observa la escalera utilizada (Biorad ®), en el carril 2 el control negativo, mientras que los carriles 3, 4 y 5 muestran los tratamientos de 0.5 Kv, 0.75 Kv y 1 KV respectivamente.

Detección por PCR del gen GFP en larvas.

El PCR realizado con los cebadores AcGFP 15F y AcGFP 10R para detectar la presencia del gen GFP en las larvas, fue positivo, ya que amplificó el tamaño esperado (712 pb) en los 3 tratamientos y el control positivo (carril 5), corroborando la presencia del constructo en las larvas y blastómeros (carriles 2-4), mientras que en el control negativo no hubo amplificación, carril 6 (Figura 15).

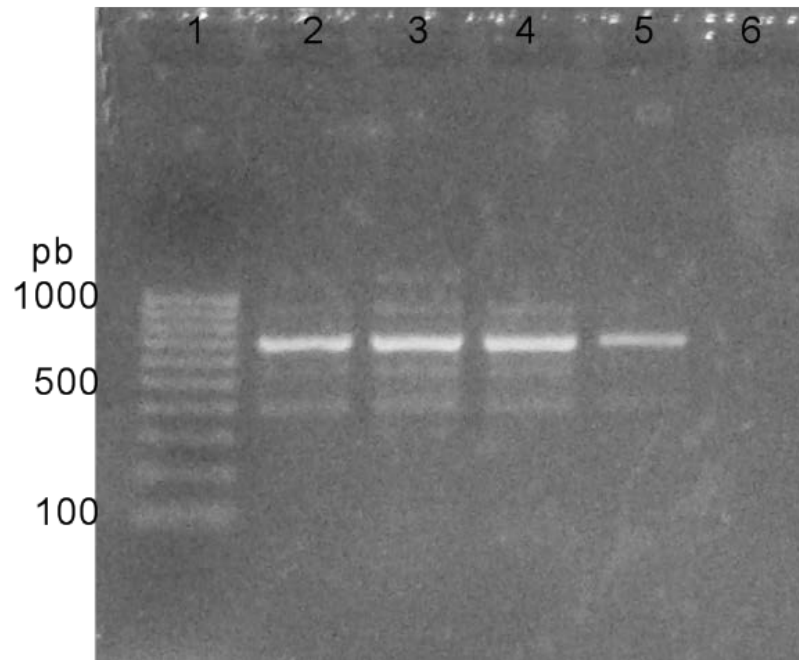


Figura 135. Producto del PCR de la detección del gen de GFP en larvas en un gel de agarosa al 1.3% y visualizado bajo luz UV. Carril 1; escalera de DNA, carriles 2, 3 y 4 los tratamientos 0.5 kV, 0.75 kV y 1 kV, respectivamente, carril 5 el control positivo y en el carril 6 el control negativo.

Detección por PCR del gen GH.

En el PCR realizado con los cebadores GHcobiaF y GHcobiaR para detectar el gen de GH, fue positivo, ya que se obtuvo el tamaño esperado de (627 pb) en los 3 tratamientos y el control positivo, corroborando la presencia del constructo en las larvas y blastómeros, mientras que en el control negativo no hubo amplificación, carril (Figura 16).

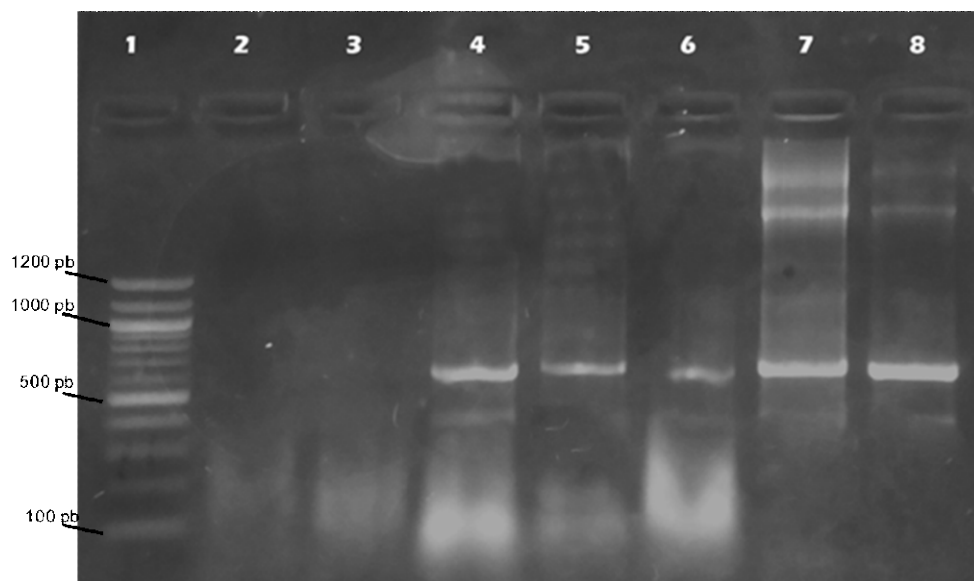


Figura 146. Fotografía del gel de agarosa al 1.3% en el que se observa en el carril 1 la escalera utilizada, en los carriles 2 (únicamente cebadores) y 3 (plásmido sin inserto) los controles negativos, en los carriles 4, 5 y 6 los tratamientos 0.5 kV, 0.75 kV y 1 kV respectivamente, y en los carriles 7 (pUC57 +GH Cobia) y 8 (pAcGFP + GH Cobia) los controles positivos.

VII. DISCUSIÓN.

La transgénesis mediada por espermatozoides fue realizada exitosamente por primera vez en 1989 con ratones como modelo biológico y desde entonces ha sido utilizada para manipular diversos organismos; sin embargo, es una técnica que requiere ser estandarizada para cada especie y equipo que se utiliza, (Lavitrano et al., 1989, Smith and Spadafora, 2005, Smith, 2012) es por ello y debido a la gran importancia comercial que posee el abulón, que en el presente trabajo se realizó la estandarización de la transformación genética mediada por espermatozoides en *H. rufescens* utilizando el electroporador Micropulser (Biorad), el cual se encuentra disponible actualmente en el mercado, factor importante ya que las investigaciones hechas anteriormente utilizaron equipo que ya no se encuentra en el mercado.

Algunas de las ventajas de usar espermatozoides como vehículo genético son: a) un gran número de ovocitos pueden ser fertilizados con el espermatozoides tratado, b) supera muchas de las grandes desventajas de los sistemas de transferencia genética convencionales relacionadas con los huevos como son la opacidad, pronúcleos invisibles y un corion muy duro, c) Es fácil de coleccionar y manipular, y en la mayoría de los casos el simple hecho de añadir agua es suficiente para activarlos, d) el espermatozoides de los animales acuáticos se puede crio-preservar de manera que el espermatozoides tratado siempre esté disponible para su uso, e) la transferencia genética mediada por espermatozoides es un método mucho más rápido, económico y simple de realizar.

En cuanto a los resultados obtenidos de este trabajo, se realizaron pruebas iniciales de electroporación para verificar los voltajes en los que el esperma se mantenía viable, en estas pruebas se encontró que la viabilidad del esperma de *Haliotis rufescens* se limita a voltajes que van desde 0.1 kV hasta 1 kV ya que al estar expuesto a voltajes superiores, pierde totalmente la movilidad. Este rango de voltajes se encuentran dentro de los valores reportados para otros animales acuáticos como el mejillón *Mytilus galloprovincialis*, en el que se electoporó con voltajes que van de 0.2 a 1.0 kV (Kuznetsov et al., 2001), así como a los datos reportados por Lu et al. (2002) con el pez besugo *Sparus sarba* con el que se utilizaron voltajes entre 0.6 y 2.0 kV, otros casos en los que se reportan voltajes similares son los de Sin et al. (1994) y Walker (1997), quienes al electoporar esperma de salmón chinook utilizaron voltajes entre 0.6 y 1.0 kV. Sin embargo, Tsai y colaboradores (1997, 2000) realizaron las electroporaciones de esperma del abulón *Haliotis diversicolor suptexta* aplicando voltajes de hasta 10 kV, los cuales resultan ser muy elevados en contraste con los demás resultados.

Por otro lado, el porcentaje de fertilización obtenido para los 3 tratamientos y el grupo control oscila entre el 75 y 80%, y no hay diferencias significativas entre el grupo control y los tratamientos ($p < 0.05$) por lo que se puede afirmar que los voltajes aplicados no afectan a la fertilización, esto aunado a que los datos también concuerdan con la tasa de reproducción natural en el abulón *Haliotis asinina* cuando los huevos y espermatozoides se encuentran a una proporción de 1:100 (Suphamungmee et al., 2010).

Dentro de los invertebrados marinos con los que se han realizado estudios de transferencia genética mediada por esperma y expresión de GFP, el presente trabajo es el primero de su clase en moluscos al reportar la expresión *in vivo* de la proteína utilizada como marcador del transgen, algo que se había realizado únicamente en anfibios (Yu, 2005), mientras que en otros invertebrados como el erizo de mar se verificó la presencia de la transgénesis midiendo actividad enzimática de la cloranfenicol acetil transferasa (Arezzo, 1989), y en moluscos como el mejillón *Mytilus galloprovincialis*, *M. chilensis* y la almeja *Chamelea gallina* mediante PCR y Southern blot (Guerra et al., 2005).

Los porcentajes de transgénesis obtenidos en el presente trabajo fueron de 9.7% para 0.5 Kv, 40% a un voltaje de 0.75 Kv, y de 27.7% a 1.0 Kv, siendo estos dos últimos voltajes diferentes significativamente del tratamiento con 0.5 kV ($p < 0.05$), sin embargo, se puede afirmar que el voltaje más efectivo para *H. rufescens* es de 0.75 kV ($p = 0.0338$), estos resultados son similares a las tasas reportadas en otros invertebrados marinos dentro de los que podemos encontrar al ostión *Pinctada máxima* en el que al electroporar el esperma, obtuvieron un porcentaje de transgénesis de 50%; sin embargo, difieren bastante de los porcentajes de transgénesis de estudios realizados con peces (Tabla I).

Al observar las larvas bajo el microscopio de fluorescencia, el grupo control no mostró fluorescencia, mientras que los resultados fueron positivos para los tratamientos de 0.5, 0.75 y 1.0 Kv, sin embargo, se observó una expresión en mosaico, ya que los puntos de emisión de fluorescencia se encontraban sin ningún patrón específico, por lo que se recomienda en futuros estudios monitorear la

expresión para determinar si la expresión es constante o se pierde en algún momento de la vida del animal. No obstante se corroboró la presencia del constructo en las larvas mediante PCR y la proteína de la GH por Western-blot.

VIII. CONCLUSIONES.

1. El espermato de *H. rufescens* es viable cuando el voltaje de electroporación se limita a valores de entre 0.1 Kv y 1 Kv en cubetas con 0.2 cm de distancia entre los electrodos
2. El voltaje más efectivo para transfectar DNA exógeno mediante electroporación en espermato de *H. rufescens* es de 0.75 kV en cubetas con 0.2 cm de distancia entre los electrodos.
3. La expresión de los genes GFP-GH mediada por el promotor de CMV es exitosa y no había sido antes probado en ninguna especie de abulón.
4. La expresión de GFP tras la transfección del constructo diseñado en el presente trabajo se puede observar mediante microscopía fluorescente y puede ser corroborada mediante diferentes técnicas moleculares como PCR y Western-blot

IX. REFERENCIAS.

- ARAI, K. & OKUMURA, S. I. 2008. Aquaculture-oriented genetic researches in abalone: Current status and future perspective. *African Journal of Biotechnology*.
- AREZZO, F. 1989. Sea urchin sperm as a vector of foreign genetic information. *Cell Biology International Reports*, 13, 391-404.
- CABALLERO, R. P. 2010. *Regulación del crecimiento en moluscos gasterópodos: Haliotis sp. y Lithopoma undosa y sus implicaciones en acuicultura y pesquerías*. Universidad Autónoma de Baja California.
- CHANG, K., QIAN, J., JIANG, M., LIU, Y. H., WU, M. C., CHEN, C. D., LAI, C. K., LO, H. L., HSIAO, C. T., BROWN, L., BOLEN, J., JR., HUANG, H. I., HO, P. Y., SHIH, P. Y., YAO, C. W., LIN, W. J., CHEN, C. H., WU, F. Y., LIN, Y. J., XU, J. & WANG, K. 2002. Effective generation of transgenic pigs and mice by linker based sperm-mediated gene transfer. *BMC Biotechnol*, 2, 5.
- CHEN, Q., YANG, J., GAO, A., HU, X. & ZHAO, K. 2001. A study on the growth comparisons of triploid of Haliotis discus Reeve. *Donghai Marine ...*.
- CHEN, T. T., CHEN, M. J., CHIOU, T.-T. & LU, J. K. 2009. Transfer of Foreign DNA into Aquatic Animals by Electroporation. 229-237.
- CHOURROUT, D. & PERROT, E. 1992. No transgenic rainbow trout produced with sperm incubated with linear DNA. *Molecular marine biology and biotechnology*, 1, 282-285.
- COLLARES, T., CAMPOS, V. F., SEIXAS, F. K., CAVALCANTI, P. V., DELLAGOSTIN, O. A., MOREIRA, H. L. & DESCHAMPS, J. C. 2010. Transgene transmission in South American catfish (*Rhamdia quelen*) larvae by sperm-mediated gene transfer. *J Biosci*, 35, 39-47.
- DOGTEROM, A. A. 1980. The effect of the growth hormone of the freshwater snail *Lymnaea stagnalis* on biochemical composition and nitrogenous wastes. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: ...*.
- DOGTEROM, A. A. & VAN DER SCHORS, R. C. 1980. The effect of the growth hormone of *Lymnaea stagnalis* on (bi) carbonate movements, especially with regard to shell formation. *General and comparative ...*.
- ELLIOTT, N. G. 2000. Genetic improvement programmes in abalone: what is the future? *Aquaculture Research*, 31, 51-59.
- FERNÁNDEZ, D. & SÁENZ-ARROYO, A. 2012. The Historical Ecology of Abalone (*Haliotis Corrugata* and *Fulgens*) in the Mexican Pacific. *México y la Cuenca del Pacífico*, 89-112.
- FLEMING, A. E., VAN BARNEVELD, R. J. & HONE, P. W. 1996. The development of artificial diets for abalone: A review and future directions. *Aquaculture*, 140, 5-53.
- GALLAGHER, S., WINSTON, S. E., FULLER, S. A. & HURRELL, J. G. 2008. Immunoblotting and immunodetection. *Curr Protoc Mol Biol*, Chapter 10, Unit 10 8.
- GANDOLFI, F. 1998. Spermatozoa, DNA binding and transgenic animals. *Transgenic research*, 7, 147-155.
- GEIGER, D. L. 2000. *Distribution and Biogeography of the Recent Haliotidae (Gastropoda: Vetigastropoda)* World-wide, Società italiana di malacologia
- GERAERTS, W. P. 1976. Control of growth by the neurosecretory hormone of the light green cells in the freshwater snail *Lymnaea stagnalis*. *Gen Comp Endocrinol*, 29, 61-71.
- GOPAKUMAR, G., RAO, S. G., NAZAR, A. A. K., KALIDAS, C., TAMILMANI, G., SAKTHIVEL, M., MAHARSHI, A. V. & RAO, S. K. 2010. Successful seed production of cobia *Rachycentron*

- canadum and its prospects for farming in India. *Marine Fisheries Information Service; Technical and Extension Series*, 206.
- GORDON, J. W., SCANGOS, G. A., PLOTKIN, D. J., BARBOSA, J. A. & RUDDLE, F. H. 1980. Genetic transformation of mouse embryos by microinjection of purified DNA. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 77, 7380-4.
- GUERRA, R., CARBALLADA, R. & ESPONDA, P. 2005. Transfection of spermatozoa in bivalve molluscs using naked DNA. *Cell Biol Int*, 29, 159-64.
- HAHN, K. O. 1989. *Handbook of culture of abalone and other marine gastropods*, Boca Raton, Florida, CRC Press.
- HOSHIKAWA, H., SAKAI, Y., KIJIMA, A. & COOK, P. A. 1998. Growth characteristics of the hybrid between pinto abalone, *Haliotis kamtschatkana* Jonas, and ezo abalone, *H. discus hannai* Ino, under high and low temperature. *Journal of Shellfish*
- HOUEBINE, L. & WILEY, J. 2003. *Animal transgenesis and cloning*, Wiley.
- HU, W., YU, D. H., WANG, Y. P., WU, K. C. & ZHU, Z. Y. 2000. [Electroporation of sperm to introduce foreign DNA into the genome of *Pinctada maxima* (Jameson)]. *Sheng wu gong cheng xue bao = Chinese journal of biotechnology*, 16, 165-168.
- JEONG, J. Y., YIM, H. S., RYU, J. Y., LEE, H. S., LEE, J. H., SEEN, D. S. & KANG, S. G. 2012. One-step sequence- and ligation-independent cloning as a rapid and versatile cloning method for functional genomics studies. *Appl Environ Microbiol*, 78, 5440-3.
- KUZNETSOV, A., PIRKOVA, A., DVORIANCHIKOV, G., PANFERTSEV, E., GAVRIUSHKIN, A., KUZNETSOVA, I. & EROKHIN, B. 2001. [Study of the transfer of foreign genes into mussel *Mytilus Galloprovincialis* Lam. eggs by spermatozoa]. *Ontogenez*, 32, 309-318.
- LAVITRANO, M., CAMAIONI, A., FAZIO, V. M., DOLCI, S., FARACE, M. G. & SPADAFORA, C. 1989. Sperm cells as vectors for introducing foreign DNA into eggs: genetic transformation of mice. *Cell*, 57, 717-723.
- LEIGHTON, D. L. 2000. *The Biology and Culture of the California Abalones*, United States of America, Dorrance Publishing Co. Inc.
- LEIGHTON, D. L. & LEWIS, C. A. 1982. Experimental hybridization in abalones. *International Journal of Invertebrate Reproduction*, 5, 273-282.
- LU, J. K., FU, B. H., WU, J. L. & CHEN, T. T. 2002. Production of transgenic silver sea bream (*Sparus sarba*) by different gene transfer methods. *Mar Biotechnol (NY)*, 4, 328-37.
- LUBET, P. 1971. Influence des ganglions cérébroïdes sur la croissance de *Crepidula fornicata* Phil. (Mollusque mesogastéropode). *C.R. Acad. Sci.*, 2309-2311.
- MAI, K., MERCER, J. P. & DONLON, J. 1995a. Comparative studies on the nutrition of two species of abalone, *Haliotis tuberculata* L. and *Haliotis discus hannai* Ino. III. Response of abalone to various levels of dietary lipid. *Aquaculture*, 134, 65-80.
- MAI, K., MERCER, J. P. & DONLON, J. 1995b. Comparative studies on the nutrition of two species of abalone, *Haliotis tuberculata* L. and *Haliotis discus hannai* Ino. IV. Optimum dietary protein level for growth. *Aquaculture*, 136, 165-180.
- MATEUS, H. 1986. *Los Abulones de México*, Secretaría de Pesca.
- MORIYAMA, S., FURUKAWA, S. & KAWAUCHI, H. 2009. Growth stimulation of juvenile abalone *Haliotis discus hannai* by feeding with salmon growth hormone in sodium alginate gel. *Fisheries Science*, 75, 689-695.
- MORIYAMA, S., TASHIRO, K., FURUKAWA, S. & KAWAUCHI, H. 2008. Ability of salmon growth hormone to accelerate somatic growth of juvenile abalone *Haliotis discus hannai*. *Fisheries Science*, 74, 860-866.

- MÜLLER, F., IVICS, Z., ERDÉLYI, F., PAPP, T., VÁRADI, L., HORVÁTH, L., MACLEAN, N. & ORBÁN, L. 1992. Introducing foreign genes into fish eggs with electroporated sperm as a carrier. *Molecular marine biology and biotechnology*, 1, 276-281.
- PATIL, J. G. & KHOO, H. W. 1996. Nuclear internalization of foreign DNA by zebrafish spermatozoa and its enhancement by electroporation. *J Exp Zool*, 274, 121-9.
- PONCE-DÍAZ, G., LLUCH-COTA, S. & BAUTISTA-ROMERO..., J. 2003. Caracterización multiescala de la temperatura del mar en una zona de bancos de abulón (*Haliotis* spp.) en Bahía Asunción, Baja California Sur, México. *Ciencias Marinas*, 29, 291-303.
- POWERS, D., KIRBY, V. & COLE..., T. 1995. Electroporation as an effective means of introducing DNA into abalone (*Haliotis rufescens*) embryos. *Molecular marine biology ...*, 4, 369-375.
- RIFFELL, J. A., KRUG, P. J. & ZIMMER, R. K. 2002. Fertilization in the sea: the chemical identity of an abalone sperm attractant. *J Exp Biol*, 205, 1439-1450.
- SEARCY-BERNAL, R., ANGUIANO-BELTRÁN, C., ESPINOZA-MONTES, J. A. & CARPIZO-ITUARTE, E. 2013. Restocking of Abalone Populations (*Haliotis* spp.) in Mexico. *Journal of Shellfish Research*, 32, 189-195.
- SEARCY-BERNAL, R., RAMADE-VILLANUEVA, M. R. & ALTAMIRA, B. 2010. Current Status of Abalone Fisheries and Culture in Mexico. *Journal of Shellfish Research*, 29, 573-576.
- SIN, F., BARTLEY, A., WALKER, S., SIN, I. & SYMONDS..., J. 1993. Gene transfer in chinook salmon (*Oncorhynchus tshawytscha*) by electroporating sperm in the presence of pRSV-lacZ DNA. *Aquaculture*, 117, 57-69.
- SIN, F. Y. T., MUKHERJEE, U. K., MCKENZIE, J. C. & SIN, I. L. 1995. Electroporation of abalone sperm enhances sperm-DNA association. *Journal of Fish Biology*, 47, 20-28.
- SMITH, K. & SPADAFORA, C. 2005. Sperm-mediated gene transfer: applications and implications. *Bioessays*, 27, 551-62.
- SMITH, K. R. 2012. *Sperm-Mediated Gene Transfer: Concepts and Controversies*.
- SUPHAMUNGMEE, W., ENGSUSOPHON, A., VANICHVIRIYAKIT, R., SRETARUGSA, P., CHAVADEJ, J., POOMTONG, T., LINTHONG, V. & SOBHON, P. 2010. Proportion of Sperm and Eggs for Maximalin vitroFertilization inHaliotis asininaand the Chronology of Early Development. *Journal of Shellfish Research*, 29, 757-763.
- SYMONDS, J. E., WALKER, S. P., SIN, F. Y. T. & SIN, I. 1994. Development of a mass gene transfer method in chinook salmon: optimization of gene transfer by electroporated sperm. *Mol. Mar. Biol. Biotechnol.*
- TAYLOR, B., DONOVAN, D., MCLEAN, E. & DONALDSON..., E. 1996. Effect of recombinant vertebrate growth hormones on growth of adult abalone, *Haliotis kamtschatkana*. *Aquaculture*, 140, 153-158.
- TSAI, H.-J., LAI, C.-H. & YANG, H.-S. 1997. Sperm as a carrier to introduce an exogenous DNA fragment into the oocyte of Japanese abalone (*Haliotis diversicolor supotexta*). *Transgenic Research*, 6, 85-95.
- TSAI, H. J. 2000. Electroporated sperm mediation of a gene transfer system for finfish and shellfish. *Mol Reprod Dev*, 56, 281-4.
- VEENSTRA, J. A. 2010. Neurohormones and neuropeptides encoded by the genome of *Lottia gigantea*, with reference to other mollusks and insects. *Gen Comp Endocrinol*, 167, 86-103.
- VENUGOPAL, T., MATHAVAN, S. & SARANGI, N. 1998. Gene transfer in Indian major carps by electroporation. *Current*
- WALKER, S. 1997. Evaluation of salmon sperm electroporation for gene transfer.
- YAN, Z. & CHEN, J. 2001. Seed breeding and culturing of triploid abalone *Haliotis diversicolor aquatilis*. *Shuichan xuebao*.

- YU, D. 2005. A sperm-mediated GFP gene transfer in amphioxus (*Bran-chiostoma belcheri tsingta-oense*). *Chinese Science Bulletin*, 50, 380-382.
- ZBIKOWSKA, H. M. 2003. Fish can be first--advances in fish transgenesis for commercial applications. *Transgenic Research*, 12, 379-389.
- ZICHEN, W. 1990. Triploidization of the Pacific Abalone with Cytochalasin B and Temperature Shock [J]. *Journal of Dalian Fisheries University*.