



# UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

---

---

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES IZTACALA

**Distribución del transcrito del Polipéptido Activador de la  
Adenilato Ciclasa de la Pituitaria (PACAP) en el cerebro anterior  
de *Chiostoma humboldtianum*.**

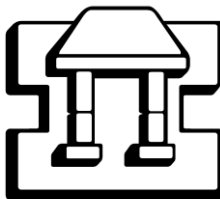
**T E S I S**

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

**BIÓLOGA**

Presenta:

**ROSAURA LOREDO RANJEL**



Director de Tesis: Dr. Rodolfo Cárdenas Reygadas.

Los Reyes Iztacala, Edo. De México, 2012.



Universidad Nacional  
Autónoma de México



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

## **Agradecimientos**

Al Dr. Rodolfo Cárdenas Reygadas por su confianza y apoyo para la realización de este trabajo.

A la M. en C. Mónica Chávez Maldonado, a la Dra. Juana Alba Luis Díaz, al Dr. Jorge Eduardo Campos Contreras y al Biol. Héctor Barrera Escorcía por sus revisiones y aportaciones para la culminación de dicho trabajo.

A Beta, por sus consejos y tips que contribuyeron a que mi desempeño en el laboratorio fuera más eficiente.

A Angy, por sus consejos, por escucharme y ayudarme cuando más lo necesitaba. Gracias por todo tu apoyo, por esos momentos tan divertidos y por tu amistad.

A mis amigas Gisela, Brenda y Rosa, por todos los buenos momentos que compartimos a lo largo de la carrera y por echarme porras cuando más las necesitaba.

A mi madre, a mis hermanos y a Alejandro González, muchas gracias por apoyarme en todo momento, ya que sin ustedes no lo hubiera logrado.

## **Dedicatorias**

A mi madre, que no solo a lo largo de toda mi carrera sino de toda mi vida me ha apoyado y que día a día se preocupa y ocupa de que no nos falte nada y que sin su apoyo, amor y comprensión yo no habría logrado lo que hasta ahora. Madre: mi éxito también es tuyo.

A mis hermanos Salvador y Alejandro, que me ayudaron cuando tenía una práctica o cuando tenía que estudiar para un examen.

A Alejandro González, por su apoyo incondicional ya que fuera una práctica de campo, un examen, un día divertido, estresante o agotador, siempre estuvo a mi lado echándome porras y apoyándome en todo momento.

A mi padre... ojala que desde allá arriba me estés viendo y te sientas orgulloso de mi.

## Índice

|  |    |
|--|----|
| <b>Abreviaturas</b>  | 6  |
| <b>Resumen</b>   | 8  |
| <b>1. Introducción</b>   |    |
| 1.1. Aspectos generales  | 9  |
| 1.2. Antecedentes  | 10 |
| 1.3. El Polipéptido Activador de la Adenilato Ciclasa de la Pituitaria (PACAP) | 12 |
| 1.4. Estructura del gen de PACAP   | 14 |
| 1.5. Mecanismos de acción de PACAP   | 17 |
| 1.6. Distribución y función del PACAP en el cerebro y otros tejidos            | 19 |
| 1.7. Generalidades de la especie de estudio                                    | 21 |
| 1.8. Anatomía del encéfalo de vertebrados no mamíferos                         | 22 |
| <b>2. Justificación</b>  | 24 |
| <b>3. Objetivo</b>   | 25 |
| <b>4. Materiales y métodos</b>   |    |
| 4.1. Trabajo en campo  | 26 |
| 4.2. Trabajo en el laboratorio   | 26 |
| 4.2.1. Técnica histológica   | 26 |
| 4.2.2. Extracción de RNA total   | 26 |
| 4.2.3. Reacción en Cadena de la Polimerasa en Transcripción Reversa (RT-PCR)   | 27 |

|  |    |
|--|----|
| 4.2.4. Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) | 27 |
| 4.2.5. Purificación de productos de PCR en gel.  | 27 |
| 4.2.6. Clonación                                 | 27 |
| 4.2.7. Hibridación                               | 28 |
| <b>5. Resultados</b>                             | 29 |
| <b>6. Discusión</b>                              | 42 |
| <b>7. Conclusión</b>                             | 45 |
| <b>8. Referencias</b>                            | 46 |
| <b>Anexos</b>                                    |    |
| Protocolo para la tinción de Nissl               | 53 |
| Protocolo para la Síntesis de la sonda de PACAP  | 54 |
| Protocolo para Hibridación <i>in situ</i>        | 55 |

## Abreviaturas

|                  |   |
|------------------|---|
| A                | Adenina   |
| AP               | Fosfatasa alcalina  |
| APO              | Área Preóptica  |
| ACTH             | Corticotropina  |
| BCIP             | 5-bromo-4cloro-3-indolil fosfato                                  |
| BSA              | Albumina de Suero Bovino  |
| C                | Citosina  |
| cAMP             | Adenosín Monofosfato Cíclico                                      |
| cDNA             | DNA complementario  |
| CE               | Cerebelo  |
| Ch               | Chirostoma  |
| Dc               | Parte central del telencéfalo dorsal                              |
| DEPC             | Dietilpirocarbonato   |
| Dd               | Parte dorsal del telencéfalo dorsal                               |
| DIG              | Digoxigenina  |
| DI               | Parte lateral del telencéfalo dorsal                              |
| Dm               | Parte media del telencéfalo dorsal                                |
| DNasa            | Deoxiribonucleasa   |
| Dp               | Parte posterior del telencéfalo dorsal                            |
| DP               | Núcleo talámico posterior dorsal                                  |
| EDTA             | Ácido etileno diaminotretacético                                  |
| G                | Guanina   |
| GH               | Hormona de crecimiento  |
| GHRH o GRF       | Hormona liberadora de la hormona de crecimiento                   |
| LH               | Hormona luteinizante  |
| LO               | Lóbulos Ópticos   |
| ME               | Medula Espinal  |
| NTB              | 4-nitroazul-tretrazolium cloruro                                  |
| NPP              | Núcleo Preóptico Periventricular                                  |
| NPPv             | Núcleo periventricular posterior                                  |
| OB               | Bulbos olfatorios   |
| OC               | Quiasma Óptico  |
| OT               | Tectum Óptico   |
| PACAP            | Polipéptido Activador de la Adenilato<br>Ciclase de la Pituitaria |
| PBS              | Buffer de fosfatos salino   |
| PRL              | Prolactina  |
| PRP              | Péptido Relacionado a PACAP                                       |
| PCR              | Reacción en cadena de la polimerasa                               |
| RNA <sub>m</sub> | Ácido Ribonucleico mensajero                                      |
| RNasa            | Ribonucleasa  |
| RT-PCR           | Reacción en Cadena de la Polimerasa en<br>Transcripción Reversa   |
| SSC              | Solución Salina de Citrato de Sodio                               |
| T                | Timina  |
| TBE              | Tris-borato-EDTA  |
| TE               | Tris-EDTA   |
| Tel              | Telencéfalo   |
| TLo              | Torus longitudinalis  |
| T <sub>m</sub>   | Temperatura de fusión   |
| U                | Uracilo   |
| Vd               | Núcleo dorsal del telencéfalo ventral                             |

VIP Péptido Intestinal Vasoactivo  
VI Núcleo lateral del telencéfalo ventral  
VM Núcleo talámico ventromedial  
Vv Núcleo ventral del telencéfalo ventral  
Vp Núcleo Postcomisural del telencéfalo ventral



## Resumen

El Polipéptido Activador de la Adenilato Ciclasa de la Pituitaria (PACAP), es miembro de la superfamilia VIP/secretina/glucagón/GHRH. El PACAP es el más conservado filogenéticamente y existen dos isoformas con actividad biológica: el PACAP38 y el PACAP27. El PACAP es un neuropéptido que estimula la actividad de la adenilato ciclasa, e incrementa la liberación de diferentes hormonas hipofisarias (GH, PRL, ACTH y LH).

Por otra parte, el pez *Chirostoma humboldtianum*, es una especie endémica del Altiplano Mexicano, que en la actualidad se encuentra amenazada por la reducción de sus poblaciones y la degradación de su hábitat natural. Posee un valor adicional debido a que tiene importancia comercial. En el presente estudio se tuvo como objetivo localizar la distribución del transcrito del PACAP en el cerebro anterior de *Ch. humboldtianum*. De encéfalos de organismos de esta especie fue aislado un fragmento de cDNA de 457 pb, el cual mostró un 97% de identidad con *Sebastiscus marmoratus* (GenBank: AB121764.1), un 94% con *Mola mola* (GenBank: AY826063.1) y un 93% con *Anguilla japonica*. La secuencia obtenida fue traducida a aminoácidos, encontrando únicamente 35 de los 38 aminoácidos de la secuencia que codifica para la estructura primaria del PACAP. Los resultados de la hibridación *in situ* demostraron que numerosas áreas del cerebro anterior de *Ch. humboldtianum* sintetizan el PACAP, las regiones en las que se detectó el transcrito del PACAP fueron telencéfalo (en algunos núcleos del área dorsal y ventral), quiasma óptico y NPP. Además también se detectó el transcrito del PACAP en la hipófisis. Por otra parte también se observó reacción positiva al PACAP en zonas como el *tectum* y el cerebelo. En contraste los controles negativos no mostraron reacción. Al determinar la distribución del PACAP en el cerebro anterior y en algunas áreas del cerebro medio y cerebro posterior de *Chirostoma humboldtianum* se encontró que el PACAP es una molécula con una amplia distribución en estas regiones del encéfalo de *Ch. humboldtianum*, sugiriendo que este péptido puede tener un papel clave en las funciones cerebrales y en la reproducción de la especie.

## 1. Introducción

### 1.1. Aspectos generales

El Polipéptido Activador de la Adenilato Ciclasa de la Pituitaria (PACAP), es un péptido que fue aislado por primera vez de tejido hipotalámico de la oveja (Miyata *et al.*, 1989). El PACAP es miembro de la superfamilia péptido intestinal vasoactivo (VIP)/secretina/glucagón/hormona liberadora de la hormona de crecimiento (GHRH), debido a que comparten los primeros 27 aminoácidos de la región amino terminal. El PACAP es el más conservado filogenéticamente (Mucio-Ramírez *et al.*, 2004) y existen dos formas con actividad biológica: el PACAP38 y el PACAP27 (Miyata *et al.*, 1990).

El PACAP es un neuropéptido que estimula la actividad de la adenilato ciclasa, e incrementa la liberación de diferentes hormonas hipofisarias como la hormona de crecimiento (GH), la prolactina (PRL), la corticotropina (ACTH) y la hormona luteinizante (LH) (Miyata *et al.*, 1989). Además se cree que este neuropéptido puede estar implicado en el control del crecimiento de peces (McRory *et al.*, 1995), ya que en el pez dorado se ha demostrado que el PACAP funciona liberando GH a través de la activación de los receptores del PACAP tipo I (Wong *et al.*, 1998).

El PACAP ejerce sus acciones vía tres receptores acoplados a proteínas G heptahelicales: un receptor específico para el PACAP (PAC1) y dos receptores compartidos con el VIP (VPAC1 y VPAC2). El PACAP estimula diversas cascadas de señalización en las neuronas, llevando a la activación de la adenilato ciclasa, la fosfolipasa C, y proteína cinasa mitógeno-activada y movilización del calcio (Hashimoto, 2002).

La estructura primaria del PACAP está preservada en los vertebrados indicando una fuerte presión selectiva en la evolución molecular de este neuropéptido (Sherwood *et al.*, 2000). De hecho, la estructura molecular del PACAP de peces es altamente homóloga con la del PACAP de mamíferos (Wong *et al.*, 2000).

## 1.2. Antecedentes

Hart *et al.*, en 1992, demostraron que el PACAP causa un incremento en la liberación de GH, ACTH, LH y la acumulación intracelular de AMPc en las células de hipófisis anterior de rata. Más tarde (1996) Hashimoto *et al.*, localizaron la distribución del RNAm del receptor del PACAP en el cerebro, hipófisis y glándula pineal de rata. La expresión del PACAP ha sido observada en el bulbo olfatorio, núcleo supraóptico y área postrema y la hipófisis presentó expresión en el lóbulo anterior. En la glándula pineal la expresión fue débil.

En 1997a Matsuda *et al.*, localizaron la distribución de células inmunorreactivas al PACAP (PACAP- like immunoreactivity), mediante inmunohistoquímica, en el cerebro del teleosteo *Uranoscopus japonicus*: en el núcleo preóptico y pars parvicellularis del hipotálamo. Fibras nerviosas y terminales inmunorreactivas para el PACAP fueron observadas en la médula oblongada. Cabe mencionar que no fueron observados cuerpos celulares inmunoreactivos al PACAP (PACAP-LI) en el cerebro medio ni en el cerebro posterior. Estos resultados sugieren que el PACAP puede estar involucrado en la regulación hipofisaria y/o en otras funciones neuronales (neurotransmisor, neuromodulador o factor neurotrópico) en el cerebro de *Uranoscopus japonicus*.

Montero *et al.*, en 1998a, localizaron la distribución de estructuras inmunorreactivas por medio de inmunohistoquímica, para el PACAP en el cerebro de la anguila: en el diencefalo, telencefalo, mesencefalo, hipotálamo e hipófisis. Además encontraron que el PACAP27 y el PACAP38 tienen la misma eficacia en la liberación de la GH en cuanto a dosis respuesta y en contraste la GHRH no presentó efecto sobre la liberación de la GH.

Por otra parte, Wong *et al.*, en el 2000, identificaron el transcrito de los receptores del PACAP: PAC1 y VPAC1 en la hipófisis, así como en diferentes áreas del cerebro, apoyando la hipótesis de que el PACAP es producido en el hipotálamo y liberado a la hipófisis anterior para regular la secreción de GH y GTH-II en peces.

Valiante *et al.*, en el 2006 localizaron la distribución del PACAP en el cerebro del pez cartilaginoso *Torpedo marmorata*, mediante hibridación *in situ*, demostrando que el ARNm para el PACAP se expresa en el cerebro a niveles apreciables; en el hipotálamo, lóbulo neurointermedio de la hipófisis y saco vasculoso. El PACAP es sintetizado y

ampliamente distribuido en el SNC, sugiriendo que este péptido puede tener un papel clave en las funciones cerebrales.



|                   | 1                        | 27         | 38      |
|-------------------|--------------------------|------------|---------|
| <b>Mamíferos</b>  | HSDGIFTDSYSRYRKQMAVKKYLA | AVLGKRYKQ  | RVKNK*  |
| <b>Pollo</b>      | HIDGIFTDSYSRYRKQMAVKKYLA | AVLGKRYKQ  | RVKNK*  |
| <b>Rana</b>       | HSDGIFTDSYSRYRKQMAVKKYLA | AVLGKRYKQ  | RIKNK*  |
| <b>Salmón</b>     | HSDGIFTDSYSRYRKQMAVKKYLA | AVLGKRYRQ  | RYRNK*  |
| <b>Pez gato</b>   | HSDGIFTDSYSRYRKQMAVKKYLA | AVLGRRYRQ  | RFNKNK* |
| <b>Stargazer</b>  | HSDGIFTDSYSRYRKQMAVQKYL  | AAVLGRRYRQ | RVNKNK* |
| <b>Tunicado-1</b> | HSDGIFTDSYSRYRNQMAVKKYLA | AVLGKRYKQ  |         |
| <b>Tunicado-2</b> | HSDGIFTDSYSRYRNQMAVKKYI  | NALLGKRYKQ |         |

Fig. 2. Secuencias de aminoácidos de PACAP de mamíferos, vertebrados no mamíferos y protocordados (Figura tomada y modificada de Arimura, 1998).

La remarcada similitud del PACAP entre humanos y tunicados sugiere que la estructura primaria del PACAP se mantuvo prácticamente sin cambios durante un periodo evolutivo que abarca más de 70 millones de años. El PACAP puede ser el péptido más altamente conservado de su tamaño durante la filogenia, implicando su vital importancia (Arimura, 1998).

#### 1.4. Estructura del gen de PACAP

Originalmente, se creía que en los mamíferos la estimulación de la liberación de la GH podría estar controlada por el PACAP y la GHRH, los cuales eran codificados por genes distintos, mientras que en los peces el PACAP y la GHRH eran contenidos en el mismo gen, siendo el PACAP mejor estimulador de la secreción de la GH (Parker *et al.*, 1993).

De esta manera numerosos estudios demostraron que el gen GRF/PACAP (Fig. 3) del pez cebra, se extiende 6.2 kb de ADN aproximadamente, y consiste en cinco exones. El primer exón codifica la región 5' no traducida (5'UTR) del RNAm de GRF/PACAP. El segundo exón codifica para el péptido señal y el amino terminal del péptido críptico. El cuarto exón codifica para el resto del péptido críptico y los primeros aminoácidos de la GHRH-como péptido. El quinto exón codifica para el resto de la GHRH-como péptido, el péptido PACAP y la región 3' no traducida (3'UTR) (Fradinger y Sherwood, 2000). De la misma manera se identificó dicho gen en el caso del salmón rojo (Parker *et al.*, 1993), de la trucha arcoíris (Krueckl y Sherwood, 2001) y del pez gato (McRory *et al.*, 1995), así como en anfibios tal es el caso de la *Rana radibunda* (Alexandre *et al.*, 2000).

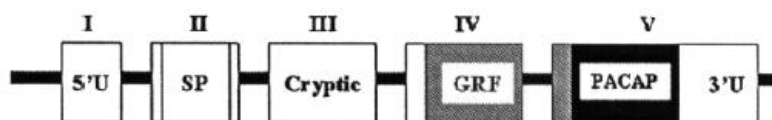


Fig. 3. Diagrama del Gen GRF/PACAP del salmón rojo. Los números romanos (I-V) indican los números de exones 1-5. 5'U y 3'U corresponden a la región 5' no traducida y a la región 3' no traducida respectivamente (Figura tomada y modificada de Krueckl y Sherwood, 2001)

Otros estudios han demostrado que la expresión de RNAm de GRF/PACAP en los embriones de trucha arcoíris es constitutiva y temprana, sugiriendo su papel en el desarrollo del cerebro aparte de su papel posterior en la liberación de hormonas de la hipófisis (Kruel y Sherwood, 2001).

El RNAm del gen PACAP/GHRH-como péptido además de ser detectado en el cerebro de algunos peces, también se detectó en otros órganos como testículo, ovario y estómago (McRory *et al.*, 1995). El RNAm de dicho gen también se encontró expresado en el cerebro, médula espinal y lóbulo neurointermedio de la hipófisis de *Rana*

*ridibunda*. Estos datos contribuyeron al entendimiento de la evolución del gen del PACAP y GHRH-como péptido en los vertebrados, proporcionando las bases anatómicas para elucidar los papeles del PACAP Y GHRH-como péptido, así como para entender la evolución molecular de estos dos importantes neuropéptidos (Alexandre *et al.*, 2000).

Así mismo, se tenía la hipótesis de que los dos genes en los mamíferos que codifican para la GHRH y el PACAP, se habían originado de la duplicación de un gen entre los peces y los tetrápodos (McRory *et al.*, 1995). Sin embargo, estudios recientes en los vertebrados no mamíferos demostraron que la GHRH (no el péptido derivado de la secuencia contenida en el gen de PACAP) es codificada por otro gen y es capaz de estimular la liberación de la hormona de crecimiento de la hipófisis de los peces (Lee *et al.*, 2007). Es por esto que los previamente llamados GHRH-como péptidos, son ahora conocidos como péptidos relacionados con el PACAP (PRPs) (Tam *et al.*, 2007). El PRP fue previamente denominado GHRH-como péptido y fue considerado en vertebrados no mamíferos como el homólogo de GHRH de mamíferos hasta el descubrimiento del auténtico gen de la GHRH en teleósteos y anfibios (Lee *et al.*, 2007).

En el pez pulmonado *Protopterus dolloi*, ambos transcritos, largo y corto (PRP/PACAP, respectivamente) fueron encontrados casi exclusivamente en el cerebro, y la isoforma corta es la transcripción más abundante, indicando que el PACAP es el producto más abundante en el cerebro del pez pulmonado. El PACAP38 también ha sido detectado en el intestino, hiel, branquia, corazón, riñón, hígado, pulmón, gónada masculina, gónada femenina y músculo. De la misma manera, el PRP ha sido detectado en todos los tejidos anteriormente mencionados excepto en músculo y gónada femenina. Los perfiles de expresión de los órganos periféricos en algunas variedades de especies sugieren que el gen PRP/PACAP fue expresado por primeramente en el sistema nervioso central y en el proceso de evolución, las funciones de este péptido diversificaron y más tarde fueron expresadas en otros tejidos (Lee *et al.*, 2009).

En contraste, la organización estructural del precursor del PRP/PACAP es conservado en los vertebrados, desde los peces hasta los mamíferos (Fig. 4) (Tam *et al.*, 2007).



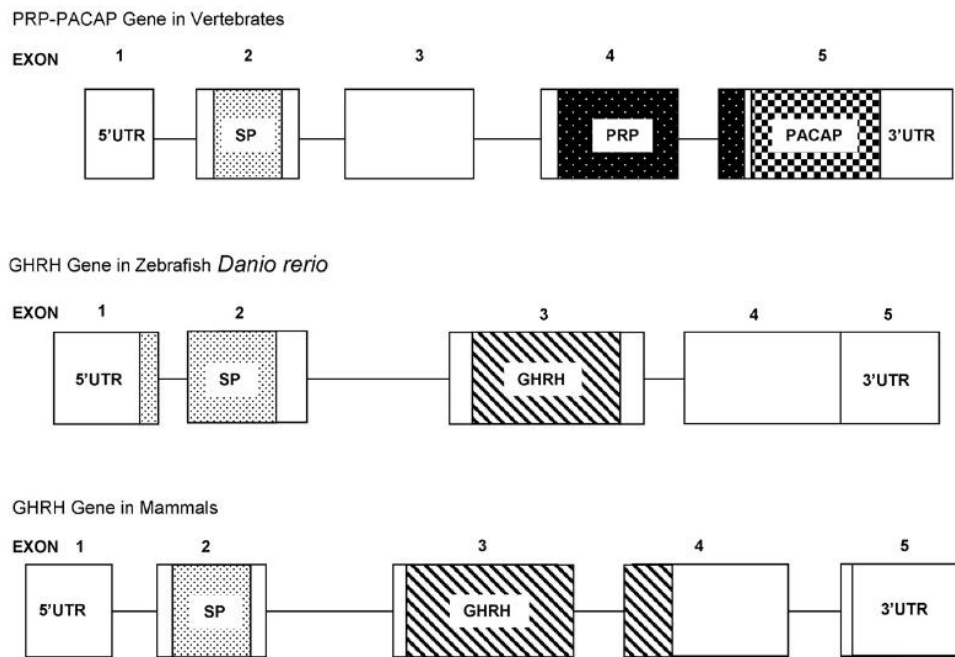


Fig. 4. Diagrama que resume la organización estructural de los genes PRP/PACAP y GHRH en vertebrados. Los exones se muestran como cajas y los intrones como líneas. La longitud de los exones e intrones no están dibujados a escala. Las abreviaturas son: UTR, región no traducida; SP, péptido señal; PRP, péptido relacionado con el PACAP; PACAP, polipéptido activador de la adenilato ciclasa de la pituitaria; GHRH, hormona liberadora de la hormona de crecimiento (Figura tomada de Tam *et al.*, 2007).

De acuerdo con dicho autor, todos los “GHRH-como péptidos” en sucesivo deben ser llamados PRP, y a partir de estos estudios PRP/PACAP y la GHRH en todas las especies de vertebrados deben considerarse como dos genes separados, y por tanto deben estar sujetos a investigaciones independientes en futuros estudios.

Recientes estudios en los vertebrados no mamíferos han demostrado la presencia del PRP y su receptor en el eje cerebro-hipófisis-gónadas (BPG). Sugiriendo la función del PRP en la regulación de la reproducción. Además este péptido ejerce efectos estimulatorios en la expresión de la hormona liberadora de gonadotropinas de salmón (sGnRH) en el cerebro, FSH y LH en hipófisis, pero inhibe la expresión de LH en el ovario. En contraste el PRP de pez dorado no altera los niveles de RNAm de la hormona de crecimiento en hipófisis, refutando el papel del PRP en la regulación de la liberación y síntesis de GH (Tam *et al.*, 2011). Sin embargo la GHRH es expresada casi exclusivamente en el cerebro de dicho pez y participa en la producción de cAMP así como en la liberación GH de células hipofisiarias, mientras que el receptor GHRH-R está activamente expresado en el cerebro e hipófisis. Por otra parte en mamíferos se cree que el PRP no es funcional debido a la ausencia de su receptor (PRPR) (Lee *et al.*, 2007).

## 1.5. Mecanismos de acción de PACAP en el encéfalo

El PACAP ejerce sus acciones vía tres receptores acoplados a proteínas G heptahelicales: un receptor específico para el PACAP (PAC1) (Ver Fig. 5) y dos receptores compartidos con el VIP (VPAC1 y VPAC2) (Hashimoto, 2002). Cabe mencionar que se han encontrado ocho variantes del receptor específico para el PACAP (PAC1), resultado de un splicing alternativo. Seis de las ocho variantes difieren una de la otra por la presencia o ausencia del casete hip, hop1 o hop2 insertado en la región C-terminal del tercer dominio intercelular (PAC1-R-s, PAC1-R-hip, PAC1-R-hop1, PAC1-R-hop2, PAC1-R-hiphop1, PAC1-R-hiphop2). Y los otros subtipos son PAC1-R-vs (very short PAC1-R) y PAC1-R-TM4, este último difiere del PAC1-R por la sustitución y delección de dos aminoácidos (CVTV a SA) en el cuarto dominio transmembranal (Arimura, 1998).

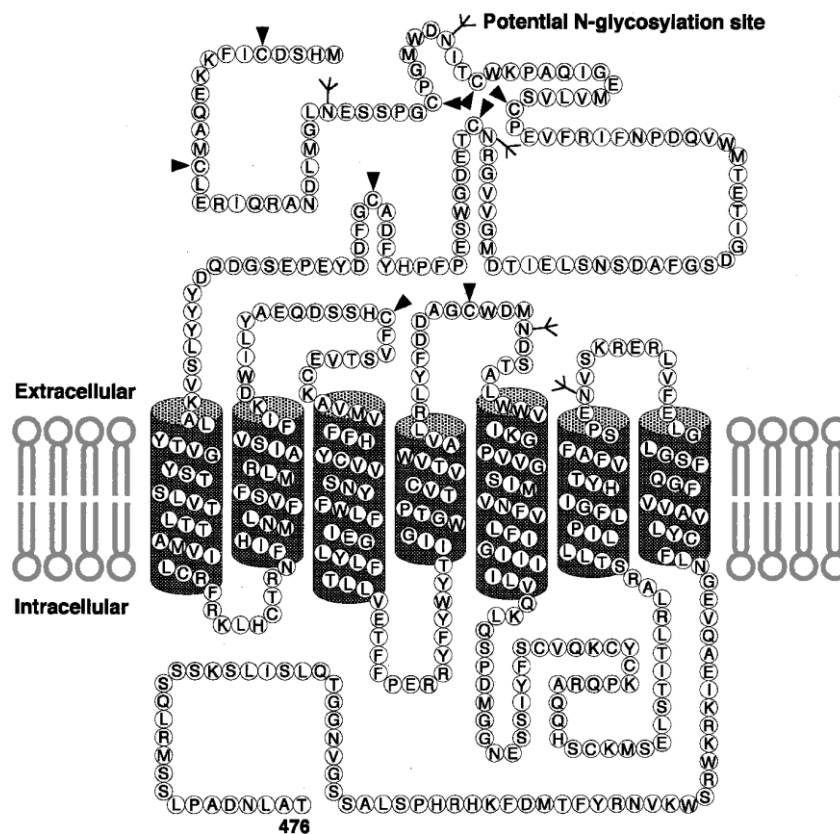


Fig. 5. Esquema del modelo del receptor de PAC1 de ratón.

Se ilustra una vista del receptor PAC1 de ratón orientado en la bicapa lipídica. El receptor contiene siete hélices transmembranales conectados por la alternancia de bucles extracelulares e intracelulares. En la región extracelular putativa, los sitios potenciales de N-glicosilación se indica mediante un símbolo Y, y los residuos de cisteína conservados entre los receptores PAC1, VPAC1 y VPAC2, los receptores de secretina y GHRH se indican con flechas (Figura tomada de Hashimoto, 2002).

El PACAP estimula diversas cascadas de señalización en las neuronas, llevando a la activación de la adenilato ciclasa, la fosfolipasa C, y proteína cinasa mitógeno-activada y movilización del calcio (Hashimoto, 2002).

Por otra parte el PACAP tiene el potencial para actuar a nivel de hipófisis y regular la liberación de gonadotropinas. Se cree que la GnRH regula la liberación de gonadotropinas preferentemente a través de la cascada IP/PKC/Ca<sup>2+</sup>, mientras que el PACAP opera preferentemente a través de la cascada cAMP/PKA (Counis *et al.*, 2007).

Algunos estudios han demostrado que la acción del PACAP sobre la liberación la GH en peces es mediada vía receptores PAC1 hipófisis, pero no vía receptores VPAC (ver Fig. 6) (Wong *et al.*, 2000).

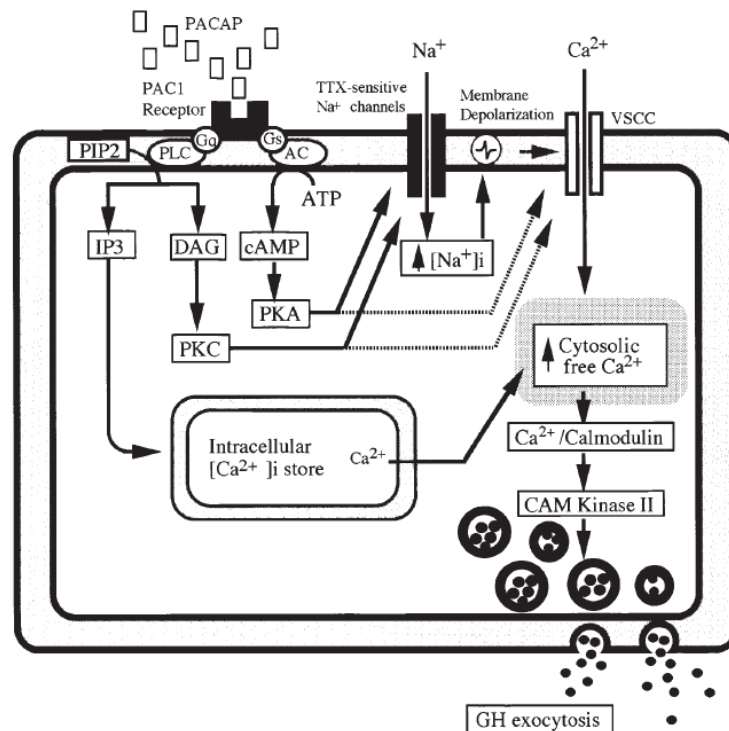


Figura 6. Esquema de los mecanismos de transducción de señales del PACAP que estimulan la liberación de la GH en pez dorado (Figura tomada de Wong *et al.*, 2000).

## 1.6. Distribución y función del PACAP en el cerebro y otros tejidos.

El PACAP es producido dentro del hipotálamo de peces y es reconocido en la hipófisis para funcionar como regulador de la secreción de hormonas de la hipófisis. (Wong *et al.*, 2000). También se ha demostrado que PACAP causa un incremento en la liberación de GH, ACTH, LH y la acumulación del AMP cíclico en células hipofisiarias de rata (Hart *et al.*, 1992). Así mismo en anguila PACAP parece ser un potente estimulador de la secreción de GH en células adenohipofisiarias. Indicando que PACAP puede jugar un papel mayor en la regulación neuroendocrina de la actividad de células somatotropas y así puede estar involucrado en el control de crecimiento, osmoregulación y reproducción (Montero *et al.*, 1998b). Además PACAP puede funcionar potencialmente como un factor hipofisiotrópico mediando la liberación de PRL y SL en la hipófisis del pez dorado (Matsuda *et al.*, 2008).

Se ha detectado Inmunorreacción positiva a PACAP en la hipófisis del pez dorado (Wong *et al.*, 2000) y notablemente en el telencéfalo ventral, diencéfalo, mesencéfalo y medula oblangata, así como en la *pars distalis* de la hipófisis de la anguila Europea *Anguilla anguilla*, indicando que PACAP puede actuar como un factor hipofisiotrópico (Montero *et al.*, 1998b).

En el cerebro del pez cebra (*Danio rerio*), se ha localizado la expresión de los genes del PACAP (PACAP1 y PACAP2) y sus receptores PAC1 (PAC1a-R y PAC1b-R) durante su desarrollo. Se encontró que los genes de PACAP están expresados en el telencéfalo, el diencéfalo, el rombencéfalo y en neuronas en la parte dorsal de la médula espinal. El RNAm del PACAP2 parece ser el más abundante durante el desarrollo del cerebro. Los dos subtipos de PAC1-R mostraron una expresión similar: los sRNAm fueron detectados en cerebro anterior, el tálamo y rombencéfalo. Sin embargo en el *tectum* solo fue detectado el gen para PAC1b-R (Alexandre *et al.*, 2011). En el pez cebra, el gen de *ghrh-pacap1* mostró una fuerte expresión en el desarrollo del cerebelo (Krueckl *et al.*, 2003). Estos resultados sugieren que PACAP puede jugar un papel importante en el desarrollo del cerebro de los peces.

Además se encontró la presencia del RNAm de GRF-PACAP en otros tejidos como en el ojo, tracto gastrointestinal, ovario y testículo (Fradinger y Sherwood, 2000).

También se ha estudiado la influencia del PACAP y del PRP de *Clarias gariepinus* y del neuropéptido Y de *Oreochromis sp* sobre el crecimiento y sistema inmune innato en

peces. Encontrando que estos péptidos además de tener actividad promotora del crecimiento y del desarrollo, estimulan varios elementos de la inmunidad innata (Estrada *et al.*, 2008).

Con respecto a la regulación neuroendocrina del control de crecimiento por el PACAP, se ha demostrado que el PACAP estimula la ingesta de alimento en tilapia juvenil. En general el PACAP parece actuar en la regulación del control de crecimiento en peces juveniles. Estos hallazgos proponen que el PACAP es un objetivo prominente con el potencial para estimular el crecimiento de peces en acuicultura (Lugo *et al.*, 2010).

### 1.7. Generalidades de la especie de estudio

*Chirostoma* es el género representativo de la familia Atherinopsidae, es exclusivo de la ictiofauna mexicana, que incluye a los charales y a los pescados blancos (Aguilar y Navarrete, 1996-1997), entre los que destaca *Chirostoma humboldtianum*, especie endémica del Altiplano Mexicano (Sánchez *et al.*, 2006) y que en la actualidad se encuentra amenazada por la reducción de sus poblaciones y la degradación de su hábitat natural (Figueroa-Lucero *et al.*, 2004).

*Ch. humboldtianum* (Figura 7) presenta cuerpo alargado y comprimido; boca pequeña con el maxilar inferior ligeramente sobresaliente, coloración del cuerpo amarillento verdoso con mancha cerebral oscura. Escamas predorsales moderadamente amontonadas con poros y canales en la línea media lateral (Alaye, 1993).



Figura 7. Ejemplar de *Chirostoma humboldtianum*, capturado en la laguna de Zacapu, Michoacán.

La distribución natural del género abarca los estados de Michoacán, Jalisco, Nayarit, Aguascalientes, Estado de México y Guanajuato. La especie de pescado blanco *Ch. humboldtianum* es quizá la de más amplia distribución natural (Rojas y Sasso, 2005), en la actualidad también se encuentra en pequeños embalses del Estado de México y en la Laguna de Zacapu (Michoacán) (Elías *et al.*, 2008). En esta última laguna, *Ch. humboldtianum* es una de las especies comerciales de las cuales depende la economía de algunas familias de pescadores (Compendio de Estadísticas Ambientales, 2008). Los peces del género *Chirostoma* juegan un papel importante en la alimentación de los mexicanos desde tiempos prehispánicos, siendo comercializados frescos, secos en forma de boquerón y en tamal. Estos peces constituyen un platillo típico en los alrededores del lago de Pátzcuaro en Michoacán y del lago de Chapala en Jalisco, si bien su consumo es en toda la República Mexicana (Aguilar y Navarrete, 1996-1997).

El pez blanco tiene entonces importancia cultural, ecológica y económica (Rojas y Sasso, 2005).

## 1.8. Anatomía del encéfalo de vertebrados no mamíferos

El cerebro de vertebrados no mamíferos (ver Figura 8) comprende tres divisiones de las cuales, de la zona rostral a la caudal son: el prosencéfalo o cerebro anterior, el mesencéfalo o cerebro medio y el rombencéfalo o cerebro posterior. El cerebro posterior, está dividido a su vez dos partes: el metencéfalo el cual comprende el cerebelo y la parte rostral del cerebro posterior, y el mielencéfalo (médula espinal), el cual comprende la parte caudal del cerebro posterior. El cerebro medio, es una sola entidad, y el cerebro anterior, se divide a su vez en dos partes: el telencéfalo y el diencéfalo (Butler y Hodos, 2005).

El diencéfalo se encuentra rostral al cerebro medio, caudal-ventral al telencéfalo y medio a los axones que forman el tracto óptico. El diencéfalo es una larga división compuesta de seis áreas principales. La parte caudal del diencéfalo contiene un área dorsal llamada pretectum, la cual recibe la entrada visual de la retina y está involucrada en acciones visuomotoras; y un área ventral llamada tuberculum posterior, el cual contiene neuronas involucradas en la regulación de funciones motoras. Más rostralmente son presentadas las otras cuatro áreas. En secuencia dorsal a ventral, estas áreas son el epitálamo, el tálamo dorsal, el tálamo ventral y el hipotálamo. El tálamo dorsal, envía información al telencéfalo y está involucrado también en la memoria y respuestas motoras; y el hipotálamo, está involucrado en las actividades del sistema nervioso autónomo y del sistema endócrino. Cada una de estas áreas está compuesta de un número de núcleos y también hay grandes extensiones de fibras que pasan a través de esta región (Butler y Hodos, 2005).

Los núcleos del tálamo dorsal reciben información a través de las neuronas de proyección de los diversos sistemas sensoriales, que transmiten a varias partes del telencéfalo. Los núcleos que se encuentran en el tálamo ventral juegan un papel, en conjunto con las estructuras telencefálicas, en el control motor del cuerpo y las extremidades. La región más rostral del cerebro, el telencéfalo, incluye una parte superior, el pallio, la cual incluye el hemisferio cerebral (también llamada cerebro). En el extremo rostral del cerebro está el bulbo olfativo (Butler y Hodos, 2005).

El telencéfalo posee a su vez bulbos olfatorios, hemisferios telencefálicos, pallium y subpallium.

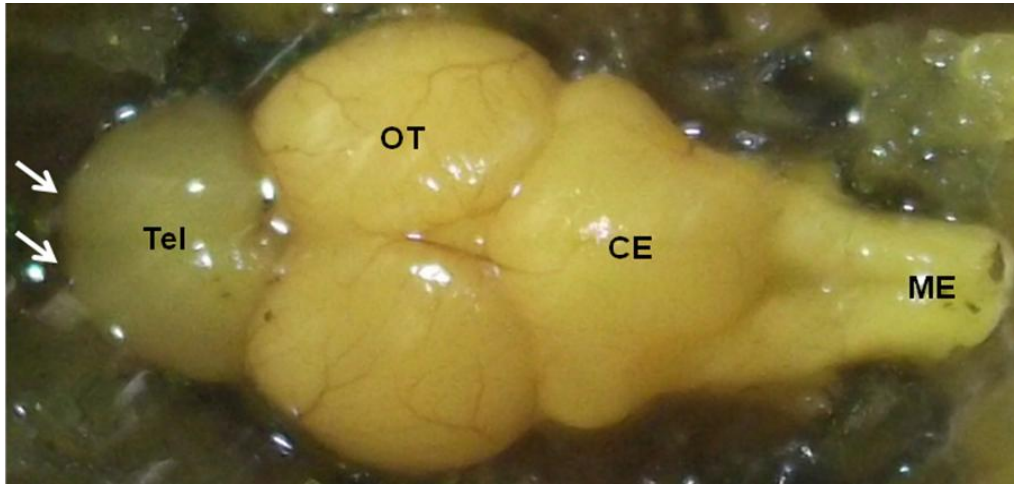


Figura 8. Vista dorsal de encéfalo de *Ch. humboldtianum*. Las flechas indican la presencia (aunque no visibles) de bulbos olfatorios, Tel; Telencéfalo o hemisferios telencefálicos, OT; Tectum Óptico, CE; Cerebelo, ME; Medula Espinal.

Los bulbos olfativos se observan en la parte anterior del encéfalo, tienen forma redondeada y se encuentran conectados a los hemisferios telencefálicos. Estos últimos son estructuras con forma ovalada, casi cilíndrica, pareadas. Los lóbulos ópticos se ubican caudal a los hemisferios telencefálicos, tienen forma ovalada y están separados uno del otro y se conectan a los ojos a través de los nervios ópticos, los cuales se encuentran en la parte ventral del cerebro. El cerebelo está compuesto por un solo lóbulo, tiene forma ovalada y se encuentra sobrepuesto a una parte de los lóbulos ópticos (Londoño y Hurtado, 2010). El cerebelo de los peces hace posible la debida coordinación de los movimientos del tronco en la natación, particularmente cuando cambian de dirección y cuando compensan corrientes verticales de agua (Sarnat y Netsky, 1976).



## 2. Justificación

Siendo *Chirostoma humboldtianum* una especie endémica del Altiplano Mexicano (Sánchez *et al.*, 2006), con importancia económica por su consumo alimenticio, y que en la actualidad se encuentra amenazada por la reducción de sus poblaciones y la degradación de su hábitat natural (Figueroa-Lucero *et al.*, 2004) y debido a que el PACAP es un estimulador de la secreción de la hormona de crecimiento (GH) y de otras hormonas hipofisiarias, en el presente estudio se propone conocer la distribución del transcrito del PACAP en el cerebro anterior de *Chirostoma humboldtianum*, debido que al comprender como funciona dicha molécula se pretende sentar las bases para estudios de la biología reproductiva de esta especie, que en un futuro permitirá estimular el crecimiento de dicho pez, a tallas con importancia económica.

### 3. Objetivo

#### Objetivo general

Localizar la distribución del transcrito del Polipéptido Activador de la Adenilato Ciclasa de la Pituitaria (PACAP) en el cerebro anterior de *Chirostoma humboldtianum*, mediante hibridación *in situ*.

## **4. Materiales y métodos**

### **4.1. Trabajo en campo**

Los ejemplares de *Chirostoma humboldtianum*, fueron colectados en la laguna de Zacapu, Michoacán, México.

Los organismos fueron sexados con base a las características externas de las gónadas, posteriormente se realizó la extracción del cerebro.

Las muestras para la extracción de ARN se colocaron en hielo seco y las muestras para hibridación *in situ* fueron fijadas con paraformaldehído al 2% con ácido pícrico en amortiguador de fosfatos (Stefanini *et al.*, 1967). Todas las muestras fueron trasladadas al laboratorio de endocrinología de peces de la FES-Iztacala, donde posteriormente fueron procesadas y estudiadas.

### **4.2. Trabajo en el laboratorio.**

#### **4.2.1. Técnica histológica.**

Los encéfalos fueron deshidratados con alcoholes de concentraciones crecientes del 70% al 100%, xilol I y xilol II, para después ser incluidos en parafina. Los cortes de encéfalo se realizaron en un micrótopo de rotación, con un grosor de 10 micrómetros y se colocaron en series (serie A, serie B, serie C y serie D).

#### **4.2.2. Extracción de RNA total**

De los encéfalos obtenidos se realizó la extracción de RNA total con el método de ácido guanidínico, tiocianato-fenol-cloroformo, de acuerdo con la técnica Chomczynski y Sacchi, 1987, con TRIZOL siguiendo la metodología recomendada en dicho protocolo.

El RNA con agua DEPC se almacenó a  $-70^{\circ}\text{C}$ .

#### **4.2.3. Reacción en Cadena de la Polimerasa en Transcripción Reversa (RT- PCR)**

Para la síntesis de cDNA se utilizó el kit *Cloned AMV First- Strand cDNA Synthesis Kit*® invitrogen y RNA total de acuerdo a las instrucciones del fabricante.

#### **4.2.4. Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)**

Se realizó una mezcla con Taq master mix, oligos: PACAP sentido (PACAP FOR 2, Secuencia de 5' a 3': CTC ATC TAT GGG ATC TTA ATG CGC TA) y antisentido (PACAP REV 2, Secuencia de 5' a 3': CTG TCT GTA CCT TCT TCC CAG CAC TG)(Small y Nonneman, 2001). El PCR se realizó en un termociclador, con una desnaturalización inicial a 94° C por 5 min, seguida de 35 ciclos de 94° C por 30 s, a una temperatura de alineamiento de 54°C por 1min., 72° C por 1min. Y una extensión final de 72° C por 7 min. La temperatura de mantenimiento fue de 4° C. Los productos del PCR se verificaron en geles de agarosa al 1% teñidos con bromuro de etidio.

#### **4.2.5. Purificación de productos de PCR en gel.**

La purificación se realizó mediante el Protocolo de purificación de productos de PCR en gel y PCR directo con el kit de Wizard SV Gel and PCR clean- Up system® Promega.

#### **4.2.6. Clonación**

Se realizó con el protocolo de clonación pGEM–T Easy Vector Systems de Promega®, el cual consiste en: para la ligación se colocó un buffer de ligación rápida 2x, pGEM-T, producto de PCR, DNA ligasa T4 y agua desionizada. Se incubó dicha mezcla. Posteriormente se llevó a cabo la transformación de las células JM109 y para ello se prepararon cajas con medio LB/ampicilina/IPTG/XGAL. Se sembraron las colonias blancas en medio LB líquido, es decir, las colonias con el inserto. Finalmente se purificó mediante el Kit Wizard Plus SV Minipreps®.

#### 4.2.7. Hibridación *in situ*

- **Síntesis de la sonda**

Se elaboró la sonda mediante el protocolo DIG-Nick Translation Mix ® Roche, haciendo algunas modificaciones a la técnica (Ver en Anexos la técnica estandarizada: Protocolo para la Síntesis de la sonda de PACAP):

Se colocaron los siguientes componentes en un tubo eppendorf de 1.5 ml: DIG – Nick Translation Mix, agua y DNA. Se mezcló, centrifugó y desnaturalizó. Posteriormente, se incubó durante tres h. Después, la reacción fue detenida y los productos obtenidos fueron almacenados a -20°C hasta su uso.

- **Verificación de la sonda.**

La verificación de la producción de sondas se realizó de acuerdo con Segura et al., 1997, el tamaño de la sonda se corroboró por electroforesis de una alícuota de la sonda marcada, en un gel de agarosa al 1%. La incorporación se verificó mediante un Dot-blot.

- **Hibridación *in situ*.**

Una vez hidratado el tejido, se agregó una mezcla de BSA 5%, SSC4x, Dextrán Sulfato 50%, DNA de esperma de salmón y Formamida, para evitar la unión inespecífica, posteriormente fueron puestos en la solución con sonda (para conocer la técnica estandarizada, ver en Anexos: Protocolo para Hibridación *in situ*). Los cortes fueron incubados durante 16 h a 55° C. Posteriormente, se lavaron e incubaron con el anticuerpo Anti-digoxigenina conjugado con Fosfatasa Alcalina (AP) (Anti – Digoxigenin – AP, Fab fragments ® Roche) durante 2 h. El revelado se realizó con NBT/BCIP durante toda la noche. La reacción se paró con TRIS/EDTA. Las muestras se lavaron, deshidrataron con alcoholes de concentraciones crecientes (80%, 90%, 96% y absoluto), xilol I y xilol II y finalmente, se montaron con Vecta Mount ®.

Las laminillas fueron observadas y estudiadas en un microscopio óptico de marca Nikon ®. Los cortes fueron comparados con estudios citoarquitectónicos del cerebro (telencéfalo y diencefalo) de *Dicentrarchus labrax* (Cerdá-Reverter *et al.*, 2001) y con el atlas del cerebro anterior del pez dorado (Peter y Gill, 1975).

## 5. Resultados

Del encéfalo anterior de *Chirostoma humboldtianum* fue aislado un fragmento de cDNA de 457 pb con los oligos FOR 2 y REV2 (Figura 9). Este fragmento además de coincidir con la secuencia reportada por Cárdenas y Chávez en el 2011 (*Ch. humboldtianum* PACAP27 (PACAP27) RNAm, partial cds. GenBank: JN157843.1), mostró un 97% de identidad con el RNAm del PACAP de *Sebastiscus marmoratus* (GenBank: AB121764.1), un 94% con *Mola mola* (GenBank: AY826063.1), un 93% con *Anguilla japonica* (GenBank: AY870141.1), 89% de identidad con el RNAm del PACAP-como péptido de *Oreochromis mossambicus* (GenBank: AY522580.2) y un 88% con el RNAm del PACAP de *Astatotilapia burtoni* (GenBank: EU523856.1). Estos resultados también se representan mediante un alineamiento de las secuencia de *Ch. humboldtianum* y las secuencias de otros teleósteos con los que presentó mayor identidad (Ver Figura 10). Se realizó un agrupamiento mediante el programa ClustalW2, en el cual se puede apreciar que tan cercana o lejana se encuentra la secuencia del PACAP entre algunas especies de teleósteos (Ver Figura 11), las cuales se encuentran representadas por los siguientes Ordenes: Atheriniformes (*Chirostoma*), Pleuronectiformes (*Cynoglossus*), Gadiformes (*Gadus*), Tetraodontiformes (*Mola* y *Takifugu*), Perciformes (*Trichogaster*, *Epinephelus*, *Oreochromis*) Siluriformes (*Clarias* y *Ictalurus*), Scorpaeniformes (*Sebastiscus*) y Anguilliformes (*Anguilla*).

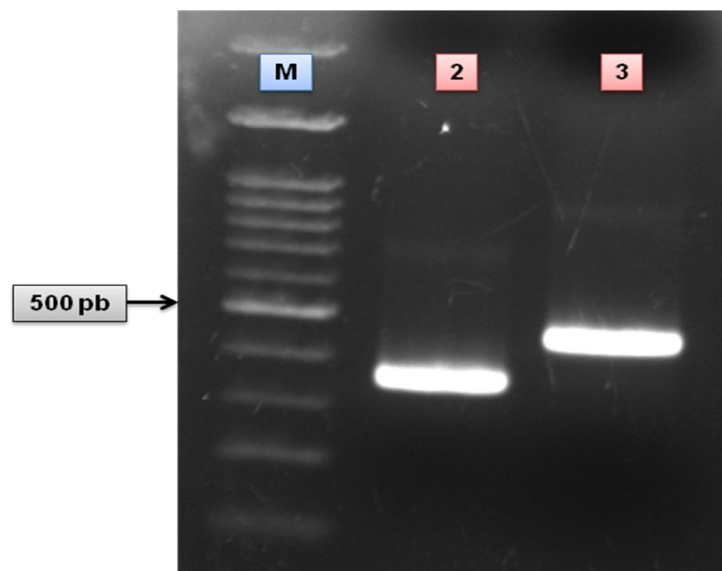


Figura 9. Resultado de la purificación de los productos obtenidos en PCR. Gel de agarosa al 1% con bromuro de etidio. Carril 1: Marcador de 100pb Carril 2: Fragmento de 329 pb. Carril 3: fragmento de 457 pb.



*humboldtianum*, *Oreochromis mossambicus* (GenBank: AY522580.2) y *Mola mola* (GenBank: AY826063.1). Las identidades son marcadas con asteriscos, mientras que las gaps son indicadas con guiones.

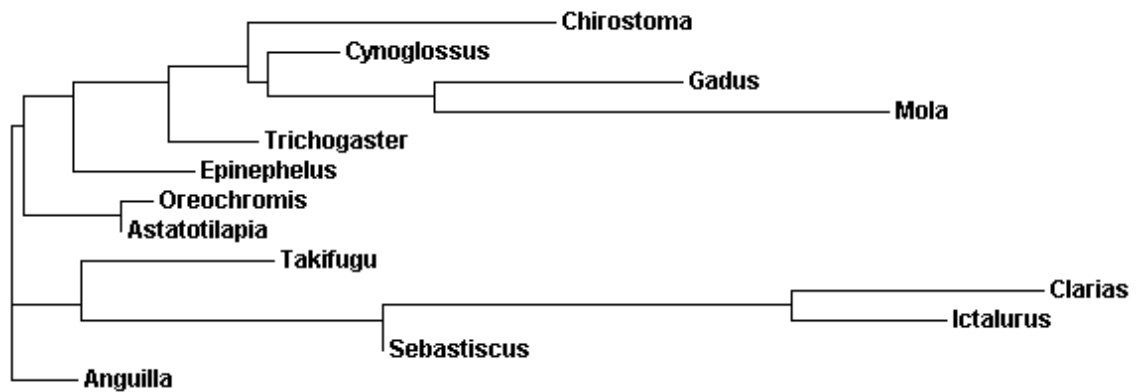


Figura 11. Agrupamiento del PACAP basado en el alineamiento de las secuencias de varios teleósteos. Mediante el programa ClustalW2. En el agrupamiento se encuentran representados los órdenes: Atheriniformes (*Chirostoma*), Pleuronectiformes (*Cynoglossus*), Gadiformes (*Gadus*), Tetraodontiformes (*Mola* y *Takifugu*), Perciformes (*Trichogaster*, *Epinephelus* y *Oreochromis*) Siluriformes (*Clarias* y *Ictalurus*), Scorpaeniformes (*Sebastiscus*) y Anguilliformes (*Anguilla*).

La secuencia obtenida fue traducida a aminoácidos (ver Figura 12) mediante el programa BioEdit, lo cual permitió identificar la secuencia parcial que codifica para la estructura primaria correspondiente a PACAP, encontrando únicamente 33 (**HSDGIFTDSYSRYRKQMAVQKYLA AVLGRRYRQ**) de los 38 aminoácidos. Se realizó una comparación de nuestra secuencia parcial de aminoácidos con las secuencias de aminoácidos previamente reportadas para el PACAP de los mamíferos, vertebrados no mamíferos y protocordados tal y como se muestra en la Figura 13.



|     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| 1   | CTC | ACC | TAT | AGG | ATC | TTA | ATG | CGC | AGC | TGT | GTC | TTC | TGC | ACA | CCT | 45  |
| 1   | L   | T   | Y   | R   | I   | L   | M   | R   | S   | C   | V   | F   | C   | T   | P   | 15  |
| 46  | ATC | GGA | CTA | AGT | TAT | CCT | AAG | ATC | AGA | CTT | GAA | AAC | GAC | GCC | TTC | 90  |
| 16  | I   | G   | L   | S   | Y   | P   | K   | I   | R   | L   | E   | N   | D   | A   | F   | 30  |
| 91  | GAT | GAG | GAT | GGC | AAT | GCT | CTG | TCG | GAC | ATG | GGA | TTT | GAG | AAC | GAC | 135 |
| 31  | D   | E   | D   | G   | N   | A   | L   | S   | D   | M   | G   | F   | E   | N   | D   | 45  |
| 136 | CAG | ATT | GCT | ATA | CGA | AGC | CCC | CCA | TCA | CTA | AAC | GAC | GAC | GCG | TAC | 180 |
| 46  | Q   | I   | A   | I   | R   | S   | P   | P   | S   | L   | N   | D   | D   | A   | Y   | 60  |
| 181 | TCC | CTG | TAC | TAC | CCC | CCG | GAG | AAG | AGA | CCA | GAA | AGG | CAT | GCT | GAG | 225 |
| 61  | S   | L   | Y   | Y   | P   | P   | E   | K   | R   | P   | E   | R   | H   | A   | E   | 75  |
| 226 | GAA | GAA | TTA | GAT | AGA | GCC | TTG | AGG | GAG | ATC | CTG | GGT | CAG | TTA | ACA | 270 |
| 76  | E   | E   | L   | D   | R   | A   | L   | R   | E   | I   | L   | G   | Q   | L   | T   | 90  |
| 271 | GCG | AGA | CAT | TAT | CTA | CAT | TCT | CTG | ATG | ACT | GTT | CGT | GCA | GGT | GAA | 315 |
| 91  | A   | R   | H   | Y   | L   | H   | S   | L   | M   | T   | V   | R   | A   | G   | E   | 105 |
| 316 | GAC | AAC | AGC | ATG | GAG | GAG | GAC | TCT | GAG | CCC | CTG | TCC | AAA | AGA | CAT | 360 |
| 106 | D   | N   | S   | M   | E   | E   | D   | S   | E   | P   | L   | S   | K   | R   | H   | 120 |
| 361 | TCA | GAC | GGG | ATC | TTC | ACC | GAC | AGC | TAC | AGC | CGC | TAT | AGA | AAG | CAG | 405 |
| 121 | S   | D   | G   | I   | F   | T   | D   | S   | Y   | S   | R   | Y   | R   | K   | Q   | 135 |
| 406 | ATG | GCC | GTG | CAG | AAA | TAC | CTG | GCA | GCA | GTG | CTG | GGA | AGA | AGG | TAC | 450 |
| 136 | M   | A   | V   | Q   | K   | Y   | L   | A   | A   | V   | L   | G   | R   | R   | Y   | 150 |
| 451 | AGA | CAG |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     | 456 |
| 151 | R   | Q   |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |

Figura 12. Secuencia parcial de aminoácidos del PACAP de *Chirostoma humboldtianum*. Las flechas señalan la localización de los primers. La secuencia de aminoácidos que está sombreada corresponde a la secuencia parcial que codifica para la estructura primaria del PACAP.

|                      | 1                               | 27                | 38             |
|----------------------|---------------------------------|-------------------|----------------|
| <b>Mamíferos</b>     | <b>HSDGIFTDSYSRYRKQMAVKKYLA</b> | <b>AVLGKRYKQ</b>  | <b>RVKKNK*</b> |
| <b>Pollo</b>         | <b>HIDGIFTDSYSRYRKQMAVKKYLA</b> | <b>AVLGKRYKQ</b>  | <b>RVKKNK*</b> |
| <b>Rana</b>          | <b>HSDGIFTDSYSRYRKQMAVKKYLA</b> | <b>AVLGKRYKQ</b>  | <b>RIKKNK*</b> |
| <b>Salmón</b>        | <b>HSDGIFTDSYSRYRKQMAVKKYLA</b> | <b>AVLGKRYRQ</b>  | <b>RYRNK*</b>  |
| <b>Pez gato</b>      | <b>HSDGIFTDSYSRYRKQMAVKKYLA</b> | <b>AVLGRRYRQ</b>  | <b>FRNK*</b>   |
| <b>Stargazer</b>     | <b>HSDGIFTDSYSRYRKQMAVQKYLA</b> | <b>AVLGRRYRQ</b>  | <b>RVRNK*</b>  |
| <b>Ch.</b>           | <b>HSDGIFTDSYSRYRKQMAVQKYLA</b> | <b>AVLGRRYRQ</b>  |                |
| <b>humboldtianum</b> |                                 |                   |                |
| <b>Tunicado-1</b>    | <b>HSDGIFTDSYSRYRNQMAVKKYLA</b> | <b>AVLGKRYKQ</b>  |                |
| <b>Tunicado-2</b>    | <b>HSDGIFTDSYSRYRNQMAVKKYI</b>  | <b>NALLGKRYKQ</b> |                |

Figura 13. Secuencia de aminoácidos del PACAP de los mamíferos, vertebrados no mamíferos y protocordados (Figura tomada y modificada de Arimura, 1998).

Al confirmar que la banda de 457 pb obtenida del encéfalo anterior de *Chirostoma humboldtianum* era la esperada, se sintetizó la sonda PACAP, la cual como se observa en la Figura 14 corresponde a aproximadamente 450 pb.

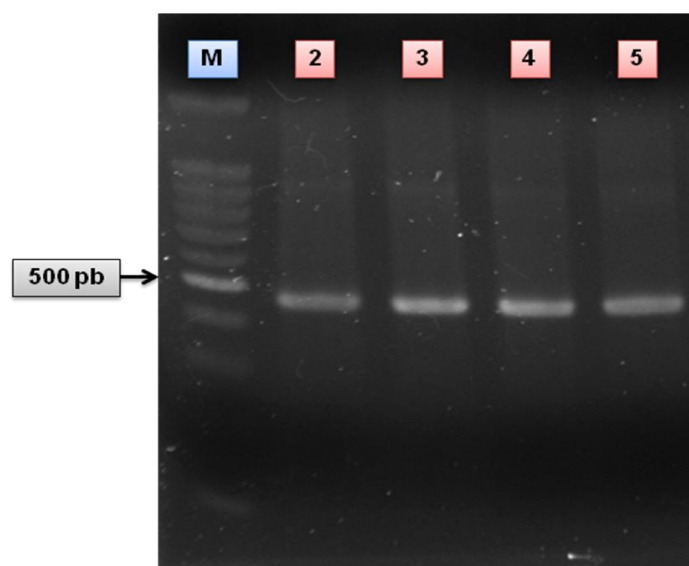


Figura 14. Resultado de la síntesis de sonda. Gel de agarosa al 1% con bromuro de etidio. Carril 1: Marcador de 100pb Carril 2-4: Sonda de PACAP, aprox 450 pb.

### **Hibridación *in situ*.**

Numerosas áreas del cerebro anterior de *Ch. humboldtianum* sintetizan PACAP, las regiones en donde se detectó RNAm de PACAP fueron telencéfalo (algunos núcleos del área dorsal y ventral), quiasma óptico, NPP, hipófisis, por otra parte al realizar la hibridación en otros cortes de cerebro medio y cerebro posterior también se logró observar reacción en algunas zonas como el *tectum* y cerebelo. En contraste los controles negativos no mostraron reacción.

Como los cortes son seriados, el corte número uno se encuentra en la laminilla 1A, que corresponden a la tinción de Nissl. El siguiente corte se encuentra en la laminilla 1B, los cortes de esta laminilla fueron tratados como control, es decir sin sonda. Y finalmente el siguiente corte se colocó en la laminilla 2C y el siguiente en la laminilla 2D, dichos cortes fueron utilizados para la hibridación *in situ*, y así sucesivamente hasta abarcar el cerebro anterior y parte del cerebro medio. A continuación se observan algunas imágenes de las diferentes series, con los tratamientos ya mencionados. Nótese que únicamente los cortes de las series C y D presentan una reacción muy

específica; en cada imagen se señala el área del cerebro a la que corresponde la reacción. En el caso de la serie B tratada como control negativo, es decir, sin sonda, no se aprecia reacción y para el caso de la serie A se observa el corte de encéfalo de *Ch. humboldtianum* con la tinción de Nissl, lo que nos permite distinguir los diferentes núcleos que lo conforman.

El transcrito del PACAP fue localizado tanto en el área dorsal como en el área ventral del telencéfalo, dichas regiones se dividen a su vez en núcleos, los cuales se pueden apreciar en la Figura 15 (Tinción de Nissl). Posteriormente se puede observar un control (Figura 16), el cual no presenta reacción al PACAP y en contraste se puede observar en la Figura 17 un corte que presenta reacción positiva al PACAP en algunos núcleos del telencéfalo, tanto en el área dorsal: el *pars medialis* (Dm) y *pars dorsalis* (Dd); como en el área ventral: el *pars lateralis* (VI), *pars dorsalis* (Vd) y el *pars ventralis* (Vv). En la Figura 18 se observa un acercamiento del *pars medialis* del área dorsal del telencéfalo en el cual se observa reacción y en las imágenes siguientes (Figura 19 y 20) se puede observar muy claramente neuronas positivas a PACAP, tanto del *pars medialis* como del *pars dorsalis* del área dorsal del telencéfalo.

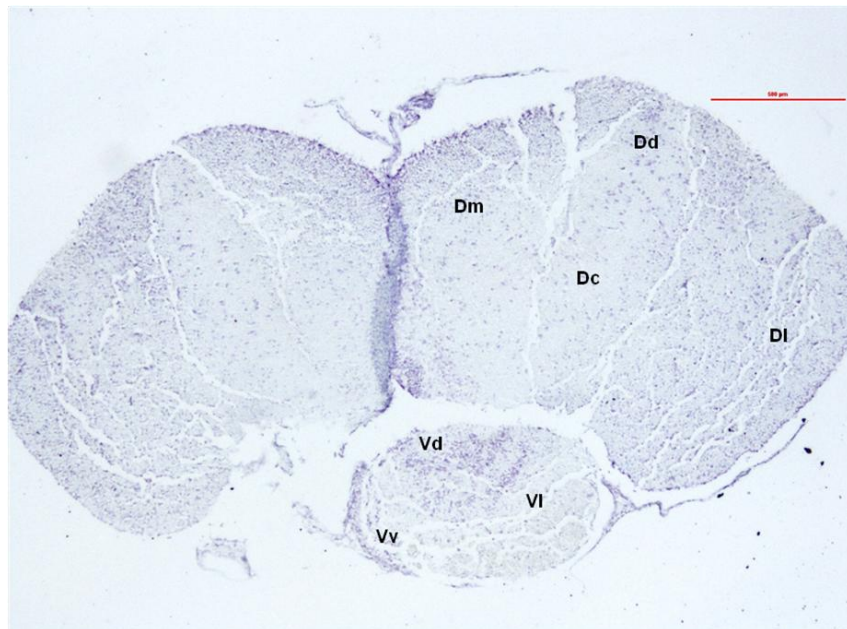


Figura 15. Corte transversal del área correspondiente a cerebro anterior de *Chirostoma humboldtianum*. Telencéfalo. Serie 1A. Corte a 10 μm. Tinción de Nissl con violeta cresil. Microscopía de campo claro (4x). Abreviaturas: Dm, *Pars medialis* o Parte media del telencéfalo dorsal; Dd, *Pars dorsalis* o Parte dorsal del telencéfalo dorsal; Dc, *Pars centralis* o Parte central del telencéfalo dorsal; DI, *Pars lateralis* o Parte lateral del telencéfalo dorsal; Vd, Parte dorsal del telencéfalo ventral; VI, Parte lateral del telencéfalo ventral; Vv, Parte ventral del telencéfalo ventral.

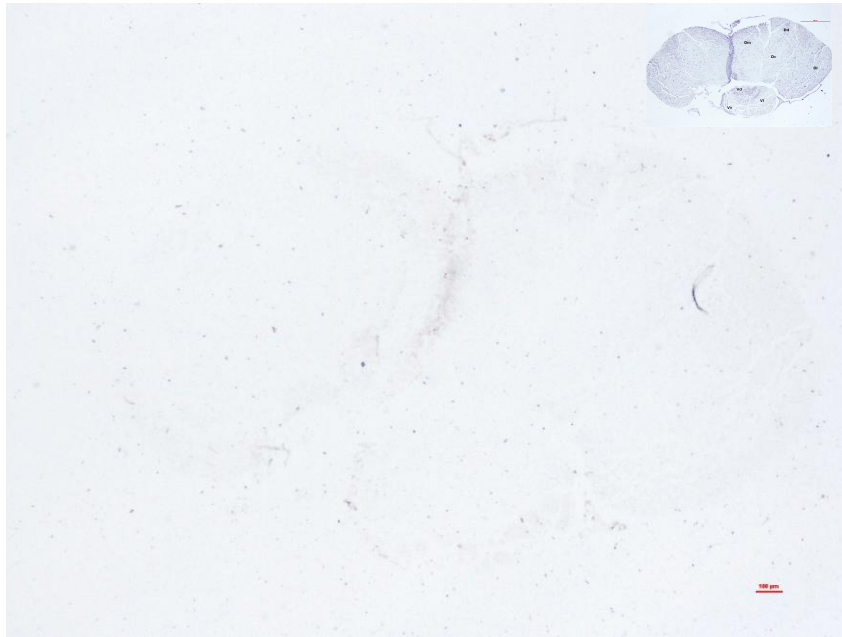


Figura 16. Corte transversal del área correspondiente al cerebro anterior de *Chirostoma humboldtianum*. Telencéfalo. Serie 1B. Corte a 10  $\mu\text{m}$ . Hibridación *in situ* Control, es decir, sin sonda PACAP y sin Tinción de Nissl. Microscopía de campo claro (4x). En la parte superior derecha se muestra la imagen correspondiente (Figura 15) a la tinción de dicha área.

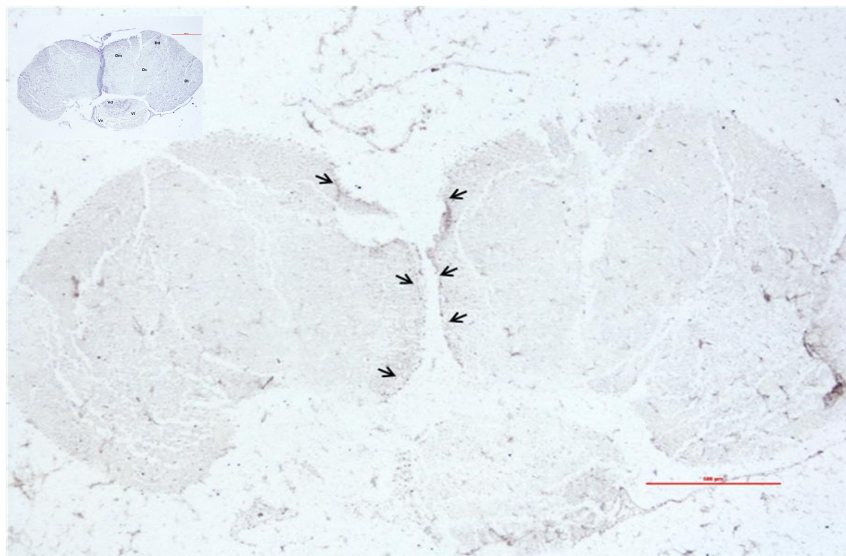


Figura 17. Corte transversal del área correspondiente al cerebro anterior de *Chirostoma humboldtianum*. Telencéfalo. Serie 1C. Corte a 10  $\mu\text{m}$ . Hibridación *in situ* con sonda PACAP y sin Tinción de Nissl. Microscopía de campo claro (4x). Reacción positiva en el núcleo *pars medio* del área dorsal del telencéfalo (flechas). En la parte superior izquierda se muestra la imagen correspondiente (Figura 15) a la tinción de dicha área.

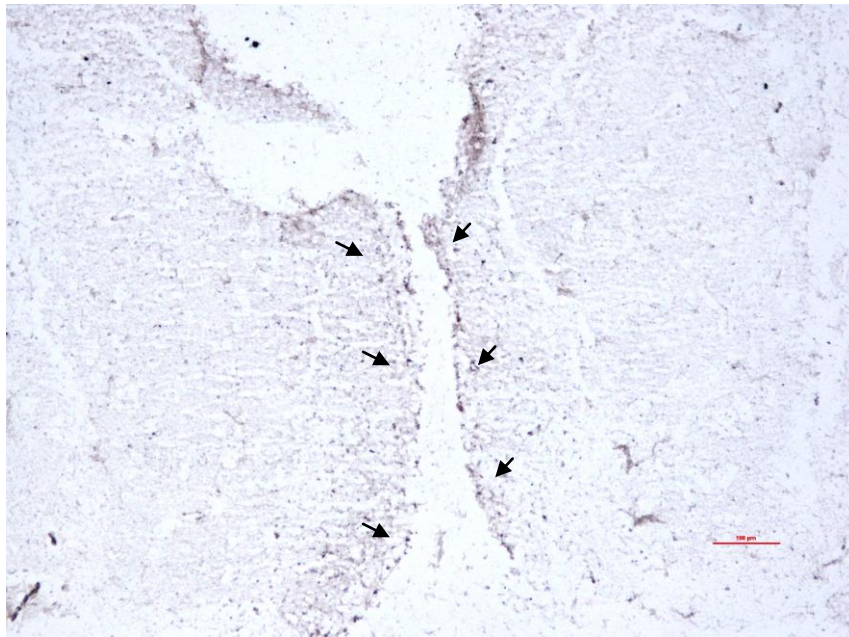


Figura 18. Corte transversal del área correspondiente al cerebro anterior de *Chirostoma humboldtianum*. Telencéfalo. Serie 1C. Corte a 10  $\mu\text{m}$ . Hibridación *in situ* con sonda PACAP y sin Tinción de Nissl. Microscopía de campo claro (10x). Reacción positiva en el núcleo *pars medio* del área dorsal del telencéfalo (flechas).

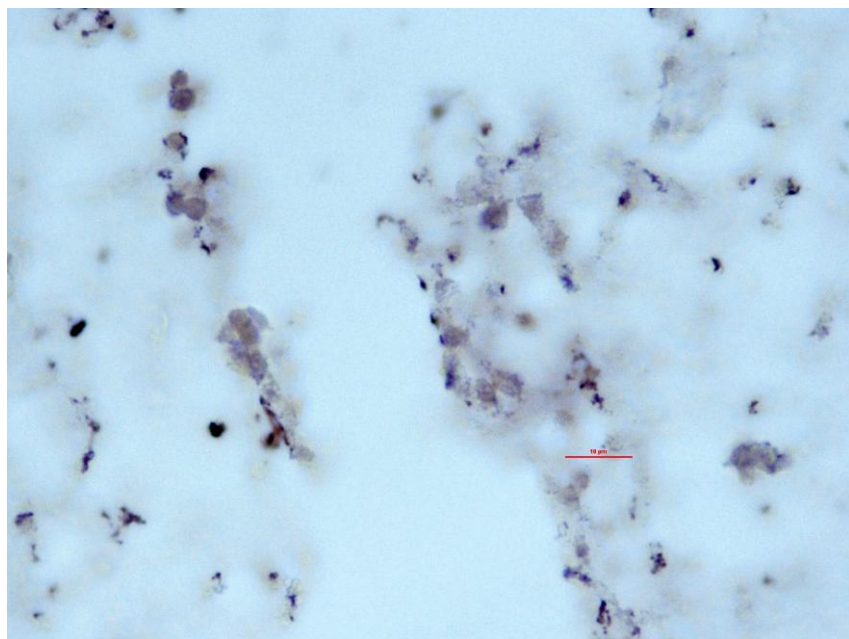


Figura 19. Corte transversal del área correspondiente al cerebro anterior de *Chirostoma humboldtianum*. Telencéfalo. Serie 1C. Corte a 10  $\mu\text{m}$ . Hibridación *in situ* con sonda PACAP y sin Tinción de Nissl. Microscopía de campo claro (100x). Reacción positiva en el núcleo *pars medio* del área dorsal del telencéfalo.

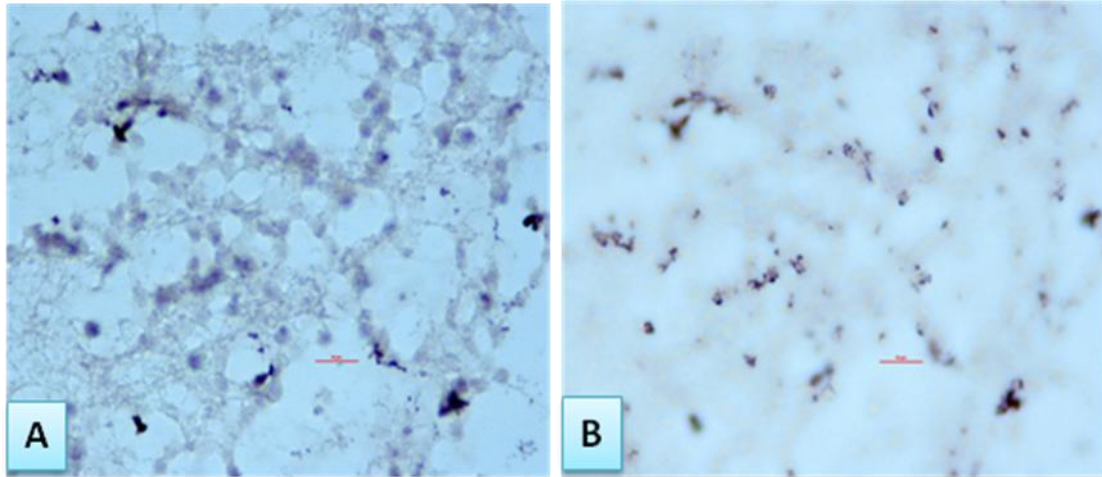


Figura 20. A y B Corte transversal del área correspondiente al cerebro anterior de *Chirostoma humboldtianum*. Telencéfalo. Serie C. Cortes a 10 µm. Hibridación *in situ* con sonda PACAP y sin Tinción de Nissl. Microscopía de campo claro (100x). Reacción positiva en el núcleo pars dorsal del área dorsal del telencéfalo.

En el telencéfalo (más hacia la zona caudal) también se encontró reacción positiva al PACAP en el Núcleo Postcomisural y en el Área Preóptica (Figura 22 y 23 A). Mientras que en la Figura 23 B, se muestra un control negativo correspondiente a dichas áreas.

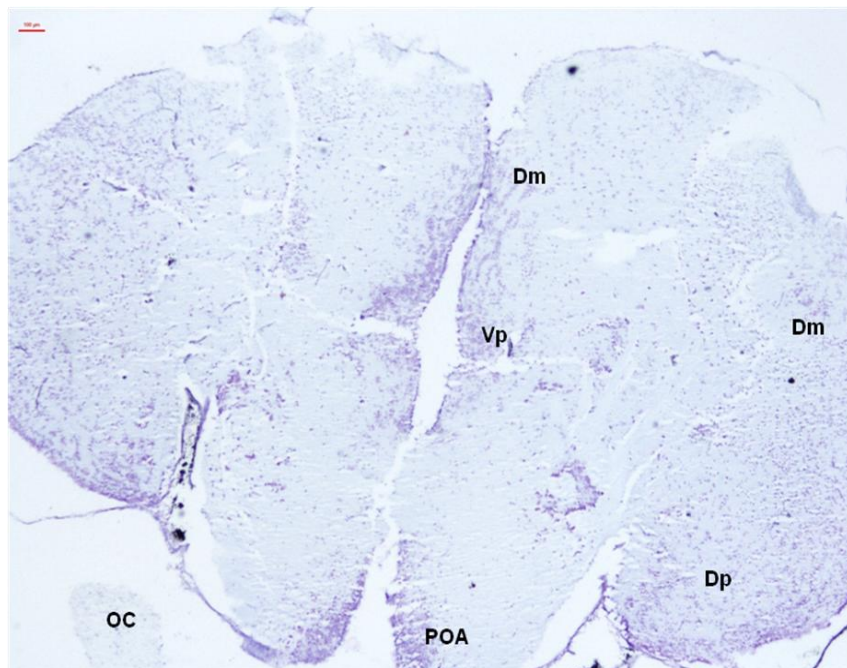


Figura 21. Corte transversal del área correspondiente al cerebro anterior de *Chirostoma humboldtianum*. Telencéfalo. Serie 2A. Corte a 10 µm. Tinción de Nissl con violeta de cresil. Microscopía de campo claro (4x). Abreviaturas: Dm, parte media del telencéfalo dorsal; Dp, Parte posterior del telencéfalo dorsal; Vp, Núcleo Postcomisural del telencéfalo ventral; POA, Área Preóptica; OC, Quiasma Óptico.

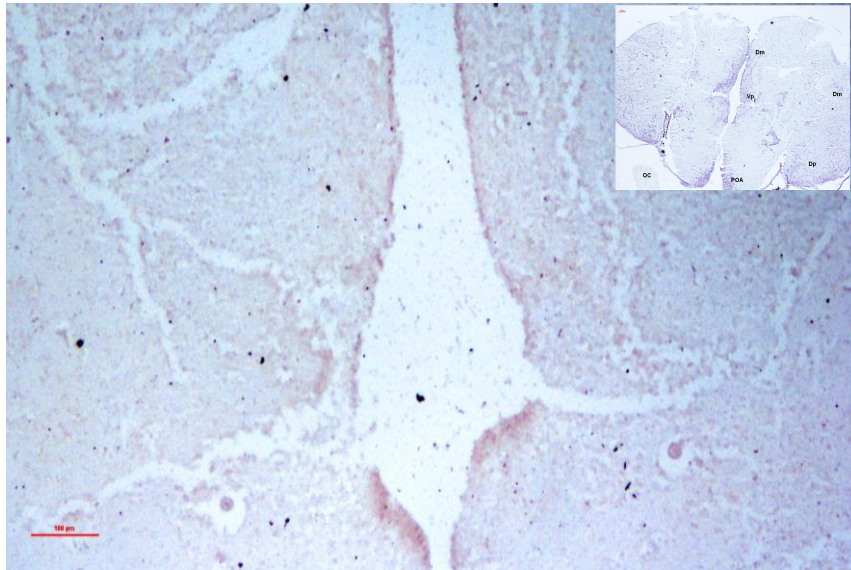


Figura 22. Corte transversal del área correspondiente al cerebro anterior de *Chirostoma humboldtianum*. Serie 2C. Corte a 10  $\mu\text{m}$ . Hibridación *in situ* con sonda PACAP y sin Tinción de Nissl. Microscopía de campo claro (4x y 10x respectivamente). Reacción a PACAP en Núcleo Postcomisural del telencéfalo ventral. En la parte superior derecha se muestra la imagen correspondiente (Figura 21) a la tinción de dicha área.

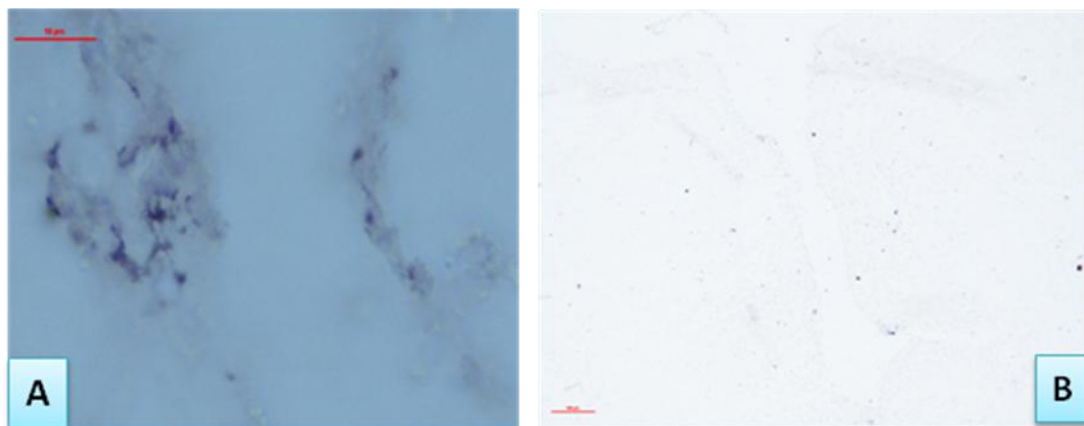


Imagen 23. A) Corte transversal del área correspondiente al cerebro anterior de *Chirostoma humboldtianum*. Serie 2D y 2B. Corte a 10  $\mu\text{m}$ . A) Hibridación *in situ* con sonda PACAP y sin Tinción de Nissl. Microscopía de campo claro (100x). Reacción a PACAP en Núcleo Preóptico Periventricular (NPP). B) Hibridación *in situ* Control, es decir, sin sonda PACAP y sin Tinción de Nissl. Microscopía de campo claro (10x).

Finalmente, como parte del telencéfalo se encuentran: la parte media y posterior del telencéfalo dorsal, área preóptica y núcleo entopendicular (Figura 24). En la Figura 25 A, correspondiente a la Hibridación *in situ*, se encontró reacción positiva al PACAP en la parte media y posterior del telencéfalo, así como en el área preóptica. Se encontraron neuronas reactivas a PACAP en el Núcleo preóptico parvocelular, tanto en la parte

anteroventral como en la parvocelular. Mientras que en la Figura 25 B no se observa reacción, demostrando una vez más que los controles resultaron negativos.

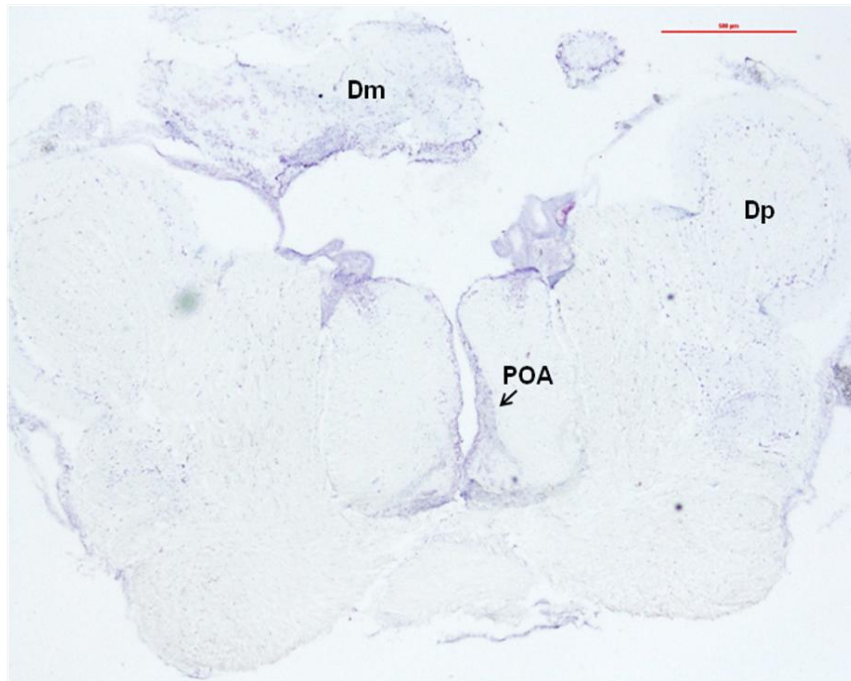


Figura 24. Corte transversal del área correspondiente al cerebro anterior de *Chirostoma humboldtianum*. Serie 2A. Corte a 10  $\mu\text{m}$ . Tinción con violeta cresil. Microscopía de campo claro (4x). Dp, parte posterior del telencéfalo dorsal; POA, Área Preóptica; Dm, parte media del telencéfalo.

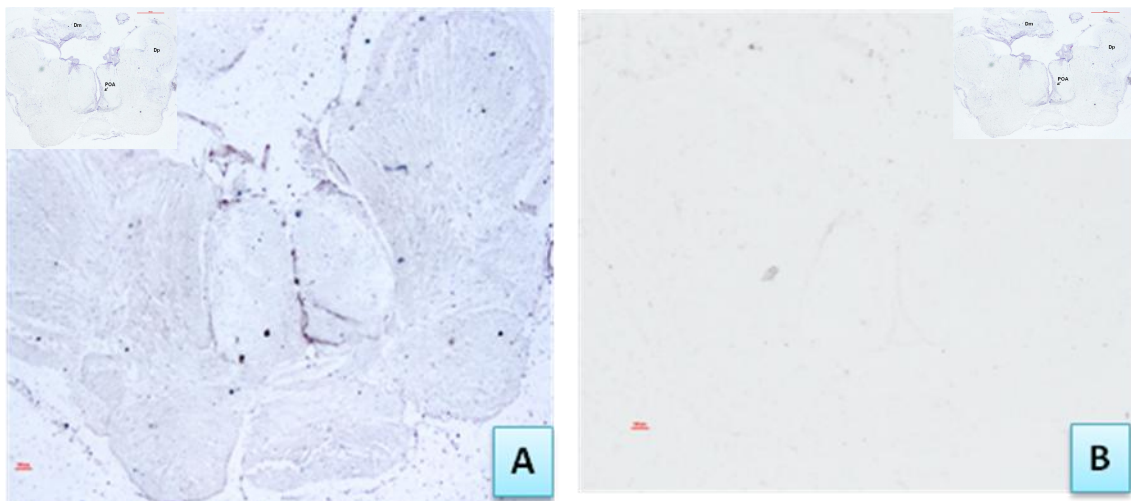


Imagen 25. A y B Cortes transversales del área correspondiente al cerebro anterior de *Chirostoma humboldtianum*. Serie 2C y 2B respectivamente. Corte a 10  $\mu\text{m}$ . A) Hibridación *in situ* con sonda PACAP. B) Hibridación *in situ* Control, es decir, sin sonda PACAP. Ambas hibridaciones sin Tinción de Nissl. Microscopía de campo claro (4x). En la parte superior izquierda y derecha de cada imagen se muestra la imagen de contratinción correspondiente a cada corte.



En la hipófisis de *Ch. humboldtianum* también se encontraron neuronas positivas al PACAP (Figura 26). Así mismo, se observaron neuronas positivas al PACAP en el *tectum* óptico (Figura 28) y en el Torus longitudinalis (TLo), comisura posterior (PCo), núcleo talámico posterior dorsal (DP), núcleo talámico posterior central (DC), núcleo talámico ventromedial (VM), núcleo preóptico magnocelular (PM), núcleo periventricular posterior (NPPv) y en el núcleo supraquiasmático (NSC) en la Figura 27 se puede apreciar la ubicación de dichos núcleos.

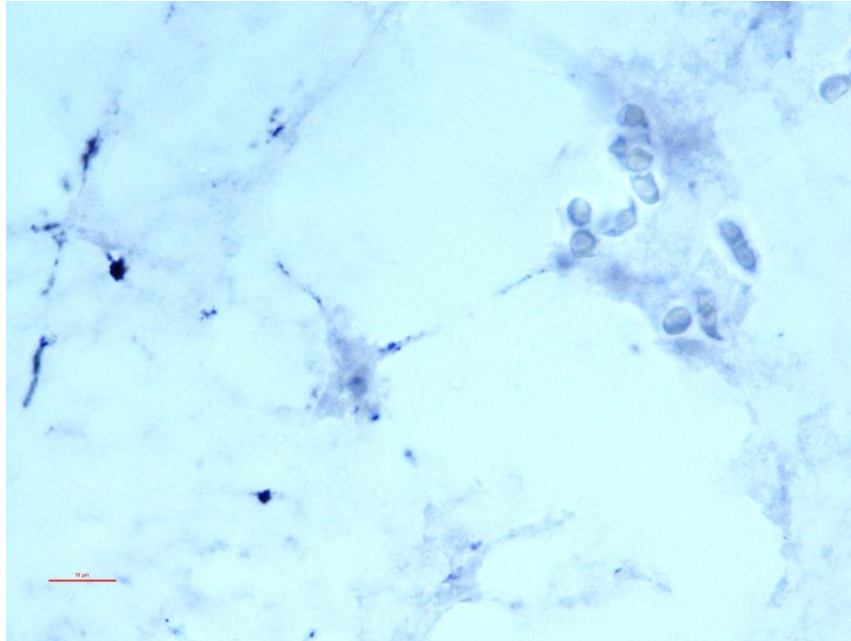


Figura 26. Corte transversal del área correspondiente al cerebro anterior de *Chirostoma humboldtianum*. Serie 3C. Corte a 10  $\mu$ m. Hibridación *in situ* con sonda PACAP y sin Tinción de Nissl. Microscopía de campo claro (100x). Neuronas inmunorreactivas a PACAP en hipófisis de *Chirostoma humboldtianum*.

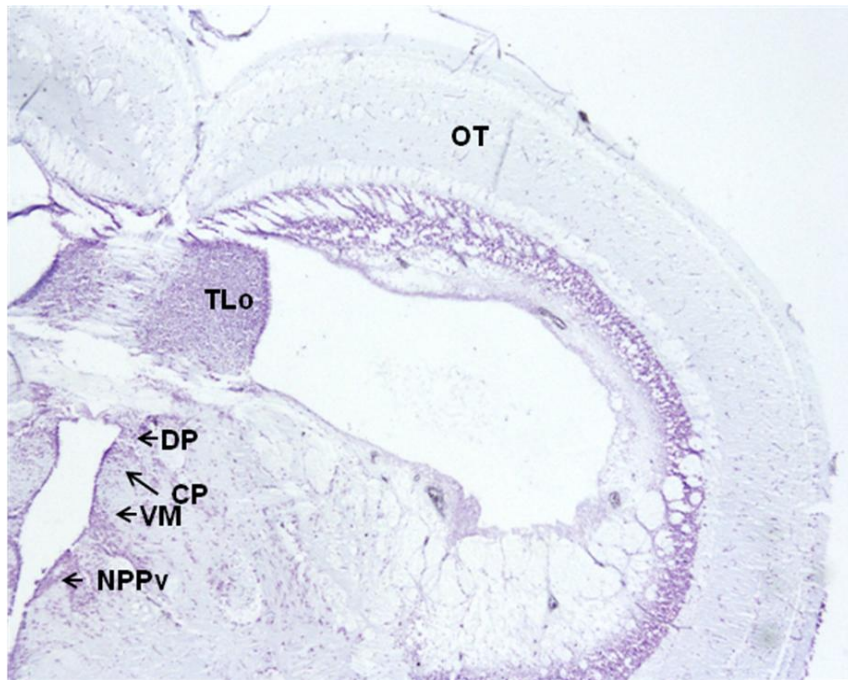


Figura 27. Cortes transversales del área correspondiente al Cerebro anterior de *Chirostoma humboldtianum*. Diencefalo. Serie 3A. Corte a 10  $\mu$ m. Tinción de Nissl con violeta cresil. Microscopía de campo claro (4x). Abreviaturas: OT, Tectum Óptico; TLo, Torus longitudinalis; DP, núcleo talámico posterior dorsal; VM, núcleo talámico ventromedial; NPPv, núcleo periventricular posterior.

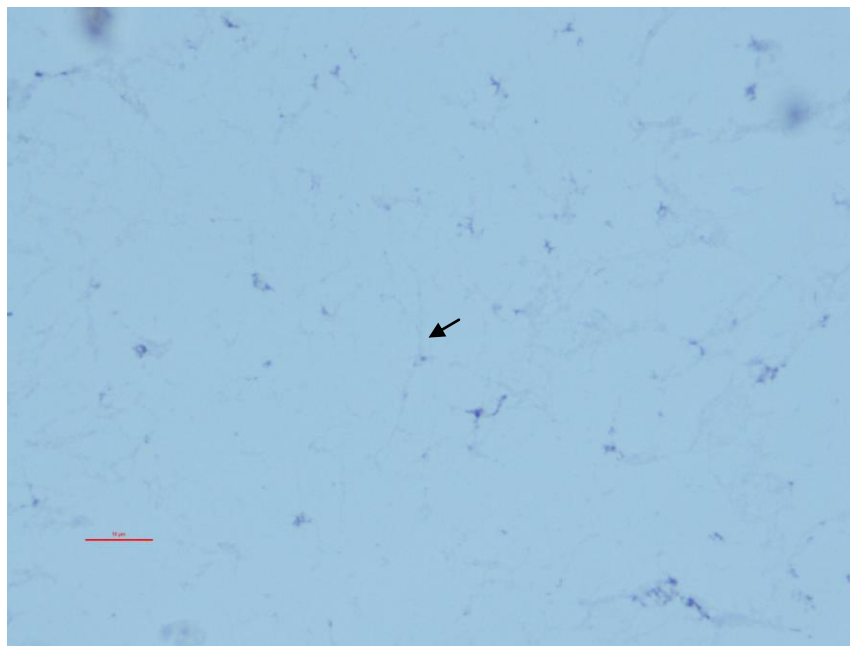


Figura 28. Corte transversal del área correspondiente al cerebro anterior de *Chirostoma humboldtianum*. Diencefalo. Serie 3C. Corte a 10  $\mu$ m. Hibridación *in situ* con sonda PACAP y sin Tinción de Nissl. Microscopía de campo claro (100x). Neuronas inmunorreactivas a PACAP presentes en *tectum* óptico. La flecha indica la presencia de una neurona positiva al PACAP.

## 6. Discusión

En el presente trabajo se reporta la distribución del RNAm del PACAP en varias áreas del cerebro anterior de *Chirostoma humboldtianum*. Con esto se puede decir que el RNAm del PACAP se encuentra ampliamente distribuido en el cerebro de dicho pez, concordando con lo reportado en otros peces tal como es el caso del elasmobranquio *T. marmorata* (Valiante *et al.*, 2006), por otra parte en *Cynoglossus semilaevis*, se ha demostrado que el RNAm del PACAP es más abundante en el cerebro que en otros tejidos y que no existe una expresión diferencial significativa de los niveles de expresión del PACAP entre los sexos o entre los meses de edad (Ji X.-S. *et al.*, 2010).

El transcrito del PACAP fue localizado tanto en el área dorsal como en el área ventral del telencéfalo. Al igual que en otras especies, los hemisferios telencefálicos de *Ch. humboldtianum*, se pueden dividir en dos regiones principales, el telencéfalo ventral (V) y el telencéfalo dorsal (D) (Cerdá-Reverter *et al.*, 2001). El área dorsal del telencéfalo está subdividida en cuatro regiones: *pars medialis* (Dm), *pars centralis* (Dc), *pars dorsalis* (Dd) y *pars lateralis* (Dl). Al igual el área ventral del telencéfalo se divide en cuatro regiones: *pars lateralis* (Vl), *pars dorsalis* (Vd) y el *pars ventralis* (Vv) y *pars supracomisuralis* (Vs) (Peter y Gill, 1975) dichas regiones se pueden apreciar en la Figura 15.

En el telencéfalo (más hacia la zona caudal) también se encuentra la parte media del telencéfalo dorsal, la parte posterior del telencéfalo dorsal, el Núcleo Postcomisural del telencéfalo ventral, el Área Preóptica y el quiasma óptico. El núcleo supracomisural se sustituye por el núcleo postcomisural (Vp), que marca la transición telencefalo-diencefalo (Figura 21). El área preóptica (POA) está limitada rostralmente por la comisura anterior, dorsalmente por el telencéfalo, el tálamo ventral y el tubérculo posterior y ventralmente por el quiasma óptico y el hipotálamo dorsal (Cerdá-Reverter *et al.*, 2001). El PACAP fue detectado en el Núcleo Postcomisural y en el Área Preóptica: neuronas reactivas al PACAP fueron detectadas en el Núcleo preóptico parvocelular.

Así mismo se encontraron neuronas positivas a PACAP en el diencefalo e hipófisis de *Ch. humboldtianum* (Figura 26). El diencefalo se encuentra rostral al cerebro medio, caudal-ventral al telencéfalo y medio a los axones que forman el tracto óptico. El diencefalo es una larga división compuesta de seis áreas principales: pretegmentum, tuberculum posterior, epitálamo, el tálamo dorsal, el tálamo ventral y el hipotálamo (Butler y Hodos, 2005). Se encontraron neuronas positivas a PACAP en el *tegmentum* óptico

(Figura 28) y en el Torus longitudinalis (TL<sub>o</sub>), núcleo talámico ventromedial (VM), dicho núcleo ha sido identificado en el tálamo ventral (Cerdá-Reverter et al., 2001). Los núcleos que se encuentran en el tálamo ventral juegan un papel, en conjunto con las estructuras telencefálicas, en el control motor del cuerpo y las extremidades (Butler y Hodos, 2005). También se encontró reacción positiva al PACAP en el núcleo talámico posterior dorsal (DP) el cual se ha identificado en el tálamo dorsal (Cerdá-Reverter et al., 2001). El tálamo dorsal, envía información al telencéfalo y está involucrado también en la memoria y respuestas motoras. Los núcleos del tálamo dorsal reciben información a través de las neuronas de proyección de los diversos sistemas sensoriales, que transmiten a varias partes del telencéfalo (Butler and Hodos, 2005). Así mismo, se encontró reacción positiva al PACAP en la comisura posterior (PCo), núcleo talámico posterior central (DC), núcleo preóptico magnocelular (PM), núcleo periventricular posterior (NPPv) y en el núcleo supraquiasmático (NSC) en la figura 27 se puede apreciar la ubicación de dichos núcleos.

Estudios anteriores han demostrado la presencia del PACAP en las gónadas de *Ch. humboldtianum* (González, 2010) y en el presente estudio se ha establecido la presencia del PACAP en el cerebro e hipófisis. De tal manera que al ser el PACAP reportado en el eje cerebro-hipófisis-gónadas (BPG) se sugiere la función del PACAP en la regulación de la reproducción de vertebrados no mamíferos, tal y como ocurre en el caso del PRP y su receptor (Tam et al., 2011).

En contraste los controles resultaron negativos lo que indica que la reacción corresponde a la sonda de PACAP y no a algún otro componente de la hibridación. Por otra parte en la tinción de Nissl, el colorante utilizado se une al ARN contenido en los ribosomas, por tanto, tiñe el núcleo, el nucléolo y los ribosomas del retículo endoplasmático rugoso (sustancia de Nissl). De las células gliales únicamente se tiñen los núcleos. Por lo tanto esta tinción proporcionó una panorámica general y exhaustiva de la distribución, tamaño y morfología de las neuronas en el tejido nervioso (Escarabajal et al., 2006), sirviéndonos así como base para identificar las áreas del encéfalo que presentan reacción positiva al PACAP así como ubicar la distribución de las neuronas en el mismo, ya que los cortes utilizados para hibridación no se tiñeron para evitar enmascarar la reacción a PACAP.

Por otra parte, al hacer la comparación de la secuencia obtenida del encéfalo anterior de *Ch. humboldtianum*, se encontró que el RNAm de PACAP de *Ch. humboldtianum* presenta un alto porcentaje de identidad con el RNAm de otros teleósteos, tal y como es

el caso de *Sebastiscus marmoratus* con el que presentó un 97% de identidad (GenBank: AB121764.1) o en el caso de *Mola mola* con un 94% de identidad (GenBank: AY826063.1) y con *Anguilla japonica*, un teleósteo primitivo, se observó un 93% de identidad (GenBank: AY870141.1), lo que nos indica la conservación de dicho polipéptido a través de las diferentes especies de teleósteos. De igual manera la secuencia de aminoácidos de la estructura primaria del PACAP se encuentra altamente conservada desde mamíferos hasta tunicados. En la secuencia parcial obtenida del encéfalo anterior de *Ch. humboldtianum* se encontraron solo 33 aminoácidos correspondientes a la secuencia primaria de PACAP: **HSDGIFTDSYSRYRKQMAVQKYLA AVLGRRYRQ**, la cual resulta ser idéntica a la de Stargazer (Matsuda *et al.*, 1997b) en los primeros 33 aminoácidos, y con respecto a los 33 primeros aminoácidos del PACAP de mamíferos (Hosoya *et al.*, 1992) y de rana (Alexandre *et al.*, 2000) resultó diferir en tan solo 3 de ellos, con respecto al PACAP de pollo (McRory *et al.*, 1997) y Tunicados-1 (Arimura, 1998) difieren en 4 aminoácidos, en cuanto a la secuencia primaria del PACAP de salmón (Parker *et al.*, 1993) difieren en 2 aminoácidos y con respecto al de pez gato (McRory *et al.*, 1995) difiere en un solo aminoácido y en contraste con Tunicados-2 (Arimura, 1998) difiere en 7 aminoácidos (Ver Fig. 10). Sin embargo, como se ha mencionado la secuencia de aminoácidos es una secuencia parcial por lo que sería de gran importancia analizar la secuencia primaria completa del PACAP de *Ch. humboldtianum*, ya que muy posiblemente en los 5 aminoácidos faltantes se encuentren más diferencias, ya que como es el caso de Stargazer (que presenta la misma secuencia que *Ch. humboldtianum*), pez gato, salmón y rana con respecto a mamíferos, difieren también en los últimos aminoácidos.

La remarcable similitud del PACAP entre humanos y tunicados sugiere que la estructura primaria del PACAP se ha mantenido prácticamente sin cambios durante un periodo evolutivo que abarca más de 70 millones de años. El PACAP puede ser el péptido más altamente conservado de su tamaño durante la filogenia, implicando su vital importancia (Arimura, 1998). Por otra parte el agrupamiento (Fig. 8), establece las relaciones de los alineamientos de las secuencias del PACAP de algunos teleósteos, entre los cuales encontramos representantes del orden Atheriniformes, Pleuronectiformes Gadiformes, Tetraodontiformes, Perciformes, Siluriformes, Scorpaeniformes y Anguilliformes. En el mismo se puede apreciar que hay una mayor similitud entre representantes del orden Atheriniformes, Pleuronectiformes, Gadiformes y Tetraodontiformes. Por el contrario Atheriniformes, muestran una menor similitud respecto a Anguilliformes, siendo estos teleósteos primitivos.

## 7. Conclusiones

- El PACAP es una molécula con una amplia distribución en el cerebro anterior de *Chirostoma humboldtianum* sugiriendo que este péptido puede tener un papel clave en las funciones cerebrales y en la reproducción de este teleosteo.
- Además el PACAP podría estar involucrado en las actividades motoras del pez *Ch. humboldtianum*, ya que se localizó la distribución de dicho péptido en el tálamo dorsal, y como se sabe esta región se encuentra involucrada en la memoria y respuestas motoras.
- El RNAm del PACAP de *Ch. humboldtianum* presenta un alto porcentaje de identidad con el RNAm de otros teleósteos.

## 8. Referencias

- Aguilar P. J. F y Navarrete S. N. 1996-1997. Crecimiento, condición y mortalidad del charal *Chirostoma humboldtianum* (Atheriniformes: Atherinidae) en México. *Revista de Biología Tropical*. 44/45:573-578.
- Alaye R. N. 1993. El pescado blanco (género *Chirostoma*) del lago de Pátzcuaro, Michoacán. Composición de especies. *Ciencia Pesquera*. 9:113-128.
- Alexandre D., Alonzeau J., Bill R. B., Ekker C. S. y Waschek. 2011. Expression Anlysis of PAC1-R and PACAP Genes in Zebrafish Embryos. *Journal of Molecular Neuroscience*. 43:94-100.
- Alexandre D., Vaudry H., Jégou S. y Anouar Y. 2000. Structure and Distribution of the mRNAs Encoding Pitiutary Adenylate Cyclase-Activating Polypeptide and Growth Hormone-Relasing Hormone-Like Peptide in the Frog, *Rana ridibunda*. *Journal of Comparative Neurology*. 421:234-246.
- Arimura A. 1998. Perspectives on Pituitary Adenylate Cyclase Activating Polypeptide (PACAP) in the Neuroendocrine, Endocrine, and Nervous Systems. *Japanese Journal of Physiology*. 48:301-331.
- Butler B. A. y Hodos W. 2005. Comparative Vertebrate Neuroanatomy: Evolution and Adaptation. Second Edition. Wiley-Interscience. Estados Unidos de America. 715 p.
- Cerdá-Reverter J. M., Zanuy S. y Muñoz-Cueto J. A. 2001a. Cytoarchitectonic Study of the Brain of a Perciform Species, the Sea Bass (*Dicentrarchus labrax*). I. The Telencephalon. *Journal of Morphology*. 247:217–228.
- Cerdá-Reverter J. M., Zanuy S. y Muñoz-Cueto J. A. 2001b. Cytoarchitectonic Study of the Brain of a Perciform Species, the Sea Bass (*Dicentrarchus labrax*). II. The Diencephalon. *Journal of Morphology*. 247:229–251.
- Chomczynski P, Sacchi N. 1987. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Analytical Biochemistry*. 162:156-9.

- Counis R., Laverrière J. N., Lazayres G. G., Tannoudji C., Larivière S., Bleux C y Magre S. 2007. What is the role of PACAP in gonadotrope function?. *Peptides*. 28:1797-1804.
- Elías, F. G., Navarrete S. N. A. y Rodríguez R. J. L. 2008. Alimentación de *Chirostoma humboldtianum* (Valenciennes); (Pisces: Atherinopsidae) en el estanque JC en Soyaniquilpan, Estado de México. *Revista Chapingo Serie Ciencias Forestales y del Ambiente*. 14: 129-134.
- Escarabajal A. Ma. D., López G. J. C., Portavella M., Carrasco V. M. y Vargas R. J. P. 2006. Fundamentos de psicobiología. Libro de prácticas I. Publicaciones Delta. España. 101 p.
- Estrada M. P., Lugo J. M., Carpio Y., Morales R., Acosta J., Rodriguez A., Morales A., Herrera F., González O., González J. L., Besada V. y Sánchez A. 2008. Neuropeptidos estimuladores del crecimiento y sistema inmune innato en organismos acuáticos. *Biotecnología Aplicada*. 25:356-361.
- Figueroa L. G., Meza G. O. M., Hernández R. C., Barriga S. I. D. L. A., Rodríguez C. A. y Arredondo F. J. L. 2004. Growth, survival and mandible development in the larvae of the shortfin silver-side *Chirostoma humboldtianum* (Valenciennes) (Atheriniformes: Atherinopsidae) under laboratory conditions. *Aquaculture*. 242:689-696.
- Fradinger A. E. y Sherwood M. N. 2000. Characterization of the gene encoding both growth hormone-releasing hormone (GRF) and pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide (PACAP) in the zebrafish. *Molecular and Cellular Endocrinology*. 165:211-219.
- González B. A. 2010. Distribución del Polipéptido Activador de la Adenilato Ciclasa de la Pituitaria (PACAP) en gónadas de *Chirostoma humboldtianum*. Tesis. Universidad Nacional Autónoma de México. Facultad de Estudios Superiores Iztacala. Pp 39.
- Hart R.G., Gowing H. y Burrin M.J. 1992. Effects of a novel hypothalamic peptide, pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide, on pituitary hormone release in rats. *Journal of Endocrinology*. 134:33-41.



- Hashimoto H. 2002. Physiological significance of pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide (PACAP) in the nervous system. *Yakugaku Zasshi*. 122:1109-21.
- Hashimoto H., Nogi H., Mori K., Ohishi H., Shigemoto R., Yamamoto K., Matsuda T., Mizuno N., Nagata S. y Baba A. 1996. Distribution of the mRNA for a Pituitary Adenylate Cyclase-Activating Polypeptide Receptor in the Rat Brain: An In Situ Hybridization Study. *Journal of Comparative Neurology*. 371:567-577.
- Hosoya M., Kimura C., Ogi K., Ohkubo S. Miyamoto Y., Kugoh H., Shimizu M., Onda H., Oshimura M., Arimura A. y Fujino M. 1992. Structure of the human pituitary adenylate cyclase activating polypeptide (PACAP) gene. *Biochimica et Biophysica*. 199-206.
- Ji X.-S., Chen S.-L., Jiang Y.-L., Xu T.-J., Yang J.-F. y Tian Y.-S. 2010. Growth differences and differential expression analysis of pituitary adenylate cyclase activating polypeptide (PACAP) and growth hormone-releasing hormone (GHRH) between the sexes in half-smooth tongue sole *Cynoglossus semilaevis*. *General and Comparative Endocrinology*. 1-11.
- Krueckl L. S. y Sherwood M. N. 2001. Developmental expression, alternative splicing and gene copy number for the pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide (PACAP) and growth hormone-releasing hormone (GRF) gene in rainbow trout. *Molecular and Cellular Endocrinology*. 182:99-108.
- Krueckl L.S., Fradinger A. E. y Sherwood M. N. 2003. Developmental Changes in the Expression of Growth Hormone-Releasing Hormone and Pituitary Adenilate Cyclase-Activating Polypeptide in Zebrafish. *Journal of Comparative Neurology*. 455:396-405.
- Lee, L. T. O., Siu F. K. Y., Tam J. K. V., Lau I. T. Y., Wong A. O. L., Lin M. C. M., Vaudry H. y Chow B. K. C. 2007. Discovery of growth hormone-releasing

hormones and receptors in nonmammalian vertebrates. *National Academy of Sciences of the USA*. 104:2133-2138.

- Lee O. L. T., Tam V. J. K., Chan W. D. y Chow C. B. K. 2009. Molecular Cloning and mRNA Distribution of Pituitary Adenylate Cyclase-activating Polypeptide (PACAP)/PACAP-related Peptide in the Lungfish. *Trends in Comparative Endocrinology and Neurobiology: Annals New York Academy of Sciences*. 1163:209-214.
- Londoño C. y Hurtado G. H. 2010. Estudio preliminar morfológico y morfométrico de encéfalo del pez tiburoncito, *Ariopsis seemanni*, (Pisces:Ariidae). *Universitas Scientiarum*. 15:101-109.
- Lugo J. M., Oliva A., Morales A., Reyes O., Garay H. E., Herrera F., Cabrales A., Pérez E. y Estrada M. P. 2010. The biological role of pituitary adenylate ciclase-activating polypeptide (PACAP) in growth and feeding behaviour in juvenile fish. *Journal of Peptide Science*. 16:633-643.
- Matsuda K., Nejigaki Y., Satoh M., Shimaura C., Tanaka M., Kawamoto K., Uchiyama M., Kawachi H., Shioda S. y Takahashi A. 2008. Effect of pituitary adenylate ciclase-activating polypeptide (PACAP) o prolactin and somatolactin release from the goldfish pituitary in vitro. *Regulatory Peptides*. 145:72-79.
- Matsuda K., Shioda S., Arimura A. y Uchiyama M. 1997a. The Study of Pituitary Adenylate Cyclase Activating Polypeptide (PACAP)-like Immunoreactivity in the Brain of a Teleost, Stargazer, *Uranoscopus japonicus*. *Zoological Science*. 14:645-650.
- Matsuda K., Takei Y., Katoh J., Shioda S., Arimura A. y Uchiyama M. 1997b. Isolation and structural characterization of pituitary adenylate cyclase activating polypeptide (PACAP)-like peptide from the brain of a teleost, Stargazer, *Uranoscopus japonicus*. *Peptides*. 18:723-727.
- McRory E. J., Parker B. D., Ngamvongchon S. y Sherwood M. N. 1995. Sequence and expression of cDNA for pituitary adenylate ciclase activating polypeptide (PACAP) and growth hormone- releasing hormone (GHRH)- like peptide in catfish. *Molecular and Cellular Endocrinology*. 108:169-177.

- McRory E. J., Parker L. R. y Sherwood M. N. 1997. Expression and alternative processing of a chicken gene encoding both growth hormone-releasing hormone and pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide. *DNA and Cell Biology*. 16:95-102.
- Miyata A., Arimura A., Dahl R. R., Minamino N., Uehara A., Jiang L., Culler D. M. y Coy H. D. 1989. Isolation of a novel 38 residue-hypothalamic polypeptide which stimulates adenylate cyclase in pituitary cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 164:567-574.
- Miyata A., Jiang L., Dahl D. R., Kitada C., Kubo K., Fujino M., Minamino N. y Arimura A. 1990. Isolation of a neuropeptide corresponding to the N-terminal 27 residues of the pituitary adenylate cyclase activating polypeptide with 38 residues (PACAP38). *Biochemical and biophysical research communications*. 170:643-648.
- Montero M., Yon L., Rousseau K., Arimura A., Fournier S., Dufour S. y Vaudry H. 1998a. Distribution, Characterization, and Growth Hormone-Releasing Activity of Pituitary Adenylate Cyclase-Activating Polypeptide in the European Eel, *Anguilla anguilla*. *Endocrinology*. 139:4300-4310.
- Montero M., Yon L., Rousseau K., Arimura A., Fournier A., Dufour S. y Vaudry H. 1998b. Localization of Pituitary Adenylate Cyclase-Activating Polypeptide in the Central Nervous System of the European Eel *Anguilla anguilla*: Stimulatory Effect of PACAP on GH Secretion. *Annals New York Academy of Sciences*. 475-477.
- Mucio, R. S., Miller P. C., Curras C. M. y León O. M. 2004. El polipéptido activador de la adenilato ciclase de la pituitaria (PACAP): actualización de conocimientos. *Salud Mental*. 27:55-69.
- Parker B. D., Coe R. I., Dixon H. G. y Sherwood M. N. 1993. Two salmon neuropeptides encoded by one brain cDNA are structurally related to members of the glucagon superfamily. *European Journal of Biochemistry*. 215:439-448.
- Peter R. E. y Gill V. E. 1975. A stereotaxic atlas and technique for forebrain nuclei of goldfish, *Carassius auratus*. *Journal of Comparative Neurology*. 159:69-101.

- Rojas C. P. M. y Sasso Y. L. F. 2005. El pescado blanco. *Revista Digital Universitaria*. 6:1-18. <http://www.revista.unam.mx/vol.6/num8/art80/art80.htm>
- Sánchez M. R., Díaz Z.M., Navarrete S. N. A., García M. M. L., Ayala N. F. y Flores A. M. D. 2006. Crecimiento, Mortalidad y Supervivencia del charal *Chirostoma Humboldtianum* (Atherinopsidae) en el embalse San Miguel Arco, Soyaniquilpan, Estado de México. *Revista Chapingo. Serie Ciencias Forestales y del Ambiente*. 12:151-154.
- Sarnat B. H. and Netsky G. M. 1976. Evolución del Sistema Nervioso. Hermann Blume ediciones. España. 408 p.
- Segura V. M. de L., López V. G. y Jiménez G. L. F. 1997. Hibridación *in situ* Ultraestructural. Plaza y Valdéz Editores. México, D. F. 28 p.
- Sherwood M. N., Krueckl L. S. y McRory E. J. 2000. The Origin and Function of the Pituitary Adenylate Cyclase-Activating Polypeptide (PACAP)/Glucagon Superfamily. *Endocrine Reviews*. 21:619-670.
- Small B. C. y Nonneman D. 2001. Sequence and Expression of a cDNA Encoding Both Pituitary Adenylate Cyclase Activating Polipeptide and Growth Hormone-Releasing Hormone-like Peptide in Channel Catfish (*Ictalurus punctatus*). *General and Comparative Endocrinology*. 122:354-363.
- Stefanini *et al.*, 1967. Buffer formaldehyde whit picrate. 29-30. In *Histological and Histochemical methods*. Ed. by Kiernan, J. A. Pergamon press. New York. (1990).
- Tam J. K. V., Lee L. T. O. y Chow B. K. C. 2007. PACAP-related peptide (PRP) - Molecular evolution and potential functions. *Peptides*. 28:1920-1929.
- Tam J. K. V., Lee L. T. O., Cheng C. H. K. y Chow B. K. C. 2011. Discovery of a new reproductive hormone in teleosts: Pituitary adenilato cyclase-activating polypeptide-related peptide (PRP). *General and Comparative Endocrinology*. 173:405-410.

- Valiante S., Prisco M., Ricchiari L., Laforgia V., Varano L., y Andreuccetti P. 2006. Distribution of PACAP in the Brain of the Cartilaginous Fish *Torpedo Marmorata*. *Annals New York Academy of Sciences*. 1070:591-596.
- Wong L. A. O., Leung Y. M., Shea C. W. L., Tse Y. L., Chang P. J. y Chow C. B. C. 1998. Hypophysiotropic Action of Pituitary Adenylate Cyclase-Activating Polypeptide (PACAP) in the Goldfish: Immunohistochemical Demonstration of PACAP in the Pituitary, PACAP Stimulation of Growth Hormone Release from Pituitary Cells, and Molecular Cloning of Pituitary Type I PACAP Receptor. *Endocrinology*. 139:3465-3479.
- Wong A. O., Li W. S., Lee E.K, Leung M.Y.,Tse L. Y., Chow B. K. Lin H. R. y Chang J. P. 2000. Pituitary adenylate cyclase activating polypeptide as a novel hypophysiotropic factor in fish. *Biochemistry and Cell Biology*. 78:329-43.
- Página de internet consultada el 18 de agosto de 2010: Compendio de estadísticas ambientales 2008. Humedales Mexicanos inscritos en la convención RAMSAR.  
[http://app1.semarnat.gob.mx/dgeia/informe\\_2008/compendio\\_2008/compendio2008/10.100.8.236\\_8080/ibi\\_apps/D3\\_BIODIV01\\_06.html](http://app1.semarnat.gob.mx/dgeia/informe_2008/compendio_2008/compendio2008/10.100.8.236_8080/ibi_apps/D3_BIODIV01_06.html)

## Anexos

### Protocolo para la tinción de Nissl

1. Montar los cortes en portaobjetos y Rehidratar:

|                  |       |
|------------------|-------|
| Xilol I          | 5 min |
| Xilol II         | 5min  |
| Alcohol absoluto | 2 min |
| Alcohol al 96%   | 2 min |
| Alcohol al 90%   | 2min  |
| Alcohol al 80%   | 2 min |
| Alcohol al 70 %  | 2 min |
| Agua destilada   | 5 min |

2. Exposición al colorante

Violeta de cresil (0.5%) 1-3 min

3. Aclarado.

Agua destilada 5 min

4. Deshidratación

|                  |       |
|------------------|-------|
| Alcohol al 70 %  | 2min  |
| Alcohol al 80%   | 2 min |
| Alcohol al 90%   | 2min  |
| Alcohol al 96%   | 2 min |
| Alcohol absoluto | 2 min |
| Xilol I          | 5 min |
| Xilol II         | 5min  |

5. Cubrir los cortes con Vecta Mount ®.

## **Protocolo para la Síntesis de la sonda de PACAP**

Se elaboró la sonda mediante el protocolo DIG-Nick Translation Mix ® Roche, haciendo algunas modificaciones:

- Colocar los siguientes componentes en un tubo eppendorf de 1.5 ml: DIG – Nick Translation Mix, agua y cDNA.
- Vortexear y centrifugar a 10 900 rpm durante 5 sec.
- Desnaturalizar e incubar a 15°C durante 180 min.
- Poner en hielo durante 5 min y agregar 2 µl de EDTA 0.5M pH 8 y calentar a 65°C durante 10 min.
- Colocar en hielo y agregar 5 µl de Acetato de Sodio 3M y 25 µl de etanol absoluto a -20°C e incubar a -70°C durante 15 min.
- Centrifugar a 10 900 rpm durante 10 min.
- Agregar agua destilada (14 µl), Acetato de Sodio 3M y etanol absoluto (como en el paso anterior) y centrifugar.
- Decantar y adicionar TE pH 8.
- Verificar en gel de agarosa al 1%.

## Protocolo para Hibridación *in situ*

Una vez hidratado el tejido, se agregó una mezcla para evitar la unión inespecífica y posteriormente fueron sometidos a la solución con sonda (experimental) y a la solución sin sonda (control).

- Incubar los cortes, tanto experimental como control en una cámara húmeda, durante 16 h a 55° C.
- Lavar con SSC 2x, durante 30 min a temperatura ambiente.
- Lavar con SSC 2x, durante una hora a 65°C.
- Adicionar buffer 1, durante 5 min.
- Incubar con el anticuerpo Anti-digoxigenina conjugado con Fosfatasa Alcalina (AP) (Anti – Digoxigenin – AP, Fab fragments ® Roche) durante 2 h.
- Lavar con buffer 1 durante 15 min (dos veces).
- Equilibrar con buffer II, durante 5 min.
- Revelar con NBT/BCIP durante toda la noche.
- Parar la reacción con TRIS/EDTA, durante 15 min.
- Remover uniones inespecíficas con alcohol al 95%, durante 15 min, con agitación.
- Deshidratar con alcoholes de concentraciones crecientes (80%, 90%, 96% y absoluto), xilol I y xilol II.
- Montar con Vecta Mount ®.

NOTA:

Buffer 1: TRIS HCl 100mM y NaCl 150mM pH 7.5

Buffer 2: TRIS HCl 100mM NaCl 100mM y MgCl<sub>2</sub> pH 9.5