



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**

---

**Aislamiento, secuenciación y clonación de  
receptores a neuroquinina B (tac3ra y tac3rb) en  
el encéfalo de *Chirostoma humboldtianum*  
(Atheriniformes: Atherinopsidae)**

**TESIS**

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:**

**BIÓLOGA**

**PRESENTA:**

**MAYRA BELEN VELAZQUEZ ARPERO**

**DIRECTOR DE TESIS: DR. RODOLFO CÁRDENAS REYGADAS**

**LOS REYES IZTACALA, ESTADO DE MÉXICO, 2016**





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**

A la Universidad Nacional Autónoma de México por permitir mi formación profesional académica, crecimiento personal y brindarme el tesoro del conocimiento. “Por mi raza hablará el espíritu”.

A la Facultad de Estudios superiores Iztacala por la oportunidad de cumplir mi formación de bióloga, por albergarme durante este tiempo como si fuese un segundo hogar y por todos los momentos vividos en tus instalaciones, orgullosamente Iztacalteca.

Al Dr. Rodolfo Cárdenas Reygadas, por darme la oportunidad de incorporarme al proyecto, por sus sugerencias, el apoyo, su experiencia y sus conocimientos transmitidos a lo largo de este tiempo.

A las Maestras Mónica Chávez Maldonado y Beatriz Macedo Garzón por sus conocimientos, recomendaciones y sus valiosas aportaciones, pero sobre todo por su tiempo y consejos para la realización tanto teórica y práctica de la presente.

Al Dr. Jorge Eduardo Campos Contreras por las explicaciones, revisiones y contribuciones para el mejoramiento de este escrito.

Al Biol. Jose Luis González Barajas por el tiempo dedicado y las recomendaciones durante la revisión de este trabajo.

## DEDICATORIAS

A mi madre María Guillermina y a mi padre Jorge por su amor incondicional, sus cuidados, interés, atención, apoyo, paciencia y comprensión en todo momento. Gracias por ser mis guías y transmitirme tantos conocimientos y experiencias, por educarme siempre con el ejemplo e inculcarme valores que han hecho de mí una persona de bien. Gracias por escucharme y brindarme la confianza necesaria para desarrollarme individualmente. Gracias por mostrarse fuertes y firmes para poder levantarme y/o reprenderme cuando fue necesario. Gracias por las noches de desvelo, o los días que aún exhaustos me brindaron tiempo, por trabajar arduamente para darnos bienestar a mí y a mis hermanos. Gracias por enseñarme a luchar y a trabajar por cumplir mis metas, por defender lo que creo correcto. Sé que no me alcanzarían las palabras de tanto que quiero agradecerles y no encuentro manera de retribuirles todo lo que de ustedes he obtenido. Solo me resta decirles que este logro también es suyo.

A mis hermanos Erik y Angel por el apoyo, las risas que son las que siempre evoco, por los momentos gratos y no tanto, por la motivación y sus consejos que me han ayudado a salir siempre adelante. Deseo que se desarrollen profesionalmente, cumplan sus metas y mejoren como personas.

A mi tía Guille por escucharme y darme palabras de aliento, por la tolerancia y los debates que me enseñan otro punto de vista, por el apoyo incondicional y por siempre mantenerme al pendiente de mí y cuidarme.

En memoria de mi abuelita Conchita, por todo lo que en vida me cuidó y enseñó, seguramente estaría orgullosa de lo que he logrado.

Los Amo.

A mis entrañables e incondicionales amigos Jessy, Gaby, Beta, Alejandra, Abril, Irasema, Karina, Vanessa, Tania, Michelle, Karla, Oli, Selene, Ramses, Pedro, Carlos, Jesús, Martín, Felipe, Álvaro por su tiempo, por todos los instantes vividos, las experiencias buenas y malas, todos los recuerdos que llevo conmigo, por las pláticas y los consejos pero sobre todo gracias por ayudarme a crecer como persona y motivarme en cada etapa de mi vida en que se encontraron presentes. Los quiero.

# **ÍNDICE**

<b>RESUMEN</b>	<b>5</b>
<b>ABSTRACT</b>	<b>6</b>
<b>INTRODUCCIÓN</b>	<b>7</b>
TAQUIQUININAS Y NEUROQUININA B (NKB)	8
RECEPTOR A NEUROQUININA B	9
RECEPTOR A NEUROQUININA B Y SISTEMA NKB/NK3R EN PECES TELEÓSTEOS	12
<b>ANTECEDENTES</b>	<b>17</b>
<b>GENERALIDADES DE LA ESPECIE DE ESTUDIO</b>	<b>19</b>
<b>PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA</b>	<b>21</b>
<b>OBJETIVOS</b>	<b>22</b>
OBJETIVO GENERAL	22
OBJETIVOS ESPECÍFICOS.	22
<b>MATERIALES Y MÉTODOS</b>	<b>23</b>
<b>RESULTADOS</b>	<b>27</b>
RECEPTOR A SUSTANCIA P (TACR1)	27
RECEPTOR A NEUROQUININA BA (TAC3RA)	28
RECEPTOR A NEUROQUININA Bb (TAC3RB)	29
<b>CONCLUSIONES</b>	<b>42</b>
<b>REFERENCIAS</b>	<b>43</b>
<b>ANEXOS</b>	<b>51</b>

## RESUMEN

El receptor a neuroquinina B (NK3R) es miembro de la superfamilia de receptores acoplados a proteínas G y es codificado por el gen *tac3r*. Recientemente se ha encontrado que en algunas especies de peces teleósteos existe una duplicación de éste mismo, dando lugar a los denominados *tac3ra* y *tac3rb*. Se ha demostrado por medio de hibridación *in situ* que se localizan en el Sistema Nervioso Central (SNC), específicamente en el hipotálamo, colocalizado con las neuronas que producen Kisspeptina, Neuroquinina B y Dynorfina (Kndy), que funcionan como moduladoras de la secreción de la Hormona Liberadora de Gonadotropinas (GnRH) y por lo tanto de gran relevancia en el eje reproductivo. *Chirostoma humboldtianum* es un pez teleósteo que pertenece a la familia Atherinopsidae, es una especie endémica presente en cuerpos de agua del altiplano mexicano, con una importancia comercial y cultural en las zonas donde se presenta. Actualmente, no se encuentra reportado en esta familia la presencia de los genes *tac3ra* y *tac3rb*, pero sí en especies filogenéticamente cercanas como *Oryzias latipes* por lo que se sugiere que la especie *C. humboldtianum* también los posea. El objetivo del presente trabajo fue aislar, secuenciar y clonar los genes del receptor a neuroquinina B en el encéfalo de *C. humboldtianum*. Para ello, se colectaron organismos maduros en la laguna de Zacapu, Michoacán. Se extrajo RNA del encéfalo con ello se realizó PCR. Se obtuvieron productos de diferentes pesos moleculares (400 y 600 pb) que corresponden a los dominios transmembranales 3 al 6 del receptor *tac3ra* y a los dominios transmembranales 3 al 7 del receptor *tac3rb* junto con sus asas intracelulares y extracelulares. Estas secuencias parciales tiene similitud con el receptor *tac3ra* de *Gasterosteus aculeatus*, *Tetraodon nigroviridis*, *Oreochromis niloticus* en un 83%, 80% y 79% respectivamente, y con el receptor *tac3rb* de *Morone saxatilis*, *Gasterosteus aculeatus*, *Oryzias latipes* en un 81%, 80% y 77% de cada especie. Adicionalmente, se obtuvo la secuencia parcial del receptor a SP (*tac1r*) que pertenece junto con el *tac3r* a la superfamilia de receptores acoplados a proteínas G. El aislamiento de ambos receptores a neuroquinina B en el encéfalo de *C. humboldtianum* concuerda con lo establecido para las especies *Oreochromis niloticus* y *Danio rerio*.

Palabras clave: *Chirostoma humboldtianum*, receptor a neuroquinina B, *tac3ra*, *tac3rb*, encéfalo.

## ABSTRACT

The neurokinin B receptor (NK3R) is a member of the superfamily of G protein-coupled receptors and it is encoded by the gene *tac3r*. Recently, a duplication of this gene has been found in some species of teleost fish, resulting in the genes *tac3ra* and *tac3rb*. They have been seen in situ hybridization which are located in the central nervous system (CNS), specifically in the hypothalamus, colocalized with neurons that produce kisspeptin, neurokinin B and Dynorphin (*kndy*), which function as modulating secretion releasing Hormone (GnRH) and therefore, is of great importance in their reproductive axis. *Chirostoma humboldtianum* is a teleost fish belonging to the Atherinopsidae family. It is an endemic species present in fresh water and streams of the Mexican plateau, with a commercial and cultural importance in areas where it is present. Currently, *tac3ra* and *tac3rb* genes have been found in phylogenetically close species like *Oryzias latipes* and it is suggested that *C. humboldtianum* also holds them. The aim of this study was to isolate, sequence and clone genes of a neurokinin B receptor in the brain of *C. humboldtianum*. Mature organisms were collected from the lagoon of Zacapu, Michoacan. RNA was extracted from the brain and PCR was performed subsequently. The obtained products have different molecular weights (400 and 600 bp) corresponding to the transmembrane domains 3 to 6 of the receptor *tac3ra* and transmembrane domains 3 to 7 of receptor *tac3rb* along with the intracellular and extracellular loops. These partial sequences have similarity to the *tac3ra* with receptor of *Gasterosteus aculeatus*, *Tetraodon nigroviridis*, *Oreochromis niloticus* by 83%, 80% and 79% respectively, and the receiver similarity with *tac3rb* of *Morone saxatilis*, *Gasterosteus aculeatus*, *Oryzias latipes* 81%, 80% to 77% of each species. In addition, a partial sequence of SP receptor (*tac1r*) was obtained. This receptor belongs with the *tac3r* superfamily of G protein-coupled receptors. Isolation of both neurokinin B receptors in the brain of *C. humboldtianum* is consistent with that reported in the *Oreochromis niloticus* and *Danio rerio* species.

Key words: *Chirostoma humboldtianum*, neurokinin B receptor, brain, *tac3ra*, *tac3rb*.

## INTRODUCCIÓN

La reproducción en peces teleósteos al igual que en los mamíferos, es regulada por ritmos biológicos complejos que requieren de una coordinación fisiológica y un control hormonal por medio del eje Hipotálamo-hipófisis-gónada (HHG) (Hernández; 2006).

Respecto al control endocrino se ha considerado desde su descubrimiento que la Hormona Liberadora de Gonadotropinas (GnRH) es el factor principal de la regulación del eje reproductivo (Ogawa y Parhar, 2014).

Al ser producida la GnRH en el hipotálamo en tetrápodos, se transporta por medio del sistema portahipofisiario y en peces teleósteos, por vía directa a través de terminaciones axonales hacia la hipófisis, para cumplir su función de estimular la secreción de las gonadotropinas, es decir, la hormona luteinizante (LH) y la hormona folículo estimulante (FSH) (Gopurappilly *et al*, 2013; Macedo, 2012).

Posteriormente, las gonadotropinas se liberan hacia el torrente sanguíneo para ser transportadas a las gónadas donde, al unirse con sus respectivos receptores estimulan la secreción de esteroides sexuales y la gametogénesis (Young *et al.*, 2013).

Es por esto que se han investigado en las últimas dos décadas los procesos que participan en la síntesis, liberación y regulación de la GnRH (Topaloglu *et al.*, 2009). Fue entonces en el 2009, cuando se descubrió que el péptido dominado neuroquinina B (NKB) y su receptor (NK3R) podrían estar implicados en la cascada del eje reproductivo, al observar que sí se presentan mutaciones en cualquiera de los genes que los codifican se genera la enfermedad de hipogonadismo hipogonadotrópico en humanos (Young *et al.*, 2013, Topaloglu *et al.*, 2009).



Posteriormente, se investigó el sistema NKB/NK3R en humano (*Homo sapiens*), rata (*Rattus norvegicus*), vacas (*Bos taurus*), ratón (*Mus musculus*), oveja (*Ovis aries*) y chimpancé (*Pan troglodytes*) aislando ambos productos por PCR; y tiempo después se encontró que mantenían conservada su localización al realizar el mapeo de distribución con estudios inmunohistoquímicos en el núcleo hipotalámico arqueado donde se coexpresaba con otros péptidos (kisspeptina y dynorfina A), y su función estaba implicada en la regulación de la secreción de GnRH (Page, 2005; Navarro, 2012; Suetomi, *et al.*, 2013; Lasaga y Debeljuk, 2011; Rance *et al.*, 2010).

### **Taquiquinas y Neuroquinina B (NKB)**

La NKB forma parte de la familia de péptidos de las Taquiquinas. En ella se encuentran también la sustancia P (SP), neuroquinina A (NKA), la hemokinina-1 (HK-1) y las denominadas endoquinas. Dicha familia tiene como característica poseer 10-11 residuos de aminoácidos y un motivo carboxilo terminal en común compuesto por "Phe-X-Gly-Leu-Met-NH<sub>2</sub>", donde la X representa un residuo hidrofóbico aromático (SP) o de cadena lateral alifática (NKA y NKB), que es crítico para la unión con el receptor y su actividad biológica (Navarro, 2013; Page 2006).

Si bien las taquiquinas se distribuyen en diferentes órganos, donde regulan funciones de vasodilatación, motilidad intestinal, actividad del músculo liso, entre otras; son los péptidos de SP, NKA y NKB los que se han localizado principalmente en las estructuras neuronales en el SNC (Patacchini *et al.*, 2004).

Todos estos péptidos son producto de genes múltiples de taquininas (tac) que probablemente son el resultado de una duplicación de genes que se produjo durante la evolución de los vertebrados. El gen *tac1* produce SP y NKA, el gen *tac4* produce las endoquinas y HK-1, mientras que el gen *tac3* (*tac2* denominado en roedores) codifica a un único producto, la NKB (Young *et al.*, 2013; Rance *et al.*, 2010).

El gen *tac3* en los vertebrados se divide en siete exones, del exón 2 al 6 codifican al precursor preprotaquiquina B, que posteriormente, al realizarse escisiones proteolíticas conduce a una proneuroquinina B, que en seguida es cortada para dar lugar a la NKB. La secuencia principal de aminoácidos que le proporciona su actividad biológica es traducida por el exón 5. (Rance *et al.*, 2010; Page, 2005).

### **Receptor a Neuroquinina B**

Para cumplir sus funciones fisiológicas la NKB debe interactuar específicamente con el receptor a neuroquinina B (NK3R). Que forma parte del subtipo de receptores a neuroquinina (NKR) donde también se encuentran los receptores NK1R y NK2R (Topaloglu *et al.*, 2009).

Sin embargo, la SP y la NKA también pueden actuar como agonistas para este receptor, aunque exhiben una unión preferencial a sus respectivos receptores. El orden de rango potencial para el NK3R es de NKB > NKA > SP (Pennefather *et al.*, 2004; Navarro, 2012).

El NK3R forma parte de la súper familia 1 de los receptores acoplados a las proteínas G ligados a rodopsina. Este grupo de proteínas tiene un gran número de receptores de membrana que comparten la misma estructura: Siete dominios transmembranales (TM I-VII), tres asas extracelulares (EL1, EL2 y EL3), tres asas intracelulares (IL1, IL2 e IL3), un amino terminal extracelular y un carboxilo terminal citoplasmático (Figura 1) (Rance *et al.*, 2010).

El NK3R es el receptor más largo de los NKR debido a que se encuentra más extendido en el amino terminal, además su longitud total puede variar de especie en especie, por ejemplo: En mamíferos el NK3R en cobayo tiene 440 aminoácidos, mientras que en la rata cuenta con 452 aminoácidos y por el contrario el de humano 465 aminoácidos son los que lo conforman (Page, 2006).

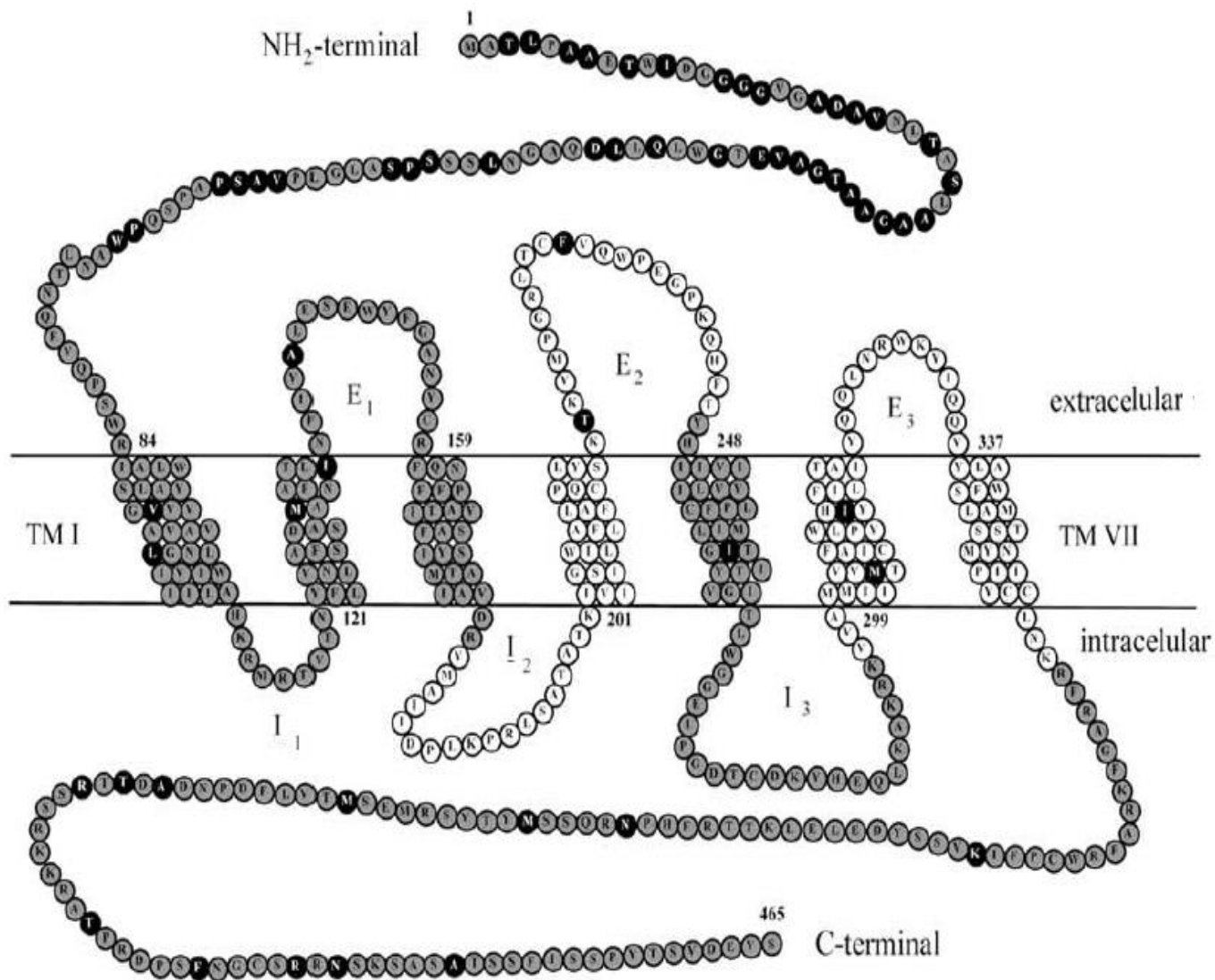


Figura 1. Estructura proteica del receptor a neuroquinina B en humano. Se muestran los dominios transmembranales (TM), las asas extracelulares (EL) y las asas intracelulares (IL). Las regiones codificadas por los exones 1,3, y 5 se muestran en gris y las regiones codificadas por los exones 2 y 4 se muestran en blanco (Modificado de Pennefather *et al.*, 2004).

Este receptor es codificado por el gen *tac3r*, que se caracteriza por poseer 5 exones. Contrariamente a muchos otros miembros de esta familia de receptores este gen contiene intrones, y se ha planteado la hipótesis de que la organización de exones puede representar unidades funcionales y/o estructurales distintas y, en

este contexto, los sitios de empalme para los exones ocurren en la frontera de las secuencias que codifican los dominios transmembranales (Hu *et al.*, 2014; Suetomi *et al.*, 2013).

En mamíferos el exón 1 codifica la región 5' sin traducción y hasta el final de TM III, el exón 2 contiene IL2, TM IV y EL2, el exón 3 contiene TM V e IL3. El exón 4 codifica para TM VI, EL3 y TM VII. Y el exón 5 contiene el extremo carboxilo terminal citoplasmático y toda la región 3' sin traducción. (Figura 2) (Suetomi *et al.*, 2013; Page, 2005; Patacchini *et al.*, 2004).

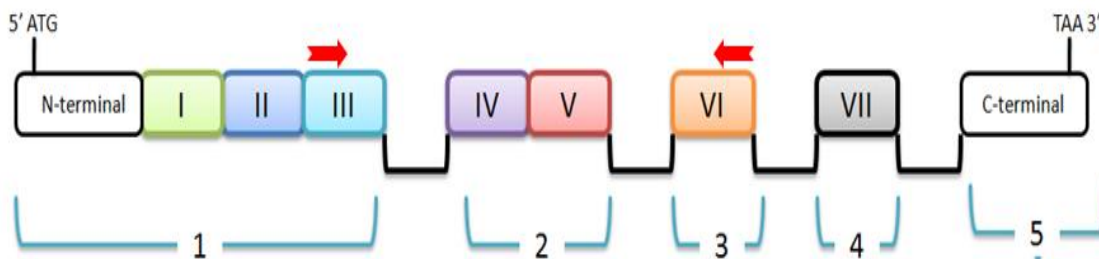


Figura 2. Estructura esquemática del gen que codifica al receptor de neuroquinina B en mamífero. La región codificante 5'-3' del amino (N) terminal, los dominios transmembranales (I-VII) y un carboxilo (C) terminal, se encuentra en cinco exones (1-5) que son interrumpidos por cuatro intrones. Las flechas indican donde se localizan los oligonucleótidos diseñados.

Aunque se prevé que especies como los caimanes (*Alligator mississippiensis*) lagartos (*Anolis carolinensis*) y gallinas (*Gallus gallus*) posean el receptor NK3R en su SNC debido a la presencia de NKB en el encéfalo de estos organismos, ha sido en mamíferos (humano, mono, oveja, rata, cabra y ratón) donde se ha desarrollado un modelo de localización del NK3R con respecto a la regulación de la hormona GnRH (Guangfu *et al.*, 2014; Page *et al.*, 2009).

Estos modelos demuestran dos sitios de localización de la expresión del gen *tac3r*: el primero ocurre en el núcleo arqueado del hipotálamo donde se encuentran las neuronas Kndy que tienen una coexpresión de NK3R, NKB, Dinorfina A (Dyn) y Kisspeptina (Kiss). Debido a esta característica NK3R puede tener un efecto regulador autocrino sobre la liberación de Kiss que se ha identificado como un potente secretagogo de GnRH. Sin embargo, se debe modular la frecuencia de

pulsos GnRH/LH-FS para ello se ha propuesto que los esteroides gonadales actúan inhibiendo a este receptor debido a su cercanía con los receptores a estrógenos alfa ( $ER\alpha$ ) y el receptor a progesterona (Figura 3) (Goodman *et al.*, 2007; Navarro *et al.*, 2009; Rance *et al.*, 2010; Guangfu *et al.*, 2014).

El segundo se encuentra en la eminencia media donde se encuentran axones que transportan GnRH para después liberarla en el sistema portahipofisiario. En esta zona se ha observado que los axones de GnRH expresan inmunorreactividad a NK3R en humano y oveja, además en neuronas GT1-7 GnRH de ratón se ha identificado mRNA de *tac3r* junto con la secreción de GnRH con la exposición de NKB a corto plazo. Comprobando que se encuentra relacionado con la modulación de la secreción de la hormona GnRH (Rance *et al.* 2010; Satoshi *et al.* ,2012; Young *et al.*, 2013; Duarte *et al.*, 2006).

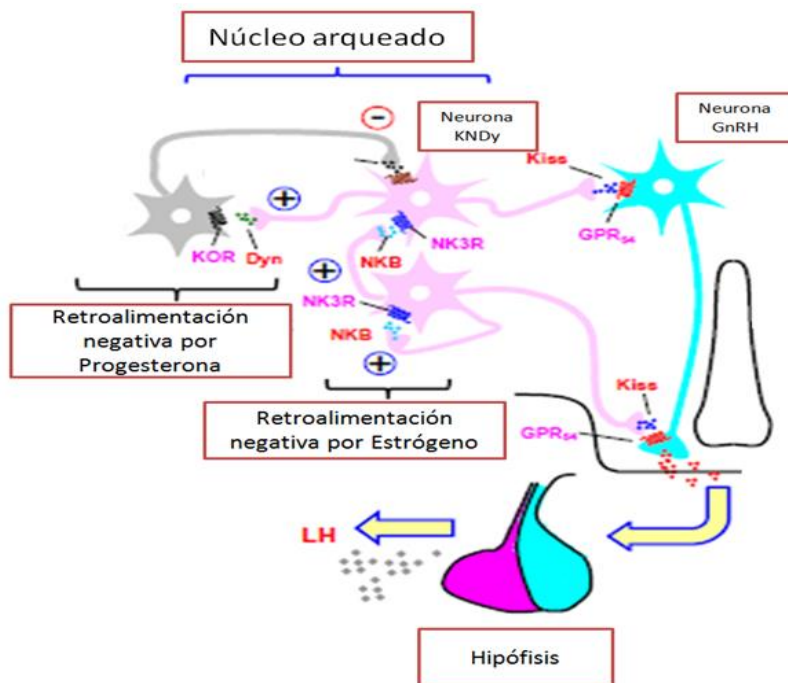


Figura 3. Modelo de neuronas Kndy en el núcleo arqueado de organismos maduros. Aquí NKB se une al receptor NK3R y estimula la secreción de Kiss. Posteriormente Kiss se une a su receptor GPR54 en las neuronas GnRH, estimulando su liberación hacia la hipófisis por el sistema portahipofisiario para generar LH. Existen dos retroalimentaciones negativas que modulan todo este sistema: una por progesterona y otra por estrógeno. (Modificado de Guangfu *et al.*, 2014).

### Receptor a neuroquinina B y sistema NKB/NK3R en peces teleósteos

El interés en el NK3R y su ligando en modelos de peces surgió al identificar por primera vez los genes que los codifican en el pez cebra (*Danio rerio*). Hasta el momento se encuentran publicados un total de 9 artículos respecto al tema, sin embargo solo los trabajos de Biran y colaboradores 2012 y 2014; Guangfu y colaboradores 2014; Hu y colaboradores 2014; Zhou y colaboradores del 2012 cuentan con información respecto al NK3R en peces teleósteos.

Hasta la fecha se ha logrado identificar el NK3R en el pez cebra (*Danio rerio*), Tilapia (*Oreochromis niloticus*), carpa china (*Ctenopharyngodon idella*), puffer verde (*Tetraodon nigrovidiris*), pez globo (*Takifugu rubripres*), medaka (*Oryzias latipes*) y carpa (*Cyprinus carpio*) en los cuales se observa que la organización estructural de un amino terminal, siete dominios transmembranales, asas intracelulares, extracelulares y un carboxilo terminal se conserva como en mamíferos (Biran *et al.*, 2012; Biran *et al.*, 2014; Hu *et al.*, 2014, Zhou *et al.*, 2012).

Como menciona Guangfu y colaboradores 2014 y Zhou y colaboradores 2012 en peces teleósteos se ha encontrado que existe una duplicación de genes *tac3r*, dando lugar a los genes *tac3ra* y *tac3rb*, con la característica de presentar una conformación conservada de 5 exones y 4 intrones presente en mamíferos; con la diferencia que, en peces se conoce que el exón 2 es el que codifica a los dominios transmembranales 3 y 4.

Aunque ambos genes codifican al mismo receptor acoplado a proteínas G, sus diferencias radican en la longitud de nucleótidos y por lo tanto la cantidad de aminoácidos traducidos, en la posición de los sitios que ayudan a su conformación estructural o a la transducción de señales (de N-glicosilación, fosforilación de la proteína cinasa C, de fosforilación de la proteína cinasa dependientes de AMPc y GMPc, de fosforilación caseína cinasa II, de fosforilación de tirosina cinasa y de N-miristoilación) y en la ubicación y la expresión que presentan en diferentes órganos (Biran *et al.*, 2012).

Entre el pez cebra y tilapia se ha observado una diferencia en la localización y la expresión relativa de los genes *tac3ra* o *tac3rb*. En pez cebra en el cerebro y la

hipófisis, existe expresión de *tac3ra* y *tac3rb*, específicamente ambos se localizaron en el telencéfalo, el *tectum* óptico e hipotálamo, pero en el cerebro posterior las mediciones de *tac3rb* son nulas (Biran *et al.*, 2012; Zhou *et al.*, 2012). En cambio en la tilapia la expresión de *tac3rb* es superior en EL cerebro anterior, medio y posterior que la de *tac3ra*, encontrando el máximo nivel de expresión de *tac3rb* en el cerebro posterior y el mínimo nivel de *tac3ra* en la hipófisis (Biran *et al.*, 2014; Hu *et al.*, 2014).

En tilapia se registró que *tac3ra* y *tac3rb* se encuentran expresados en la *pars distalis proximalis* de la adenohipófisis además se hizo una colocalización con las células gonadotropas de tilapia, dando positiva la reacción inmunofluorescente. De la misma manera en el pez cebra se observó niveles de expresión génica del NK3R en la hipófisis donde también se obtuvieron señales de transcripción del ligando, y se observó un aumento en la secreción de LH cuando fueron incubadas con NKB. (Biran *et al.*, 2014; Zhou *et al.*, 2012). A diferencia del pez cebra, cuando se realizaron estudios de tratamientos de NKB en células de la hipófisis de carpa no se observó un cambio en la producción de LH, en cambio se obtuvo respuesta de secreción de somatolactina (SL) medida por el NK3R, lo que nos habla de una diferencia funcional del sistema NKB/NK3R en la hipófisis dependiendo de la especie (Hu *et al.*, 2014)

Por otro lado, en el pez cebra se demostró por hibridación *in situ* que las poblaciones neuronales NKB y Kiss se encuentran separadas dentro de la habénula e hipotálamo, y no en el *tuberis lateralis* que se considera como la estructura homóloga del núcleo arqueado en mamíferos (Biran *et al.*, 2012; Guangfu *et al.*, 2014).

Sin embargo no se excluye la posibilidad de las interacciones funcionales de NKB y las neuronas kisspeptina para desempeñar un papel en la regulación de GnRH debido a la localización de distintos neuropeptidos: NKB, Kiss, GPR54, receptor de la leptina, la hormona concentradora de melanina, dos receptores de melanina, entre otros en la zona ventral del hipotálamo periventricular, lo que sugiere que las

vías de neuropéptidos no se encuentran conservadas del todo y requieren mayor investigación en modelos de peces (Zhou et al., 2012; Biran *et al.*, 2012).

Respecto a la transducción de la señal en modelos de peces es similar a la presente en mamíferos. Después de adoptar una configuración helicoidal y dejar expuesto el motivo carboxilo terminal "FXGLM" de la NKB y permitir la unión con los TM VI y VII se desencadena la señalización del receptor a través de las proteínas Go o Gq/11 (Guangfu *et al.*, 2014).

Al separarse los complejos de la proteína G ocurre la activación de la adenilato ciclasa, que aumentan los niveles intracelulares de adenosinmonofosfato cíclico y la activación de la proteína cinasa A, pero también puede ocurrir la activación de la fosfolipasa C, que permite la formación de inositol trifosfato y de diacil glicerol provocando el aumento de la concentración de calcio ( $Ca^{2+}$ ) intracelularmente y la activación de la proteína cinasa C, que al igual que la proteína cinasa A, realiza eventos de fosforilación de otros complejos proteicos que permitan continuar con la vía de señalización (Figura 4) (Biran *et al.*, 2012; Biran *et al.*, 2014; Zhou *et al.*, 2012).

Se ha propuesto que ocurra con las proteínas RAS que pueden generar la activación de las proteínas cinasas activadas por mitógenos (MAPK), las cuáles son capaces de traslocarse al núcleo para regular la transcripción de GnRH o de Kiss. El mecanismo exacto del proceso mediante el cual NKB regula la liberación de GnRH en peces aún no se ha esclarecido por completo (Figura 4) (Satake *et al.*, 2003; Guangfu *et al.*, 2014).



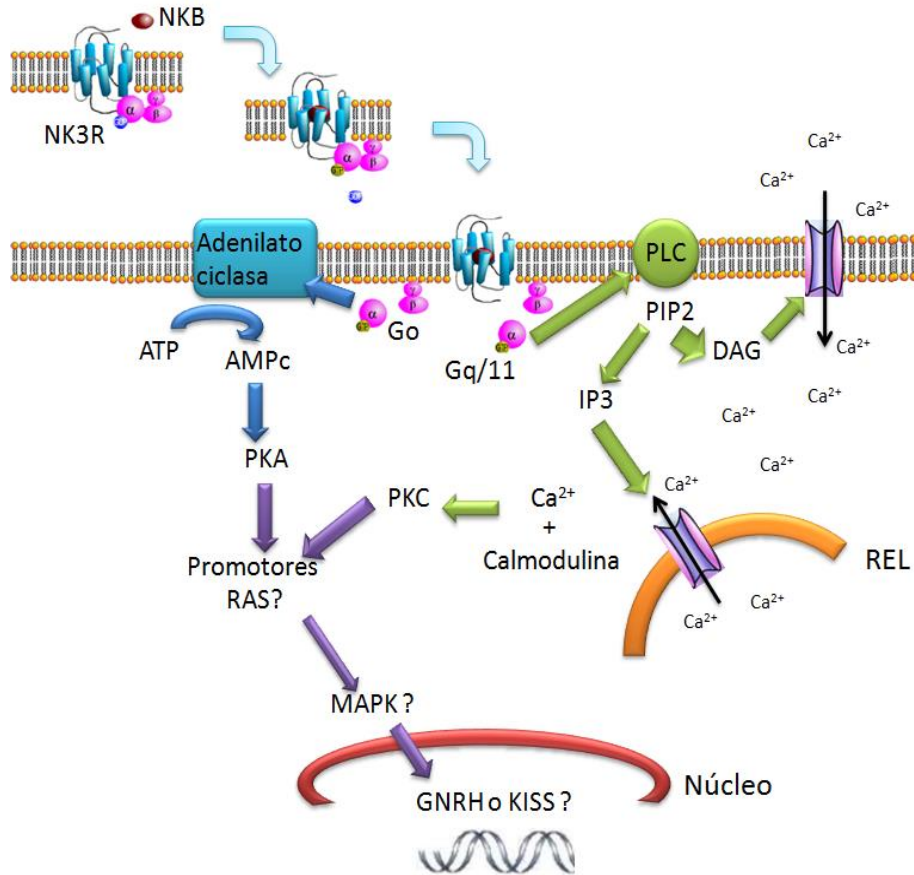


Figura 4. Modelo propuesto de la transducción de señal del NK3R. La unión del ligando NKB con el receptor NK3R provoca el cambio conformacional en la proteína Go o Gq/11, el GDP cambia por un GTP en la subunidad  $\alpha$  y las subunidades  $\alpha$ ,  $\beta$  y  $\gamma$  se separan. La subunidad de la proteína Go se une a la adenilato ciclasa provocando por medio de adenosintrifosfato (ATP) la formación adenosin monofosfatocíclico (AMPc), y éste activa a la proteína cinasa A (PKA) u ocurre la unión de la subunidad de la proteína Gq/11 a la fosfolipasa C (PLC) provocando la formación de inositoltrifosfato (IP3) diacilglicerol (DAG) a partir del la hidrolisis de fosfatidilinositol 4,5-bifosfato (PIP2) que permiten el aumento de Calcio ( $\text{Ca}^{2+}$ ) al interior de la célula a través la apertura de canales membranales o canales del retículo endoplasmático liso. El  $\text{Ca}^{2+}$  se une a la calmodulina y activa a la proteína cinasa C (PKC). PKA y PKC pueden fosforilar los llamados promotores que se propone sean proteínas RAS que activan proteínas quinasas activadas por mitogenos (MAPK) que a su vez pueden entrar al núcleo y regulan la transcripción de kisspeptina (Kiss) o la hormona liberadora de gonadotropinas (GnRH). Sin embargo es un proceso no del todo claro actualmente (?)

## Antecedentes

Para comprender el sistema NKB/NK3R en los peces, se han utilizado a diferentes especies de teleósteos como modelos de estudio.

Zhou y colaboradores (2012) para vislumbrar la evolución del gen *tac3* y los genes del receptor *tac3r* localizaron y clonaron secuencias de ADNc de longitud completa que codifican a *tac3* (*tac3a* y *tac3b*) y *tac3r* (*tac3ra1*, *tac3ra2*, *tac3rb*) en el pez cebra (*D. rerio*). El análisis de las secuencias demostró que los genes *tac3ra* y *tac3rb* estaban presentes en las especies Tilapia (*O. niloticus*), carpa china (*C. idella*), puffer verde (*T. nigrovidiris*), pez globo (*T. rubripes*), medaka (*O. latipes*) todas registradas en la base de datos GeneBank. Estudios en la distribución tisular revelaron que *tac3* y *tac3r* se expresan principalmente en las regiones del cerebro, concluyendo que los múltiples genes *tac3* y *tac3r* identificados en los vertebrados evolucionaron a partir de eventos de duplicación de genes de la familia de las taquininas y que los sistemas *tac3/tac3r* también operan en teleósteos.

Biran y colaboradores (2012) para estudiar la conservación evolutiva y las funciones fisiológicas de la NKB usaron como modelo de estudio al pez cebra (*D. rerio*), en donde identificaron los genes de la taquinina B (*tac3a* y *tac3b*) y de su receptor (*tac3ra* y *tac3rb*) clonando dos formas de ADNc. Analizando estos resultados encontraron que filogenéticamente *tac3* y los genes de mamífero de neuroquinina, surgen de un mismo linaje. En el análisis de presencia/ausencia en el desarrollo del pez cebra observaron que *tac3a* se expresaba de forma asimétrica en la habénula en embriones, mientras que en los adultos, las neuronas *tac3a* fueron localizados en los núcleos cerebrales específicos que se sabe que están implicados en la reproducción.

Hu y colaboradores en el 2014 emplearon como modelo de estudio a la carpa (*C. carpio*) para demostrar los efectos directos y la vía de señalización de los dos productos *tac3* que fueron analizados a nivel de la pituitaria. Se obtuvieron y clonaron los genes de *tac3*. En las células de la pituitaria los tratamientos con NKB no afectaron la liberación de LH, pero se observó un aumento de somatolactina

alfa ( $SL\alpha$ ). Respecto a la señal de transducción se comprobó que la respuesta esta mediada por la unión a NK3R y la vía por la adenilato ciclasa/AMPC/proteína quinasa A, la fosfolipasa C/ 1,4,5-inositol trifosfato/ proteína quinasa C y ( $Ca^{2+}$ )/ calmodulina dependiente de la proteína quinasa de activación II. Lo que demuestra que el sistema NKB/NK3R no juega un papel en la regulación de LH en el nivel de la hipófisis en especies de carpa.

Nuevamente, Biran y colaboradores en el 2014, estudiaron el papel de NKB en la especie *O. niloticus* (tilapia). Identificaron específicamente el sistema NKB/NK3R en la hipófisis de tilapia. Dichos autores reportan con un análisis filogenético y bioinformático que tilapia tiene 1 gen putativo tac3 y dos genes del NK3R (tac3ra y tac3rb) que se agrupan con otros tac3 y linajes de receptores de NKB. También observaron el aumento de los niveles plasmáticos de FSH y LH al inyectar intraperitonealmente tiNKB, siendo más eficaz este aumento en células de LH que poseen tac3ra y tac3rb, a un mayor grado que aquellas productoras de FSH. Con todos estos datos concluyeron que el sistema tac3r/NKB tiene como función una regulación paracrina/autocrina en la liberación de gonadotropinas en la hipófisis de pez.

## Generalidades de la especie de estudio

El pez blanco *Chirostoma humboldtianum* se ha convertido en un modelo de estudio importante para distintas investigaciones relacionadas con la endocrinología, crecimiento y alimentación de peces. Algunas de ellas son las relacionadas con el crecimiento, mortalidad y sobrevivencia del charal (Sánchez-Merino *et al.*, 2007); el desarrollo ovárico y su relación con los niveles hormonales circulantes de  $17\beta$ -estradiol y  $17\alpha$ -hirdroxiprogesterona durante el primer ciclo reproductivo en hembras (Blancas-Arroyo, 2007); la alimentación en el estanque JC en soyaniquilpan, estado de México (Fernández *et al.*, 2008); la estructura y ultraestructura de sus ovocitos (Cárdenas *et al.*, 2008); La distribución de la hormona GnRH de salmón (sGnRH) en el cerebro anterior (Chávez, 2009); el aislamiento, secuenciación y clonación de GnRH de peje (Macedo, 2012); la distribución del polipéptido activador de la adenilatociclasa de la pituitaria (PACAP) en las gónadas (González, 2010); la distribución de la isoforma de sGnRH en las gónadas (Toribio, 2010); sobre el polipéptido activador de la adenilatociclasa de la pituitaria (PACAP) (Chávez y Cárdenas, 2012); el aislamiento y secuenciación de receptores a estrógeno en encéfalo (Muñoz-Osnaya, 2016) o la secuencia completa de DNA mitocondrial (Barriga-Sosa *et al.*, 2016).

El interés presente en las investigaciones de esta especie se relaciona a que forma parte de un género que está compuesto de un número de especies consideradas representativas y endémicas de México (Muñoz, 2011; Martínez-Palacios *et al.*, 2002). Originalmente la especie tenía una amplia distribución en el altiplano, encontrándose en el Río Lerma, Santa María y San Pedro, además de los lagos de los estados de Michoacán, Nayarit y Jalisco (Fernández *et al.*, 2008, Blancas-Arroyo, 2007; Paulo-Maya *et al.*, 2000).

*C. humboldtianum*, taxonómicamente pertenece a la familia Atherinidae y se ha propuesto que filogenéticamente fuera el ancestro que dio origen a las especies con mayor talla en cuanto al género (Martínez *et al.*, 2006). Se conoce que el crecimiento de esta especie es lento y alcanza su primera madurez sexual al llegar

a una talla de 11 a 13 cm y a partir de este momento se considera que los meses de madurez gonadal abarcan de marzo a septiembre presentando varios desoves durante esta temporada y no cuentan con un dimorfismo sexual para su diferenciación (Rojas y Sasso, 2005; Blancas-Arroyo,2007).

El pez blanco en México tiene una alta importancia cultural, debido a que el consumo de esta especie permitió el establecimiento de diferentes culturas en el altiplano mexicano y lagos del valle en la época prehispánica (Sánchez,1992).

Actualmente, estos peces siguen desempeñando un papel importante en el consumo y como fuente de proteínas en muchas familias de las localidades cercanas a donde se encuentran (Hernández, 2006;Barriga-Sosa *et al.*, 2016). Por lo tanto, también se han explotado como recurso natural y se les ha implementado un valor en el comercio local como producto fresco o productos derivados del mismo, algunos reportes estiman que su precio puede llegar hasta los 430 pesos por kilo lo que permite el sustento de dichas familias (Martínez-Palacios *et al.*, 2002).

Sin embargo, durante las últimas décadas, se ha mermando la amplitud de distribución y de sus poblaciones drásticamente en las regiones en que se presentaba (Blancas, 2007; Rojas y Sasso, 2005). Las poblaciones de peces blancos se han visto amenazadas debido a la modificación de su hábitat original, a la sobrepesca, a la contaminación de los cuerpos de agua y a la introducción de especies exóticas o diseminadas (Fernández *et al.*, 2008).

Otra de las desventajas que presenta dicha especie es que su domesticación y cultivo no se han logrado por el desconocimiento de sus necesidades ecológicas y biológicas respecto a su crecimiento, desarrollo y reproducción, aunado a su alto grado de hipersensibilidad a los estímulos ambientales (Blancas-Arroyo *et al.*, 2014).

## Planteamiento del problema

Ha quedado de manifiesto la importancia del sistema NKB/NK3R en el eje reproductivo en los mamíferos (Topaloglu *et al.*, 2009; Lasaga y Debeljuk, 2011; Rance *et al.*, 2010) y se ha empezado a investigar si este sistema cuenta con las mismas características en modelos de estudio en peces. Actualmente, existe poco conocimiento acerca de los receptores a Neuroquinina B, como su presencia, su conformación tanto molecular como estructural, modo de acción, señales de transducción y papel evolutivo, en diferentes grupos de peces teleósteos.

Respecto a lo anterior, se destaca que no se cuentan con registros sobre la presencia ni la conformación del o los genes que codifican al receptor a neuroquinina B en la familia Atherinopsidae, por lo que conocer esta información impulsaría las investigaciones del sistema NKB/NK3R y su papel endocrinológico en el eje reproductivo.

Por último, debido a que la especie *C. humboldtianum* posee gran valor cultural, comercial y biológico es necesario contar con los conocimientos endocrinológicos de la biología reproductiva, en este caso del conocimiento del gen codificante al receptor a neuroquinina B, para permitir diseñar mecanismos biotecnológicos para el mejoramiento de la tasa de reproducción, la maduración gonadal o a la creación e incorporación de NKB en la acuicultura a futuro (Muñoz, 2011). Y así lograr la reproducción controlada y sistemática en cautiverio, además, de contribuir en el rescate, conservación y aprovechamiento de esta especie endémica de nuestro país.

## **OBJETIVOS**

### **Objetivo General**

Aislar, secuenciar y clonar los receptores a neuroquinina B (tac3r), en el cerebro de *Chirostoma humboldtianum*.

### **Objetivos específicos.**

- 1) Aislamiento de los receptores a neuroquinina B en el cerebro de *C. humboldtianum*.
- 2) Secuenciarlos receptores a neuroquinina B en el cerebro de *C. humboldtianum*
- 3) Clonarlos receptores a neuroquinina B en el cerebro de *C. humboldtianum*

## MATERIALES Y MÉTODOS

Los organismos sexualmente maduros de la especie *C. humboldtianum* fueron colectados en la laguna de Zacapu, Michoacán (Figura 5) en los meses de abril, mayo, septiembre del 2015 y marzo del 2016 por el método de chinchorro con ayuda de pescadores de la cooperativa local.



Figura 5. Mapa de la ubicación del área de estudio, Zacapu Michoacán 19°48'58" N, 101°47'26" W, altitud 1,887 msnm (Obtenido de Google Maps-INEGI).

Los ejemplares fueron anestesiados con MS-222 (Sigma®) y posteriormente sacrificados. Los organismos a utilizar se seleccionaron con base a su talla (11 a 13 cm de longitud) para después ser separados en lotes de hembras y machos, utilizando para ello la extracción manual de ovocitos o líquido seminal (Figura 6). Acto seguido, los encéfalos fueron extraídos y se colocaron en tubos Eppendorf 1.5 ml (previamente tratados con dietil-pirocarbonato). Las muestras fueron puestas en hielo seco para su conservación y su posterior traslado al laboratorio



de Endocrinología de peces en la Unidad de Morfofisiología y Función de la Facultad de Estudios Superiores Iztacala.



Figura 6. Organismos de *Chirostomahumboldtianum*

En el laboratorio, se realizó la extracción de ARN total de los encéfalos por medio de Trizol basada en la técnica fenol-cloroformo- isotiocianato (Chomczynski y Sacchi, 1987) y su integridad se verificó por medio de un gel de agarosa al 1%, teñido con Midori Green NipponGenetics® (Figura 7).

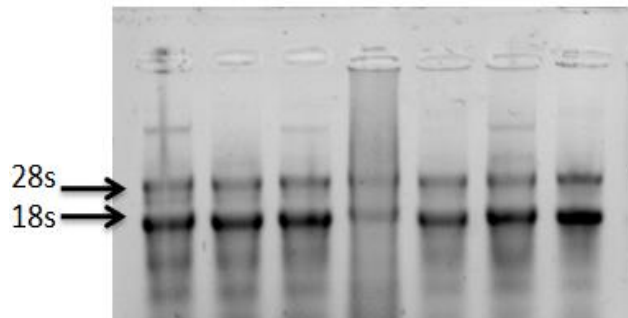


Figura 7. Electroforesis en gel de agarosa al 1%teñido con Midori Green para la verificación de la integridad de los RNA's totales aislados

Para realizar las amplificaciones por PCR se diseñaron oligonucleótidos específicos para las secuencia de *tacr3* (Tabla 1) tomando como base una secuencia consenso realizada con las especies de peces filogenéticamente cercanas.

1. *tacr3ra*: *O. niloticus* (NM\_001301378), *T. rubripes* (NM\_001280097), *O. latipes* (NM\_001278910), *D. rerio* (NM\_001256638), *Poecilia mexicana* (XM\_015005556.1) y *Astyanax mexicanus* (XM\_007235686.2) (Anexo 1).

2. tac3rb: *D. rerio* (JF317293.1), *O. latipes* (NM\_001278874.1), *T. nigroviridis* (BK008097.1), *T. rubripes* (NM\_001280112.1), *O. niloticus* (KF471675.1), *A. mexicanus* (XM\_007235686.2) y *P. mexicana* (XM\_015005556.1) (Anexo 2).

Oligos	Secuencia 5'-3'	Posición (nucleótidos)
F2RA	AATTCCACAACCTTCTTCC	296-314
R2RA	TTCACAACCTTCCTCTTA	706-724
F5RB	TYCACAACCTTCTTCCCN	302-320
R6RB	TTCACCACCTTCCTYTDD	704-722

Tabla 1. Oligonucleótidos diseñados para el aislamiento de la secuencia de tacr3 y región donde se localizan.

Las amplificaciones de PCR se realizaron con dos métodos diferentes: En el primero, una vez extraído el RNA, se sintetizó el cDNA de acuerdo con la metodología del kit SuperScriptIII RT (Invitrogen®). Ya obtenido, se utilizó en reacciones de amplificación por PCR con las condiciones por Lopez-Bedillo *et al.*, 2013: precorrida 95°C 5 minutos, 40 ciclos de desnaturalización 95°C 1 minuto, con modificaciones en el alineamiento de 56.8°C por 45 segundos y la extensión 72°C 3 minutos; y por último un ciclo con una extensión final de 72°C por 7 minutos.

Para el segundo método se utilizó el kit SuperScriptIII One-Step RT-PCR System with Platinum Taq DNA polymerase (Invitrogen®) y se siguió el protocolo descrito. En este método se ingresa el RNA total extraído junto con los componentes del kit para que se realice la síntesis del cDNA y las amplificaciones del PCR en conjunto. Por lo tanto las condiciones empleadas fueron las siguientes: síntesis de cDNA en un ciclo de 58°C por 30 minutos, una precorrida de 94°C por 2 minutos, 40 ciclos de desnaturalización a 94°C por 15 segundos, alineamiento a 53°C por 1 minuto, extensión a 68°C por minuto y medio; y un ciclo para una extensión final de 68°C por 5 minutos.

Los productos obtenidos fueron verificados por electroforesis en geles de agarosa al 1% y teñidos con Midori Green NipponGenetics® y purificados por columna a

través del MinElute Gel Extracción Kit QIAGEN® siguiendo las indicaciones de protocolo descrito. De la misma manera los productos purificados fueron verificados en un gel de agarosa al 1% y se secuenciaron en a un secuenciador automático Perkin Elmer ABI 3100.

Los tres productos obtenidos se clonaron, utilizando el protocolo del kit pGEM-Easy Vector system® (Promega), las colonias seleccionadas fueron purificadas con el protocolo del kit Wizard Plus SV Minipreps DNA PurificationSystem® (Promega) para después realizar PCRs con las condiciones que respectan a cada receptory su posterior verificación en un gel de agarosa al 1% con Midori Green® (Figura 8).

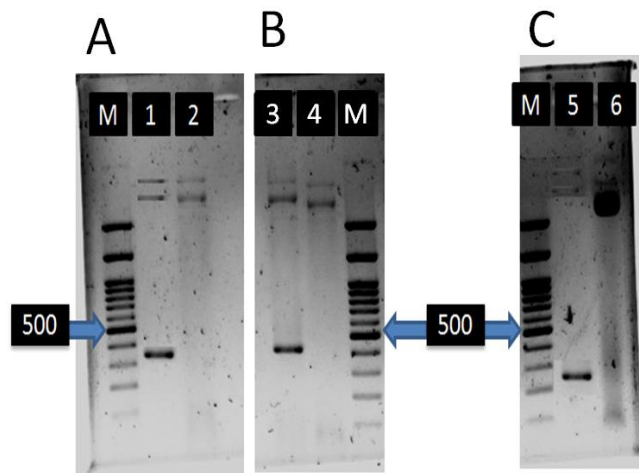


Figura 8. Electroforesis en gel de agarosa al 1% teñido con Midori Green para verificar las clonaciones de los productos tac1r, tac3ra y tac3rb. M) Marcador de peso molecular. En A) 1) Producto tac1r. 2) Plásmido del producto tac1r. En B) 3) Producto tac3ra. 4) Plásmido del producto tac3ra. En C) 5) Producto tac3rb. 6) Plásmido del producto tac3rb.

Las secuencias obtenidas se analizaron usando BLAST (versión 2.0, National Center for Biotechnology Information), se utilizó la base de datos GenBank, Bio Edit Sequence Alignment Editor (versión 7.2.5), y Geneious R9 (versión 9.1.3).

## RESULTADOS

### Receptor a sustancia P (*tacr1*)

Utilizando el primer método para las amplificaciones de PCR antes descritas con los oligos F5RB-R6RB se logró obtener un producto de aproximadamente 350 pb. (Figura 9).

Analizando la secuencia obtenida de 301pb en la base de datos del GenBank se encontró para *C. humboldtianum* la parte codificante del dominio III al V del gen de *tacr1* (Figura 9).

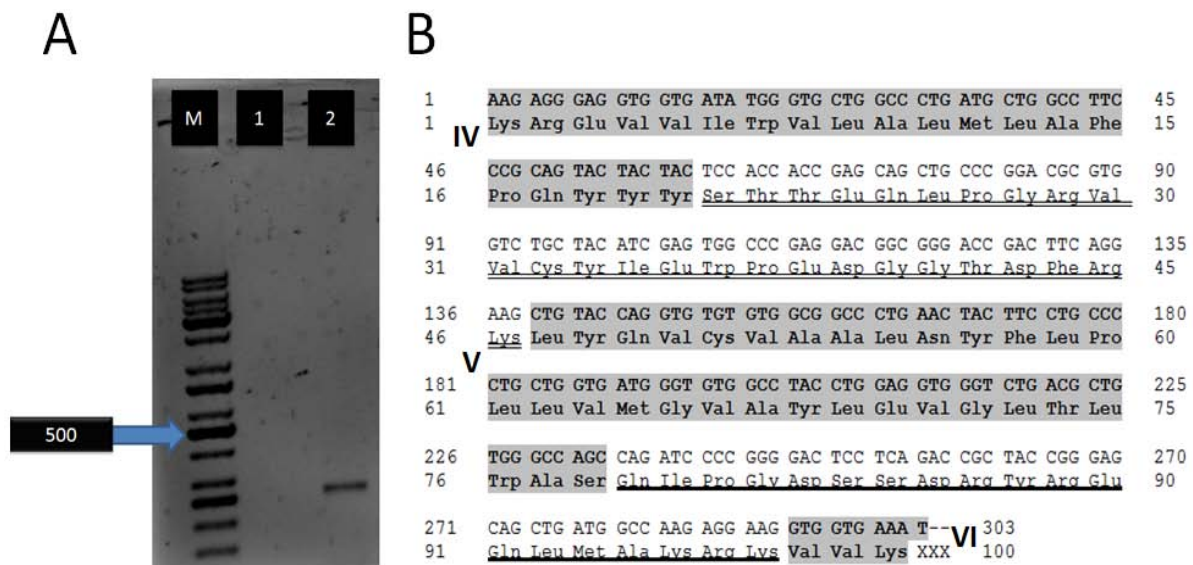


Figura 9. Electroforesis de un gel de agarosa al 1% teñido con Midori Green. M) Marcador de peso molecular 50 pares de bases (pb). 1) Control negativo. 2) Producto de aproximadamente 400 pb. B: Secuencia obtenida de 301pb. De gris se localizan las zonas codificantes de los dominios transmembranales (III, VI, V), subrayado de la asa intracelular 2 y en doble subrayado el asa extracelular 2 que corresponden a la secuencia parcial del receptor de sustancia P (*Tacr1*).

Utilizando el segundo método con el protocolo del kit SuperScript III One-Step RT-PCR y los juegos de oligos F2RA/R2RA y F5RB/R6RB se obtuvo un bandeo inespecífico. Posteriormente, por el peso del amplicón esperado de aproximadamente 300 a 400 pb se eligieron dos bandas que se purificaron y mandaron a secuenciar (Figura 10).

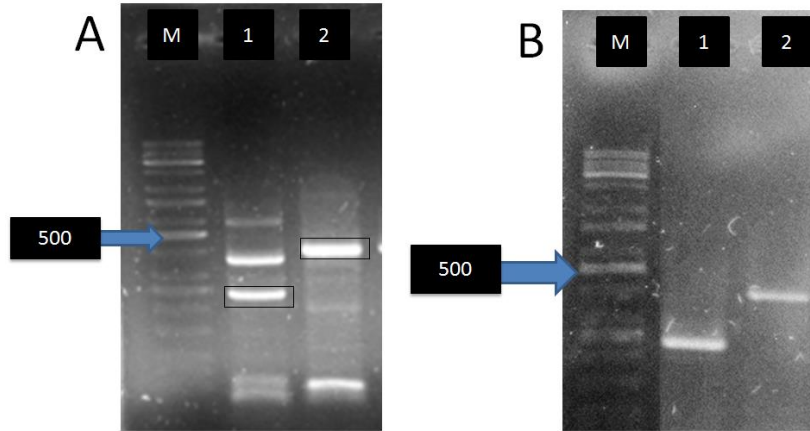


Figura 10. Electroforesis gels de agarosa 1% con Midori Green. A. Muestras de RT-PCR Las bandas señaladas fueron seleccionadas para su posterior purificación. B. Bandas purificadas y secuenciadas. M) Marcador. 1) Muestra con oligos F5RB-R6RB. 2) Muestras con Oligos F2RA-R2RA).

### Receptor a neuroquinina Ba (*tac3ra*)

Con los oligos F2RA y R2RA se obtuvo una secuencia de 396 pb que codifican 132 aminoácidos y pertenece al gen reportado del receptor a Neuroquinina Ba (*tac3ra*) en la base de datos de NCBI (Figura 11).

1	III	TAC TCT ATG GCG GCG ATA GCC ATA	GAC AGG TAT ATG GCA ATC ATC	45
1		Tyr Ser Met Ala Ala Ile Ala Ile	Asp Arg Tyr Met Ala Ile Ile	15
46		CAT CCT CTC AAG CCT CGT CTG TCA GCC CGA GCC ACC ATC	GGA GTT	90
16		His Pro Leu Lys Pro Arg Leu Ser Ala Arg Ala Thr Ile	Gly Val	30
91		ATA TTA TTC ATC TGG AGC CTC GCA GTT ATT CTG GCC TTC CCC CTT		135
31		Ile Leu Phe Ile Trp Ser Leu Ala Val Ile Leu Ala Phe Pro Leu		45
	IV			
136		TGC TAC TTC TCC ACC ACG CGG ACA CTA	CCA GGC AGG ACC TTT TGT	180
46		Cys Tyr Phe Ser Thr Thr Arg Thr Leu	Pro Gly Arg Thr Phe Cys	60
181		TAC GTG GCC TGG CCC CGC ATG GCT GAT GAC CCC	TTC ATG TAT CAC	225
61		Tyr Val Ala Trp Pro Arg Met Ala Asp Asp Pro	Phe Met Tyr His	75
226		ATC ATA GTA ACA GTC CTG GTG TAT CTG CTG CCG CTG GTG GTG ATG		270
76		Ile Ile Val Thr Val Leu Val Tyr Leu Leu Pro Leu Val Val Met		90
	V			
271		GCC ATT ACT TAC ACC ATT GTT GGA GTG TCG CTG TGG GGA	AGC GAG	315
91		Ala Ile Thr Tyr Thr Ile Val Gly Val Ser Leu Trp Gly	Ser Glu	105
316		ATC CCT GGA GAC TCA TCT GAC AAC TAT CAT GGA CAG CTC CGT GCT		360
106		Ile Pro Gly Asp Ser Ser Asp Asn Tyr His Gly Gln Leu Arg Ala		120
361		AAA AGG AAG GTG GTG AAG ATG ATG ATC ATT GTG GTG		396
121		Lys Arg Lys Val Val Lys Met Met Ile Ile Val Val	VI <sub>132</sub>	

Figura 11. Secuencia en nucleótidos y aminoácidos de *tac3ra* para *C. humboldtianum*. Los dominios transmembranales III, VI, V y VI se encuentran en color gris, mientras que las asas intracelulares 2 y 3 se encuentran subrayadas y el asa extracelular 2 en doble subrayado.

### Receptor a neuroquinina Bb (tac3rb)

Con los oligos F5RB y R6RB se secuenció un fragmento de 375 pb, que corresponden 125 aminoácidos de la secuencia de los dominios transmembranales del III al VI que componen la estructura del receptor a neuroquinina Bb (Figura 12).

1	TCT ATG GCG GCG ATT GAC TTA GAC AGG	TAT ATG GCA ATC ATC CAT	45
1	<u>Ser Met Ala Ala Ile Asp Leu Asp Arg</u>	<u>Tyr Met Ala Ile Ile His</u>	15
46	CCT CTC AAG CCT CGT CTG TCA GCC CAA CAC ACC	ATC GGA GTT ATA	90
16	<u>Pro Leu Lys Pro Arg Leu Ser Ala Gln His Thr</u>	<u>Ile Gly Val Ile</u>	30
91	TTA TTC ATC TGG AGC CTC GCA GTT ATT CTG GCC TTC CCC CTT TGC		135
31	<u>Leu Phe Ile Trp Ser Leu Ala Val Ile Leu Ala Phe Pro Leu Cys</u>		45
	<b>IV</b>		
136	TAC TTC TCC ACC ACG CGG	ACA CTA CCG GGC AGG ACC TTT TGT TAC	180
46	<u>Tyr Phe Ser Thr Thr Arg</u>	<u>Thr Leu Pro Gly Arg Thr Phe Cys Tyr</u>	60
181	GTG GCC TGG CCC CGC ATG CCT GAT GAC CCC	TTC ATG TAT CAT ATC	225
61	<u>Val Ala Trp Pro Arg Met Pro Asp Asp Pro</u>	<u>Phe Met Tyr His Ile</u>	75
226	AGA GTA ACA GTC CTG GTG TAT CTG CTG CCG CTG GTG GTG ATG GCC		270
76	<u>Arg Val Thr Val Leu Val Tyr Leu Leu Pro Leu Val Val Met Ala</u>		90
	<b>V</b>		
271	ATT ACT TAC ACC ATT GTT GGA GTG	TCG CTG TGG GGA AGC GAG ATC	315
91	<u>Ile Thr Tyr Thr Ile Val Gly Val</u>	<u>Ser Leu Trp Gly Ser Glu Ile</u>	105
316	CCT GGA GAC TCA TCT GAC AAC TAT TAT GGA CAG CTC CGT GCT AAG		360
106	<u>Pro Gly Asp Ser Ser Asp Asn Tyr Tyr Gly Gln Leu Arg Ala Lys</u>		120
361	AGG AAG GTT GTG AAA	<b>VI</b> <sup>375</sup>	
121	<u>Arg Lys Val Val Lys</u>	125	

Figura 12. Composición de aminoácidos y nucleótidos del receptor a neuroquinina Bb para *C. humboldtianum*. Los dominios transmembranales III, VI, V, VI se encuentran en color gris, subrayadas las asas intracelulares 2 y 3, en doble subrayado el asa extracelular 2.

## DISCUSIÓN

En este trabajo se aisló por primera vez en *C. humboldtianum* el gen del receptor a sustancia P (tac1r) y los genes codificantes al receptor a neuroquinina B (tac3ra y tac3rb)

La primera secuencia encontrada mostró porcentajes de similitud con el gen tacr1 de *T. nigroviridis*, *T. rubripes*, *P. mexicana*, *G. aculeatus*, con las cuales está filogenéticamente relacionada (Tabla 2). El gen tac1r codifica al receptor NK1R que es considerado el receptor de la sustancia P, conservado en todos los vertebrados (Satoshi *et al.*, 2012).

Gaddy colaboradores en el 2003; Commons 2010; y López-Bedillo en el 2013 mencionan que el tac1r se encuentra distribuido ampliamente en el cerebro y puede localizarse en el telencéfalo, el diencefalo (incluyendo el hipotálamo), el mesencefalo y el cerebro posterior, y su activación se ha visto implicada en procesos como la transmisión sináptica, neurotoxicidad, inflamación neurogénica y en procesos tales como el dolor, estrés y ansiedad.

Tabla 2. Porcentaje de similitud de la secuencia parcial obtenida que corresponde al receptor de taquinina 1 (Sustancia P) de *Chirostoma humboldtianum* con otras especies de peces.

Especie	Porcentaje de Identidad	Longitud total (pb)	Número de acceso al GenBank
<i>Tetraodon nigroviridis</i>	86%	1284	BK008099.1
<i>Takifugu rubripes</i>	82%	1248	NM_001280107.1
<i>Poecilia mexicana</i>	81%	3209	XM_015010821.1
<i>Gasterosteus aculeatus</i>	78%	1248	KT261475.1

Este tipo de oligonucleótidos diseñados generalmente se ocupan cuando se desea conseguir un gen que no ha sido reportado en organismos filogenéticamente cercanos, al emplearlos el número de opciones en las que se puede posicionar incrementa el obtener el producto esperado, en este caso, la alineación da como

resultado a una secuencia relacionada al grupo de los receptores a taquininas (Sharrocks, 1994; Innis, y Gelfand, 1994; Dieffenbachet *al.*, 1995; Cortazar y Rincon, 2004).

La secuencia obtenida de *tac1r* de *C. humboldtianum* coincide con las regiones que codifican a los TM del III al VI (Figura 9). Esto concuerda con lo observado con Lopez-Bedillo (2013) quien obtuvo dos genes codificantes del receptor 1 (*tac1ra* y *tac1rb*) en el pez cebra con los motivos estructurales de siete dominios transmembranales hidrofóbicos, con tres asas extracelulares, tres asas intracelulares, un amino-terminal extracelular y un extremo carboxilo terminal citoplasmático, composición conservada en el grupo de los receptores acoplados a proteínas G (Rance, 2010) (Figura 13).

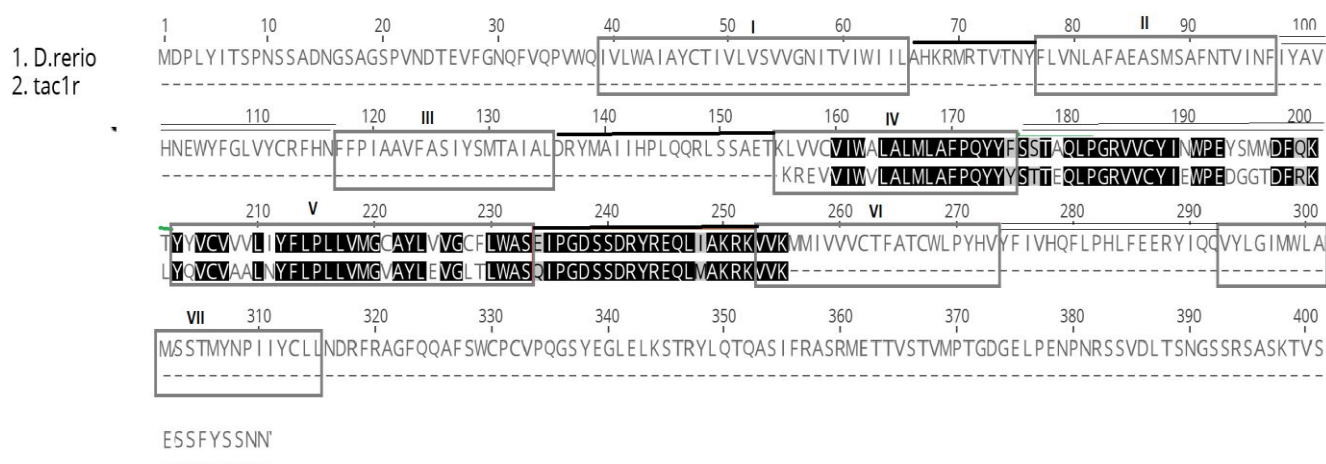


Figura 13. Similitud entre *tac1r* de *C. humboldtianum* y *D. rerio* (NP\_001268728.1). De negro se encuentran las regiones similares, en un recuadro gris los TM I-VII, subrayado IL 1, 2 y 3, y en doble subrayado las IL 1, 2 y 3.

*Tac1r* está filogenéticamente relacionado con la molécula del receptor *tac3r* por ello se ha descrito que existe una similitud en la organización de ambos genes y que presentan cinco exones interrumpidos por intrones. Estudios filogenéticos en mamíferos señalan que los tres receptores de taquinina constituyen una familia de receptores homólogos que se originaron a partir de la duplicación de un gen ancestral común (Candenas *et al.*, 2001; Page, 2005).



Se observó que la composición de nucleótidos de los productos obtenidos de *tac1r* y *tac3rb* presentaba zonas de similitud (Figura 14), en relación a los aminoácidos que codifican ambas secuencias se encontró una similitud entre los que componen los TM, IL 3 y EL 2, las diferencias se encuentran entre la longitud del EL 2 y los TM (Figura 15), estos resultados forman parte de las evidencias que podrían sustentar la misma afirmación en especies de peces debido a la similitud entre la conformación de los dominios transmembranales que los componen y entre cada asas intra o extracelular, las diferencias presentes puede desempeñar un papel importante en su localización y la señalización (Patacchini y Maggi, 2001; Lopez-Bedillo, 2013).

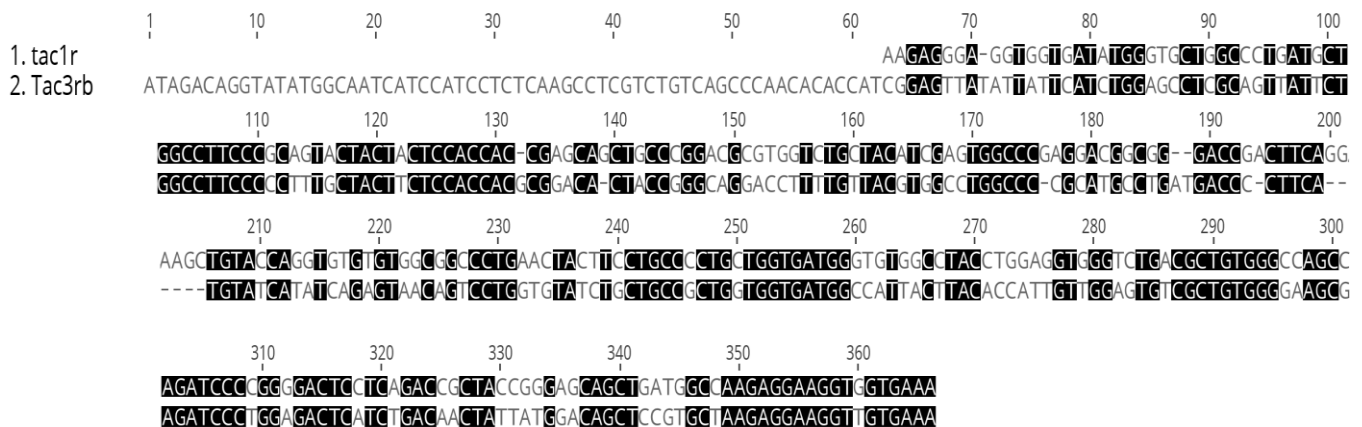


Figura 14. Similitud en la composición de nucleótidos entre los productos obtenidos *tac1r* y *tac3rb* de *C. humboldtianum* aislados con el mismo par de oligonucleótidos. El color negro marca las zonas donde se tiene una mayor similitud entre ambas secuencias.



Figura 15. Similitud en la composición de aminoácidos entre los productos obtenidos *tac1r* y *tac3rb* de *C. humboldtianum*. De negro se encuentran las regiones similares, en un recuadro gris los dominios transmembranales (TM III-VI), subrayado asas intracelulares 2 y 3, y en doble subrayado la asa extracelular 2

La relación filogenética les otorgó una similitud estructural que también dio como resultado que el ligando pudiese interactuar con más de un receptor de la familia

de las taquininas siempre y cuando se presentarán en concentraciones suficientemente altas (Linden *et al.*, 2000; Pennefather *et al.*, 2004). Ello tiene importancia endocrinológica en los grupos de mamíferos y peces al registrarse que existe liberación de prolactina en células de la pituitaria de rata (*R. norvegicus*) y de carpa (*C. carpio*) cuando se da la unión de NKB con NK1R y NK2R, respectivamente en cada especie (Mau *et al.*, 1997; Hu *et al.*, 2014).

Sin embargo, la capacidad de NKB de unirse a los otros dos receptores de taquinina es una unión no covalente y con una menor afinidad, hasta el momento, no se ha comprobado que la unión de NKB con el receptor NK1R o NK2R participe en la regulación de GnRH como sucede cuando se une al receptor NK3R (Patak *et al.*, 2002; Hu *et al.*, 2014).

Las secuencias encontradas en el pez *C. humboldtianum* (Figura 10) corresponden a las secuencias parciales de los genes codificantes del NK3R (tac3ra y tac3rb). Este resultado concuerda con los trabajos de Biran y colaboradores (2012) y Biran y colaboradores (2014) donde con resultados similares en la especie *D. rerio* y *O. niloticus* propusieron que en el linaje de los peces teleósteos existe un par de genes para formar este receptor, a diferencia de los mamíferos, donde se ha establecido que existe un único gen responsable de producirlo.

Se ha encontrado que entre las secuencias parciales encontradas de tac3ra y tac3rb para *C. humboldtianum* existe una alta similitud, existiendo solo una diferencia de 14 nucleótidos que al ser traducidos solo produce el cambio de 7 aminoácidos entre ambas secuencias reflejándose en una similitud de un 90% (Figuras 16 y 17A) La similitud resulta dependiente de la especie al comparar la similitud entre de las secuencias tac3ra y tac3rb de *G. aculeatus*, *O. latipes* y *D. rerio* en la zonas que codifican del dominio transmembranal 3 al 6 tiene una similitud de un 88%, 78% y 77% respectivamente, debido a que son zonas conservadas y de relevancia para la unión del ligando y procesos de señalización (Figura 17) (Biran *et al.*, 2012; Zhou *et al.*, 2012; Biran *et al.*, 2014).

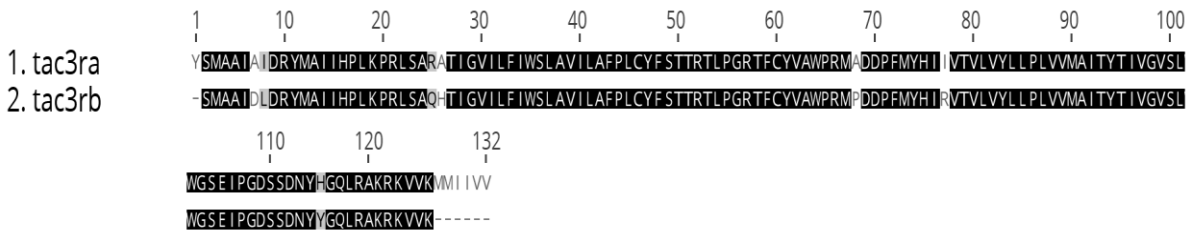


Figura 16. Similitud en la composición de aminoácidos entre los productos obtenidos tac3ra y tac3rb de *C. humboldtianum*.

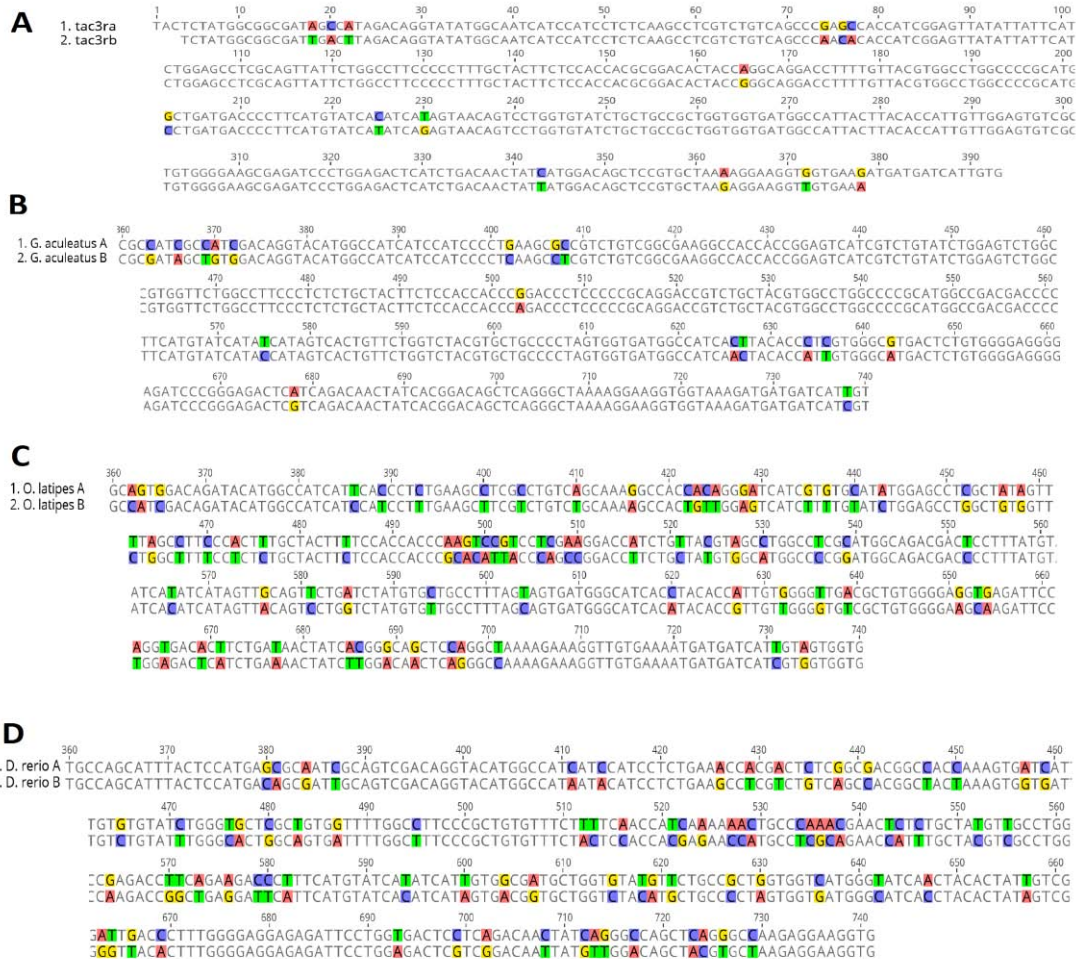


Figura 17. Similitud de nucleótidos entre las secuencias de tac3ra y tac3rb de A) *C. humboldtianum*, B) *G. aculeatus* (KT261480, KT261481), C) *O. latipes* (BK008087.1, BK008088) D) *D. rerio*. (JF3117293.1 JF3117292.1). Los nucleótidos señalados indican las diferencias entre las secuencias que codifican del dominio transmembranal III al VI.

La presencia de los genes tac3ra y tac3rb en el pez blanco apoya la hipótesis de la historia evolutiva de los tacr's, que propone que un gen ancestral dio lugar a cuatro genes tacr después de dos rondas de duplicación (2R) (Zhou *et al.*, 2012). Una copia del gen duplicado de tacr se perdió antes de que los peces teleosteos y

los mamíferos se dividieran; sin embargo, en el linaje de peces teleósteos se produjo una duplicación adicional que dio lugar a dos *tac3r*. Con los conocimientos actuales, la historia de la evolución de los *tac3r* es en gran parte desconocida (Christoffels *et al.*, 2004; Zhou *et al.*, 2012).

Zhou y autores proponen agregar a esta hipótesis que existió una duplicación local de un gen ancestral *tac3ra*, basados en un análisis desintenia genómica y un análisis de árbol filogenético, afirmando la presencia de dos genes *tac3ra* (*tac3ra1* y *tac3ra2*) donde esta duplicación se conservó a través de procesos de neofuncionalización o subfuncionalización en las especies *D. rerio*, *T. nigroviridis*, *T. rubripecta*, *Gasterosteus aculeatus* y *O. latipes*. Hasta el momento y con lo encontrado en *C. humboldtianum*, donde solo se obtuvo la secuencia parcial de un solo *tac3ra* con porcentajes de similitud de hasta el 84% con otras especies de peces (Tabla 3), no es posible realizar la inferencia de la presencia de uno o dos subtipos de *tac3ra*.

Tabla 3. Porcentaje de similitud de la secuencia obtenida con otras especies de peces teleósteos.

Especie	Porcentaje de Identidad	Longitud total (pb)	Número de acceso al GenBank
<i>Morone saxatilis</i>	84%	1924	KT361627.1
<i>Tetraodon nigroviridis</i>	80%	1239	BK008096.1
<i>Danio rerio</i>	74%	1269	NM_001256638.1

Respecto al receptor *tac3rb* se ha establecido, con los datos existentes, que no sufrió ninguna duplicación del genoma, puesto que solo se ha encontrado este gen en diferentes especies de peces teleósteos como son *D.rerio* (Biranet *al.*, 2012), *O. niloticus* (Biran *et al.*, 2014), *O. latipes*, *T. rubripes*, *T. nigroviridis* (Zhou *et al.*, 2014); incluyendo ahora a la secuencia parcial de dicho gen en especie *C. humboldtianum* (Figura 12) que tiene un porcentaje de similitud superior al 78% con las secuencias de estas especies. El mayor porcentaje de similitud es con las especies *Oreochromis niloticus*, *Oryzias latipes*, reportadas por Zhou y

colaboradores en 2012, y *G. aculeatus* no reportada en artículo pero si en banco de datos (Tabla 4).

Tabla 4. Porcentaje de similitud de la secuencia obtenida para *Chirostoma humboldtianum* correspondiente al receptor a neuroquinina B con otras especies de peces.

Especie	Porcentaje de identidad	Longitud total (pb)	Número de acceso al GenBank
<i>Gasterosteus aculeatus</i>	82%	1014	KT261481.1
<i>Oryzias latipes</i>	80%	1119	NM_001278874.1
<i>Oreochromis niloticus</i>	78%	1086	NM_001301381.1

Son escasos los artículos que hablen de forma específica como se presenta la síntesis del NK3R a través de la transcripción de estos dos genes en peces teleósteos. En las especies: pez cebra (Biran *et al.*, 2012) y tilapia (Biran *et al.*, 2014) se ha formulado una estructura de las regiones codificantes de dichos genes y los cuales se han tomado de base para analizar las secuencias encontradas (Biran *et al.*, 2012; Biran *et al.*, 2014).

La secuencia parcial encontrada en *C. humboldtianum* del gen *tacr3a* (Figura 11) está compuesta por 396 pb (132aa) que codifican parcialmente el TM 3 e inicios del 6. Mientras que la longitud total de este gen en tilapia (Biran *et al.*, 2014) y pez cebra (Biran *et al.*, 2012) aislado es de 1249 pb (415 aa) y 1273 pb (399 aa) respectivamente. Para la secuencia parcial del receptor *tac3rb* del pez blanco (Figura 12) fue de 357 pb y 120 aa que codifican el final de TM3 hasta inicios del TM 6, y se tiene registrada para tilapia 1087 pb (361 aa) y pez cebra 1323 pb (395 aa) (Biran *et al.*, 2012; Biran *et al.*, 2014).

Las diferencias en el número de bases de cada secuencia están determinadas principalmente por la diferencia en las longitudes de los aminos y carboxilos terminales, ya que el NK3R es el NKR con el carboxilo más extenso (Hu *et al.*, 2014; Suetomi *et al.*, 2013).

Si bien solo se lograron obtener secuencias parciales de los genes *tac3ra* y *tac3rb* estas contienen la base de la traducción de zonas de suma importancia para el funcionamiento del receptor, en general los TM y las EL están típicamente involucradas en el reconocimiento y la unión del ligando, en especial los dominios TM3, TM6 y TM7 donde se ha observado que existe una mayor conservación de las secuencias nucleotídicas entre mamíferos y peces (Biran *et al.*, 2014; Sekoni *et al.*, 2014).

Los TM además juegan un papel importante en el tráfico del receptor a la superficie celular, mientras que las IL 2 y 3 están involucradas en el acoplamiento del receptor con la proteína G y las beta arrestinas, que son esenciales para la transducción de la señal (Sekoni *et al.*, 2014). Todo esto, basándonos en la alta similitud de la estructura entre el NK3R de peces teleósteos y de humano (Gether *et al.*, 1993).

Encontramos que los aminoácidos que conforman el NK3R en las secuencias de *C. humboldianum* están conservados también en *D. rerio*, *O. niloticus*, *G. aculeatus*, *O latipes*, *T. rubripes* y *T. negroviridis*. La presencia de aminoácidos no polares (GAVLIFWMP) en mayor proporción en los dominios transmembranales permite la conformación estructural alfa-hélice, y la unión dentro de esta estructura con pocos aminoácidos polares (STCYNQ) y básicos (KRH) permite que se estabilice por interacciones electrostáticas e hidrófobas (Candenas *et al.*, 2001; Patacchini y Maggi, 2001) La traducción de Glutamina en el TM 7 del *tac3rb* es una característica que no presenta *tac3ra* (Figura 18)(Biran *et al.*, 2012; Biran *et al.*, 2014).

En las asas intra o extracelulares se pueden encontrar una mayor cantidad de aminoácidos polares>básicos>ácidos (DE), el acomodo de dichos aminoácidos les otorga a las asas extracelulares una estructura de cuatro filamentos  $\beta$ -hoja plegada mientras que los intracelulares no son estructurados (Figura 18) (Rance, 2010; Page, 2006; Patacchini *et al.*, 2004; Suetomi *et al.*, 2013).

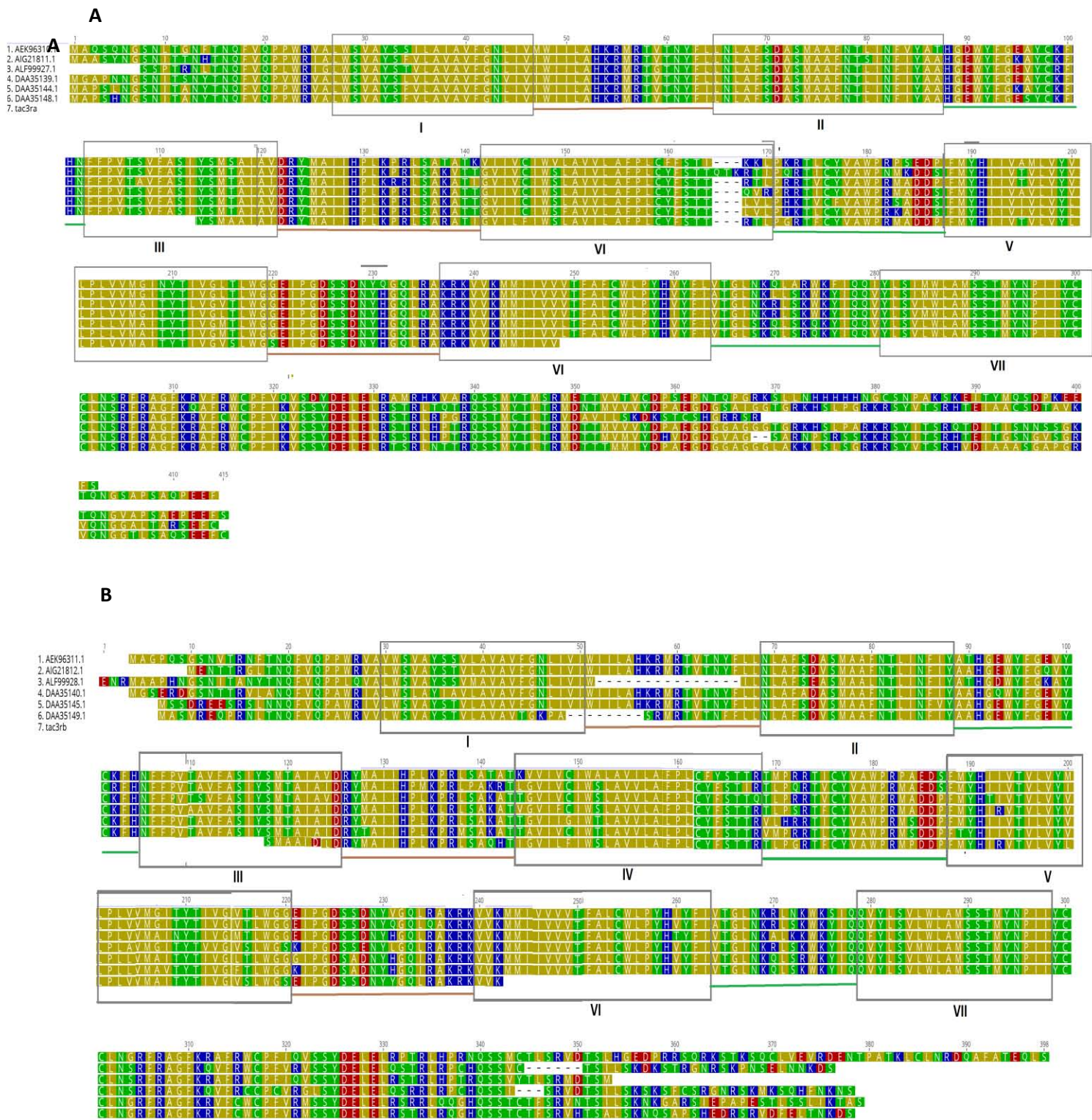


Figura 18. Alineamiento de las secuencias A) tac3ra y B) tac3rb en aminoácidos indicando de *C. humboldtianum*, *D. rerio* (AEK96310.1 y AEK96311.1), *O. niloticus* (AIG21811.1 y AIG21812.1), *G. aculeatus* (ALF99927.1 y ALF99928.1), *O. latipes* (DAA35139.1 y DAA35140.1), *T. rubripes* (DAA35144.1 y DAA35145.1), *T. negroviridis* (DAA35148.1 y DAA35149.1) indicando su propiedad básica en azul, ácida en rojo, polar en verde y de color amarillo los no polares.

Al realizar la comparación entre secuencias de aminoácidos de tac3ra y tac3rb de *C. humboldtianum* con lo descrito por Biran y colaboradores en el 2012, obtuvimos los sitios de N-miristoilación, sitios de fosforilación de la tirosina cinasa, sitios de fosforilación de la proteína cinasa C y sitios de fosforilación de la proteína cinasa A dependiente de AMPc y GMPc en cada secuencia y se encuentran conservadas en las especies *D. rerio*, *O. niloticus*, *G. aculeatus*, *O. latipes*, *T. rubripes* y *T. negroviridis* (Figura 19).

En ambos genes tac3r de *C. humboldtianum* se conserva la presencia de 4 de los 5 exones codificantes como se ha registrado en otras especies de peces como son *D. rerio* y *O. niloticus* (Biran *et al.*, 2012; Biran *et al.*, 2014) (Figura 19). Similar a lo que ocurre en ambas especies y el gen tac3r de mamífero, en los genes de *C. humboldtianum* el exón 2 es el que codifica al TM IV (Rance, 2010).

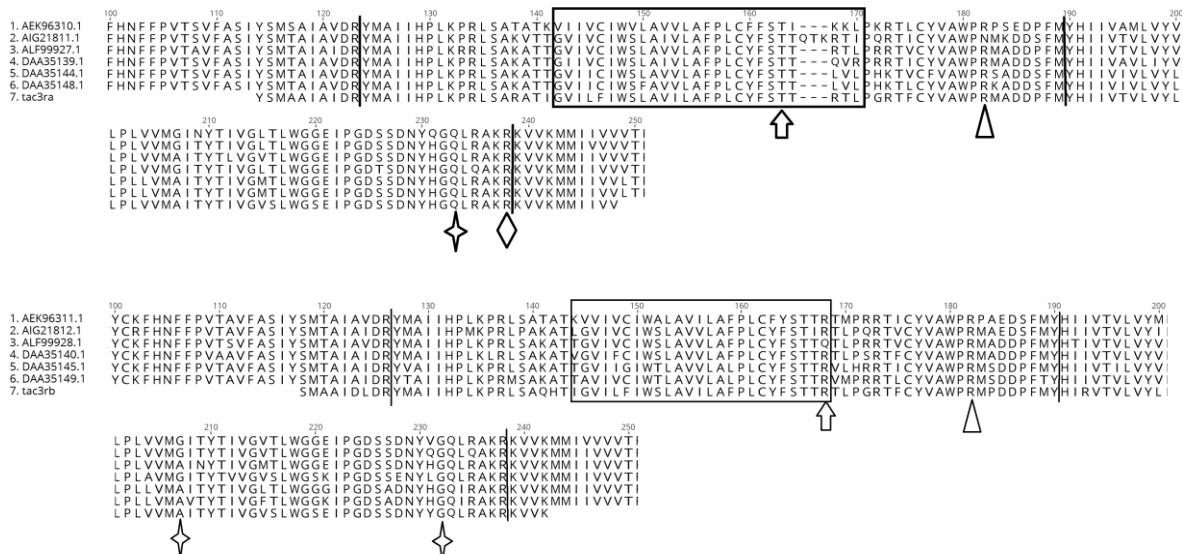


Figura 19. Similitud entre las secuencias tac3ra y tac3rb obtenidas de *C. humboldtianum* con *D. rerio* (AEK96310.1 y AEK96311.1), *O. niloticus* (AIG21811.1 y AIG21812.1), *G. aculeatus* (ALF99927.1 y ALF99928.1), *O. latipes* (DAA35139.1 y DAA35140.1), *T. rubripes* (DAA35144.1 y DAA35145.1), *T. negroviridis* (DAA35148.1 y DAA35149.1). La división con una línea indica los límites de exones, de recuadro se encuentra el TM IV, la flecha indica es el sitio fosforilación de la proteína cinasa C, el triangulo sitio de fosforilación de la tirosina cinasa, estrella sitios de N-miristoilación, y el rombo sitio de fosforilación de la proteína cinasa A dependiente de AMPc y GMPc

El encontrar tac3ra y tac3rb en el cerebro de organismos maduros, concuerda con los registros en pez cebra, en carpa y en tilapia, donde se observó que la



expresión de ambos genes se da principalmente en regiones del telencéfalo, hipotálamo, techo óptico, cerebro posterior, médula y por supuesto, la hipófisis (Zhou *et al.*, 2012; Biran *et al.*, 2012; Biran *et al.*, 2014; Hu *et al.*, 2014).

La expresión de los dos genes es heterogénea para cada especie, por ejemplo, entre el pez cebra (Biran *et al.*, 2012) y la tilapia (Biran *et al.*, 2014), en el primero *tac3ra* es mayormente expresado en hipófisis y *tac3rb* en cerebro posterior, mientras que en el segundo *tac3ra* se expresaba en mayor nivel en el techo óptico y *tac3rb* en el hipotálamo (Biran *et al.*, 2012; Biran *et al.*, 2014).

Si bien se ha demostrado que el receptor que codifican ambos genes tiene una relevancia como regulador crítico del desarrollo reproductivo normal, debido a que se ha encontrado evidencias sobre la activación del receptor por medio del ingreso de ligandos análogos administrados al organismo junto con marcadores y el aumento de la síntesis de LH en pez cebra o en tilapia, en el caso de la carpa y otros ciprínidos se conoce que no ocurre de esta manera sino que activa otras vías que ayudan a la liberación de serotonina y prolactina (Hu *et al.*, 2014). En ambos, teniendo un papel endocrinológico relevante (Zhou *et al.*, 2012; Biran *et al.*, 2012; Biran *et al.*, 2014; Hu *et al.*, 2014; Satake y Kawada, 2006).

El registro de estos genes en la familia Atherinopsidae ocurre por primera ocasión en el organismo *C. humboldtianum*, de acuerdo a las secuencias registradas en el GenBank (NCBI) (Tabla 5).

Tabla 5. Relación de secuencias registradas en el banco de datos de NCBI por ordenados por familias, especies y número de acceso.

Familia	Especies	Número de Acceso al Genbank.
Cyprinidae	<i>Danio rerio</i>	NM_001256638.1 JF317293.1
	<i>Sinocyclocheilus anshuiensis</i>	XM_016455148.1
Tetraodontidae	<i>Tetraodon nigroviridis</i>	BK008096.1 BK008097.1
	<i>Takifugu rubripes</i>	BK008092.1 NM_001280112.1
Adrianichthyidae	<i>Oryzias latipes</i>	BK00808    NM_001278874.1

		7.1
Cichlidae	<i>Oreochromis niloticus</i>	NM_001301378.1 KF471675.1
Gasterosteidae	<i>Gasterosteus aculeatus</i>	KT261480.1
Nothobranchiidae	<i>Nothobranchius furzeri</i>	XM_015943658.1
Characidae	<i>Astyanax mexicanus</i>	XM_007235686.2

Dado que los peces son el conjunto de vertebrados más amplio y evolutivamente más divergente, el conocer la presencia de los genes que codifican a este receptor en el modelo *Chirostoma humboldtianum*, ayudará a comprender de mejor manera su papel evolutivo y las funciones en el que se ve involucrado.

## CONCLUSIONES

Se aisló una secuencia parcial del receptor a neuroquinina Ba (tac3ra) en el encéfalo de *C. humboldtianum* de 396pb que corresponde a los dominios transmembranales III al VI, junto con las asas intracelulares 2 y 3 y la asa extracelular 2

Se aisló una secuencia parcial del receptor a neuroquinina Bb (tac3rb) el encéfalo de *C. humboldtianum* con una longitud de 375pb, que codifica al final del dominio transmembranal III hasta inicios del dominio transmembranal VI incluyendo las asas intracelulares 2 y 3 y extracelular 2.

Por primera vez; se aislaron, secuenciaron y clonaron secuencias parciales de los genes codificantes al receptor neuroquinina B (tac3ra y Tac3rb) a la familia Atherinidae y la especie *C. humboldtianum*.

## Referencias

1. Barriga-Sosa L., De León F., Del Río-Portilla M., The complete mitochondrial DNA of the endemics shortfin silverside, *Chirostoma humboldtianum* (Valenciennes, 1835) *Mitochondrial DNA A DNA MappSeq Anal.*, 27(2):1545-1546
2. Biran, J., Palevitch, O., Ben-Dor, S., & Levavi-Sivan, B. (2012). Neurokinin Bs and neurokinin B receptors in zebrafish-potential role in controlling fish reproduction. *Proceedings Of The National Academy Of Sciences*, 109(26), 10269-10274. <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.1119165109>
3. Biran, J., Golan, M., Mizrahi, N., Ogawa, S., Parhar, I., & Levavi-Sivan, B. (2014). Direct Regulation of Gonadotropin Release by Neurokinin B in Tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Endocrinology*, 155(12), 4831-4842. <http://dx.doi.org/10.1210/en.2013-2114>
4. Blancas-Arroyo G. 2007. Desarrollo ovárico y su relación con los niveles hormonales circulantes de 17- Estradiol y 17-hidrociprogesterona durante el primer ciclo reproductivo en hembras de pez blanco *Chirostoma humboldtianum* (Valenciennes 1835). *Tesis de Doctorado*. Universidad Autónoma Metropolitana.
5. Blancas-Arroyo G, Frías-Sevilla R., Rosa-Pimentel E., Suárez-Navarro V., Castro-Gómez J. y Magaña-Morales J. (2014). Efecto de la salinidad en la sobrevivencia de peces silvestres del género *Chirostoma* durante el transporte y mantenimiento en laboratorio. *Hidrobiológica*, 24 (3): 223-230
6. Candenás, M.L., Magraner, J., Armesto, C.P., Anselmi, E., Nieto, P.M., Martín, J.D., Advenier, C., Pinto, F.M., (2001). Changes in the expression of tachykinin receptors in the rat uterus during the course of pregnancy. *Biology of Reproduction* 65 (2), 538–543.
7. Cárdenas, R., Chávez, M., González, J., Aley, P., Espinoza, J., & Jiménez García, L. (2007). Oocyte structure and ultrastructure in the Mexican silverside fish *Chirostoma humboldtianum* (Atheriniforme: Atherinopsidae). *RBT*, 56(3). <http://dx.doi.org/10.15517/rbt.v56i3.5715>

8. Chávez M. (2009) Distribución de la hormona liberadora de Gonadotropinas de salmón (sGnRH) en el cerebro anterior de *Chirostoma humboldtianum*. Tesis de maestría. Universidad Nacional Autónoma de México,
9. Chávez, M., Cárdenas, R. (2012). El Polipéptido activador de la adenilato ciclasa de la pituitaria (PACAP) en *Chirostoma humboldtianum* INVESTIGACIÓN ICTIOLÓGICA EN MÉXICO. TEMAS SELECTOS EN HONOR AL DR. JOSÉ LUIS CASTRO AGUIRRE. UNAM- SIMAC, cap. 1 pp 3-11. ISBN 978-607-02-3628-0.
10. Chomczynski, P. y Sacchi, N. (1987). Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem.* 162(1):156-9.
11. Commons, K. (2010) Neuronal pathways linking substance P to drug addiction and stress. *Brain Research* 1314 175–182. (doi:10.1016/j.brainres.2009.11.014)
12. Cortazar A. y S. Rincon, 2004. Métodos físico-químicos en biotecnología. Instituto de Biotecnología. UNAM. México.
13. Christoffels, A., Koh, E.G., Chia, J.M., Brenner, S., Aparicio, S., Venkatesh, B., (2004). Fugu genome analysis provides evidence for a whole-genome duplication early during the evolution of ray-finned fishes. *Mol. Biol. Evol.* 21, 1146–1151.
14. Dieffenbach C., T. Lowe, y G. Dveksler 1995. General Concepts for PCR Primer Design. *Cold Spring Harbor Laboratory Press*, New York, pp. 133–155.
15. Duarte, C., Schütz, B., & Zimmer, A. (2006). Incongruent pattern of neurokinin B expression in rat and mouse brains. *Cell Tissue Res*, 323(1), 43-51. <http://dx.doi.org/10.1007/s00441-005-0027-x>
16. Fernández E., Navarrete A., Rodríguez J. (2008). Alimentación de *Chirostoma humboldtianum* en el estanque JC en Soyaniquilpan, Estado de México. *Revista Chapingo Serie Ciencias Forestales y del Ambiente* 14(2): 129-134, 2008.

17. Gadd C., Murtra P., De Felipe C. y Hunt S. (2003) Neurokinin-1 receptorexpressingneurons in the amygdala modulate morphine reward andanxiety behaviors in the mouse. *Journal of Neuroscience*23 8271–8280.
18. Gether, U., Johansen, T.E., Schwartz, T. *Biology Chemical.*,1993, 268, 7893.
19. González, A. 2010. Distribución del polipéptido activador de la adenilatociclasa de la pituitaria (PACAP) en gónadas de *Chirostoma humboldtianum*. *Tesis de Licenciatura* Universidad Nacional Autónoma de México.
20. Gopurappilly, R., Ogawa, S., & Parhar, I. (2013). Functional Significance of GnRH and Kisspeptin, and Their Cognate Receptors in Teleost Reproduction. *Frontiers In Endocrinology*, 4. <http://dx.doi.org/10.3389/fendo.2013.00024>
21. Goodman, R., Lehman, M., Smith, J., Coolen, L., de Oliveira, C., &Jafarzadehshirazi, M. et al. (2007). Kisspeptin Neurons in the Arcuate Nucleus of the Ewe Express Both Dynorphin A and Neurokinin B. *Endocrinology*, 148(12), 5752-5760. <http://dx.doi.org/10.1210/en.2007-0961>
22. Hernández M. (2006) La pesquería en el lago de Pátzcuaro. In: Arreguín S.F., Beléndez M.L., Gómez- Humaran M.I., Solana S.R. and Rangel D.C. (eds.), *Sustentabilidad y pesca responsable en México. Evaluación y manejo*. Instituto Nacional de la Pesca. Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación. México, D. F. 391-422.
23. Hu, G., He, M., Ko, W., Lin, C., & Wong, A. (2014). Novel Pituitary Actions of TAC3 Gene Products in Fish Model: Receptor Specificity and Signal Transduction for Prolactin and Somatolactin  $\alpha$  Regulation by Neurokinin B (NKB) and NKB-Related Peptide in Carp Pituitary Cells. *Endocrinology*, 155(9), 3582-3596. <http://dx.doi.org/10.1210/en.2014-1105>
24. Innis, M. y D. Gelfand, 1994. Optimization of PCRs. *PCR Protocols: a Guide to Methods and Applications*. CRC Press, Londres. pp. 5–11.

25. Lasaga M. y Debeljuk L. (2011). Tachykinins and the hypothalamo–pituitary–gonadal axis: An update. *Peptides*, 32(9), 1972-1978. <http://dx.doi.org/10.1016/j.peptides.2011.07.009>
26. Linden, D.R., Chell, M.J., El-Fakahany, E.E., Seybold, V.S., (2000). NK3 receptors couple to the activation of neuronal nitric-oxide synthase in stably transfected Chinese hamster ovary cells. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* 293, 559–568.
27. Lopez-Bellido, R., Barreto-Valer, K., & Rodriguez, R. (2013). Expression of tachykinin receptors (tacr1a and tacr1b) in zebrafish: influence of cocaine and opioid receptors. *Journal Of Molecular Endocrinology*, 50(2), 115-129. <http://dx.doi.org/10.1530/jme-12-0199>
28. Macedo B., 2012. Aislamiento, secuenciación y clonación de pGnRH en el charal (*Chirostoma humboldtianum*). Tesis de Maestría. Universidad Nacional Autónoma de México
29. Martínez C., Racotta I., Ríos-Durán M., Palacios E., Toledo-Cuevas y Ross L. (2006) Advances in applied research for the cultura of Mexican silversides (*Chirostoma*, Atherinopsidae). *Biocell*. Vol 30(1): 137-148
30. Martínez-Palacios C., Ríos-Durán M, Campos- Mendoza A., Toledo-Cuevas M. y Ross L. 2002 Avances en el cultivo del pescado blanco de Pátzcuaro *Chirostoma estor estor*. En: Cruz-Suárez L., Ricque-Marie D., Tapia-Salazar M., Gaxiola-Cortés M. y Simoes N.(Eds.). Avances en Nutrición Acuícola VI. Memorias del VI Simposium Internacional de Nutrición Acuícola. 3 to 6 September. Cancún, Quintana Roo, México.
31. Mau, S., Witt, M., Saermark, T., Vilhardt, H., (1997). Substance P increases intracellular Ca<sup>2+</sup> in individual rat pituitary lactotrophs, somatotrophs, and gonadotrophs. *Molecular Cell Endocrinology*. 126, 193–201.
32. Mi, X., Yu, H., Jia, P., Zhang, Z., Zhang, L., & Liu, J. (2010). Two tachykinin-like peptides from skin secretions of *Danio rerio*. *Journal Of Peptide Science*, 16(2), 81-84. <http://dx.doi.org/10.1002/psc.1194>

33. Muñoz M. (2011). Biotecnología aplicada en la reproducción de peces. *Informador Técnico*. 75 (12):66-72
34. Muñoz-Osnaya, G. (2016). Aislamiento y secuenciación de receptores a estrógeno en encéfalo de *Chirostoma humboldtianum* (Atheriniformes: ATHERINOPSIDAE). Tesis de licenciatura. Universidad Nacional Autónoma de México, Facultad de Estudios Superiores Iztacala, Estado de México, México.
35. Navarro, V. (2012). New Insights into the Control of Pulsatile GnRH Release: The Role of Kiss1/Neurokinin B Neurons. *Frontiers In Endocrinology*, 3. <http://dx.doi.org/10.3389/fendo.2012.00048>
36. Navarro, V. (2013). Interactions Between Kisspeptins and Neurokinin B. *Advances. Experimental Medicine And Biology*, 325-347. [http://dx.doi.org/10.1007/978-1-4614-6199-9\\_15](http://dx.doi.org/10.1007/978-1-4614-6199-9_15)
37. Ogawa, S. y Parhar, I. (2014). Structural and Functional Divergence of Gonadotropin-Inhibitory Hormone from Jawless Fish to Mammals. *Frontiers In Endocrinology*, 5. <http://dx.doi.org/10.3389/fendo.2014.00177>
38. Page, N. (2005). New challenges in the study of the mammalian tachykinins. *Peptides*, 26(8),1356-1368. <http://dx.doi.org/10.1016/j.peptides.2005.03.030>
39. Page, N. (2006). Characterization of the gene structures, precursor processing and pharmacology of the endokinin peptides. *Vascular Pharmacology*, 45(4), 200-208. <http://dx.doi.org/10.1016/j.vph.2005.08.028>
40. Page, N., Morrish, D., & Weston-Bell, N. (2009). Differential mRNA splicing and precursor processing of neurokinin B in neuroendocrine tissues. *Peptides*, 30(8),1508-1513. <http://dx.doi.org/10.1016/j.peptides.2009.04.023>
41. Patacchini, R., Lecci, A., Holzer, P., & Maggi, C. (2004). Newly discovered tachykinins raise new questions about their peripheral roles and the tachykinin nomenclature. *Trends In Pharmacological Sciences*, 25(1), 1-3. <http://dx.doi.org/10.1016/j.tips.2003.11.005>



42. Patacchini, R., Maggi, C., (2001). Tachykinin receptors and receptor subtypes. *Archives internationales de pharmacodynamie et de thérapie Journal* 329 (1), 161–184.
43. Patak, E., Pennefather, J.N., Fleming, A., Story, M.E., (2002). Functional characterization of tachykinin NK1 receptors in the mouse uterus. *British Journal of Pharmacology* 137 (8), 1247–1254.
44. Pennefather, J., Lecci, A., Candenas, E., Patak, F., Pinto, C., Maggi, C. (2004). Tachykinins and tachykinin receptors: a growing family. *Life Sciences*. 74 (2004): 1445–1463.
45. Paulo-Maya J., Figueroa L. y Soria-Barreto M. (2000) Peces dulceacuícolas mexicanos XIX *Chirostoma humboldtianum* Atheriniformes: Atherinopsidae). ENCBIPN, *Zoología Informa*, 43: 59-74.
46. Pennefather, J., Lecci, A., Candenas, M., Patak, E., Pinto, F., & Maggi, C. (2004). Tachykinins and tachykinin receptors: a growing family. *Life Sciences*, 74(12), 1445-1463.  
<http://dx.doi.org/10.1016/j.lfs.2003.09.039>
47. Rance N., S. Krajewski, M. Smith, M. Cholanian y P. Dacks. (2010). Neurokinin B and the hypothalamic regulation of reproduction. *Brain Research*, 1364, 116-128. <http://dx.doi.org/10.1016/j.brainres.2010.08.059>
48. Rojas P. y L. Sasso. (2005). El pescado Blanco. *Revista Digital Universitaria*. 6(8):1067-6079
49. Sánchez, P. S. 1992. Biología Reproductiva del Charal Blanco *Chirostoma grandocule* (STEINDACHNER, 1894 Pisces: ATHERINIDAE), del lago de Pátzcuaro, Mich. México. Tesis de Licenciatura. Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo, Michoacán México. 62 p.
50. Sanchez-Merino R., Díaz-Zaragoza M., Navarrete-Salgado A., García-Martínez M., Ayala-Niño F., Flores-Aguilar (2007) Crecimiento, mortalidad y sobrevivencia del charal *Chirostoma humboldtianum* (Atherinopsidae) En el embalse San Miguel Arco soyaniquilpan, estado de México, *Revista chapingo*, 12(2): 151-154

51. Satake, H., Kawada, T., (2006). Overview of the primary structure, tissue-distribution, and functions of tachykinins and their receptors. *Current Drug Targets* 7, 963–974.
52. Satake, H., Kawada, T., Nomoto, K., & Minakata, H. (2003). Insight into Tachykinin-Related Peptides, Their Receptors, and Invertebrate Tachykinins: A review. *Zoological Science*, 20(5), 533-549. <http://dx.doi.org/10.2108/zsj.20.533>
53. Satoshi O., Ramadasan, P., Goschorska, M., Anantharajah, A., We Ng, K., & Parhar, I. (2012). Cloning and expression of tachykinins and their association with kisspeptins in the brains of zebrafish. *The Journal Of Comparative Neurology*, 520(13), 2991-3012. <http://dx.doi.org/10.1002/cne.23103>
54. Sekoni D. Abreu A. Shuyun X, Titilayo M., Gianetti E., Tusset, T., Carroll J., Latronico A., Seminara S., Carroll R. y Kaiser U. (2014) TACR3 mutations disrupt NK3R function through distinct mechanisms in GnRH-deficient patients. *The FASEB Journal*. 28(4): 1924–1937.
55. Sharrocks, A., (1994). The design of primers for PCR, PCR Technology: Current Innovations. *CRC Press*, London: pp. 5–11
56. Suetomi Y., Matsuda F., Uenoyama Y, Maeda K., Tsukamura H., y Ohkura S. (2013). Molecular Cloning and Identification of the Transcriptional Regulatory Domain of the Goat Neurokinin B Gene TAC3. *Journal Of Reproduction And Development*, 59(5), 463-469. <http://dx.doi.org/10.1262/jrd.2013-037>
57. Topaloglu, A., Reimann, F., Guclu, M., Yalin, A., Kotan, L., & Porter, K. et al. (2009). TAC3 and TACR3 mutations in familial hypogonadotropic hypogonadism reveal a key role for Neurokinin B in the central control of reproduction. *Nature Genetics*, 41(3), 354-358. <http://dx.doi.org/10.1038/ng.306>
58. Toribio L. 2010. Distribución de la isoforma de salmón de GnRH (sGnRH) en gónadas de *Chirostoma humboldtianum*. Tesis de Licenciatura. Universidad Nacional Autónoma de México.

59. Young, J., George, J., Tello, J., Francou, B., Bouligand, J., & Guiochon-Mantel, A. et al. (2013). Kisspeptin Restores Pulsatile LH Secretion in Patients with Neurokinin B Signaling Deficiencies: Physiological, Pathophysiological and Therapeutic Implications. *Neuroendocrinology*, 97(2), 193-202. <http://dx.doi.org/10.1159/000336376>
60. Zhou, W., Li, S., Liu, Y., Qi, X., Chen, H., & Cheng, C. et al. (2012). The evolution of tachykinin/tachykinin receptor (TAC/TACR) in vertebrates and molecular identification of the TAC3/TACR3 system in zebrafish (*Danio rerio*). *Molecular And Cellular Endocrinology*, 361(1-2), 202-212. <http://dx.doi.org/10.1016/j.mce.2012.04.007>

## Anexos

1. Diseño de oligonucleótidos de tac3ra realizado una secuencia consenso alineando las secuencias de tac3ra de *Oreochromis niloticus* (NM\_001301378), *Takifugu rubripes* (NM\_001280097), *Oryzias latipes* (NM\_001278910), *Danio rerio* (NM\_001256638), *Poecilia mexicana* (XM\_015005556.1) y *Astyanax mexicanus* (XM\_007235686.2). Oligonucleotidos tachados

```

                220          *          240          *          260          *          280
NM_0012566 : CATTTCCTGGCATGGCACAGTCACAGAACGGATCTAACCTAACGGGAACTTTACGAACCAGTTCGTGCAG : 90
NM_0012789 : -----ATGGGAGCCCCGAATAACGGATCCAACATAAACGTCCAACTATACCAACCAGTTTGTGCAG : 60
NM_0012800 : -----ATGGCACCTTCACTCAACGGATCCAACATCACCGCGAACTACACCAACCAGTTCGTGCAG : 60
NM_0013013 : -----ATGGCGGCTTCATATAACGGATCCAACATAAACGACGAACCACACCAACCAGTTTGTCCAG : 60
XM_0072356 : CG---C-GCCATGGCACAGTCCAGAACGGCACCGCGCTCCCGGGAACTCACCAACCAGTTCGTGCAG : 275
XM_0150055 : -----ATGGGTACCCCACACAACGGATCAAATGTAACATCGAATTACCAACCAACCAGTTCGTGCAG : 60
                ATGGCACCGTCAcAGAACGGATCCAACATAAACGGCGAACTACACCAACCAGTTCGTGCAG

```

```

                *          300          *          320          *          340          *
NM_0012566 : CCGCCGTGGCGCGTGGCGCTGTGGTGGTGGCGTACAGCTCCATCCTGGCGATCGCGGGTGTTCCGGGAATC : 160
NM_0012789 : CCCGTGTGGCGCGTCGCTCTCTGGTGGTGGCTTACAGCTTGGTTTTGGCGGTGGCCGTTTTGGAAATG : 130
NM_0012800 : CCTCCGTGGCGCGTCGCGCTCTGGTCCGTGGCTTACAGCTTCGTGTGGCGGTGGCCGGTGTTCCGGGAACC : 130
NM_0013013 : CCGCCATGGCGCATCGCTCTCTGGTCTGTGGCTTACAGCTTCGTGTGGCGGTGGCCGGTTTTGGAAACC : 130
XM_0072356 : CCCGCGTGGCGCGTGGCGCTCTGGTCCCTCGCTTACAGCACCATCCTGGGCGTGGCCGTGTTCCGGGAACC : 345
XM_0150055 : CCGCCGTGGCGCATCGCTCTCTGGTCTGTGGCTTACAGCTCCGTGTGGCGGTGGCCGTTTTGGAAACC : 130
                CCGccgTGGCGCGTCGCTcTcTGGTGGgTCGCCTACAGCtTcGTGcTGGcggTgGCCGTgTTTGGGAACCc

```

```

                360          *          380          *          400          *          420
NM_0012566 : TGATCGTCATGTGGATCATTTCTGGCTCATAAGCGGATGCCGACCGTCACCAACTACTTTCTGCTCAAACTT : 230
NM_0012789 : TCATCGTCATTTGGATCATTTCTTGCGCACAAGCGTATGAGAACGGTGACGAATTACTTTCTGCTCAAACTT : 200
NM_0012800 : TGATCGTCATATGGATCATTTCTCGCCCACAAGCGCATGAGGACGGTGACCAACTACTTTATCCTCAAATTT : 200
NM_0013013 : TAATTGTGATATGGATCATTTCTTGCGCACAAGCGCATGAGGACAGTGACAAACTACTTTCTGCTAAAACTT : 200
XM_0072356 : TAGTGGTGATGTGGATCATCTCGCGCACAAGCGGATGCGACCGTCACCAACTACTTTCTGCTGAAACTT : 415
XM_0150055 : TCATCGTGATATGGATCATTTCTCGCCCATAAGCGGATGCGGACGGTGACCAACTACTTTCTGCTTAAACTT : 200
                TCaTCGTCATATGGATCATtCTCGCGCACAAAGCGGATGAGGACGGTGACCAAcTACTTTCTgCTCAAAcCT

```

\* 440 \* 460 \* 480 \*  
 NM 0012566 : GGC**GTTTCGGACGCGTCCATGGCCGCGCTTCAACACTTTGATCAAA**TTTCGTTTACGCCACA**CA**CGGAGAT : 300  
 NM 0012789 : GGC**GTTTCGGACGCGTCCATGGCTGCGTTCAACACTCTGATCAAA**TTTCATCTACGCTGCG**CA**CGGGAG : 270  
 NM\_0012800 : GGC**TTCGGACGCGTCCATGGCCGCGTTCAACACTTTGATCAAA**TTTCATCTACGCCGCT**CA**CGGGAG : 270  
 NM\_0013013 : GGC**GTTTCGGATGCGTCAATGGCTGCTTTCAATACTTCAATAAA**TTTATCTACGCCGCT**CA**CGGGAG : 270  
 XM 0072356 : GGC**CTTCGGACGCGTCCATGGCCGCGTTTAAACGCTGGTGAAC**TTTCGTGTACGCCA**CA**CGGGAC : 485  
 XM 0150055 : GGC**CTTCGGACGCGTCGATGGCCGCTTTTAAACGCTTTGATAAA**TTTATCTACGCTGT**CCATCGGAGAC** : 270  
 GGC**GTTtTCGGAcGCGTCCATGGCCGCGTTCAAc**CtTtgaTCAAcTTTCATCTACGCCGcTCAcGGGGAG

500 \* 520 \* 540 \* 560  
 NM 0012566 : TGGT**ATTTCGGAGAAAGCC**TACTGCA**AAATTTCACAA**TTT**TTCCCGT**CACCTCCGTGTT**TGCCAGCATTT** : 370  
 NM 0012789 : TGGT**ATTTCGGAGAGGCT**TACTGCA**AAATTTCACAA**TTT**TTCCCGT**CACATCTGTGTT**TGCAAGCATCT** : 340  
 NM\_0012800 : TGGT**ATTTCGGCAAAGCC**TACTG**TAAATTTCACAA**TTT**TTCCCGT**CACGTCTGTGTT**TGCGAGCATCT** : 340  
 NM\_0013013 : TGGT**ATTTCGGGAAAGCC**TACTGCA**AAATTTCACAA**TTT**TTCCAGT**CACATCTGTGTT**TGCAAGCATCT** : 340  
 XM 0072356 : TGGT**ATTTCGGAGAGGCG**TACTGCA**AGTTTCACAA**TTT**TTCCCGT**CACCTCCGTGTT**CGCCAGCATCT** : 555  
 XM 0150055 : TGGT**ATTTCGGGAAAGCC**TACTG**TAAATTTCAAAA**TTT**TTCCAGT**GACATCTGTGTT**CGCAAGCATCT** : 340  
 TGGT**AcTTcGGGAAAGCC**TACTGCA**AaTTcCAeAAcTTCTTcCCC**GTcACATCTGTGTT**TGCAAGCATcT**

\* 580 \* 600 \* 620 \*  
 NM 0012566 : ACT**CCATGAGCGCAATCGCAGT**CGACAGGTACATGG**CCATC**ATCC**CTCTGAAA**CCAC**CGACTCTCGGC** : 440  
 NM 0012789 : ACT**CGATGACTGCGATAGCAGT**GGACAGATACATGG**CCATC**ATCC**CTCTGAAG**CCT**CGCCTGTCAGC** : 410  
 NM\_0012800 : ACT**CGATGACTGCCATCGCCGT**GGACAGGTACATGG**CCATC**ATCC**CTCTGAAG**CCCC**CGCCTGTCGGC** : 410  
 NM\_0013013 : ACT**CAATGACGGCAATAGCTGT**GGACAGGTACATGG**CCATC**ATCC**CTCTAAG**CCT**CGATGTCAGC** : 410  
 XM 0072356 : ACT**CCATGACTGCTATAGCCGT**GGACAGGTACATGG**CTATA**ATT**CACCCGCTGAAG**CCT**CACCTGTCGGC** : 625  
 XM 0150055 : ACT**CCATGACTGCAATAGCTGT**GGACAGATACATGG**CCATC**ATCC**CACTGAAG**CCCC**CGTCTCTCAGC** : 410  
 ACT**CCATGAcTGCAATAGCCGTg**GACAGGTACATGG**CcATcATCCACCC**CTTgAAgCCCCg**CCTGTCAGC**

640 \* 660 \* 680 \* 700  
 NM 0012566 : G**ACGGCCACC**AAAGTGAT**CatTGTGTGTATCTGG**GTG**CTCGCTGT**G**GT**TTTga**GCCTTCCC**G**CTGTGTTTC** : 510  
 NM\_0012789 : A**AAGGCCACC**C**ACAGG**AT**CATCGTGTGCATA**TGGAG**CTCGCTATA**G**GT**TTT**AGCCTTCCC**A**CTTTGCTAC** : 480

NM\_0012800 : GAAGGCCACCACAGGGGTCATCATCTGTATCTGGAGTCTGGCTGTGGTTCTGGCCCTTCCCCTCTCTGTGTAC : 480  
 NM\_0013013 : GAAGGTCACCACAGGGGTTATGTTTGTATCTGGAGTCTAGCTATAGTTTTGGCTTTCCCCTCTCTGTGTAC : 480  
 XM\_0072356 : CACGGCTACTAAAGTGGTGATCGTGTTTATCTGGGTGCTGGCGGTGTGCCTGGCCCTTCCCCTCTGTGTTC : 695  
 XM\_0150055 : AAAGGTCACCATGGGAGTTCATCGTCAAGTATCTGGAGCCTGGCAGTGGTACTGGCTTTCCCCTCTGTGTCTAT : 480  
 GAAGGCCcACcACaGgGtGCATCgTgTgtATcTGGAGCCTGGCTGTGGTTTTGGCCCTTCCCCTCTGTGTAC

NM\_0012566 : TTTTCAACCATCAAAA-----AACTGCC-CAAACGAACCTCTCTGTATGTTGCCTGGCCGACCTT : 571  
 NM\_0012789 : TTTTCCACCACCCAAG-----TCCGTCCTC-GAAGGACCATCTGTATAGTAGCCTGGCCTCGCATGG : 541  
 NM\_0012800 : TTCTCCACCACCCTTG-----TTCTGCCTCATAAG-ACCGTCTGTCTCGTGGCCTGGCCGCCAGTG : 541  
 NM\_0013013 : TTCTCAACCACCCAACCAAGCGAACCATCCCAAGGACCATCTGTATGTGGCCTGGCCCAACATGA : 550  
 XM\_0072356 : TTCTCCACCATCAGAA-----AATTACC-CAAGAGGACTCTGTGTACGTGGCCTGGCCCATCCA : 756  
 XM\_0150055 : TTCTCCACCATCTCAGC-----TCAACC-ACAGAACCATCTGTATGTCCGCTGGCCTCGCATGG : 541  
 TTCTCCACCACcCAaAA CcTGCCtCAAAaGGACCATcTgCtTaCGTGGCCTGGCCTCgCATGG

NM\_0012566 : CAGAAAGACCCTTTCATGTATCATATCATTGTGGGAGTCTGGTGTATGTTCTGCCGCTGGTGGTTCATGGG : 641  
 NM\_0012789 : CAGACGACTCCTTTATGTATCATATCATAGTTCAGTCTCATCTATGTCTGCCCTTATAGTAGTGATGGG : 611  
 NM\_0012800 : CCGACGACTCCTTCATGTATCATATCATAGTCATCGTCTGTGTCTACCTCTGCCCTCTGCTGGTTCATGGC : 611  
 NM\_0013013 : AGGATGACTCCTTCATGTATCATATCATAGTAAAGTCTGTGTCTACGTCTGCCCTTATAGTAGTGATGGG : 620  
 XM\_0072356 : GCGAGGACTCCTTCATGTACCATATCATAGTGACTGCACTGGTGTACATCTGCCCTGGTGGTGTATGGG : 826  
 XM\_0150055 : AAGATGACCCTTTATGTATCATATCATAGTGACTGTGCTACTGTATGTCTGCCCTTGGTGGTGTATGGG : 611  
 CAGACGACTCcTTCATGTAtCATATCATaGTGAcAgtTCTgGTCTATGTgCTGCCCTTgTgGTGTATGGg

NM\_0012566 : TATCAACTTACACTATGTGCGGATTGACCCTTTGGGGAGGAGAGATTCCTGGTGACTCCTCAGACAACTAT : 711  
 NM\_0012789 : CATCACTTACACCATTGTGGGGTTGACGCTGTGGGGAGGTGAGATTCAGGTGACACTTCTGATAACTAT : 681  
 NM\_0012800 : CATCACTTACACCATTGTGGGGAATGACGCTCTGGGGAGGGGAGATTCCTGGAGACTCCTCCGACAACTAT : 681  
 NM\_0013013 : CATTACTTACACCATAGTGGGGCTGACACTGTGGGGTGGTGGATTCCTGGAGATTCGTCTGATAACTAT : 690  
 XM\_0072356 : GATTACTTACACTATAGTGGGGGTAACGCTATGGGGAGGGGAGATTCCTGGAGACTCGTCGGATAAATTAC : 896  
 XM\_0150055 : CATCACTTACACCATTGTGGGGGTTGACACTGTGGGGTAGTGGATTCCTGGAGACTCATCTGACAAATTAT : 681

CATCAcCTACACCATTGTgGGGTgACGCTGTGGGGAgGTGAGATTCcTGGAGActCCTCTGATAACTAt

920 \* 940 \* 960 \* 980  
NM 0012566 : CAGGGC CAGCT CAGGGCC AAG GAGGAAGGT GGTGAAA ATGATGAT CAT TGTAGTGGTGAC CTTTGCC TCT : 781  
NM 0012789 : CACGGG CAGCT CCAGGCT AAAAGA AAGGT TGTGAAA ATGATGAT CAT TGTAGTGGTGAC CTTTGCC TCT : 751  
NM\_0012800 : CATGGA CAGCT CAGAGCT AAAAGG AAGGT CGTGAA GATGATGAT CAT TGTG GTGCTGAC CTTTGCC TCT : 751  
NM\_0013013 : CATGGA CAGCT CCGGGCT AAAAGG AAGGT GGT TAA GATGATGAT TGT TGTAGTGGTGAC CTTTGCC TCT : 760  
XM 0072356 : CACGGT CAGCT GCGTGCAAAGG AAGGT GGTGAA GATGATGAT CAT CGTG GTGCTGAC CTTTGCC ATCT : 966  
XM 0150055 : CATGGA CAGCT CAAAAGCT AAAAGG AAGGT GGTAAA GATGATGAT CAT TGTG GTGGTGAC TTTTGCC TCT : 751  
CATGGACAGCTcCGGGC TAAAAGgAAGGTGCTGAA GATGATGATcaTtGTAGTggTGACCTTTTGCCCTCT

\* 1000 \* 1020 \* 1040 \*  
NM 0012566 : GCTGGG TGCCGTAC CATGTGTAT TTCCTG GGTGAC GGGAT TGAACAAGCAGCTGGCTCGATG GAAGTTCAT : 851  
NM 0012789 : GCTGGG TGCCCTAC CACATCTAC TTCATT GTGAC CGGCAT CAACAAGCGTCTGAGCAAGTGAAGTACAT : 821  
NM 0012800 : GCTGGG TGCCCTAT CACGTTTAC TTCATCGT GACGGGGCTCAGCAAGCAGCTGAGCAAGCAGAAGTACAT : 821  
NM 0013013 : GTTGGG TGCCATAC CATGTTTAC TTCATT CAACAAGGTC CAACAAGCTTCTAAGCAAATGAAGTACAT : 830  
XM 0072356 : GCTGGG TGCCGTAC CACGTGTAC TTCCTGAT TACAGGCC TGAACAAGCAGCTGGTGAAGAGGAAGTCCAT : 1036  
XM 0150055 : GCTGGG TGCCGTAT CATCTCTAC TTCATT GTGAC CGGCTCTCGATAAACGCCTGATGAAGTGAAGTACAT : 821  
GcTGGcTGCCGTACCACGTCTAcTTCATTgtGACCGGCCCTCaacAAgCAGCTgAGCaaGTgGAAGTACAT

1060 \* 1080 \* 1100 \* 1120  
NM 0012566 : TCAGCAGATCTATCTGTCCATCATGTGGCTTGCCATGAGCTCCACCATGTATAACCCCATTTATTTACTGCT : 921  
NM 0012789 : CCAGCAGGTTTACCTGTCTGGT GATGTGGCTGGCAATGAGCTCCACCATGTACAACCCCATTCATCTACTGCT : 891  
NM\_0012800 : CCAGCAGGTTGACCTGTCTGTGCTGTGGCTGCGATGAGCTCCACCATGTACAACCCCATTCATCTACTGCT : 891  
NM\_0013013 : CCAGCAGGTTTACCTGTCTGATCATGTGGCTTGCAATGAGTTCCACCATGTACAACCCCTATTCATCTACTGCT : 900  
XM 0072356 : CCAGCAGGTTTACCTCGCGGT CATGTGGCTGCCATGAGCTCCACCATGTACAACCCCATTCATCTACTGCT : 1106  
XM\_0150055 : CCAGCAGGTTTACCTGTCTGATGCTGTGGCTGGCCATGAGCTCCACCATGTATAAATCCTGTTATCTACTGCT : 891  
cCAGCAGgTTTAcCTgtCGGTcATGTGGCTGGCCATGAGcTCCACCATGTACAACCCCaTCATcTACTGCT

\* 1140 \* 1160 \* 1180 \*  
NM 0012566 : TGCCTAACAGCCGGT TTCGCGCTGGCTTCAAACGTTTTCGCTGGTGCCCTTTTGTGCAAGTCTCTG : 991  
NM\_0012789 : TGCCTAACAGCAGGT TTCGAGCAAGGCTTCAAGCGG GCGTTTCGCTGGTGCCCTTCATCAAGGTGTCAA : 961

NM\_0012800 : TGCCTCAACAGCAGGTTTCCGAGCGGGCTTCAAGCGTGCGTTCCGTGGTGTCCGTTTCATTAAGGTGTCCA : 961  
 NM\_0013013 : TGCCTCAACAGCAGGTTTCCGAGCAGGCTTCAAGCAAGCATTTTCGTGGTGCCTTTCATTAAGGTGTCCA : 970  
 XM\_0072356 : TGCCTCAACAGCAGGTA----- : 1123  
 XM\_0150055 : TGCCTCAACAGCAGGTTTCCGAACC GGCTTCAAGAGGGCATTTTCGTGGTGCCTTTCATCAAGGCATCCA : 961  
 TGCCTcAACAGCaGGTtttcgAGcAggcttcaaGCGGgCGttCcgCtggtgCccGttCAtCAaGgTGtcCA



2. Diseño de oligonucleótidos de *tac3rb* obteniendo una secuencia consenso alineando las secuencias de *tac3r* de *Danio rerio* (JF317293.1), *Oryzias latipes* (NM\_001278874.1), *Tetraodon nigroviridis*(BK008097.1), *Takifugu rubripes* (NM\_001280112.1), *Oreochromis niloticus* (KF471675.1), *Astyanax mexicanus* (XM\_007235686.2) y *Poecilia mexicana* (XM\_015005556.1). Los oligonucleótidos se encuentran tachados

```

                220                *                240                *                260                *                280
KF471675.1 : -----ATGGAA--AACACAAC--CAGA-GGTCGTGACCAAC CAGTTCGTGCAGCC : 44
NM_0012788 : -----ATGGGCTCTGAACGGGATGGATCGAACACCAC--CAGA-GTCCTGGCCAAC CAGTTCGTGCAGCC : 62
JF317293.1 : -----ATGGCTGGTCCTCAGAGCGGCTCAAATGTGACG-C-GT-AATTTACAAATCAGTTCGTGCAGCC : 62
BK008097.1 : -----ATGGCATCAGTTCGGGA-GCAA-----CC--CAGA-AATCTGACCAAC CAGTTCGTGCAGCC : 53
NM_0012801 : -----ATGTCATCCGATCGGGA-GGAA-----AG--CAGA-AGTCTGAACAAC CAGTTCGTGCAGCC : 53
XM_0072356 : GCGCCATGGCACAGTCCAGAACGGCACCG-CGCTCC--CGGGGAACCTCACC AAC CAGTTCGTGCAGCC : 277
XM_0150055 : -----ATGGGTACCCACACAACGGATCCAATGTAACATC-G--AATTACACCAAC CAGTTCGTGCAGCC : 62
                atgGCATCTGCTcGGGAcGgAACCAACGCAAcCAGAAATCtGaccAAcCAGTTCGTGCAGCC
                *                300                *                320                *                340                *
KF471675.1 : TCCGTGGCGCGTcGCGCTGTGGTcGGTGGCTTACAGCACAGTGTCTGGCGGTGGCGGTC TTCCGG-GAACTT : 113
NM_0012788 : GGCGTGGCGCATcGCGCTGTGGTcGGTGGCTTACATCGCCGTCTAGCGGTGGCGGTT TTCCGG-AAACTT : 131
JF317293.1 : GCCGTGGCGGGTcGCCGTCTGGTcGGTGGCTTACAGCTCGGTGTCTCGCGGTTCGCCGTT TTCCGG-AAACTT : 131
BK008097.1 : GGCGTGGCGCGTcGCTGCTCTGGTcGGTGGCTTACAGCACCGTGTCTGGCGGTGGCGGTTACTGGGAAACTT : 123
NM_0012801 : CGCGTGGCGCATcGCTGCTGTGGTcGGTGGCTTACAGCACGTTGTCTGGCGGTGGCGGTT TTGG-AAACTT : 122
XM_0072356 : CCCGTGGCGCGTGGCGCTCTGGTCCCTCGCCTACAGCACCATCTGGGCGTGGCGGTT TTCCGG-GAACTT : 346
XM_0150055 : GCCGTGGCGCATcGCTCTCTGGTcGCTGGCTTACAGCTCCGTGTCTGGCGGTGGCGGTT TTGG-AAACTT : 131
                GcCGTGGCGcGTcGCGcTCTGGTcGGTGGCTTACAgCACCgTGCTGGcGGTgGCCGTTttCGGAAACcT
                *                360                *                380                *                400                *                420
KF471675.1 : GATAGTGATTGGGATATTCTTGGCGCACAAAGC-GGATGAGGACTGTCACCAACTATTTCTTGCTGAACTT : 182
NM_0012788 : GATCGTCATTGGGATATTCTTGGCGCACAAAGC-GCATGAGAAGTGTACCAACTACTTCTTGCTTAACTT : 200
JF317293.1 : CATTGTTATTGGGATCATTTTGGCCATAAAC-GGATGCGCACCCTCACCAACTATTTTCTTGCTCAACTT : 200
BK008097.1 : G-----CAAGCCGCATGCGAACCCTCACGAACTTTTTCTTGCTCAACTT : 167
NM_0012801 : GATTGTGATTGGGATCATCTTGGCGCACAAAGC-GAATGCGCACCCTCACTAACTACTTCTTGCTCAACTT : 191
XM_0072356 : AGTGGTGTGTTGGGATCATCTTGGCGCACAAAGC-GGATGCGCACCCTCACCAACTACTTCTTGCTGAACTT : 415
XM_0150055 : CATCGTGATAAGGATCATCTTGGCCATAAAC-GGATGCGGACGGTGACCAACTACTTCTTGCTTAACTT : 200
                GatCgtGatTtggatCatTctGgcGcaCAAAGcGGATGCGCACCGTcACCAACTaCTTcTcTGCTCAACTT
                *                440                *                460                *                480                *
KF471675.1 : GGCTTTCTCTGACGTTTCCATGGCCGCTTTCAACACGCTCATCAACTTCATCTACGCGGCTCACGGGAGAG : 252
NM_0012788 : GGCTTTCCGCGGATGCGTCCATGGCCGCGTTCAACACCCTCATCAACTTCATCTACGCGGCGCACGGACAG : 270
JF317293.1 : GGCGTTTTCGACGCGTCCATGGCCGCTTTCAACACGCTCATCAACTTCATTTACGCGCACGGACGGAGAG : 270

```

BK008097.1 : GGCTTTCTCTGACGTTTCATGGCAGCGTTCAACACGCTCATCAACTTCAATTACGCGGGCTCACGGGAGAG : 237  
 NM 0012801 : GGCGTTCTCCGACGTGTCCATGGCAGCGTTCAACACGCTCATCAACTTCTGTACGCGGGCTCACGGGAGAG : 261  
 XM 0072356 : GGCTTTCTCGACGCGTCCATGGCCGCGCTTTAACACGCTGGTGAACCTTCTGTACGCGCACGGGGAC : 485  
 XM 0150055 : GGCTTTCTCGACGCGTCCATGGCCGCGCTTTAACGCTTTGATAAACTTTATCTACGCTGTCCATGGGAGAC : 270  
 GGCTTTCTcCGGAcGCGTCCATGGCCGCGTTCAACaCGcTCaTCAACTTcATCTACGCGGcTCAcGGgAG

KF471675.1 : TGGTACTTTCGGGCAGGTGTACTGCAAGTTTCCAAACTTCTTTCCCGTCAACCGCCGTGTTTGCCAGCATCT : 322  
 NM 0012788 : TGGTACTTTGGAGAGGTCTACTGCAAGTTTCCAAACTTCTTCCCTGTGTGCTGCTGTGTTTGCAAGCATCT : 340  
 JF317293.1 : TGGTACTTTCGGAGAGGTGTACTGCAAGTTTCCAAACTTCTTCCCTGTGACCGCCGTGTTTGCCAGCATTT : 340  
 BK008097.1 : TGGTACTTTGGTGAATCTACTGCAAAATTTCCAAACTTCTTCCCGTCAACCGCTGTGTTTGCCAGCATCT : 307  
 NM 0012801 : TGGTACTTTGGCGAGGTGTACTGCAAGTTTCCAAACTTCTTCCCGTCAACGGCGGTGTTTGCCAGCATCT : 331  
 XM 0072356 : TGGTACTTTCGGAGAGGCGTACTGCAAGTTTCCAAACTTCTTCCCGTCAACCTCCGTGTTTGCCAGCATCT : 555  
 XM 0150055 : TGGTACTTTCGGGAAGCCACTGTAATTTCCAAACTTCTTCCCAAGTGAATCTGTGTTTGCAAGCATCT : 340  
 TGGTACTTTCGGAgAggTCTACTGcAaGTTCCAcAACTTcTTeCCTGTCaCCGCTGTGTTTGCCAGCATcT

KF471675.1 : ACTCCATGACCGCGATCGCCATCGACAGGTACATGGCGATCATCCACCCTATGAAGCCTCGTCTGCCTGC : 392  
 NM 0012788 : ACTCCATGACGGCCATAGCCATCGACAGATACATGGCCATCATCCATCCTTTGAAGCCTTGTCTGTCTGC : 410  
 JF317293.1 : ACTCCATGACAGCGATGTCAGTTCGACAGGTACATGGCCATAATACATCCTCTGAAGCCTCGTCTGTCTGC : 410  
 BK008097.1 : ACTCCATGACCGCCATGCTATCGACAGGTACACGGCCATCATCCACCCTGAAGCCCGTATGTCTGC : 377  
 NM 0012801 : ACTCTATGACCGCCATCGCCATCGACAGGTACGTGGCCATCATCCATCCCTGAAGCCTCGCTGTCTGC : 401  
 XM 0072356 : ACTCCATGACTGCTATAGCCGTGGACAGGTACATGGCTATAAATTCACCCGCTGAAGCCTCACCTGTCTGC : 625  
 XM 0150055 : ACTCCATGACTGCAATAGCTGTGGACAGATACATGGCCATCATCCACCCTGAAGCCCGTCTCTCTGC : 410  
 ACTCcATGACCGCCATAGCCATCGACAGGTACatGGCCATCATCCACCCTCTGAAGCcTCgTcTgtCAGC

KF471675.1 : TAAAGCCACTCTGTTGGGATCATGTTCTGTATCTGGAGC-TGGGCTGTGGTTCTGGCCTTCCGGCTCTGCTA : 461  
 NM 0012788 : AAAAGCCACTGTTGGAGTTCATCTTTTGTATCTGGAGC-CTGGGCTGTGGTTCTGGCTTTTCCCTCTCTGCTA : 479  
 JF317293.1 : CACGGCTACTTAAAGTGGTGTATGTTCTGTATTTGG-GCACTGGCAGTGAATTTGGGCTTTCCGGCTGTGTTT : 479  
 BK008097.1 : GAAGGCCACCACAGCAGTTCATCGTCTGCATCTGGACC-CTGGCCGTGGTTCTGGCGCTCCCTCTCTGTTA : 446  
 NM 0012801 : GAAGGCCACCACAGGAGTTCATCATCGGTATCTGGACC-CTGGCCGTGGTTCTGGCGCTCCCTCTCTGTTA : 470  
 XM 0072356 : CACGGCTACTTAAAGTGGTGTATGTTCTGTATTTGG-GTGTGGCGGTGTCTCTGGCCTTCCCTCTGTGTTT : 694  
 XM 0150055 : AAAGGTCACCATGGGAGTTCATCGTCAATATCTGGAGC-CTGGCAGTGGTACTGGCTTTCCCTCTGTGCTA : 479

AAAGGCCACTATAGGAGTCATCGTCTgtATcTGGAGccTGGCTGTggTTcTGGCTTTcCCTCTCTGTTA

```

          *           720           *           740           *           760           *
KF471675.1 : CTTCCTCCACCATCCGAACTCTGCCCCAAAGGACCGTCTCGCTACGTGGCCCTGGCCCGGCATGGCTGAAGAC : 531
NM_0012788 : CTTCCTCCACCAACCGCACATACCCAGCCGGACCTTCTGCTATGTGGCACTGGCCCGGGATGGCAGACGAC : 549
JF317293.1 : CTACTCCACCACGAGAACCATGCCCTCGCAGAACCATTTGCTACGTCCGCTGGCCAAAGACCGGCTGAGGAT : 549
BK008097.1 : CTTCCTCCACCAACCGAGTGAATGCCCCGCAAGACCTCTGCTACGTGGCCCTGGCCCGGCATGTCCGACGAC : 516
NM_0012801 : TTTCTCCACCAACCGAGTTCGCAACCGCAAGACCATCTGCTACGTGGCTTGGCCCGGCATGTCTGACGAC : 540
XM_0072356 : CTTCCTCCACCATCAGAAATACCCAAAGAGGACTCTGTGCTACGTGGCCCTGGCCCGAGATCCAGCGAGGAC : 764
XM_0150055 : TTTCTCCACCACTCGAGTCAACCCACAGAACCATCTGCTATGTCCGCTGGCCCGGCATGGAAGATGAC : 549
CTtCTCCACCAACCGaACTCtGCccCGCaGGACcATCTGCTACGTGGCCCTGGCCCCGCAgGGCTGACGAC
```

```

          780           *           800           *           820           *           840
KF471675.1 : TCCTTCAITGTATCATATCATAGTTACAGTTCTGGTCTACATACTGCCCTTAGTGGTGATGGGCATCACCT : 601
NM_0012788 : CCCTTTAITGTATCACATCATAGTTACAGTCTGGTCTATGTGTGGCCCTTAGCAGTGATGGGCATCACAT : 619
JF317293.1 : TCATTCAITGTATCACATCATAGTGACGGTGCTGGTCTACATGCTGCCCTTAGTGGTGATGGGCATCACCT : 619
BK008097.1 : CCGTTCAITGTATCACATCATAGTGACGGTACTGGTTTACGTGTGGCCCTTAGTGGTCAATGGCCGTCACCT : 586
NM_0012801 : CCGTTCAITGTATCACATCATAGTGACAATACTGGTTTATGTGTGGCCCTTAGTGGTGATGGCCATCACTT : 610
XM_0072356 : TCCTTCAITGTACCATATCATAGTGACTGCACTGGTGTACATGCTGCCCTTGGTGGTGATGGGGATTACCT : 834
XM_0150055 : CCCTTTAITGTATCATATCATAGTGACTGTGCTACTGTATGTGCTGCCCTTGGTGGTGATGGGCATCACTT : 619
CCCTTCAtGTAtCACATCATAGTGACAgTACTggTCTACGTgCTGCCCTTAGtgGTgATGGGcaTcACCT
```

```

          *           860           *           880           *           900           *
KF471675.1 : ATACCAATTGTGGGGGTGACACTATGGGGAGGTGAGATCCCTGGAGATTCATCTGATAAATAACCAAGGACA : 671
NM_0012788 : ACACCGTTGTGGGGGTGTCGCTGTGGGGAAAGCAAGATCCCTGGAGACTCATCTGAAAACATCTTTGGACA : 689
JF317293.1 : AACTATAGTGGGGTTAACTTTGGGGAGGAGAGATCCCTGGAGACTCGTCGGACAATTAATGTTGGACA : 689
BK008097.1 : ACACCAATTGTGGGCTTTACCTGTGGGGAGGAAAATGATCCCGGAGACTCAGCCGACAACATACAGGCCA : 656
NM_0012801 : ACACCAATCGTGGCCTGACCTGTGGGGAGGGGGATCCCGGAGACTCAGCCGACAACATACAGGGGCA : 680
XM_0072356 : AACTATAGTGGGGTAACTGCTATGGGGAGGGGAATGATCCCTGGAGACTCGTCGGATAAATAACAGGTCA : 904
XM_0150055 : ACACCAATCGTGGGGGTGACACTGTGGGGTAGTGAATGATCCCTGGAGACTCATCTGACAATAATCATGGACA : 689
AcACCAATTGTGGGGGTGACACTGTGGGGaAGTGAATGATCCCTGGAGAcTCATCTGACAATAATcATGGACA
```

920 \* 940 \* 960 \* 980

KF471675.1 : GCTACAGGCCAAAAGGAAGGTGGTGAAGATGATGATTAATTGTAGTGGTTACCTTCGCCCTCTGCTGGCTG : 741  
 NM 0012788 : ACTCAGGGCCAAAAGAAAGGTGTGTAAAATGATGATCATCGTGGTGGTGACCTTTGCCCTCTGCTGGCTG : 759  
 JF317293.1 : GCTACGTGCTAAGAGGAAGGTGGTGAAGATGATGATCGTGGTGGTGGTGACCTTCGCCCTCTGCTGGTTG : 759  
 BK008097.1 : CATCAGAGCTAAAAGGAAGGTGGTGAAGATGATGATCATCGTAGTGGTGACCTTTGCCCTCTGCTGGCTG : 726  
 NM 0012801 : CATCAGAGCAAAAGAGGAAGGTGTGTGAAGATGATGATCATCGTAGTGGTGACCTTTGCCCTCTGCTGGCTG : 750  
 XM 0072356 : GCTGCGTGCAAAAGAGGAAGGTGGTGAAGATGATGATCATCGTGGTGGTGACCTTTGCCCTCTGCTGGCTG : 974  
 XM 0150055 : GCTCAAAGCTAAAAGGAAGGTGGTAAAAGATGATGATCATTTGTGGTGGTGACCTTTGCCCTCTGCTGGTTG : 759  
 gCTCAGAGCTAAAAGGAAGGTGGTAAAAGATGATGATcaTCGTGGTgGTgACCTTTGCCcTCTGCTGGCTG

\* 1000 \* 1020 \* 1040 \*  
 KF471675.1 : CCGTATCATGTCCTACTTCAATCGCGACGGGTCTCAACAAGCGTCTGAGCAAGTGGAAAGTACATCCAGCAGG : 811  
 NM 0012788 : CCCTACCACGTCTACTTCAATGTGACCGGCATCAACAAGCGTCTGAGCAAGTGGAAAGTACATCCAGCAGG : 829  
 JF317293.1 : CCGTATCACATCTATTTCAATCGTAACAGGCCTGAACAAACGCCTGACAAAGTGGAAAGTACATCCAGCAGG : 829  
 BK008097.1 : CCCTATCACGTCTACTTCAATGTGACGGGACTCAACAAGCAGCTGAGCAAGTGGAAAGTACATCCAGCAGG : 796  
 NM 0012801 : CCCTATCATGTCCTACTTCAATGTGACGGGTCTCAACAAGCAGTGTGAGCAGTGGAAAGTACATCCAGCAGG : 820  
 XM 0072356 : CCGTACCACGTGTACTTCTGATTACAGGCCTGAACAAGCAGCTGGTGAAGAGGAAGTACATCCAGCAGG : 1044  
 XM 0150055 : CCGTATCATCTCTACTTCAATGTGACCGGTCTCGATAAACGCCTGATGAAGTGGAAAGTACATCCAGCAGG : 829  
 CCGTATCACGTcTAcTTCaTTgtGACGGGCcTCaAcAAGCGGcTgAGCAaGtGGAAGTACATCCAGCAGG

1060 \* 1080 \* 1100 \* 1120  
 KF471675.1 : TTTACCTGTCCGTGCTGTGGCTTGCAATGAGCTCCACCATGTACAATCCCATCATCTACTGCTGCTCAA : 881  
 NM 0012788 : TTTACCTGTCCGTGATGTGGCTGGCAATGAGCTCCACCATGTACAACCCCATCATCTACTGCTGCTCAA : 899  
 JF317293.1 : TGTATCTGTCTGTGCTGTGGCTGGCCATGAGCTCCACCATGTACAACCCCATCATCTACTGCTGTCTGAA : 899  
 BK008097.1 : TGTACTGTCCGTGCTATGGCTGGCAATGAGCTCCACCATGTACAACCCCATCATCTACTGCTGCTCAA : 866  
 NM 0012801 : TGTACTGTCCGTGCTGTGGCTGGCGATGAGCTCCACCATGTACAACCCCATCATCTACTGCTGCTCAA : 890  
 XM 0072356 : TCTACTCGCGGTCAATGTGGCTCGCCATGAGCTCCACCATGTACAACCCCATCATCTACTGCTGCTCAA : 1114  
 XM 0150055 : TTTACCTGTCAAGTGTGTGGCTGGCCATGAGCTCCACCATGTATAATCCGTGTATCTACTGCTGCTCAA : 899  
 TTTAcCTgtCGGTgCTgTGGCTGGCAATGAGCTCCACCATGTAcAACCcCaTcATcTACTGCTGcCTcAA

\* 1140 \* 1160 \* 1180 \*  
 KF471675.1 : TAGCAGGTTCGAGCTGGTTTCAAGCAGGTTTCCGCTGGTGCCCTTTTGTCCGGGTGTCCAGCTACGAT : 951  
 NM 0012788 : CAGCAGATTTCGGGCGGGCTTCAAGCAGGTTTCCGCTGCTGTCCCTGCGTGCAGGGGTGAGCTACGAT : 969  
 JF317293.1 : TGGCAGATTTCGCGCGGGCTTCAAGCAGGCTTCAAGTGGTGTCCCTTCAATTCAGGTGTCCAGCTATGAC : 969

```

BK008097.1 : CGGCAGGTTC CGAGCCGGA TTCAAGCGGGTTTCTGCTGGTGCCCGTTTGT CAGGATGTCAAGCTACGAT : 936
NM 0012801 : TGGCAGGTTC CGGGCCGGG TTCAAGCGGGTGTTTTGCTGGTGCCCGTTTGT CAGGATGTCAAGCTATGAC : 960
XM 0072356 : CAGCAGGTAA----- : 1124
XM 0150055 : CAGCAGGTTCGAA CCGC TTCAAGAGGGCA TTTCGCTGGTGCCCGTTCA TCAAGGCATCCAGCTACGAC : 969
CAGCAGGTtTcgAGcCggCttcaagCGggTtttCCgCtgGtgCccCtTTGtCAGgGTGtCAagctacgaT

```