



UNIVERSITAT DE BARCELONA



GRADO DE BIOLOGIA

**Mantenimiento de una línea de pez cebra transgénica  
para *vasa:EGFP* y estudio de la expresión gonadal de la  
*dnmt1* y la *dnmt3***

**Toni Costa Ribas**

Francesc Piferrer (tutor externo)

Noelia Díaz (cotutora externa)

Adrià Casinos (tutor interno)

Grup Biologia de la Reproducció

Institut de Ciències del Mar, CSIC

Barcelona, Febrero 2014



**CSIC**  
CONSEJO SUPERIOR DE INVESTIGACIONES CIENTÍFICAS



Institute  
of Marine  
Sciences



**Mantenimiento de una línea de pez cebra transgénica para *vasa:EGFP* y estudio de la expresión gonadal de la *dnmt1* & *dnmt3***

Toni Costa Ribas

Tonicosta90@gmail.com

Proyecto Final de Grado

Realizado entre el 14 de Julio del 2013 y el 29 de Noviembre del 2013.

En el

Grup Biologia de la Reproducció (GBR)

Institut de Ciències del Mar, CSIC

Passeig Marítim 37-49, Barcelona

Bajo la dirección de:

Francesc Piferrer (tutor externo)

i

Adrià Casinos (tutor interno)

Tel. 93-2309567; piferrer@icm.csic.es

Tel. 93-4021454; acasinos@ub.edu

Con la colaboración de Noelia Díaz del GBR

Fecha entrega del trabajo: Barcelona, Febrero 2014



## Índice

|  |           |
|--|-----------|
| <b>ABSTRACT</b> .....  | <b>1</b>  |
| <b>1. INTRODUCCIÓN</b> .....   | <b>2</b>  |
| <b>2. OBJETIVOS</b> .....  | <b>5</b>  |
| <b>3. MATERIALES Y MÉTODOS</b> .....   | <b>6</b>  |
| 3.1 Animales y estabulación.....   | 6         |
| 3.1.1 Animales.....  | 6         |
| 3.1.2 Estabulación.....  | 7         |
| 3.2 Diseño experimental.....   | 9         |
| 3.2.1 Mantenimiento y cría línea vasa:EGFP.....                                  | 9         |
| 3.2.2 Análisis fluorescencia individual de individuos vasa:EGFP .....            | 9         |
| 3.2.3 Estudio expresión dnmt1 & dnmt3 .....                                      | 10        |
| 3.3 Técnicas de muestreo y protocolos .....                                      | 10        |
| 3.3.1 Mantenimiento de la cámara y protocolos de reproducción .....              | 10        |
| 3.3.2 Obtención y conservación de las muestras para el análisis por PCR .....    | 13        |
| 3.3.3 Obtención y conservación de las muestras para el estudio epigenético ..... | 13        |
| 3.3.4 Extracción de ADN y análisis por PCR.....                                  | 14        |
| 3.3.5 Análisis de la fluorescencia de vasa:EGFP .....                            | 15        |
| 3.3.6 Extracción ARN .....   | 16        |
| 3.3.7 Obtención ADNc.....  | 16        |
| 3.3.8 PCR tiempo real (qRT-PCR).....   | 17        |
| 3.3.9 Estadísticas .....   | 21        |
| <b>4. RESULTADOS</b> .....   | <b>23</b> |
| 4.1 Cría y análisis de individuos.....   | 23        |
| 4.2 Fluorescencia .....  | 24        |
| 4.3 Resultados qRT-PCR. Estudio de la expresión de dnmt1 & dnmt3.....            | 24        |
| <b>5. DISCUSIÓN</b> .....  | <b>27</b> |
| 5.1 Cría y análisis individuos.....  | 27        |
| 5.2 Fluorescencia .....  | 27        |
| 5.3 qRT-PCR. Estudio de la expresión de dnmt1 & dnmt3.....                       | 28        |
| <b>6. CONCLUSIÓN</b> .....   | <b>29</b> |
| <b>AGRADECIMIENTOS</b> .....   | <b>30</b> |
| <b>BIBLIOGRAFÍA</b> .....  | <b>32</b> |
| <b>ANEXO</b> .....   | <b>34</b> |
| Tablas.....  | 34        |
| Figuras.....   | 37        |
| Tablas suplementarias .....  | 47        |
| Figuras suplementarias .....   | 58        |



## Abstract

Epigenetics studies the heritable changes in gene function that cannot be explained by changes in the DNA sequence. There are three common epigenetic mechanisms known as the DNA methylation, histone modifications and non-coding RNAs. These mechanisms can modify the way genes are expressed in the organism and thus can regulate DNA expression. DNA methylation is the best studied epigenetic mechanism, and the only one that can covalently modify DNA. These reactions are catalyzed by a group of enzymes known as DNA methyl-transferases (*dnmts*). This methylation is usually associated to gene silencing and hence is very important to gene expression regulation. This epigenetic mechanism has been found to be important in the sex differentiation process in some species like the European Sea bass.

The zebrafish, also known as *Danio rerio*, is used in this study as a model organism due to its many advantages over other organisms. Zebrafish embryonic development is roughly the same as other higher vertebrates. Also, zebrafish and the human genome are very similar, so studies in this model organism can be extrapolated easily. This study will show how to maintain a transgenic zebrafish line (*vasa:EGFP*) through selective breeding and its use to study piscine *dnmts*.

Thus, to have a better understanding on how DNA-methylation works on gonadal development we studied the expression levels of two zebrafish *dnmts*: *dnmt1* and *dnmt 3*. The gene expression has been studied on individuals at different ages and from different gender to determine if there were differences between them. The data shows that the differences between male and female fishes most of the time are not significant. However, gene expression levels vary significantly throughout the development. Therefore DNA-methylation must be an important mechanism in zebrafish gonadal development.

Palabras clave: Epigenética, *Danio rerio*, diferenciación sexual, ADN-metiltransferasas

## 1. Introducción

La epigenética se puede definir como el estudio de cambios heredables en la función genética que no pueden ser explicados por cambios producidos en la secuencia de ADN (Russo et al., 1996). Existen tres mecanismos epigenéticos que afectan la expresión de los genes: la metilación del ADN, las modificaciones de histonas y los ARN no codificantes. El conjunto de modificaciones químicas del ADN junto con los cambios producidos por las histonas forman un complejo regulatorio que modula la estructura de la cromatina y la función génica. Los mecanismos epigenéticos otorgan a los organismos la habilidad de integrar información genómica y ambiental para modificar sus genes y generar un fenotipo determinado. Durante el desarrollo, las células se diferencian, adquieren y mantienen una identidad a partir de cambios en la expresión génica. Todo esto es crucial para los procesos de determinación y diferenciación sexual, siendo ambos procesos indispensables para el funcionamiento y la perpetuación de las especies (Piferrer, 2013).

La metilación del ADN, proceso en el que se centra el estudio realizado, es esencial en prácticamente todos los organismos y es requerido por la mayoría de células somáticas y germinales. Este fenómeno es establecido y mantenido por una serie de enzimas catalíticas conocidas como ADN-metiltransferasas (*dnmts*). Dependiendo de la especie, estas enzimas varían en su secuencia pese a que su función sigue siendo similar. En el pez cebra encontramos una enzima de mantenimiento, la *dnmt1*, y una serie de enzimas que llevan a cabo la metilación *de novo*. Este último grupo de enzimas, que comprenden de la *dnmt3* a la *dnmt8*, son homólogas de la *dnmt3a* y la *dnmt3b* (Campos et al., 2012).

En el genoma de los vertebrados, incluyendo algunos peces como el pez cebra (*Danio rerio*), las regiones 5' de muchos genes contienen unas secuencias conocidas como CpG islands (Gardiner-Garden and Frommer, 1987). Una región CpG se conoce como una secuencia de ADN no metilado con un tamaño mayor de 200 bp con una proporción de guanina-citosina mayor del 50%. Estas regiones CpG, zonas reguladoras, son las dianas de las *dnmts*. La metilación de islas CpG suele conllevar la silenciación de genes a partir del bloqueo de la unión de factores de transcripción y/o maquinaria de transcripción, a la vez que puede promover la formación de cromatina inactiva (Takizawa et al., 2001). Esto parece confirmar que la metilación de citosinas de las CpG está relacionada con el establecimiento y mantenimiento de la expresión celular de genes reguladores del desarrollo (Ehrlich, 2003).



Las metilaciones producidas en estas regiones CpG, como se ha mencionado anteriormente, pueden ser de mantenimiento o *de novo* (Fig. supl. 1). La *dnmt1*, una metiltransferasa de mantenimiento, se encarga de llevar a cabo una copia de un patrón ya existente de metilación durante la división celular. Esto implica también que las marcas epigenéticas del genoma son heredables. El otro grupo de *dnmts* lleva a cabo la metilación *de novo*, esta metilación tiene lugar en zonas CpG que se encuentran previamente sin metilar y que suelen conllevar cambios en la expresión génica (Piferrer, 2013). A lo largo del desarrollo de un organismo, ya desde sus estadios embrionarios, se pueden apreciar grandes variaciones en las regiones metilables del genoma. Estos cambios se encuentran relacionados y explican las variaciones que se producen en la expresión del genoma y que hacen posible el desarrollo del individuo (Fang et al., 2013). Estudios recientes indican que el patrón de metilación del genoma en las etapas tempranas del desarrollo es adquirido del esperma paterno (Jiang et al., 2013). Pese a que los patrones de metilación parecen ser fijos ya desde las primeras etapas del desarrollo, tienen cierta plasticidad, pudiendo variar y verse afectados por ejemplo por factores ambientales como la temperatura (Navarro-Martín et al., 2011).

La actividad de las metiltransferasas en su modulación de la expresión génica juega un papel esencial en el desarrollo y diferenciación sexual. Un estudio reciente en la lubina europea (*Dicentrarchus labrax*), por ejemplo, ha permitido relacionar la regulación mediante los niveles de metilación de promotores con la actividad y regulación de la aromatasa, o *cyp19a1a* (Navarro-Martín et al., 2011), en gónadas y cerebro. La aromatasa es una enzima que se encarga de aromatizar los andrógenos, produciendo estrógenos. Con el fin de profundizar más en el estudio de la actividad de estas enzimas metiladoras en la diferenciación sexual, se ha llevado a cabo un diseño experimental para analizar la expresión génica de dos de estas enzimas en diferentes estadios de la diferenciación gonadal de pez cebra mediante el uso de técnicas de análisis de la expresión génica mediante PCR a tiempo real (qRT-PCR). En concreto, las *dnmts* analizadas serán la *dnmt1* y la *dnmt3*, encargada del mantenimiento del patrón de metilación y de la actividad metiladora *de novo*, respectivamente. Debido a la imposibilidad de realizar estos estudios en lubina, se ha escogido el pez cebra como modelo de estudio ya que tiene un sistema de determinación sexual poligénico influenciado por la temperatura, al igual que en las lubinas.

El pez cebra (*Danio rerio*) es el organismo modelo seleccionado para este estudio ya que presenta una serie de ventajas frente a otros posibles candidatos, como por

ejemplo su alto grado de similitud en su desarrollo embrionario respecto a otros vertebrados superiores así como la semejanza en su genoma con el ser humano (Bopp et al., 2006). El estudio del genoma del pez cebra ha permitido identificar un gran número de mutantes para diferentes genes. El descubrimiento de estos mutantes ha permitido crear individuos transgénicos mediante la ingeniería genética. Estos individuos transgénicos son útiles para realizar estudios de diferentes aspectos fisiológicos, como por ejemplo el desarrollo gonadal (Aleström et al., 2006). Dada la gran utilidad del pez cebra (*Danio rerio*) como organismo modelo para la investigación el desarrollo de protocolos adecuados para que su mantenimiento y viabilidad sean óptimos. Además, al igual que la lubina, el pez cebra presenta un sistema de determinación del sexo poligénico influenciado por la temperatura.

En este estudio se ha tratado tanto con líneas salvajes (*wild type* o *wt*) como con una línea transgénica conocida como *vasa:EGFP* (Krøvel and Olsen, 2002). En esta línea transgénica, mediante el uso de la ingeniería genética, se ha incluido un marcador fluorescente, la proteína EGFP: *enhanced green fluorescent protein*). La proteína EGFP es prácticamente idéntica a la GFP, sin embargo, la primera produce unos niveles de fluorescencia más intensos que su homóloga.

Esta línea transgénica es especialmente útil ya que nos permite conocer tanto la localización y como el nivel de expresión de la proteína *vasa* gracias a la fluorescencia que desprende y que puede ser observada con una lupa de fluorescencia. La proteína *vasa* se encuentra en las células primordiales de los peces cebras desde estadios muy tempranos del desarrollo. El gen que codifica para esta proteína es materno y juega un papel vital en la gastrulación y en etapas posteriores del desarrollo. Es por ello que en las primeras etapas de la gastrulación del embrión se puede observar ya los niveles de expresión de *vasa* con la ayuda de un microscopio de fluorescencia (Koen et al., 2000). A medida que avanza el desarrollo sin embargo, la expresión de *vasa* desaparece casi por completo y solamente se aprecia en las células primordiales que formarán posteriormente las gónadas (Krøvel and Olsen, 2002).

En paralelo también se llevará a cabo un mantenimiento de las diferentes líneas transgénicas de pez cebra Exo y Nuus. Para ello será necesario mantener los individuos en condiciones óptimas y llevar a cabo una cría continuada para asegurar la obtención de individuos, tanto *wild type* como homocigotos transgénicos.

## 2. Objetivos

En lo que respecta al mantenimiento de las líneas de pez cebra:

- Realizar el mantenimiento de las diferentes líneas de pez cebra, incluyendo la línea transgénica *vasa:EGFP*, tanto en lo que se refiere al cuidado de los individuos como al mantenimiento de la cámara.
- Protocolo de cría y conservación de la línea transgénica llevando a cabo análisis mediante PCR convencional de las hembras de la generación F2 con el fin de obtener individuos homocigotos para el transgen.
- Analizar en el tiempo los niveles de fluorescencia en individuos transgénicos.

Los objetivos del estudio de la expresión de la *dnmt1* y la *dnmt3* son:

- Estudiar y comparar la expresión de ambas ADN-metiltransferasas en el tejido gonadal de peces cebra.
- Observar si existen diferencias en los niveles de expresión de ambas *dnmts* entre individuos de diferentes sexos.
- Comparar los niveles de expresión en diferentes estadios.

### **3. Materiales y métodos**

#### **3.1 Animales y estabulación**

##### **3.1.1 Animales**

El animal utilizado ha sido el pez cebra (*Danio rerio*) (Fig. supl. 2). Un pez de agua dulce cuyo hábitat en numerosas ocasiones se encuentra sometido a cambios constantes en los niveles de salinidad, pH y temperatura. La gran resistencia del pez cebra ante cambios en el ambiente lo convierten en un organismo modelo fácil de mantener en cautividad si se aplican los protocolos adecuados (Spence et al., 2008).

Durante este proyecto se usaron principalmente dos tipos diferentes de pez cebra para continuar con el mantenimiento de la línea *vasa:EGFP*: unos pertenecientes a una cepa *wild type* y otros pertenecientes a cepas transgénica para *vasa:EGFP*. Los peces cebra transgénicos usados provienen de dos líneas diferentes, llamadas Exo y Nuus, ambas líneas se obtuvieron con el mismo procedimiento y presentan el mismo tipo de transgen (Fig. 1A y Fig. 1B).

Los individuos usados en el estudio epigenético de la expresión de las *dnmts* pertenecían a la línea *wild type*, es decir genotipo salvaje. Los peces del diseño experimental tenían edades comprendidas entre los 12 y los 130 días post fertilización (dpf, del Inglés days post fertilization), tanto machos como hembras. Las condiciones y procedimientos de cría de los peces utilizados en el experimento fueron los mismos que para las otras líneas de pez cebra.

### 3.1.2 Estabulación

El conjunto de peceras usado para la cría de los peces cebra forman parte de un sistema de racks de la casa comercial Aquaneering, especialmente diseñado para el cultivo pez cebra. El funcionamiento es independiente de otros sistemas de filtración centrales, ya que es un sistema de agua cerrado, también tiene su propio sistema de filtración que asegura mantener unas condiciones óptimas tanto en temperatura como en circulación y calidad del agua.

El estante, también llamado rack, proporciona soporte para un conjunto de peceras de diferentes tamaños, tamaños que dependen del número de peces que queremos tener agrupados o la función que queramos llevar a cabo. El rack contiene un sistema que proporciona circulación de agua constante a las diferentes peceras almacenadas en él, además se encarga de mantener unos parámetros constantes. El agua pasa por un circuito de filtración multi-fase antes de llegar a las peceras, proceso que asegura la correcta recirculación del agua por todo el sistema permitiendo mantener los parámetros establecidos a lo largo del tiempo.

El proceso de filtrado de Aquaneering empleado tiene cuatro fases (Fig. supl. 3):

1. El primer proceso de filtración se produce por una almohadilla de Dacron donde las partículas mayores de 10 micrones quedan atrapadas y después pueden ser retiradas con facilidad.
2. El agua es bombeada dentro de un filtro biológico que contiene una población de bacterias beneficiosas que aseguran la estabilidad ecológica del agua recirculante.
3. La circulación prosigue y llega a un tercer proceso de filtración a partir de filtros de carbón activado situados en una segunda cámara. En esta cámara además se encuentra un calentador de agua controlado por un microprocesador que mantiene constante la temperatura.
4. Finalmente, el agua pasa por un esterilizador UV antes de llegar a las peceras.

La cámara que contiene los racks (estantes con las peceras) debe tener unos parámetros constantes para que la estabulación sea correcta. En la Tabla supl. 1 se pueden observar las principales variables que deben controlarse en el interior de la cámara. Los peces se encuentran sometidos a un fotoperiodo de 12 horas a lo largo de todo el año, la temperatura ambiental debe rondar los 26°C pudiendo oscilar ligeramente dentro de unos rangos preestablecidos. El control de la humedad también es importante y debe tener un valor del 55%.

Todos los parámetros indicados anteriormente corresponden a variables controladas en el interior de la cámara y son revisados y anotados periódicamente. Además se lleva a cabo una revisión de la calidad del agua, muy importante para que los peces se encuentren en buena salud. Las variables analizadas en la calidad del agua se muestran en la Tabla supl. 2. La calidad del agua es también examinada periódicamente y registrada para poder llevar un seguimiento constante de los posibles cambios o problemas que puedan aparecer.

### **Alimentación**

La alimentación es muy importante en la estabulación y mantenimiento del *Danio rerio*, especialmente en las primeras etapas del desarrollo de los individuos, donde son substancialmente vulnerables.

Dependiendo de la edad de los especímenes, y de si son reproductores o no, el alimento será diferente. El alimento proporcionado a los peces se da en forma de pienso, y dependiendo del pez, también se añade a la dieta artemia y huevos de langosta. El número de tomas de comida que recibe cada individuo también depende del estado y edad del pez (Tabla supl. 3).

## **3.2 Diseño experimental**

### **3.2.1 Mantenimiento y cría línea *vasa:EGFP***

El mantenimiento de la línea de peces transgénicos para *vasa:EGFP* tiene como finalidad obtener un stock de individuos homocigotos, ello implica también llevar a cabo una cría y selección posterior de los individuos. Para realizar este proceso se empleó el diseño experimental mostrado en la Fig. 2.

La conservación y cría de la línea transgénica parte de un stock de individuos homocigotos. Debe tenerse en cuenta que la transmisión del transgen *vasa* es materna. Por lo tanto a partir del cruce de una hembra homocigota para el transgen con un macho wild type obtenemos una F1 completamente heterocigota para *vasa:EGFP*. A partir de esta primera generación homocigota se lleva a cabo un cruce de un macho heterocigoto con una hembra homocigota de la generación parental. Con este último cruce se obtiene una F2 con un 50% de individuos homocigotos y un 50% heterocigotos. Para conocer si las hembras de la F2 son homocigotas o heterocigotas para el transgen se lleva a cabo un estudio por PCR convencional de su progenie.

A partir de una hembra de la F2, de la cual se desconoce exactamente su polimorfismo para el transgen, se lleva a cabo un cruce con un macho wild type. Dependiendo de si nuestra hembra es originalmente homocigota o heterocigota esperaremos tener un 100% de larvas con presencia del transgen o un 50% respectivamente. Para detectar la presencia del transgen en las larvas se llevara a cabo un protocolo de análisis mediante PCR.

Los individuos de la F2 usados en este procedimiento ya han sido mostrados con anterioridad tanto en la Fig. 1A como en la Fig. 1B. A partir del análisis de la F3 obtenida a partir del cruce de hembras de la F2 con machos wild type se conocerá el genotipo de dichos individuos.

### **3.2.2 Análisis fluorescencia individual de individuos *vasa:EGFP***

Al encontrarnos ante una línea de peces con un marcador fluorescente, como es la proteína *vasa:EGFP*, se puede llevar a cabo un seguimiento de la intensidad que desprende dicho marcador a lo largo del desarrollo y crecimiento de las larvas obtenidas. La evolución de la intensidad en la fluorescencia de los individuos es

diferente entre sexos y por lo tanto a partir de los datos obtenidos puede conocerse el futuro sexo de los especímenes.

Para llevar a cabo este estudio seis de las larvas obtenidas en dos de las numerosas puestas llevadas, una perteneciente al 30/07/2013 y otra al 23/08/2013. Dichas larvas fueron criadas en placas de cultivo celular de 6 pozos, donde se colocó una larva en cada uno de los pozos. Los parámetros y la alimentación establecidos durante el desarrollo de estos individuos son los mismos que en los preestablecidos anteriormente para la estabulación. Sin embargo, al no tener un sistema de renovación de agua en las placas se llevó a cabo un cambio de medio diario con el fin de mantener las larvas en condiciones óptimas.

### **3.2.3 Estudio expresión *dnmt1* & *dnmt3* en gónadas**

El diseño experimental planteado permite estudiar los niveles de expresión de dos genes diferentes en el tejido gonadal a diferentes edades del organismo modelo, el pez cebra. También permite observar si existen diferencias en dichos niveles de expresión entre los sexos, ya que se analizan réplicas de ambos. El diseño experimental llevado a cabo se puede observar en la Fig. 3.

Se estudia la expresión génica a diferentes edades: 12 dpf, 22 dpf, 32 dpf, 60 dpf, 90 dpf, 110 dpf y 130 dpf (dpf como días tras la fertilización). En cada uno de estos puntos se analizan 6 individuos de cada sexo, exceptuando los puntos comprendidos entre 12 dpf y 32 dpf, ya que en ese periodo el pez cebra aún no se ha diferenciado sexualmente y es considerado como una larva indiferenciada. Por lo tanto, de los individuos ya desarrollados tendremos 12 peces, 6 de cada sexo.

Los genes estudiados expresan para dos *dnmts*, son la *dnmt1* y la *dnmt3*. Ambos genes son analizados en todos los individuos usados en el diseño experimental, además, para poder comparar esta expresión génica se usa el gen *ef $\alpha$*  como gen de control endógeno.



### **3.3 Técnicas de muestreo y protocolos**

#### **3.3.1 Mantenimiento de la cámara y protocolos de reproducción**

##### **Mantenimiento de la cámara**

El mantenimiento de los peces cebra implica un control constante de las instalaciones. Las diferentes variables de la cámara, mostradas anteriormente en la Tabla supl. 1, y la calidad del agua (Tabla supl. 2), son comprobadas diariamente, ajustadas y anotadas correspondientemente.

Principalmente cada día debe asegurarse que la temperatura se encuentra a 28°C y el pH a 7,2. Además la conductividad debe mantener unos valores de entre 800-1000  $\mu\text{d}$ , estos valores son verificados con la ayuda de un conductímetro. Los valores de dureza del agua también son controlados en un rango de valores de 7-8 GH, el GH del agua es analizado mediante un kit comercial de comprobación de dureza cuyo funcionamiento se basa en colorantes. Los filtros y tubos que intervienen en la filtración y circulación de agua en los racks también son comprobados diariamente y sustituidos si es necesario.

El mantenimiento también implica observar diariamente los individuos almacenados en los racks y sacrificar los que se encuentren en malas condiciones o estén enfermos.

##### **Reproducción**

El pez cebra alcanza la madurez sexual entre los 3-4 meses, al alcanzarla ya puede ser usados como reproductor. Los peces destinados a la reproducción son alimentados con artemia dos veces al día, además, también se les proporcionan huevos de langosta. Estos pequeños cambios en la alimentación ayudan a mejorar la eficacia en la cría considerablemente.

Para llevar a cabo la cría un macho y una hembra son elegidos. En este caso dado la naturaleza del diseño experimental, en el que queremos mantener la línea transgénica, se usaron hembras transgénicas y machos wild type. Los individuos son depositados en tanques individuales que consisten de tres partes: el contenedor, un separador en la mitad de dicho contenedor y una capa con una rejilla en el fondo que evita que en caso de puesta los peces puedan llegar a comerse sus propios huevos. Además para las hembras serán cruzadas como máximo una vez cada dos semanas; los machos

deberán descansar mínimo cuatro días entre puestas. Las hembras necesitan un periodo de descanso más prolongado, de una a dos semanas, para permitir la recuperación de los ovarios y que éstos vuelvan a madurar oocitos.

En algunas ocasiones una hembra puede presentar problemas a la hora de oviposicionar pese a seguir el protocolo correctamente tanto de alimentación como de descanso. Este fenómeno puede estar provocado por diferentes problemas fisiológicos, uno de los más comunes es la aparición de un tapón vaginal en la cloaca de la hembra. El bloqueo mecánico de la cloaca se puede producir por una sobremaduración de oocitos que endurecen su corión llegando a evitar futuras oviposiciones por parte del individuo. Si no se soluciona el problema la hembra puede seguir acumulando oocitos en la cavidad celómica agravando aún más la obstrucción lo que puede acabar desencadenando problemas en la natación, respiración e incluso deformidades del raquis. La solución más efectiva y rápida para el bloqueo de la cloaca consiste en llevar a cabo un masaje abdominal suave previa anestesia del pez, también el uso de oxitocina permite la distensión de la cloaca y por lo tanto favorece la oviposición de los oocitos sobremadurados causantes del bloqueo (Ramos Blasco and Martín Caballero, n.d.).

Los tanques destinados a la reproducción son preparados con agua de una conductividad de 760  $\mu\text{d}$ . Esta conductividad ayuda al éxito de la puesta y también tiene efecto sobre las feromonas liberadas por los individuos. Los peces son depositados en los tanques con el agua de baja conductividad ya preparada. El macho y la hembra no se encuentran en contacto ya que se encuentran en extremos contrarios gracias al separador situado en el centro. Los separadores son retirados a la mañana siguiente a las 9:00 am. Entre las 9:30 y las 11:30 se comprueba si la pareja ha producido huevos, si es así estos son recolectados.

Para la recolección de los huevos se retiran los peces del tanque, el macho se retira a su tanque original mientras que la hembra es separada en un tanque individual, ya que queremos llevar a cabo un análisis de su progenie para conocer si es homocigota o heterocigota. Los huevos son recogidos mediante un colador pequeño con el cual los huevos quedan atrapados al llevar a cabo la filtración del agua contenida en el tanque y son posteriormente depositados en placas de Petri.

Los huevos se mantienen en placas de Petri en un medio embrionario, en cada placa se depositan un máximo de 80 huevos. El medio embrionario (Tabla supl. 4)

proporciona unas condiciones de pH y conductividad óptimas a los huevos y futuras larvas tras la eclosión. El medio embrionario es renovado periódicamente ya que en las placas de Petri no existe renovación de agua ni oxígeno.

A las 72 horas tras la fertilización (hdf) los huevos eclosionan y se lleva a cabo un recuento de las larvas y se determina el porcentaje de eclosión. A los 6dpf se lleva un nuevo recuento de las larvas supervivientes. También se obtiene el porcentaje de supervivencia a los 6 días.

A los 6 días las larvas pueden ser ya transferidas a tanques para su desarrollo. Para llevar a cabo este paso antes se debe añadir unas gotas de agua en las placas donde tenemos los individuos, de esta forma el cambio de medio embrionario a agua dentro del tanque no es tan brusco y aumentamos la supervivencia.

Mediante este procedimiento se obtuvieron las diferentes larvas necesarias para la obtención de hembras homocigotas así como la obtención de peces para el experimento de expresión de ADN.

### **3.3.2 Obtención y conservación de las muestras para el análisis por PCR**

Se llevan a cabo cruces entre machos wild type y hembras transgénicas pertenecientes a la F2 de las cuáles queremos conocer si son homocigotas o heterocigotas para el transgen. Siete días después la puesta, doce larvas supervivientes de cada una de las hembras son extraídas de la placa de Petri donde se encuentran mediante el uso de una pipeta Pasteur. Las larvas son depositadas individualmente en tubos eppendorf de 1,5 ml. El almacenamiento y conservación de las muestras debe realizarse dentro de congeladores a una temperatura de -80 °C, antes de llevar a cabo el almacenamiento la totalidad del agua del eppendorf que contiene la larva debe ser retirada.

### **3.3.3 Obtención y conservación de las muestras para el estudio epigenético**

Los individuos indiferenciados se obtuvieron a partir de un cruce entre peces adultos wild type. Las larvas fueron criadas y se conservaron después 6 individuos de cada una de las edades necesarias para el diseño experimental (12dpf, 22dpf y 32dpf) en tubos eppendorf almacenados a una temperatura de -80°C.

Los peces ya diferenciados fueron obtenidos por el mismo procedimiento, sin embargo solamente se utilizó el tejido gonadal de dichos individuos, las muestras también fueron conservadas a -80°C.

### **3.3.4 Extracción de ADN y análisis por PCR**

#### **Extracción ADN**

La extracción de ADN se lleva a partir de las larvas obtenidas en las puestas de 7dpf. El protocolo de extracción usado se basa en una resina conocida como Chelex-100 producido por la empresa Bio-Rad. Esta resina quelante se puede utilizar junto con la ayuda de la proteinasa K para la extracción de ADN de diferentes tejidos para su posterior uso en la PCR. Es un procedimiento económico, rápido, simple y no requiere de múltiples pasos (García González et al., 2004).

Los pasos del protocolo de extracción de ADN con Chelex-100 son (García González et al., 2004):

1. 500 µL de Chelex-100 10% diluidos con agua previamente autoclavada a la muestra de tejido, en este caso una larva completa
2. 15 µL de proteinasa K de una concentración de 10 mg/ml
3. Se incuba a 55 °C durante una hora en movimiento
4. Se incuba a 100 °C durante 15 minutos en estático
5. Se centrifuga a 10.000 rpm durante 10 segundos
6. Se centrifuga nuevamente a 10.000 rpm pero en durante 10 minutos.

El ADN obtenido a partir de este protocolo se encuentra en la fase líquida del sobrenadante resultante del proceso de centrifugación. La conservación del ADN a 4 °C o -20 °C dependerá de si su uso será inmediato o a largo tiempo, respectivamente.

## Análisis por PCR

El análisis mediante PCR tiene como intención amplificar la región que codifica para la proteína EGFP contenida en el transgen *vasa:EGFP*. Si de las doce larvas amplificadas, todas pertenecientes a la misma puesta, presentan la banda correspondiente a la proteína indicará que la hembra parental es homocigota, si por el contrario la hembra es heterocigota solo algunas de las larvas analizadas presentarán la banda.

Los primers utilizados para la amplificación del fragmento de genoma se muestran en la Tabla supl. 5. La polimerasa utilizada en la PCR fue la GoTaq polymerase de la casa comercial Promega(Buffer, n.d.)(Buffer, n.d.). El mix necesario para llevar a cabo la PCR de un individuo se muestra en la Tabla supl. 6. Para la PCR de cada individuo se precisan de 2  $\mu\text{L}$  de muestra y 8  $\mu\text{L}$  de mix, por lo tanto se tienen 10  $\mu\text{L}$  totales. La amplificación se lleva a cabo en un termociclador, cuyas condiciones son las siguientes:

|                           |             |
|---------------------------|-------------|
| 94 °C durante 3 minutos   | } 40 ciclos |
| 95 °C durante 10 segundos |             |
| 52 °C durante 15 segundos |             |
| 72 °C durante 30 segundos |             |
| 72 °C durante 5 minutos   |             |
| 16 °C reposo              |             |

Las muestras amplificadas se almacenan a una temperatura de 4 °C o -20 °C, dependiendo de si su uso será inmediato o debe almacenarse durante más tiempo. El gel utilizado para correr las muestras será un gel de agarosa de una concentración del 1,5-2 % (Tabla supl. 7). En cada gel se cargarán las 5  $\mu\text{L}$  de cada una de las 12 larvas junto con 1  $\mu\text{L}$  de ladder 100 pb. El gel se correrá a 120V durante 5 minutos y posteriormente 30-40 minutos a 80V.

El posterior análisis y captura de imágenes de los geles se llevó a cabo mediante el uso de un ordenador conectado a un sistema de documentación de geles de la marca Bio-Rad, que gracias a la luz ultravioleta y una cámara fotográfica situada en su interior permite analizar y captar imágenes de los geles. El software usado para llevar a cabo todo este proceso es el Quantity One, también de Bio-Rad.

### **3.3.5 Análisis de la fluorescencia de *vasa:EGFP***

El análisis de la intensidad fluorescente que desprende la proteína *vasa:EGFP* fue analizada a lo largo del desarrollo de algunas larvas. Este estudio se llevó a cabo con la ayuda de un microscopio de fluorescencia junto con una cámara y un ordenador. La cámara, conectada al ordenador, mediante el uso del software Analysis, permite obtener fotografías de los individuos. Posteriormente y con la ayuda del programa ImageJ, se obtienen los valores de intensidad\*píxel de los individuos, y se analizan las fotografías tomadas.

Para obtener las imágenes correspondientes en la lupa de fluorescencia es necesaria la inmovilización de las larvas, para ello son anestesiadas con la ayuda de hielo. Los parámetros usados en el software Analysis para la captura de imágenes se muestran en la Tabla supl. 8.

### **3.3.6 Extracción ARN**

El protocolo empleado para llevar las extracciones de ARN está basado en el uso de Trizol. Durante las extracciones es necesario el uso de guantes y su cambio frecuente, ya que las muestras de ARN son fáciles de contaminar con RNasas. Las soluciones usadas deben estar libres de RNasas y alcoholes. Los pasos para llevar a cabo la extracción de ARN se muestran en la Tabla supl. 9.

Con el fin de conocer las concentraciones de ARN obtenidas en las diferentes extracciones realizadas se usó el Nanodrop. El Nanodrop es un espectrofotómetro que nos proporciona la información de diferentes aspectos de las muestras de ADN y ARN, como por ejemplo su concentración, a partir de 1,5µL de la muestra. El Nanodrop a partir de las curvas de absorbancia de la muestra a 260/280 y 260/230 obtiene los datos de concentración de la muestra. El rango de concentraciones que proporciona el Nanodrop va de 0-1000 ng/µL, si alguna de las muestras analizadas indica unos valores superiores dicha muestra debe ser diluida y analizada nuevamente. A partir de la disolución, si los datos se encuentran dentro del rango del aparato, podremos conocer la concentración inicial de la muestra multiplicando los valores obtenidos por el factor de dilución.

### 3.3.7 Obtención ADNc

La obtención de ADNc a partir de ARNm se realizó a partir de la técnica de la PCR a tiempo real (qRT-PCR). Concretamente para la síntesis del ADNc se usó la retrotranscriptasa SuperScript III de Invitrogen. Esta síntesis de ADN tiene lugar en dos reacciones diferentes, el protocolo es el siguiente:

1. Los siguientes componentes son añadidos en un tubo de microcentrifuga:  
Random hexamer ..... 2,5µL (100 µM)  
Muestra ARN ..... 100 ng (volumen máximo ARN=9,5µL)  
10nM dNTP mix ..... 1µL  
Agua destilada ..... hasta alcanzar un volumen total de 13µL  
Las muestras son calentadas a 65°C durante 5 minutos.
2. Se incuba en hielo al menos durante 1 minuto.
3. Se centrifugar brevemente.
4. Se añade el siguiente contenido a cada una de las muestras:  
5x 1st strand buffer ..... 4µL  
0,1M DTT ..... 1µL  
RNasa inhibitor (RNase OUT) ..... 1µL  
SuperScript III RT ..... 1µL
5. El contenido de cada muestra es pipeteado para mezclarlo uniformemente.
6. Se incuba a 25°C durante 5 minutos.
7. Se incuba 50 minutos a 50°C (30-60 minutos)
8. La reacción de polimerización es inactivada calentando las muestras a 70°C durante 15 minutos.

El ADNc obtenido puede ser usado en amplificaciones mediante PCR. Sin embargo, si se tienen que amplificar fragmentos mediante PCR mayores de 1kb es necesario eliminar el ARN complementario al ADNc. Para llevar a cabo este último paso, se añade 1µL (2 unidades) de *E.coli* RNasa H y se incuba a 37°C durante 20 minutos.

### 3.3.8 PCR a tiempo real (qRT-PCR)

La qRT-PCR lleva a cabo una medición de la fluorescencia que producen las muestras durante la fase exponencial de su amplificación durante el proceso. Existen diferentes productos para detectar la fluorescencia durante la amplificación, en este estudio se ha usado el SYBR Green. Para la cuantificación de la expresión de un gen determinado el proceso tiene lugar en 3 pasos:

- Retrotranscripción del ARN a ADNc
- La amplificación del ADNc obtenido mediante una PCR
- Cuantificación de los productos amplificados

El primer paso, la obtención del ADNc a partir del ARN ya ha sido tratada en el punto anterior. El segundo paso, en el cual se lleva a cabo la amplificación del ADNc, necesita de primers específicos para los genes que queremos estudiar. Por lo tanto, es necesario diseñar dichos primers, así como probar su nivel de eficiencia para esta labor. Finalmente, tras la amplificación se pueden cuantificar los productos y analizar los datos obtenidos para conocer la expresión de los genes analizados en las diferentes muestras. Los primers diseñados se muestran en la Tabla supl. 10.

Los valores cuantitativos obtenidos en la qRT-PCR se conocen como  $C_T$  (threshold cycle). El  $C_T$  se define como el ciclo de la PCR en el cual la señal fluorescente del reportero sobrepasa un umbral preestablecido arbitrariamente. Presentando los datos como  $C_T$  nos aseguramos que la PCR se encuentra en su fase exponencial de amplificación (Fig. supl. 4). El valor numérico de la  $C_T$  está relacionado inversamente con la cantidad de amplicones que se han formado en la reacción (i.e., valores bajos de  $C_T$  implican grandes cantidades de amplicón). Los valores de  $C_T$  obtenidos se tratarán mediante cuantificación relativa, donde los datos de la PCR se presentarán relativos a otro gen endógeno con función de control para poderlo comparar con nuestro gen de interés.



### **Diseño y cálculo de la eficiencia de los primers**

Para realizar la qRT-PCR primero se diseñaron los primers para los dos genes de interés (Tabla supl. 10), *dnmt1* y *dnmt3*, además, también es necesario un primer para amplificar el gen endógeno que cumplirá la función de control (*efa*). Los diferentes primers usados no deben formar primers dimers, ya que esto provocaría errores durante el estudio en los valores obtenidos, por el mismo motivo tampoco deben ser complementarios entre ellos. A su vez, deben tener temperaturas de alineamiento similares, ya que si son muy distantes los resultados tampoco serán óptimos. De la misma forma, el tamaño de los fragmentos amplificados es recomendable que sea similar. El diseño de los primers puede llevarse a cabo con diferentes programas informáticos como por ejemplo el Oligo7 o el Primer Express Software de Applied Biosystems.

Se realiza un estudio de la eficiencia de los primers para asegurarse de su correcto funcionamiento. Para ello se lleva a cabo una qRT-PCR a partir de diferentes diluciones del conjunto de todas las muestras de ADNc para conocer cuál es la concentración óptima para llevar a cabo nuestra real time. Las diluciones empleadas para este proceso son: 1; 1/5; 1/10; 1/50; 1/100; 1/500. Normalmente cuando el ADNc se ha obtenido de 100ng iniciales de ARN el uso de una dilución 1/10 es suficiente. A partir de los valores de  $C_T$  obtenidos de las diluciones de los primers (*dnmt1*, *dnmt3* & *efa*) se analiza su eficiencia como primer. La calidad como primer se obtiene a partir de los parámetros ( $R^2$ , slope y eficiencia) que deben estar entre unos rangos concretos para considerar nuestro primer como bueno. Los valores de  $R^2$  deberían ser mayores a 0,98. El slope, que es la progresión lineal de  $C_T$  respecto al logaritmo de las concentraciones de ADNc, debe estar comprendido entre -3,1 y -3,6. Por último la eficiencia de los primers, que depende de los valores obtenidos en  $R^2$  y slope, debe mantenerse en un rango de entre 90-110%.

Los resultados obtenidos del estudio de la eficiencia de los primers en distintas diluciones de ADNc se observan en las gráficas de la Fig. 4. En las figuras se aprecia como realizando la qRT-PCR con una dilución de ADNc 1/10 en todos los primers ya obtenemos unas  $C_T$  de alrededor de 25, lo cual es suficiente. Siempre que los valores de  $C_T$  obtenidos, para una determinada dilución de ADNc y primer, estén por debajo de 30 podrán usarse, sin embargo es recomendable que la  $C_T$  se encuentre alrededor de 25. Por lo tanto, y a partir de los resultados obtenidos se decidió usar una dilución de ADNc de 1/10.

### Preparación placa qRT-PCR

La qRT-PCR se lleva a cabo en unas placas especiales destinadas para este fin (Fig. supl. 5), donde se deposita la muestra de ADNc junto con un mix que contiene el SYBR GREEN y los diferentes componentes necesarios para poder llevar a cabo la amplificación del material genético. El mix completo para cada una de las muestras se puede observar en la Tabla supl. 11. Se realizan tres réplicas de cada una de las muestras para minimizar posibles errores. El procedimiento es llevado a cabo en hielo para evitar que las muestras junto con el mix se calienten y puedan empezar la reacción de polimerización. Además, se debe evitar en lo posible el contacto con la luz del SYBR GREEN, ya que contiene un fluoróforo que al encontrarse en contacto con la luz se degrada.

En este estudio se prepararon dos placas, en cada una de ellas se estudió la expresión de una *dnmt* diferente (*dnmt1* & *dnmt3*), junto con el gen endógeno *efa*. La dilución final empleada para el estudio fue de 1/10 ADNc.

### Parámetros de la máquina para qRT-PCR (7900HT Fast Real-Time PCR)

La qRT-PCR fue realizada en el termociclador 7900HT Fast Real-Time de la casa comercial Applied Biosystems. La placa es cargada en el termociclador y los parámetros de la amplificación son configurados en el ordenador que está conectado a la máquina. El programa para controlar y configurar el procedimiento es el SDS Software. En el programa SDS se configura un nuevo archivo  $\Delta\Delta C_t$  y se añadirán los detectores implicados en el proceso, es decir, las *dnmts*. También se añade el gen endógeno utilizado que actuará como control. Después de llevar a cabo las diferentes configuraciones del procedimiento este ya puede empezar. Los ciclos de temperatura que tendrán lugar en el termociclador para llevar a cabo la amplificación son:

- 50°C 2 minutos
  - 95°C 10 minutos
  - 95°C 15 segundos
  - 60°C 1 minuto
- } 40 ciclos

Cuando ha terminado la amplificación de la placa, en 1 hora y 30 minutos aproximadamente, se lleva a cabo una curva de disociación. Para llevar a cabo este procedimiento se siguen los mismos pasos que en la preparación del archivo  $\Delta\Delta C_t$ , sin embargo se elige la opción de “Standard curve”. Las condiciones de temperatura para el procedimiento varían y son las siguientes:

- 72°C 60 segundos
- 95°C 15 segundos
- 60°C 15 segundos
- 95°C 15 segundos

La curva de disociación proporciona información sobre el proceder de la amplificación y por lo tanto permite comprobar si ha tenido éxito. Gracias a esta curva, por ejemplo, podemos comprobar existen formaciones de primer-dimers durante el proceso. Junto con el archivo  $\Delta\Delta C_t$  obtenido, que proporciona la información sobre los niveles de expresión alcanzados, se extraen los datos obtenidos del procedimiento en forma de  $C_T$ , que posteriormente serán debidamente analizados.

### **Análisis datos qRT-PCR**

A partir de los archivos obtenidos  $\Delta\Delta C_t$  de la Real-Time se extraen los datos contenidos en ellos. Para este procedimiento se utilizó el programa SDS 2.3 y RQ Manager. El archivo  $\Delta\Delta C_t$  es cargado en el programa RQ Manager a partir del cual se observan los datos de la PCR, los datos son exportados como “Results Data”, ya que contienen todos los valores modificados si es que hemos realizado algún cambio. Con la ayuda del programa SDS se analiza el archivo que contiene la curva de disociación. Gracias a la curva de disociación se pueden visualizar los productos de la qRT-PCR (Fig. supl. 6). La curva de fusión muestra si los productos se fusionan a la misma temperatura, lo que indica que la amplificación es específica para el amplicon obtenido, o existen más picos, lo que podría implicar que se han formado dímeros en los primers utilizados.

Los datos que contiene el archivo “Results Data” son analizados en el programa Excel para llevar a cabo los diferentes cálculos necesarios para determinar los niveles de expresión génica. Los cálculos se realizan a partir de las  $C_T$  obtenidas para cada una de las muestras. De cada individuo se han analizado sus niveles de expresión para tres genes: *dnmt1*, *dnmt3* y *ef $\alpha$* ; con tres réplicas por muestra. De cada individuo se obtiene la  $C_T$  media a partir de las tres réplicas y se calcula a partir de éstos el  $\Delta C_T$ .

El valor  $\Delta C_T$  es el resultado de la resta entre la  $C_T$  media del gen estudiado y la  $C_T$  media del gen endógeno de control *ef $\alpha$* . Por último, a partir de los valores de  $\Delta C_T$  se obtienen los  $2\Delta C_T$  ( $2\Delta C_T = E^{(-1) * (\Delta C_T)}$ ). Al final para cada uno de los individuos obtenemos un valor  $2\Delta C_T$  para cada una de las *dnmts* estudiadas que nos indica el nivel de expresión.

### 3.3.9 Estadísticas

Las diferentes estadísticas realizadas en los cálculos fueron llevadas a cabo con el programa Statgraphics y R studio. En todos los casos se llevó a cabo una comprobación de normalidad de los datos y niveles de significación para un nivel de confianza del 95%. En los casos en los que los valores presentaron diferencias significativas en sus varianzas se llevaron a cabo una transformación de los valores.

En el estudio de los datos obtenidos a partir de la cría de individuos los datos mostraron normalidad por lo que no ha sido necesaria ninguna transformación numérica. Los valores de expresión de las *dnmts*, obtenidas a partir de la qRT-PCR, sin embargo, han requerido una transformación a partir del uso del logaritmo neperiano para poder asegurar la normalidad en los datos.

## 4. Resultados

### 4.1 Cría y análisis de individuos

A partir de la cría de la línea de pez cebra transgénica, tanto de los individuos Exo como Nuus, se han obtenido una serie de tablas donde se muestran los resultados del estudio de una lista de variables. Las variables estudiadas en las puestas realizadas son el número de huevos y su rango, el porcentaje de fertilización de dichos huevos, la proporción de huevos eclosionados y su supervivencia a los 6 días. También se muestra el porcentaje de individuos homocigotos obtenidos a partir de los análisis mediante PCR realizados.

En la Tabla 1 se muestran los datos obtenidos a partir de la línea de peces cebra Nuus. El número de huevos entre los diferentes grupos de individuos, que a su vez provienen de puestas diferentes, no presentan diferencias significativas entre ellos ( $F_{exp}=0,45$ ;  $pvalue=0,722$ ). Sin embargo la fecundación de los huevos en las diferentes puestas sí que presenta diferencias significativas entre los diferentes grupos ( $F_{exp}=6,12$ ;  $pvalue=0,002$ ). Los test estadísticos nos indican diferencias entre los individuos Nuus 5 y el resto, al igual que Nuus 8, por el contrario Nuus 6 y Nuus 7 no presentan diferencias significativas entre ellos pero si las presentan con el resto de los grupos. La proporción de eclosión también presenta diferencias significativas entre grupos ( $F_{exp}=4,21$ ;  $pvalue=0,0132$ ), donde claramente Nuus 7 presenta unos niveles mayores de eclosión de sus larvas respecto al resto. En la supervivencia de las larvas a los 6 días también apreciamos diferencias significativas entre grupos ( $F_{exp}=9,22$ ;  $pvalue=0,002$ ).

Los resultados del estudio de los grupos de la línea Exo se pueden observar en la Tabla 2. El número de huevos por puesta de los diferentes grupos no presenta diferencias significativas ( $F_{exp}=1,00$ ;  $pvalue=0,431$ ). Las proporciones de fecundación de los huevos, sin embargo, presentan diferencias significativas claras entre grupos ( $F_{exp}=3,34$ ;  $pvalue=0,0135$ ) siendo Exo 8 los que presentan una tasa de fecundación mayor. El porcentaje de eclosión de las puestas entre grupos no presenta diferencias significativas entre grupos ( $F_{exp}=1,24$ ;  $pvalue=0,311$ ). Al igual que en la eclosión, la supervivencia a los 6 días de las larvas no presenta diferencias significativas entre los diferentes grupos Exo ( $F_{exp}=2,26$ ;  $pvalue=0,067$ ).

Con el fin de agrupar los valores de ambas líneas, Nuus y Exo, en la Tabla 3 se ha llevado una comparación de los datos totales para cada una de las líneas. El número de huevos de ambas líneas no presenta diferencias significativas en sus puestas ( $F_{exp}=0,13$ ;  $pvalue=0,722$ ). La proporción de huevos fecundados tampoco presenta diferencias significativas ( $F_{exp}=0,06$ ;  $pvalue=0,801$ ) al igual que la proporción de huevos eclosionados ( $F_{exp}=1,53$ ;  $pvalue=0,219$ ). En lo que respecta los valores de supervivencia de las larvas eclosionadas a los 6 días tampoco observamos diferencias significativas entre los grupos ( $F_{exp}=1,82$ ;  $pvalue=0,182$ ).

Los resultados del estudio de las larvas de las puestas mediante PCR para poder determinar si las hembras de la F2 son individuos homocigotos o heterocigotos para el transgen se muestran en la Tabla 4. En la tabla se observan los individuos finales homocigotos y heterocigotos para ambas líneas de pez cebra, Exo y Nuus. A partir de un test de Chi-cuadrado entre los datos de ambos grupos sabemos que no existen diferencias significativas en la proporción de individuos homocigotos finales ( $F_{exp}=3,70$ ;  $pvalor=0,054$ ). En la Fig. 5 se puede observar la proporción de hembras homocigotas totales para cada una de las líneas de pez cebra.

## 4.2 Fluorescencia

Los niveles de intensidad fluorescente producida por la proteína *vasa:EGFP* se analizaron en varios individuos de una puesta producida el 30 de julio del 2013. Los valores se muestran en la Fig. 6 donde se agrupan los datos obtenidos en diferentes días para cada uno de los 5 individuos. Con el fin de analizar los datos obtenidos se llevó a cabo un estudio estadístico mediante una ANOVA multifactorial que mostró diferencias significativas entre individuos ( $F_{exp}=4,50$ ;  $pvalue=0,019$ ). Las diferencias entre individuos se muestran en la figura con letras estadísticas.

En la Fig. 7A se muestra la evolución más detallada de la evolución de la fluorescencia de uno de los individuos analizados, en concreto de un macho procedente de una puesta del día 23 de agosto del 2013 que puede observarse en la Fig. 7B.

### 4.3 Resultados qRT-PCR. Estudio de la expresión de *dnmt1* & *dnmt3*

A partir de los datos obtenidos en la qRT-PCR se han analizado los niveles de expresión de la *dnmt1* y la *dnmt3*. En el estudio se ha comprobado cómo varía la expresión de estos genes a medida que se desarrollan los individuos. A su vez, también se ha estudiado si existen diferencias entre peces de diferente sexo, en el caso de los peces ya diferenciados. También se han comprobado las diferentes curvas de disociación obtenidas para los genes analizados para comprobar que no se han formado primer-dimers en el procedimiento.

La curva de disociación para la *dnmt1* se muestra en la Fig. supl. 7. En esta figura podemos observar como en la temperatura comprendida entre los 80°C y los 85°C aparece un único pico pronunciado. En la Fig. supl. 8 se observa la segunda curva de disociación obtenida, perteneciente a la *dnmt3*. En esta segunda curva observamos también un único pico pronunciado en una temperatura cercana a los 70°C.

La amplificación de la *dnmt1* se muestra en la Fig. supl. 9. Podemos observar como el threshold, o umbral, tiene un valor de 0.021. Los valores de  $C_T$ , por lo tanto, corresponderán al ciclo en el que el nivel de fluorescencia de la amplificación de la muestra alcanza este umbral. Los niveles de fluorescencia producidos se encuentran relacionados directamente con la cantidad de amplicon producida. En la Fig. supl. 10 se aprecia la amplificación del gen control utilizado en el análisis de la *dnmt1*, el gen *ef $\alpha$* . En este caso el umbral de fluorescencia es de 0,151.

En la Fig. supl. 11 se observa la amplificación de la *dnmt3*. Presenta un valor de umbral de 0,301. Los resultados del gen *ef $\alpha$*  utilizado durante la amplificación de la *dnmt3*, utilizado como control, se presentan en la Fig. supl. 12. El umbral del gen endógeno en este caso es de 1,424.

Después de agrupar los datos obtenidos de los individuos por edades y sexos se elaboraron dos gráficas a partir ellos, una para cada gen analizado. En los valores de ambas gráficas se ha llevado a cabo un análisis estadístico con el fin de encontrar si existen diferencias significativas entre los grupos de individuos con diferentes edades. A su vez, también se ha estudiado si existen diferencias entre sexos en grupos de individuos de la misma clase de edad.

En la Fig. 8 se muestra la gráfica para la expresión de la *dnmt1*. La gráfica muestra la media de los niveles de expresión de los individuos por grupos de edad y sexo junto con el error estándar. En la gráfica se observa como existen diferencias significativas entre individuos de diferentes clases de edad ( $F_{exp}=49,43$ ;  $pvalue=0,000$ ), con un nivel de confianza del 95%. En lo que respecta a las diferencias entre sexos en los niveles de expresión de *dnmt1*, de la misma clase de edad, solo se han encontrado diferencias en peces de 110 días de edad ( $F_{exp}=6,24$ ;  $pvalue=0,046$ ) con valores de intensidad superiores para las hembras.

El estudio de los datos obtenidos de la *dnmt3* se muestra en la Fig. 9. En la gráfica también se muestra el error estándar. Al igual que en el caso de la expresión de la *dnmt1*, se han encontrado diferencias significativas entre los individuos de diferentes clases de edad ( $F_{exp}=10,33$ ;  $pvalue=0,009$ ). Sin embargo, en la *dnmt3* no se han encontrado diferencias significativas en los niveles de expresión de *dnmts* entre sexos.



## **5. Discusión**

### **5.1 Cría y análisis individuos**

Los resultados sobre la cría y variables estudiadas durante la cría en ambas líneas transgénicas, Nuus y Exo, nos muestra que no existen diferencias significativas en ninguna variable, como se observa en la Tabla 3. Sin embargo, existen diferencias entre los grupos que componen ambas líneas, por lo tanto las diferencias no son a nivel de línea sino de grupo. Estas diferencias en fecundidad, eclosión y supervivencia de los huevos pueden ser causadas por factores genéticos y/o fisiológicos de los propios individuos, ya que tanto la alimentación como los parámetros ambientales son los mismos para todos los peces. La existencia de estas diferencias nos da la opción de elegir individuos de los grupos con mayor éxito reproductivo si nuestro fin es obtener el mayor número de embriones posible, descartando los grupos con menor producción de crías.

En lo que respecta al estudio mediante PCR de las proporciones entre hembras homocigotas y heterocigotas, en la Fig. supl. 13 se puede apreciar un gel de una hembra homocigota y otra heterocigota, no se encontraron diferencias significativas entre ambas líneas de pez cebra (Tabla 4). El no encontrar diferencias implica que no existen variaciones en la segregación del alelo que contiene el transgen entre los individuos y su descendencia entre las líneas Nuus y Exo.

### **5.2 Fluorescencia**

En este experimento se esperaba poder observar de forma clara como con la ayuda de la proteína EGFP unida a *vasa* se podía estudiar la conversión de las gónadas bipotenciales de las larvas evolucionan a ovarios juveniles, en el caso de las hembras, o se transforman en testis (testículos) en el caso de los machos (Wang et al., 2007). Sin embargo, no se consiguieron replicar los resultados obtenidos en dicho artículo ya que no se consiguieron obtener suficientes replicados, únicamente 5 individuos.

Los datos esperados habrían seguido un patrón similar a los mostrados en la Fig. supl. 14, obtenidos del artículo mencionado anteriormente (Wang et al., 2007). En la figura podemos observar como las hembras presentan los niveles de expresión de EGFP más elevados, sin embargo, en los machos observamos una gran variabilidad

durante el desarrollo, aunque a medida que avanza este desarrollo todos presentan los mismos niveles bajos de expresión.

Los valores de fluorescencia obtenidos se muestran en la Fig. 6. Los resultados de la evolución de los niveles de fluorescencia de los diferentes individuos presentaron diferencias significativas entre ellos. Sin embargo no se pudieron obtener más datos ya que la supervivencia en el experimento fue baja, lo que no permite sacar conclusiones claras puesto que no conocemos el sexo final de los individuos. Solo en un individuo, mostrado en la Fig.7, procedente otra puesta presentó una longevidad mayor como para observar la variación de su fluorescencia con una duración suficiente para permitir conocer su sexo ya diferenciado, que en este caso resultó ser macho.

Los estudios anteriormente mencionados indican que, pese a que los niveles de expresión en hembras pueden presentar variaciones considerables a lo largo de su desarrollo entre individuos, son bastante constantes. Sin embargo en el caso de los machos se puede diferenciar entre tres tipos según su fluorescencia (Wang et al., 2007):

1. Tipo I: individuos machos que durante su desarrollo muestran prácticamente los mismos niveles de expresión de EGFP que a su vez son los más bajos.
2. Tipo II: machos que presentan un pico considerable de expresión de EGFP durante su desarrollo, sin embargo, este se detiene y finalmente presenta un nivel de expresión bajo.
3. Tipo III: estos individuos presentan unos niveles de expresión de EGFP casi idénticos a los que mostraría una hembra. El individuo mostrado en la Fig. 7 pertenece a este tipo III. Finalmente, estos peces presentan un descenso brusco y muy pronunciado de expresión que queda a un nivel prácticamente idéntico a los de sus homólogos machos.

### **5.3 qRT-PCR. Estudio de la expresión de *dnmt1* & *dnmt3***

Las curvas de disociación de ambos estudios, *dnmt1* y *dnmt3*, nos indican que la temperatura de fusión de nuestros productos es la misma, esto implica que la amplificación producida es específica para el amplicón. Si la curva presentase más de un pico claro indicaría la posible formación de primer-dimers, es decir, dímeros de los cebadores usados.

La expresión del gen *dnmt1*, mostrada en la Fig. 8, varía a lo largo del desarrollo de los individuos. Se puede apreciar que el grado de expresión de *dnmt1* en las clases de edad indiferenciadas, de 12 a 32 días, los niveles son bajos. En cambio, las clases de edad ya diferenciadas sexualmente, de 60 dpf en adelante, presentan niveles significativamente mayores.

El gen que codifica para la *dnmt3*, una *dnmt* con acción metiladora *de novo* se muestra en la Fig. 9. El patrón de expresión que presenta esta *dnmt3* es similar al anterior. Los individuos de las clases de edad aún indiferenciadas presentan niveles de expresión bajos. Por el contrario, los individuos diferenciados sexualmente presentan niveles significativamente mayores en la expresión del gen estudiado. Sin embargo, la diferencia entre los niveles de expresión entre ambos grupos, diferenciados sexualmente e indiferenciados, no son tan grandes como en el caso del patrón de expresión de la *dnmt1*. Debemos tener en cuenta que los individuos diferenciados e indiferenciados no son completamente comparables entre ellos. Esto se debe a que los tejidos son diferentes y también lo son las concentraciones de RNA.

El aumento en los niveles de expresión en *dnmts* en individuos diferenciados, puede indicar que estas enzimas cumplen un papel importante en el proceso de regulación génica que regula la diferenciación del tejido gonadal.

Las diferencias entre sexos en lo que respecta los niveles de expresión de ambas *dnmts* no parecen ser significativos en la mayoría de las edades estudiadas. Únicamente en los individuos de 110 días se encuentran diferencias significativas. Estas diferencias además solo son para la *dnmt1*, donde encontramos niveles de expresión significativamente más elevados en hembras. Sin embargo, pese a no ser diferencias estadísticamente significativas, la expresión de ambas *dnmts* es siempre mayor en las hembras en todas las clases de edad diferenciadas sexualmente.

Si comparamos los niveles de expresión de la *dnmt1* y la *dnmt3*, se observa que la expresión de la *dnmt1* es significativamente más elevada en todos los puntos estudiados, respecto a la *dnmt3*. Por lo tanto, la acción metiladora de la *dnmt1* será mayor que la *dnmt3*. Si sólo tenemos en cuenta estas dos *dnmts* estudiadas podemos decir que los niveles de metilación de mantenimiento, llevados a cabo por la *dnmt1*, son mayores que las metilaciones *de novo*, producidas por la *dnmt3* estudiada.

## 6. Conclusión

Respecto a la cría y mantenimiento de la línea transgénica de zebrafish *vasa:EGFP*:

- El mantenimiento del *Danio rerio* requiere unas instalaciones adecuadas y un mantenimiento diario para asegurar unos individuos completamente viables para una mejor producción de embriones.
- Pequeños cambios en variables de estabulación o alimentación pueden afectar la viabilidad de los individuos.
- La alimentación de los individuos destinados a la reproducción es especialmente importante para asegurar una puesta.
- Los embriones son especialmente susceptibles los primeros días de vida.
- No se han encontrado diferencias entre las líneas transgénicas para *vasa:EGFP* usadas, sin embargo, si se han encontrado diferencias entre parejas.
- La segregación del transgen *vasa:EGFP* es igual en los individuos de ambas líneas, Exo y Nuus.
- Existen importantes diferencias en los niveles de expresión de *vasa* entre individuos de diferente sexo y edad, e incluso entre individuos del mismo sexo y edad.
- A pesar de lo mencionado en el punto anterior, los niveles de fluorescencia nos permiten conocer los niveles de expresión de *vasa* y relacionarlos con el sexo del individuo antes de que éste sea visible.

Del estudio de la expresión génica de la *dnmt1* y la *dnmt3* en gónadas de pez cebra:

- La técnica qRT-PCR es un método eficiente para determinar la expresión génica de una muestra a partir de ARNm.
- Puede existir una relación entre los niveles bajos de expresión de ambas *dnmts* en individuos indiferenciados y el desarrollo sexual, ya que tras la diferenciación los niveles aumentan significativamente.
- Pese a que ambas *dnmts* parecen tener niveles de expresión mayores en las hembras, por lo general, las diferencias no son lo suficientemente grandes como para ser significativas.
- Los niveles de expresión de la *dnmt1* son significativamente más elevados que los de la *dnmt3*. Estas diferencias pueden estar causadas por la diferente naturaleza metiladora de estas *dnmts*, donde la primera está en constante control mientras que la segunda puede que solo sea activa en determinados momentos.

## **Agradecimientos**

En primer lugar me gustaría agradecer a Francesc Piferrer la oportunidad de llevar a cabo este proyecto en el Grup de Biologia de la Reproducció del ICM-CSIC. Ha sido una experiencia formidable de la que he obtenido una gran experiencia, tanto a nivel profesional como personal. Dar las gracias a todo el personal con el que he trabajado durante estos últimos meses y en especial a Noelia Díaz, Sílvia Joly y Gemma Fuster. Sin vosotras sin duda la experiencia no habría sido la misma. Solo tengo palabras de agradecimiento para Noelia y Sílvia, las cuales me han ayudado enormemente durante todo el proyecto, gracias también a Gemma por la compañía y conversación durante los largos ratos en la ZAE.

Gracias a todos.

## Bibliografía

- Aleström, P., Holter, J.L., Nourizadeh-Lillabadi, R., 2006. Zebrafish in functional genomics and aquatic biomedicine. *Trends Biotechnol.* 24, 15–21.
- Bopp, S.K., Minuzzo, M., Lettieri, T., 2006. The Zebrafish ( *Danio rerio* ): an Emerging Model Organism in the Environmental Field.
- Buffer, G., n.d. Supplied With : 3005, 8–9.
- Campos, C., Fernandes, J.M.O., Valente, L.M.P., 2012. Molecular evolution of zebrafish *dnmt3* genes and thermal plasticity of their expression during embryonic development. *Gene* 500, 93–100.
- Ehrlich, M., 2003. Expression of various genes is controlled by DNA methylation during mammalian development. *J. Cell. Biochem.* 88, 899–910.
- Fang, X., Corrales, J., Thornton, C., Scheffler, B.E., Willett, K.L., 2013. Global and gene specific DNA methylation changes during zebrafish development. *Comp. Biochem. Physiol. B. Biochem. Mol. Biol.* 166, 99–108.
- García González, L. a, Rodrigo Tapia, J.P., Sánchez Lazo, P., Ramos, S., Suárez Nieto, C., 2004. [DNA extraction using Chelex resin for oncogenic amplification analysis in head and neck tumours]. *Acta Otorrinolaringol. Esp.* 55, 139–44.
- Gardiner-Garden, M., Frommer, M., 1987. CpG islands in vertebrate genomes. *J. Mol. Biol.* 196, 261–282.
- Jiang, L., Zhang, Jing, Wang, J.-J., Wang, L., Zhang, L., Li, G., Yang, X., Ma, X., Sun, X., Cai, J., Zhang, Jun, Huang, X., Yu, M., Wang, X., Liu, F., Wu, C.-I., He, C., Zhang, B., Ci, W., Liu, J., 2013. Sperm, but not oocyte, DNA methylome is inherited by zebrafish early embryos. *Cell* 153, 773–84.
- Kimmel, C.B., Ballard, W.W., Kimmel, S.R., Ullmann, B., Schilling, T.F., 1995. Stages of embryonic development of the zebrafish. *Dev. Dyn.* 203, 253–310.
- Koen, A., Water, S. Van De, Goos, H., Bogerd, J., Zivkovic, D., 2000. Vasa protein expression and localization in the zebra © sh 95, 271–274.
- Krøvel, A.V., Olsen, L.C., 2002. Expression of a vas::EGFP transgene in primordial germ cells of the zebrafish. *Mech. Dev.* 116, 141–50.
- Laia Navarro-Martín, Jordi Viñas, Laia Ribas, Noelia Díaz, Arantxa Gutiérrez, Luciano Di Croce, F.P., 2011. DNA Methylation of the gonadal aromatase (*cyp19a*) promoter is involved in temperature-dependent sex ratio shifts in the European Sea Bass. *PLoS Genet.* 7, e1002447.
- Miana, A.B., Izpis, J.C., 2007. El pez cebra.
- Piferrer, F., 2013. Epigenetics of sex determination and gonadogenesis. *Dev. Dyn.* 242, 360–70.

- Piferrer, F., Blázquez, M., Navarro, L., González, A., 2005. Genetic, endocrine, and environmental components of sex determination and differentiation in the European sea bass (*Dicentrarchus labrax* L.). *Gen. Comp. Endocrinol.* 142, 102–110.
- Ramos Blasco, J., Martín Caballero, J., n.d. Dilatación abdominal en peces, Zebra fish (*Danio rerio*).
- Russo, V., RA, M., AD, R., 1996. Epigenetic mechanisms of gene regulation. 692p.
- Schmittgen, T.D., Livak, K.J., 2008. Analyzing real-time PCR data by the comparative CT method. *Nat. Protoc.* 3, 1101–1108.
- Spence, R., Gerlach, G., Lawrence, C., Smith, C., 2008. The behaviour and ecology of the zebrafish, *Danio rerio*. *Biol. Rev. Camb. Philos. Soc.* 83, 13–34.
- Takizawa, T., Nakashima, K., Namihira, M., Ochiai, W., Uemura, A., Yanagisawa, M., Fujita, N., Nakao, M., Taga, T., 2001. DNA methylation is a critical cell-intrinsic determinant of astrocyte differentiation in the fetal brain. *Dev. Cell* 1, 749–758.
- Wang, X.G., Bartfai, R., Sleptsova-Freidrich, I., Orban, L., 2007. The timing and extent of “juvenile ovary” phase are highly variable during zebrafish testis differentiation. *J. Fish Biol.* 70, 33–44.

Anexo

Tablas

Tabla 1. Tabla resumen cría línea Nuus

| Línea  | Hembras fertilizadas | Rango huevos | Huevos                   | Fecundación (%)                     | Eclosión (%)                          | Supervivencia 6° día (%)            |
|--------|----------------------|--------------|--------------------------|-------------------------------------|---------------------------------------|-------------------------------------|
| Nuus 5 | 9                    | 30-300       | 134.11 ± 89.26<br>(n=9)  | 50,49 ± 9,13 <sup>b</sup><br>(n=9)  | 22,43 ± 20,43 <sup>a</sup><br>(n=9)   | 20,37 ± 12,08 <sup>a</sup><br>(n=9) |
| Nuus 6 | 3                    | 50-187       | 115 ± 68.76<br>(n=3)     | 78,26 ± 15,81 <sup>c</sup><br>(n=3) | 24,76 ± 24,76 <sup>a,b</sup><br>(n=3) | 25,36 ± 20,92 <sup>a</sup><br>(n=3) |
| Nuus 7 | 19                   | 24-270       | 113.37 ± 70.84<br>(n=19) | 77,1 ± 6,28 <sup>c</sup><br>(n=19)  | 65,89 ± 64,43 <sup>b</sup><br>(n=19)  | 60,83 ± 8,31 <sup>b</sup><br>(n=19) |
| Nuus 8 | 4                    | 20-200       | 105 ± 98.48<br>(n=4)     | 20,83 ± 13,69 <sup>a</sup><br>(n=4) | 0,00 ± 30,65 <sup>a</sup><br>(n=4)    | 0,00 ± 18,12 <sup>a</sup><br>(n=4)  |



Tabla 2. Tabla resumen cría línea Exo

| Línea  | Hembras fertilizadas | Rango huevos | Huevos                   | Fecundación (%)                     | Eclosión (%)           | Supervivencia 6° día (%) |
|--------|----------------------|--------------|--------------------------|-------------------------------------|------------------------|--------------------------|
| Exo 5  | 7                    | 21-223       | 117.28 ± 81.77<br>(n=7)  | 60,65 ± 11,20 <sup>b</sup><br>(n=7) | 66,27 ± 13,00<br>(n=7) | 0,91 ± 16,11<br>(n=7)    |
| Exo 6  | 3                    | 48-120       | 90.33 ± 37.63<br>(n=3)   | 49,82 ± 17,11 <sup>b</sup><br>(n=3) | 24,44 ± 19,86<br>(n=3) | 60,61 ± 24,60<br>(n=3)   |
| Exo 7  | 6                    | 90-300       | 156.66 ± 81.15<br>(n=6)  | 71,81 ± 12,10 <sup>c</sup><br>(n=6) | 48,59 ± 14,04<br>(n=6) | 78,66 ± 17,40<br>(n=6)   |
| Exo 8  | 5                    | 30-132       | 82.4 ± 40.23<br>(n=5)    | 75,60 ± 13,26 <sup>c</sup><br>(n=5) | 59,76 ± 15,38<br>(n=5) | 93,33 ± 19,06<br>(n=5)   |
| Exo 9  | 2                    | 60-84        | 72 ± 16.97<br>(n=2)      | 14,58 ± 20,96 <sup>a</sup><br>(n=2) | 52,38 ± 24,33<br>(n=2) | 18,18 ± 3,013<br>(n=2)   |
| Exo 10 | 21                   | 23-250       | 106.23 ± 63.79<br>(n=21) | 78,84 6,47 <sup>c</sup><br>(n=21)   | 68,96 ± 7,50<br>(n=21) | 76,34 ± 9,30<br>(n=21)   |

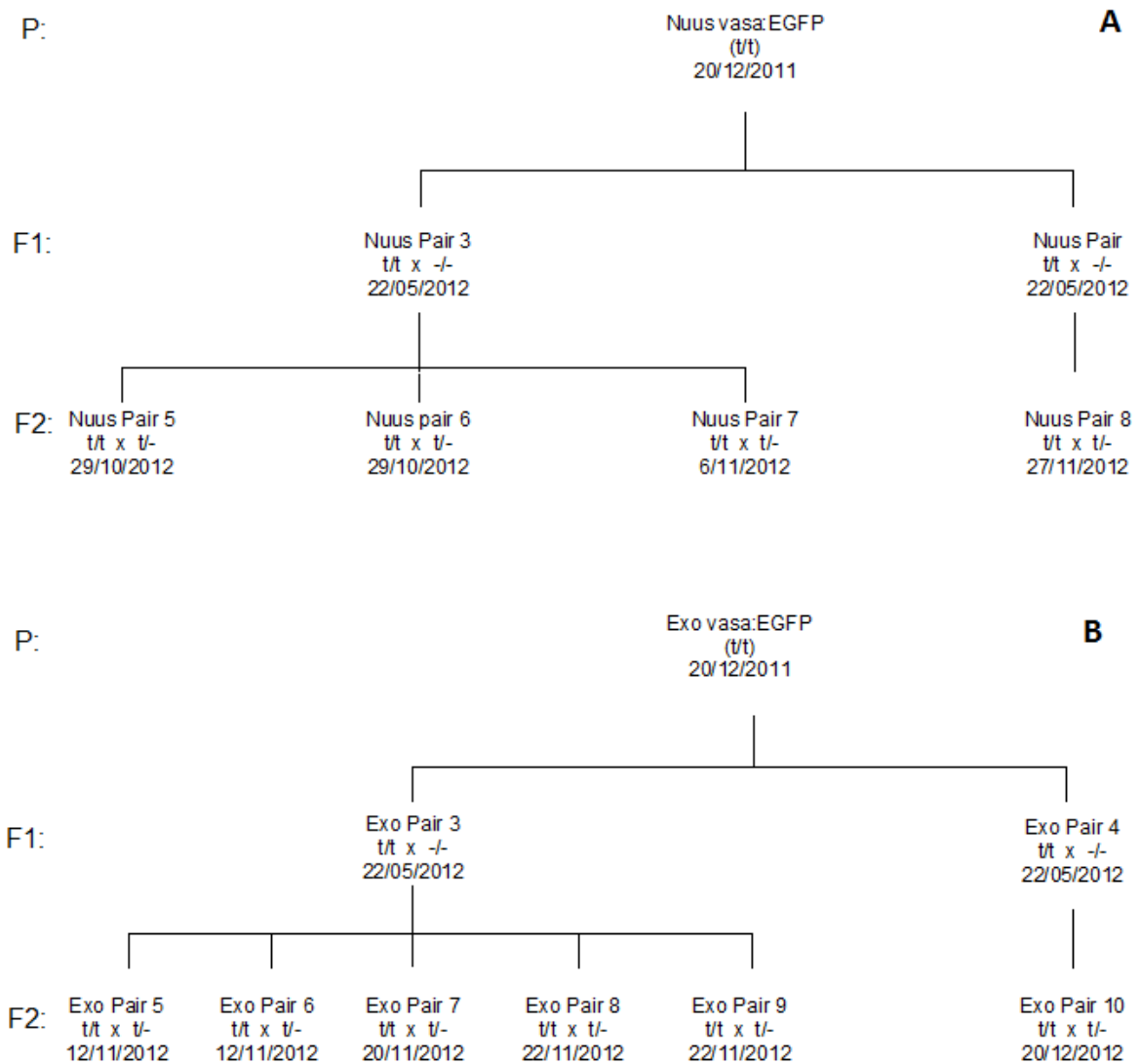
**Tabla 3. Tabla comparativa líneas Nuus y Exo**

| Línea      | Hembras fertilizadas | Rango huevos | Huevos                 | Fecundación (%)        | Eclosión (%)           | Supervivencia 6° día (%) |
|------------|----------------------|--------------|------------------------|------------------------|------------------------|--------------------------|
| Nuus total | 35                   | 20-300       | 80,6 ± 67,82<br>(n=35) | 63,93 ± 5,54<br>(n=35) | 43,66 ± 8,39<br>(n=35) | 40,43 ± 7,47<br>(n=35)   |
| Exo total  | 44                   | 21-300       | 76,7 ± 64,14<br>(n=44) | 66,35 ± 4,94<br>(n=44) | 49,58 ± 7,48<br>(n=44) | 44,12 ± 6,67<br>(n=44)   |

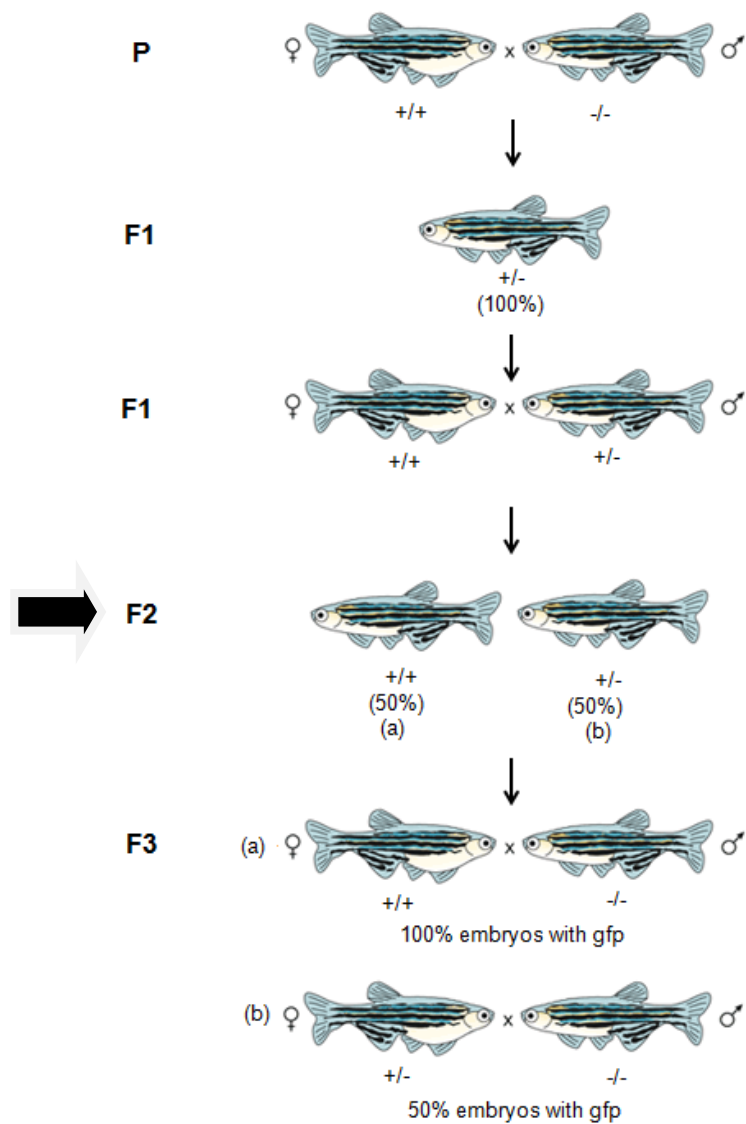
**Tabla 4. Tabla proporción individuos homocigotos/heterocigotos totales**

| Línea | Hembras t/t | Hembras t/- | % t/t |
|-------|-------------|-------------|-------|
| Nuus  | 8           | 10          | 44,4  |
| Exo   | 15          | 5           | 75,0  |
| Total | 23          | 15          | 60,5  |

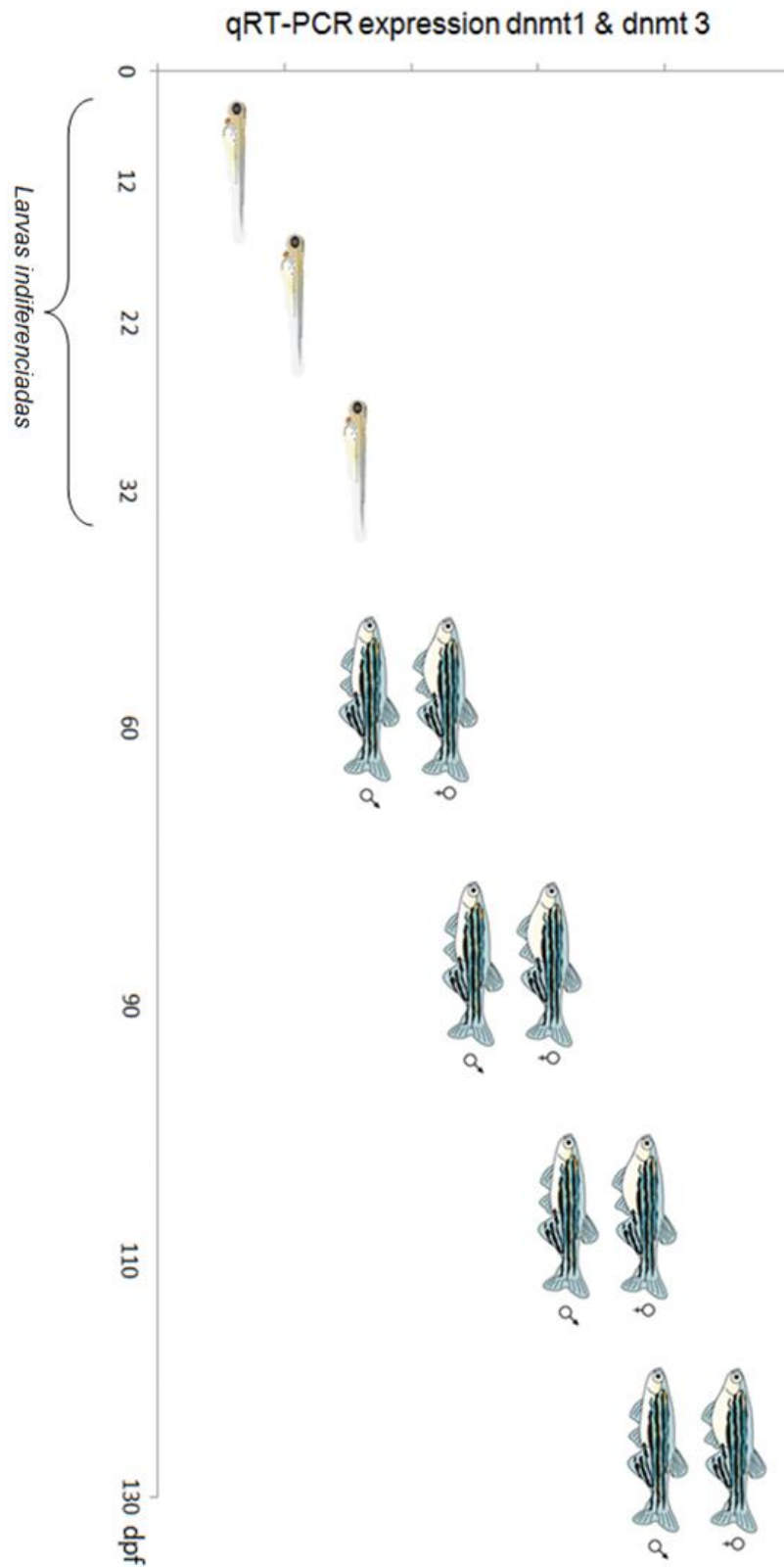
## Figuras



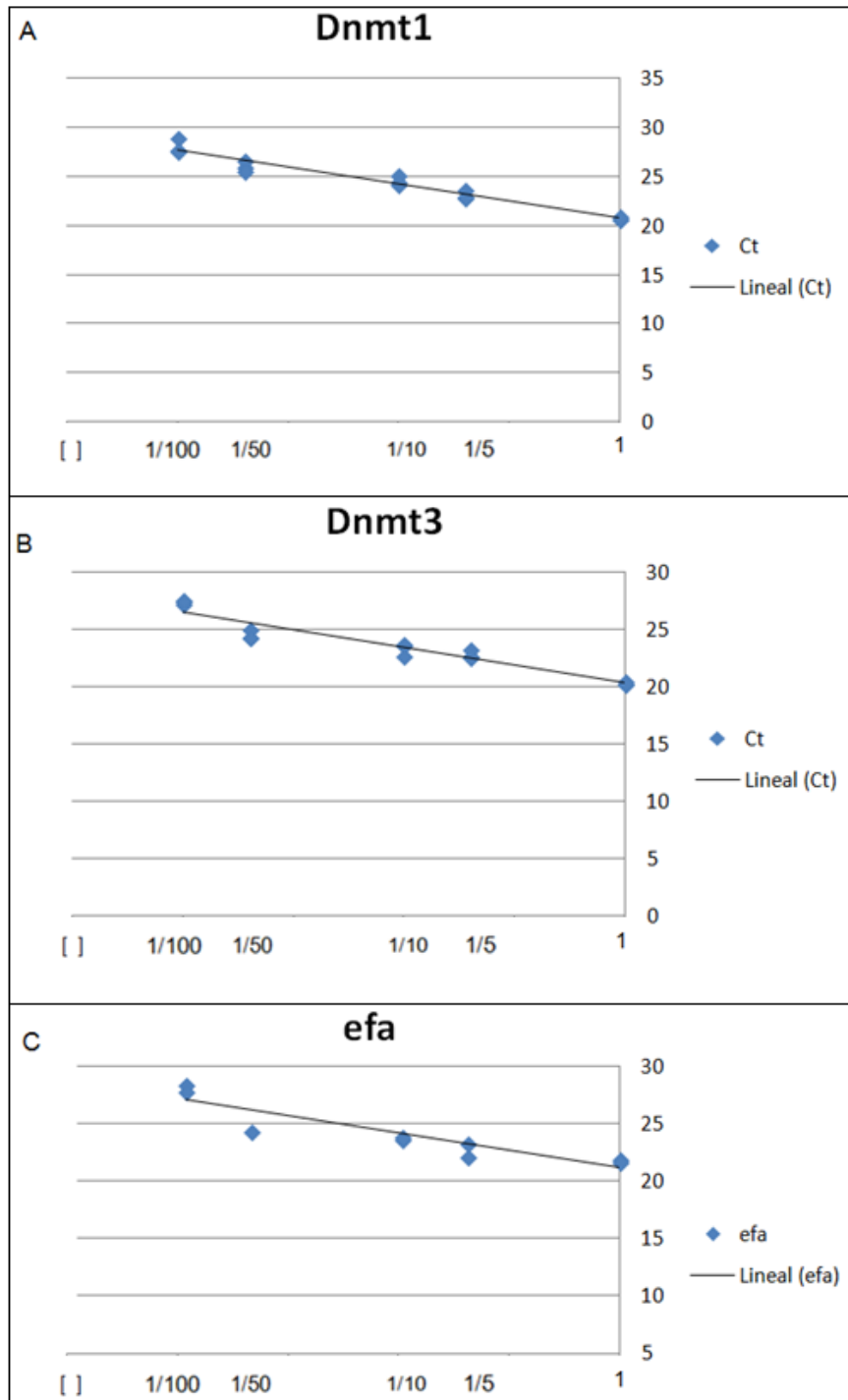
**Figura 1.** En la ilustración se muestran las dos líneas transgénicas de pez cebra. (A) Línea Nuus y (B) línea Exo. En todos los cruces realizados se muestran los alelos de las clases parentales así como la fecha de realización de dicho cruce.



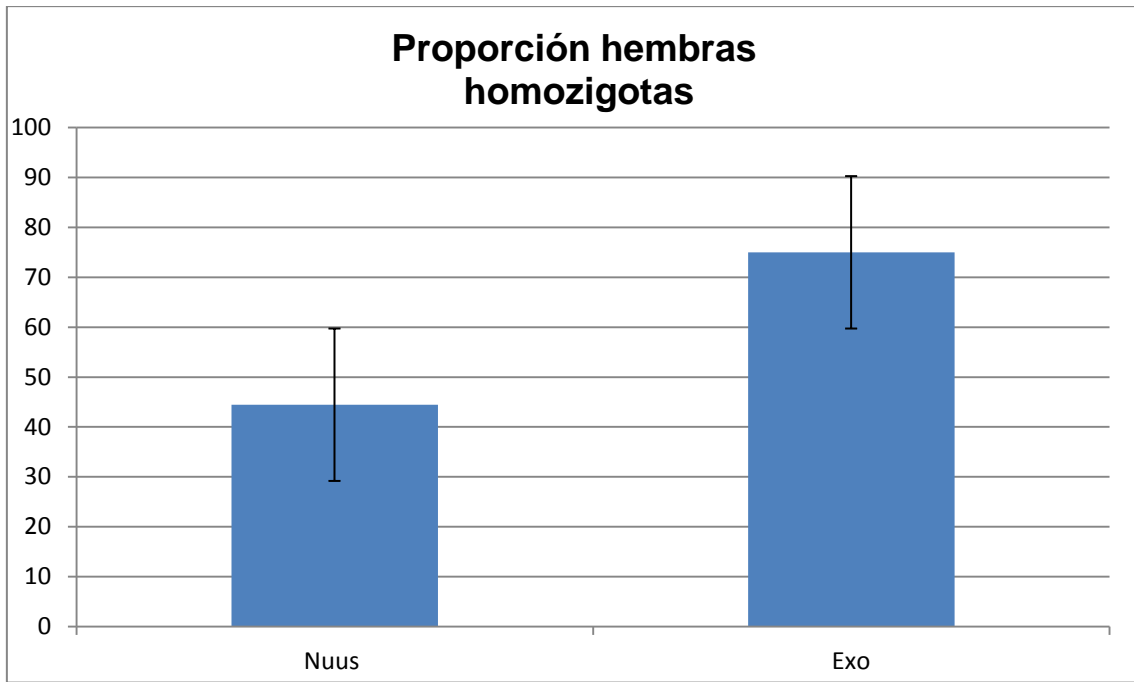
**Figura 2.** Protocolo de cría para el mantenimiento de una línea transgénica de pez cebra, en concreto para *vasa:EGFP*. Durante las prácticas se parte de de los cruces de la F2 (flecha negra) para obtener una F3 mediante la cual poder realizar un análisis genético por PCR, los anteriores cruces ya habían sido realizados por miembros del GBR.



**Figura 3.** Diseño experimental para el estudio de la expresión de dos genes en el tejido gonadal en pez cebra, *dnmt1* & *dnmt3*, que codifican para ADN-metiltransferasas. Para el experimento se usaron individuos en diferentes estadios de desarrollo y distinguiendo cuando fue posible entre ambos sexos. Podemos diferenciar dos tipos de individuos: las larvas indiferenciadas sexualmente e individuos adultos con gónadas ya diferenciadas (se muestran en la imagen como larvas o peces). Para cada punto de muestreo se analizaron 6 individuos para cada gen de interés.

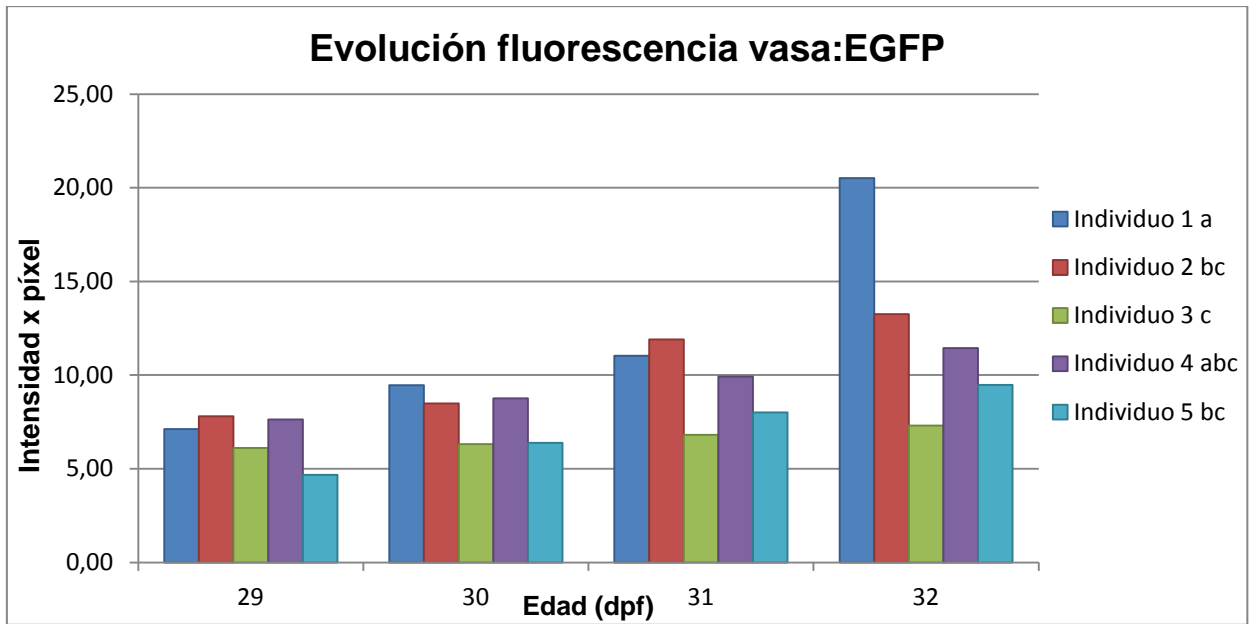


**Figura 4. Comprobación primers (*dnmt1*, *dnmt3*, *efa*).** Las 3 gráficas muestran la  $C_T$  obtenidas para todos los primers a partir de diluciones de ADNc. Este procedimiento permite conocer que dilución de muestra utilizar para obtener unos buenos resultados en la qRT-PCR. La  $C_T$  de la dilución que se observa debe tener un valor por debajo de 30 para ser considerada como óptima. Para este estudio la dilución de ADNc utilizada fue de 1/10, presentando una  $C_T$  de alrededor 25 para los diferentes cebadores empleados.

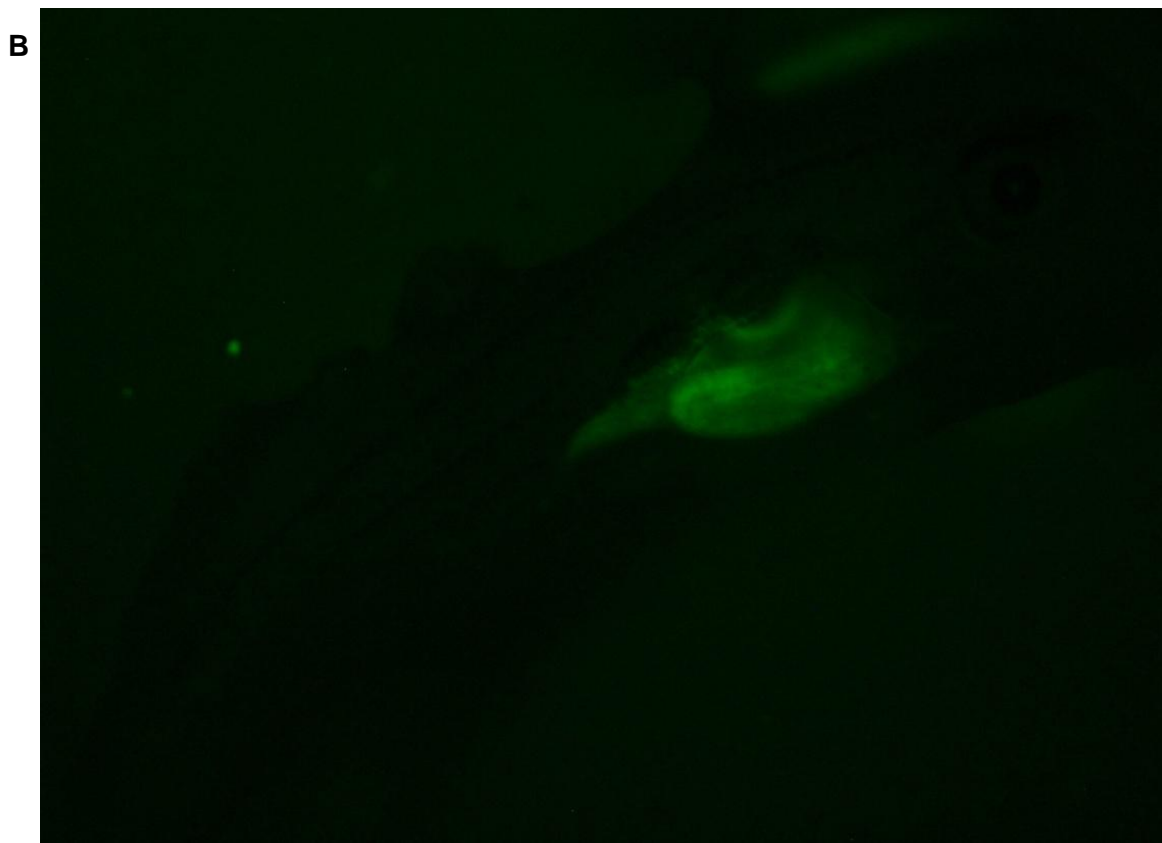
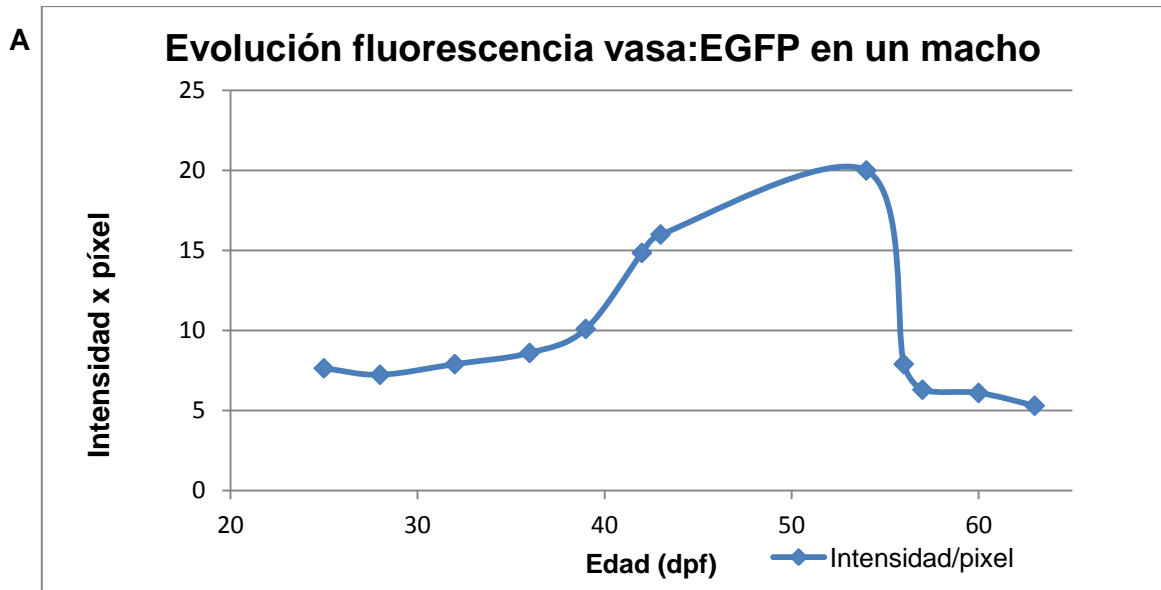


**Figura 5.** Proporciones de hembras homocigotas para las diferentes líneas transgénicas (Nuus n=18, Exo n=20).

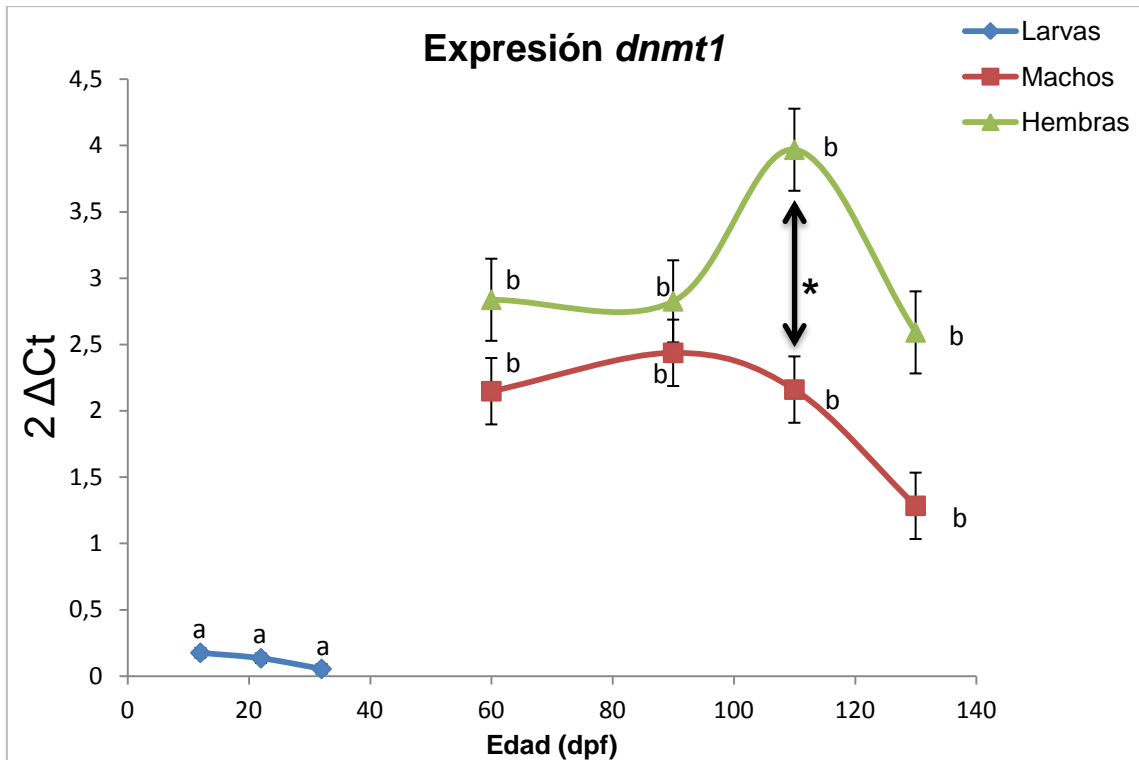




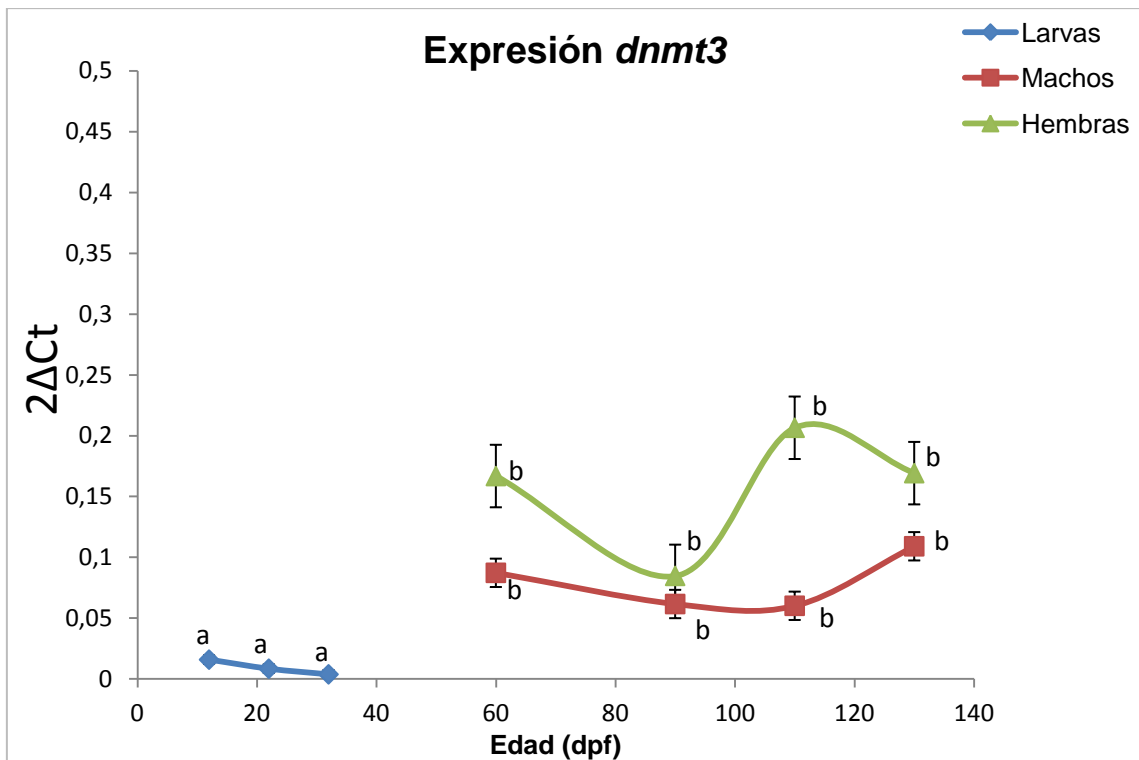
**Figura 6.** Valores de intensidad obtenidos de los diferentes individuos de la puesta del 30/07/2013.



**Figura 7A y 7B.** En la figura 7A se muestra la evolución de la intensidad de la fluorescencia, que corresponde con los niveles de expresión de vasa, de un macho perteneciente a una puesta del día 23/08/2013. La figura 7B muestra el macho analizado a los 54 dpf, edad donde presentó el nivel más elevado de intensidad.



**Figura 8. Expresión de la *dnmt1* en el tejido gonadal.** Los puntos de la gráfica muestran los valores medios de expresión de los individuos analizados para la *dnmt1*, agrupándolos según la clase de edad y el sexo. Se han llevado a cabo análisis estadísticos para comprobar si existen diferencias significativas entre sexos y entre clases de edad.



**Figura 9. Expresión de la *dnmt3* en el tejido gonadal.** Los puntos de la gráfica muestran los valores medios de expresión de los individuos analizados para la *dnmt3*, agrupándolos según la clase de edad y el sexo. Se han llevado a cabo análisis estadísticos para comprobar si existen diferencias significativas entre sexos y entre clases de edad.

## Tablas suplementarias

Tabla suplementaria 1. Parámetros de la cámara

| <b>VARIABLES<br/>AMBIENTALES</b> | <b>VALORES DE CONSIGNA<br/>(rangos tolerados)</b>                               |
|----------------------------------|---|
| Temperatura ambiental            | 26°C (23°C-30°C)  |
| Humedad                          | 55% (47%-62%)   |
| Temperatura del agua             | 28°C (24°C-30°C)  |
| pH                               | 7.2 (6.8-8.3)   |
| Luz encendida                    | De 8.30 a 20.30   |
| Luz apagada                      | De 20:30 a 8:30   |
| Niveles del agua del rack        | Rack 1: Entre las bandas roja y blanca<br>Rack 2: Cobertura total de las bombas |

\*Según GBR

**Tabla suplementaria 2. Calidad del agua**

| <b>Parámetros</b>                                   | <b>Condiciones toleradas por el pez cebra</b> | <b>Condiciones establecidas</b> |
|---|---|---------------------------------|
| <b>Temperatura (°C)</b>                             | 22-30 °C                                      | 28                              |
| <b>Dureza</b>                                       | 8-10 GH (75-200 mg/L)                         | 7_8                             |
| <b>pH</b>   | 7_8   | 7-7.5                           |
| <b>Salinidad</b>                                    | 0,3 ppt                                       | 0,3 ppt                         |
| <b>Amonio</b>                                       | 0,02-0,05 ppm                                 | 0,02-0,05 ppm                   |
| <b>Nitrito</b>                                      | < 2,0 ppm                                     | < 2,0 ppm                       |
| <b>Nitrato</b>                                      | < 200 ppm                                     | < 200 ppm                       |
| <b>Fosfato</b>                                      | 250 ppm (0,25 mg/L)                           | 250 ppm (0,25 mg/L)             |
| <b>Silicio</b>                                      | -   | -                               |
| <b>Oxígeno disuelto a 28°C</b>                      | 7-8 mg/L                                      | 7-8 mg/L                        |
| <b>Conductividad</b>                                | 0-1000 µS                                     | 0-1000 µS                       |
| <b>Buffering (alcalinidad, Ca/MgCO<sub>3</sub>)</b> | 60-120 ppm                                    |                                 |
| <b>Calcio</b>                                       | 60-120 ppm                                    |                                 |
| <b>Magnesio</b>                                     | 60-120 ppm                                    |                                 |
| <b>Cobre</b>  | 1-10 ppb (or ug/L)                            |                                 |
| <b>Cloro</b>  | low / 0 ppm                                   | low / 0 ppm                     |







1ppm(partes por millón)= 1mg/1L

\*Referencias:

Detrich, H., Weste, M., and Zon, L., Eds. (2005) The Zebrafish: 2nd Edition Genetics, Genomics and Informatics Methods Cell Biol. Vol77.

Westerfield, M. (2000). The zebrafish book. A guide for the laboratory use of zebrafish (Danio rerio). 4th ed., Univ. of Oregon Press, Eugene.

Tabla suplementaria 3. Alimentación pez cebra

| ESTADO DEL PEZ            | EDAD (dpf) | ETIQUETA  | TIPO DE PIENSO     | Nº DE TOMAS/ DÍA  |
|---------------------------|------------|---|--------------------|---|
| <b>HUEVOS Y EMBRIONES</b> | 0-6        | —   | —                  | —   |
| <b>LARVA</b>              | 6-15       |    | SERA MICRON        | 3 de pienso +1 Artemia  |
| <b>LARVA</b>              | 14-18      |    | SERA MICRONv+ Nº 1 | 3 de pienso + 3 de Artemia  |
| <b>POST LARVA</b>         | 16-40      |    | 100-200 µm Nº 1    | 3 de pienso + 3 de Artemia  |
| <b>ALEVIN 1</b>           | 41-63      |   | 200-300 µm Nº 2    | 2 de pienso+ 1 de Artemia   |
| <b>ALEVIN 2</b>           | 64-93      |  | Nº 3               |   |
| <b>JUVENIL</b>            | 94-114     |  | Nº 4               | 2 de pienso+ 1 de Artemia   |
| <b>ADULTO</b>             | >115       |  | Nº 5               |   |
| <b>REPRODUCTOR</b>        | >115       |  | Nº5 + CONGELADO    | 2 de pienso+ 1 de Artemia + 3 veces por semana Congelado (sustituir pienso) |

\*Protocolo elaborado por Grup Biologia de la Reproducció

#### Tabla suplementaria 4. Medio embrionario

---

| <b>Stock # 1</b>     | <b>1L of EM</b> |
|----------------------|-----------------|
| NaCl - S3014 (Sigma) | 0,8 g           |
| KCl - P4504 (Sigma)  | 0,04 g          |
| H <sub>2</sub> O MQ  | 10 ml           |

| <b>Stock # 2</b>                                 |         |
|--|---------|
| NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> - S5011 (Sigma) | 0,036 g |
| H <sub>2</sub> KO <sub>4</sub> P - 60220 (Fluka) | 0,06 g  |
| H <sub>2</sub> O MQ                              | 10 ml   |

| <b>Stock # 3</b>                            | <b>1L of EM</b> |
|---|-----------------|
| CaCl <sub>2</sub> Dihydrate - C3881 (Sigma) | 0,144 g         |
| H <sub>2</sub> O MQ                         | 10 ml           |

| <b>Stock # 4</b>                  | <b>1L of EM</b> |
|-----------------------------------|-----------------|
| MgSO <sub>4</sub> - M7506 (Sigma) | 0,12 g          |
| H <sub>2</sub> O MQ               | 10 ml           |

| <b>Stock # 5</b>                   | <b>1L of EM</b> |
|------------------------------------|-----------------|
| NaHCO <sub>3</sub> - S5761 (Sigma) | 0,35 g          |
| H <sub>2</sub> O MQ                | 10 ml           |

---

---

#### Cantidad de stock necesaria para 1L de medio embrionario

---

10 ml Hank's Stock #1  
1 ml Hank's Stock #2  
10 ml Hank's Stock #3  
10 ml Hank's Stock #4  
10 ml recién preparados de Hank's Stock #5  
959 ml H<sub>2</sub>O MQ  
20 µl of 1 M NaOH

---

\*Referencias: Westerfield, M. (2000). The zebrafish book. A guide for the laboratory use of zebrafish (Danio rerio). 4th ed., Univ. of Oregon Press, Eugene.



**Tabla suplementaria 5. Primers para *vasa:EGFP***

| Primers   | Secuencia                             |
|-----------|---------------------------------------|
| EGFP3-F1: | 5' - ACC ACA TGA AGC AGC ACG ACT - 3' |
| EGFP2-R1: | 5' - CTT CTC GTT GGG GTC TTT GCG - 3' |

### Tabla suplementaria 6. Mix PCR para una reacción

|                   | Volumen ( $\mu$ l) |
|-------------------|--------------------|
| Buffer            | 1,0                |
| MgCl <sub>2</sub> | 0,6                |
| dNTPs             | 1                  |
| Primer Forward    | 0,2                |
| Primer Reverse    | 0,2                |
| Polimerasa        | 0,05               |
| dH <sub>2</sub> O | 6,95               |

### Tabla suplementaria 7. Composición gel agarosa

---

|                        |
|------------------------|
| Gel Agarosa            |
| 50 ml TBE 1x           |
| 0,50 g agarosa         |
| 0,5 $\mu$ l Syber-Safe |

---

**Tabla suplementaria 8. Parámetros usados para la captura de imágenes de fluorescencia**

---

|            |             |
|------------|-------------|
| Rojo       | 2,25        |
| Verde      | 8,17        |
| Azul       | 3,1         |
| Gamma      | 1,55        |
| Saturación | 0,1         |
| Tiempo     | 70 ms - 7 s |

---

## Tabla suplementaria 9. Protocolo extracción ARN

---

### Protocolo extracción ARN

---

1. Depositar las muestras sobre hielo y añadir 250µL de Trizol (1ml de Trizol por cada 100mg de tejido).
  2. Homogenizar con la ayuda de un pistilo. Añadir 250µL de Trizol para alcanzar los 500µL totales.
  3. Incubar a temperatura ambiente durante 5-10 minutos para permitir la disociación completa de complejos de nucleoproteínas.
  4. Añadir 100µL de cloroformo (200µL/1ml Trizol) en cada uno de los tubos que contiene las muestras. Realizar un vórtex de la muestra durante 15 segundos.
  5. Centrifugar a máxima velocidad (13700 rpm) durante 15 minutos a 4°C.
  6. Transferir la fase acuosa resultante de la centrifugación (upper phase) a un tubo nuevo.
  7. Precipitar el ARN contenido en la fase acuosa a partir de la adición de 250µL de 2-isopropanol (0,5ml/1ml trizol) y mezclarlo con la ayuda de un vórtex.
  8. Incubar las muestras a temperatura ambiente durante 10 minutos.
  9. Centrifugar a máxima velocidad 10 minutos a 4°C.
  10. Remover el sobrenadante y limpiar los pellets resultantes de la centrifugación con 75% etanol previamente almacenado a -20°C (1ml EtOH/1ml trizol).
  11. Vórtex de las muestras.
  12. Centrifugar a 7500rpm durante 5 minutos a 4°C.
  13. Remover el sobrenadante y secar el pellet de ARN. No secarlo demasiado ya que después puede ser complicado resuspenderlo y disolverlo.
  14. Resuspender el pellet en 20-30µL de agua DEPC (dependiendo del tamaño del pellet)
  15. Dejar reposar las muestras 2 minutos a 55°C.
  16. Usar 1,5µL del ARN extraído para comprobar su concentración en el nanodrop.
  17. Almacenar las muestras de ARN a una temperatura de -80°C.
-

Tabla suplementaria 10. Primers qRT-PCR

| Especie | Gen            | F/R | Secuencia                         | ntds | Primer dimers? | Compleme ntario? | Ta              | Tamaño inserto |
|---------|----------------|-----|-----------------------------------|------|----------------|------------------|-----------------|----------------|
| Zf      | <i>dhmt1</i>   | F   | TCTTCAGCACTACAGTTAC<br>CAATCCT    | 26   | No             | No               | 56,9-<br>60,9°C | 90             |
| Zf      | <i>dhmt1</i>   | R   | CGTGCACATTCCTGACA<br>CT           | 20   | No             | No               | 56,9-<br>60,9°C | 90             |
| Zf      | <i>dhmt3</i>   | F   | AAGATTTAGGCGTCGGTT<br>TCG         | 21   | No             | No               | 58,0-<br>61,7°C | 88             |
| Zf      | <i>dhmt3</i>   | R   | GTGTCACCCCCTTCAATTA<br>ACTG       | 23   | No             | No               | 58,0-<br>61,7°C | 88             |
| Zf      | <i>efa GBR</i> | F   | CTGGAGGCCAGCTCAAAC<br>AT          | 20   | No             | No               | 57,6-<br>61,3°C | 87             |
| Zf      | <i>efa GBR</i> | R   | ATCAAGAAGAGTAGTACC<br>GCTAGCATTAC | 29   | No             | No               | 57,6-<br>61,3°C | 87             |

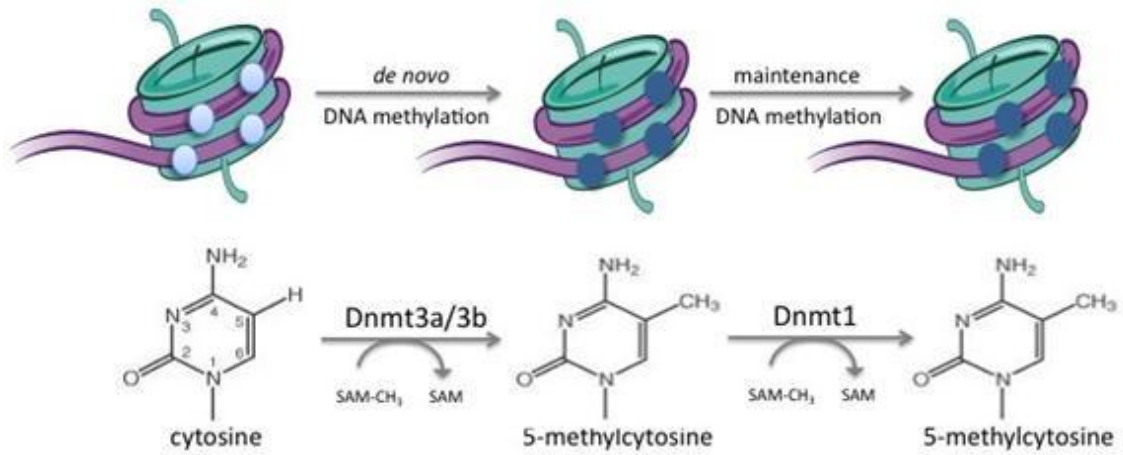
### Tabla suplementaria 11. Mix qRT-PCR

---

|                                       |
|---------------------------------------|
| Master mix muestra qRT-PCR            |
| ADN 1 $\mu$ l                         |
| SYBR GREEN 5 $\mu$ l                  |
| Primer Forward 10 $\mu$ M 0.5 $\mu$ l |
| Primer Reverse 10 $\mu$ M 0.5 $\mu$ l |
| MQ H <sub>2</sub> O 3 $\mu$ l         |

---

## Figuras suplementarias



**Figura supl. 1.** Mecanismos de metilación del ADN. La figura muestra los dos tipos de *dnmts*: *dnmt1*, encargada del mantenimiento de la metilación, y las *dnmt3a/3b*, responsables de la metilación *de novo*.

\*Imagen obtenida de Harvard Department of Stem cell & Regenerative Biology



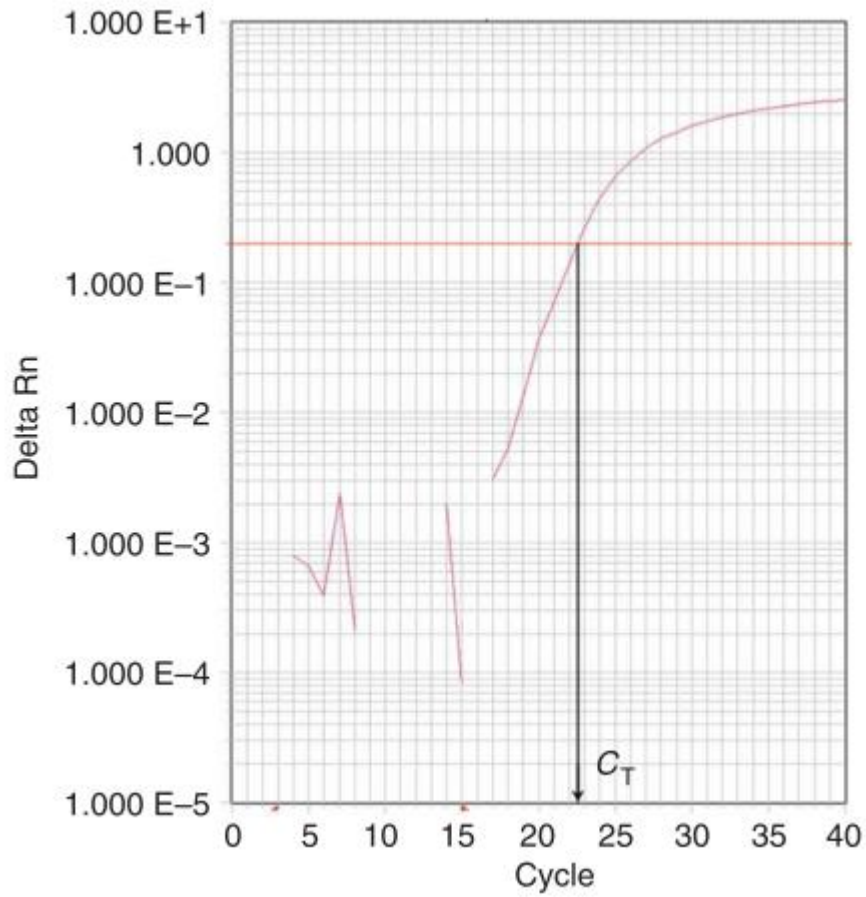


**Figura supl. 2.** Peces cebra fotografiados a diferentes edades, se muestra tanto un individuo adulto, de aproximadamente 4 centímetros, como embriones en diferentes momentos de su desarrollo (Kimmel et al., 1995; Miana and Izpis, 2007).



**Figura supl 3.** Réplica de los racks usados para la cría de los peces cebra en el GBR. Se observa el proceso completo de filtrado del agua que recircula por los conductos para proporcionar agua a las peceras que contienen los individuos.

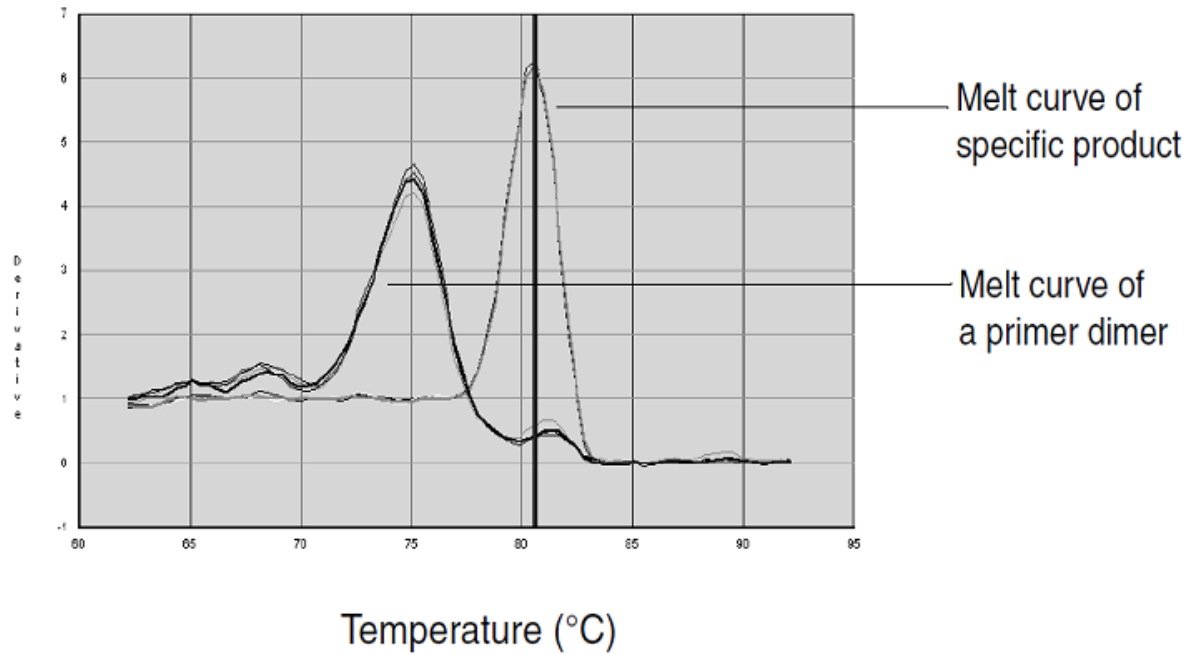
\*Imagen obtenida de Aquaneering Incorporated.



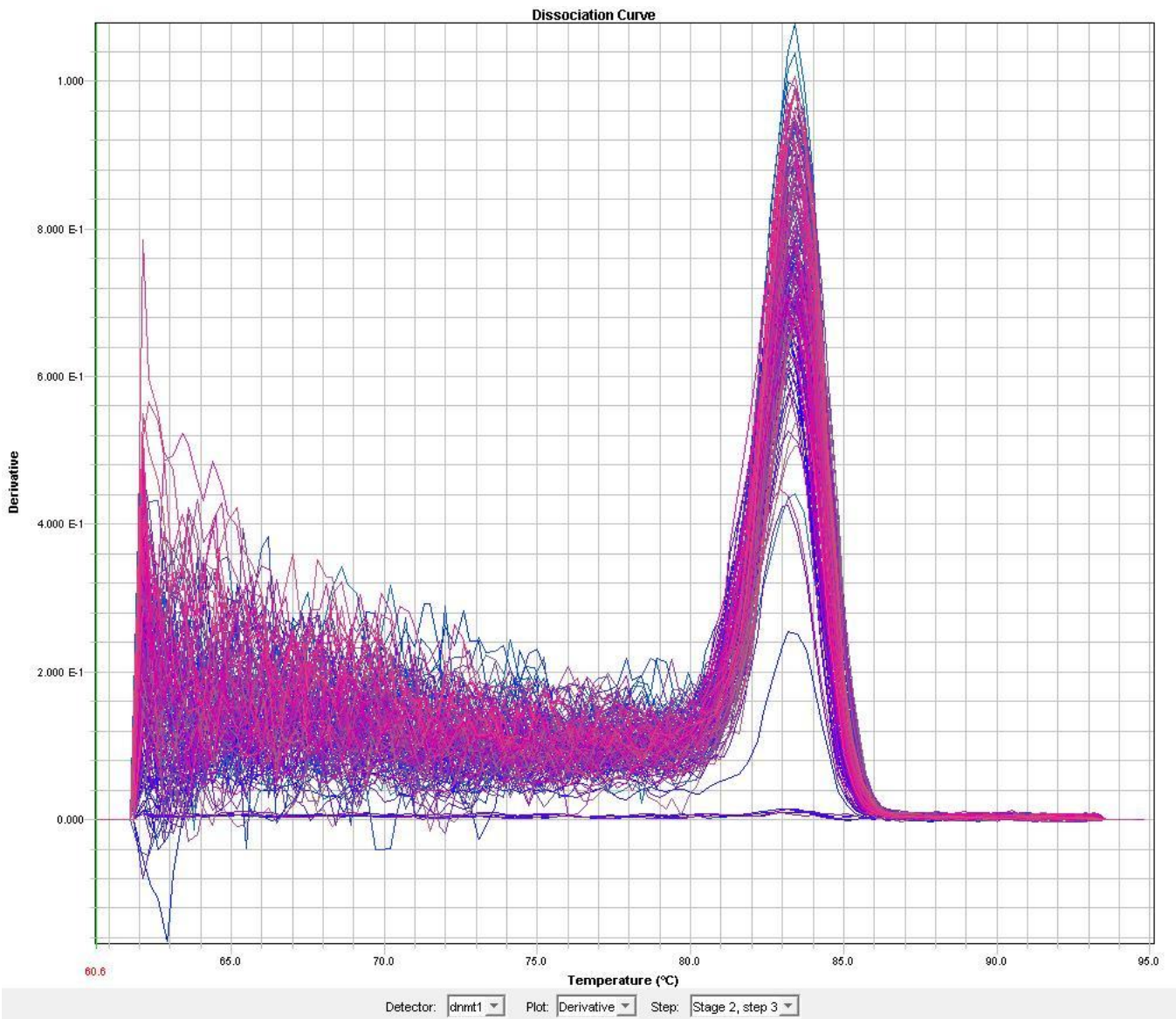
**Figura supl. 4.** Cálculo de la  $C_T$  en una qRT-PCR. En este caso la PCR estaba programada para tener 40 ciclos. El punto en el que la curva corta con el umbral (threshold), mostrado como una línea horizontal roja, es el valor de la  $C_T$ . En este caso la  $C_T$  es de 22,5 (Schmittgen and Livak, 2008).



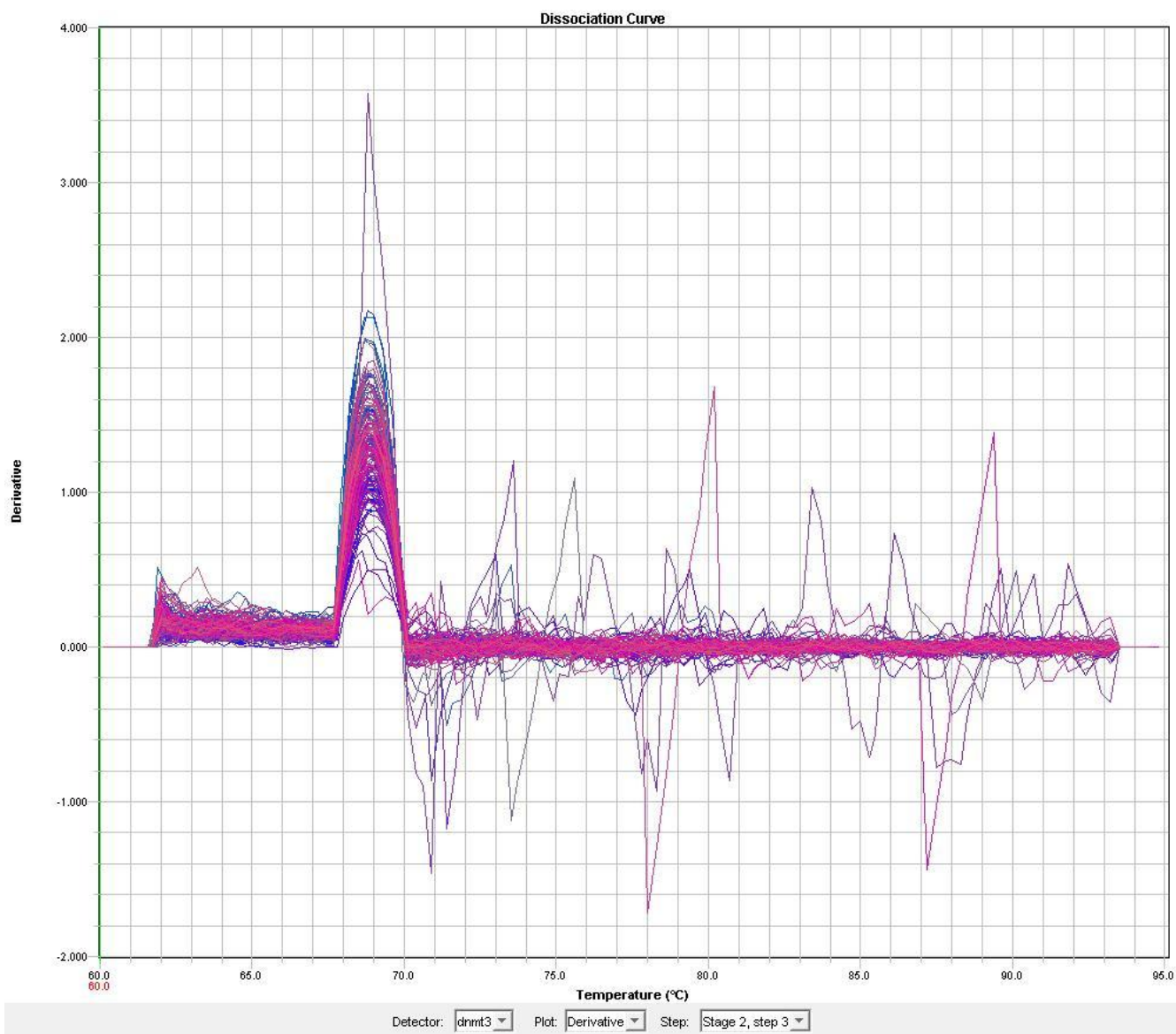
**Figura supl. 5. Placa qRT-PCR 384 pocillos.** Las placas de 384 pocillos han sido usadas para llevar a cabo las PCR en tiempo real. En concreto se han elaborado dos placas, una con la *dnmt1* y su gen control endógeno, y otra para la *dnmt3* con su gen endógeno control. El gen empleado como control endógeno es *efa*. Estas placas están realizadas en plástico y están libres de DNasa, RNasa y otros tipos de contaminación. Tras depositar las muestras junto con el mix de reacción, la placa es tapada con una lámina de cierre. Esta lámina protege las muestras de posibles contaminaciones, sin embargo, tiene que tener una alta transparencia para no dificultar la lectura de los valores de fluorescencia durante el procedimiento de amplificación.



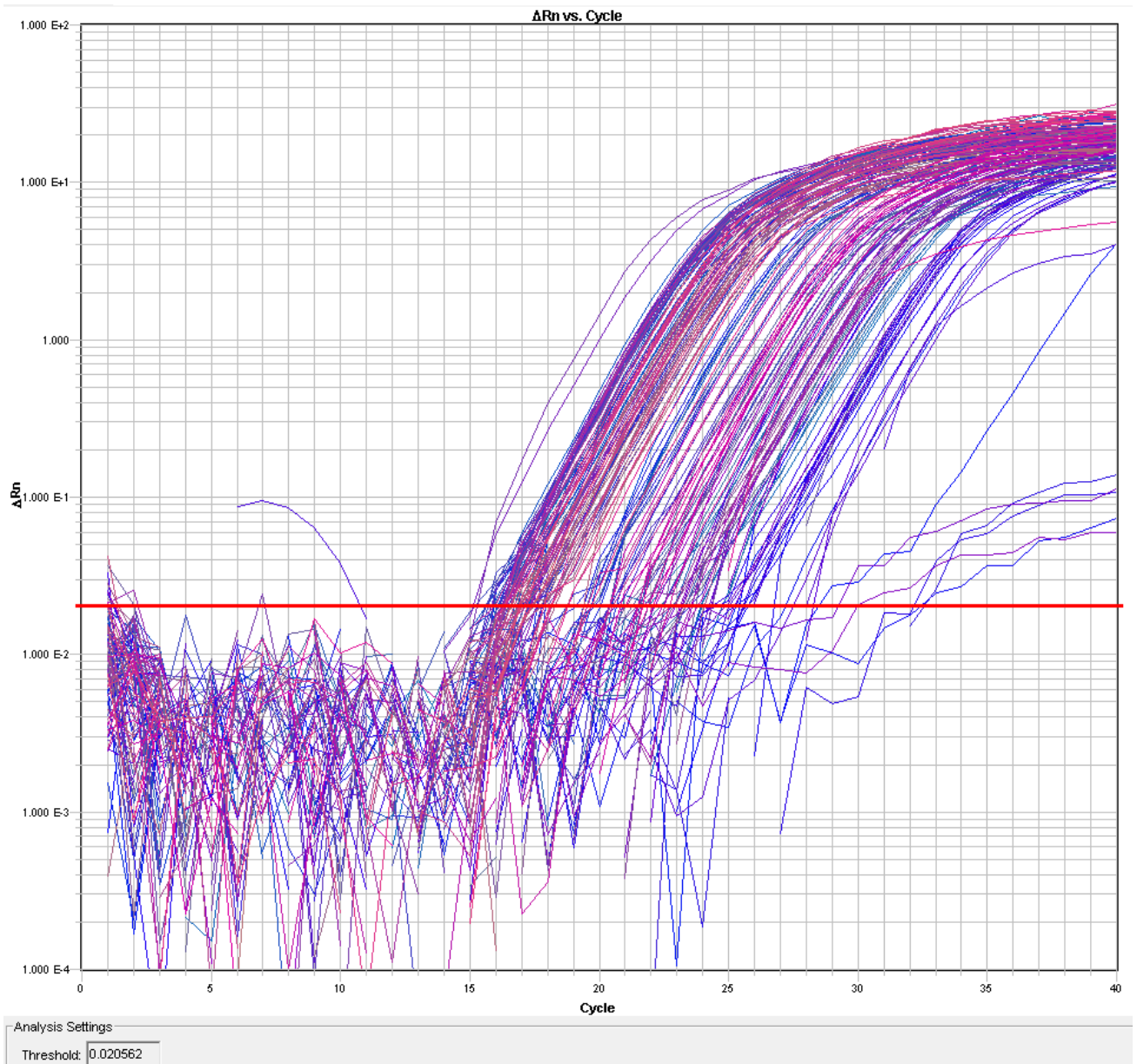
**Figura supl. 6. Ejemplo de una curva de disociación.** Se observa como existen dos picos marcados consecutivos el uno del otro. El primer pico corresponde a una amplificación inespecífica, se han formado dímeros de los cebadores utilizados, no es nuestro amplicon de interés. El segundo pico corresponde al amplicon específico a partir de los primers utilizados. Gracias a la curva de disociación podemos descartar errores producidos por amplificaciones inespecíficas, como la que se observa en este caso.



**Figura supl 7. Curva disociación *dnmt1* obtenida para las muestras estudiadas.** En la imagen podemos observar como alrededor de los 90°C aparece un pico claro. Este pico indica el amplicon que se ha producido específico para nuestros cebadores. Las señales anteriores al pico pronunciado son ruido de fondo. Al tener solo un pico pronunciado podemos decir que no se han producido amplificaciones inespecíficas a causa de primer-dimers.

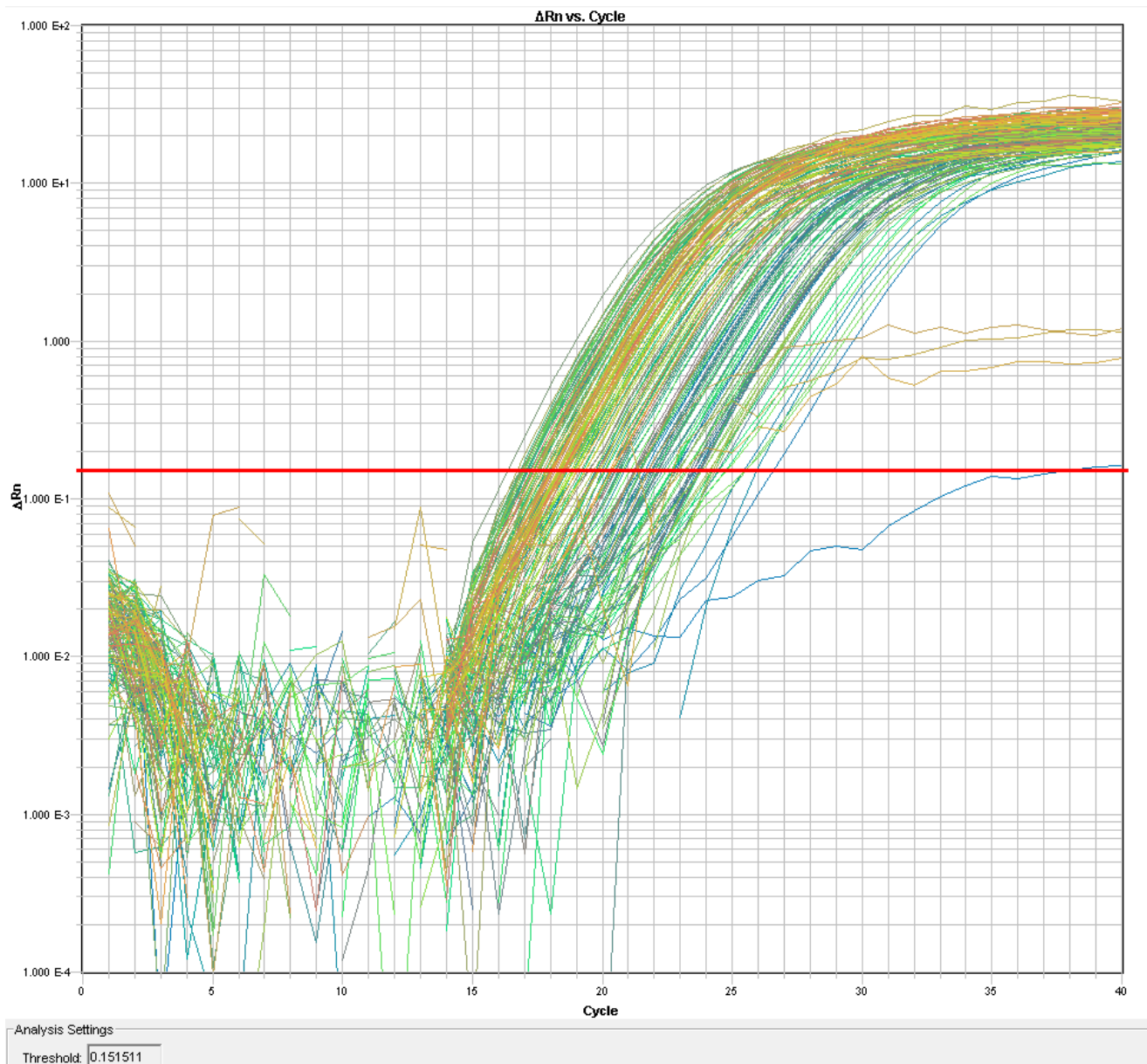


**Figura supl. 8. Curva disociación *dnmt3* obtenida para las muestras estudiadas.** Al igual que en la curva de disociación para la *dnmt1*, en ésta observamos un único pico pronunciado. Por lo tanto, no se han producido amplificaciones inespecíficas y únicamente se ha amplificado nuestro producto específico. Si queremos comparar ambas curvas de disociación debemos tener en cuenta las diferencias en la escala del eje de ordenadas. Tras el pico aparecen algunas muestras que contienen diversos picos a lo largo de la curva, estas muestras fueron consideradas atípicas y descartadas para el posterior análisis.

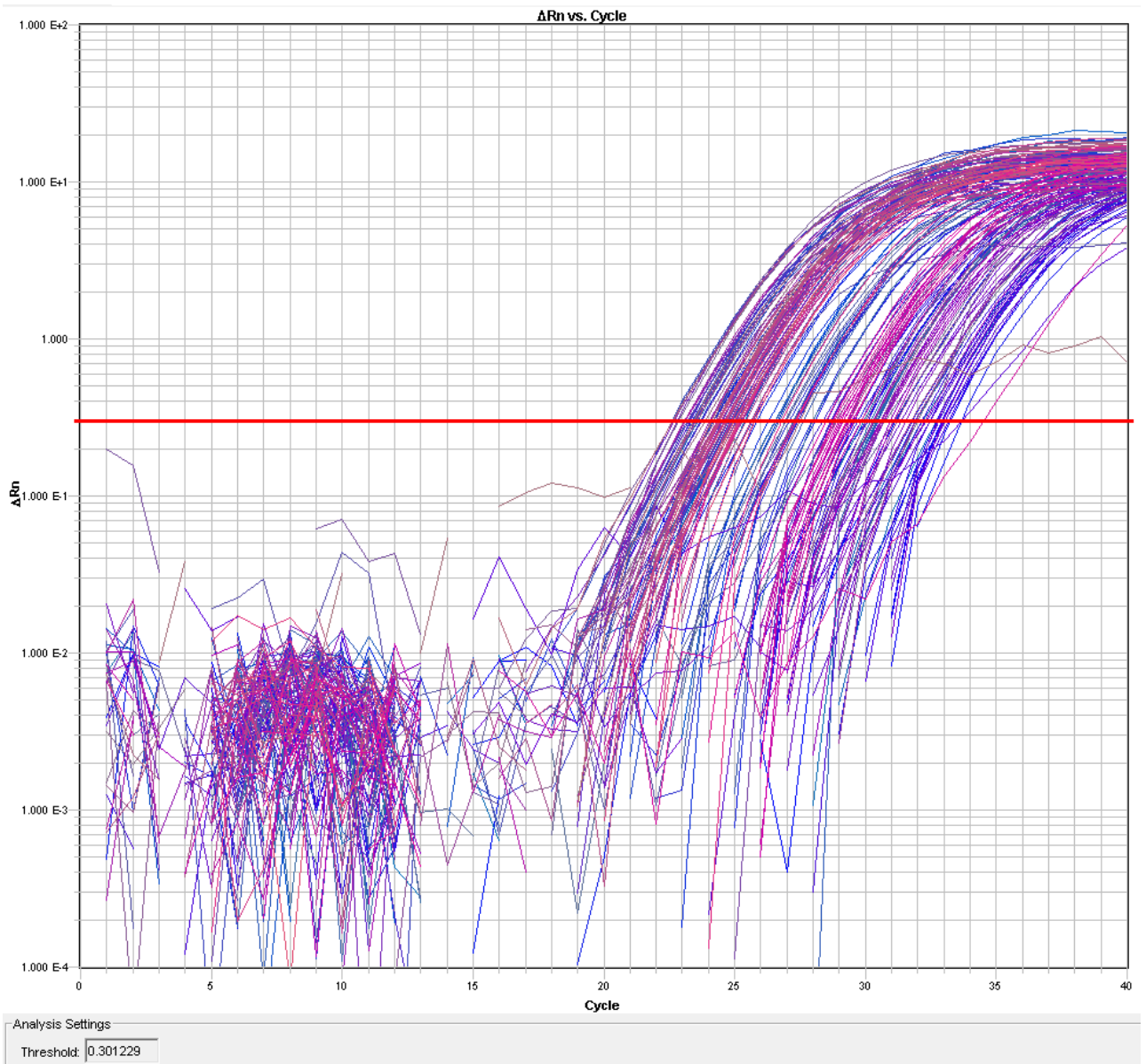


**Figura supl. 9. qRT-PCR de *dnmt1*.** La intensidad de fluorescencia de las muestras tiene como valor el Rn. El valor Rn corresponde con la señal normalizada de la intensidad de la fluorescencia producida por la muestra.  $\Delta Rn$  se comprende como el incremento de la señal de fluorescencia en cada punto. Los valores de  $\Delta Rn$  se muestran en el eje de ordenadas mientras que en el eje de abscisas se muestra el número de ciclo. Las  $C_T$  de cada muestra corresponden con el valor de  $\Delta Rn$  en el momento de cruzar el umbral, que en este caso es 0,0205.

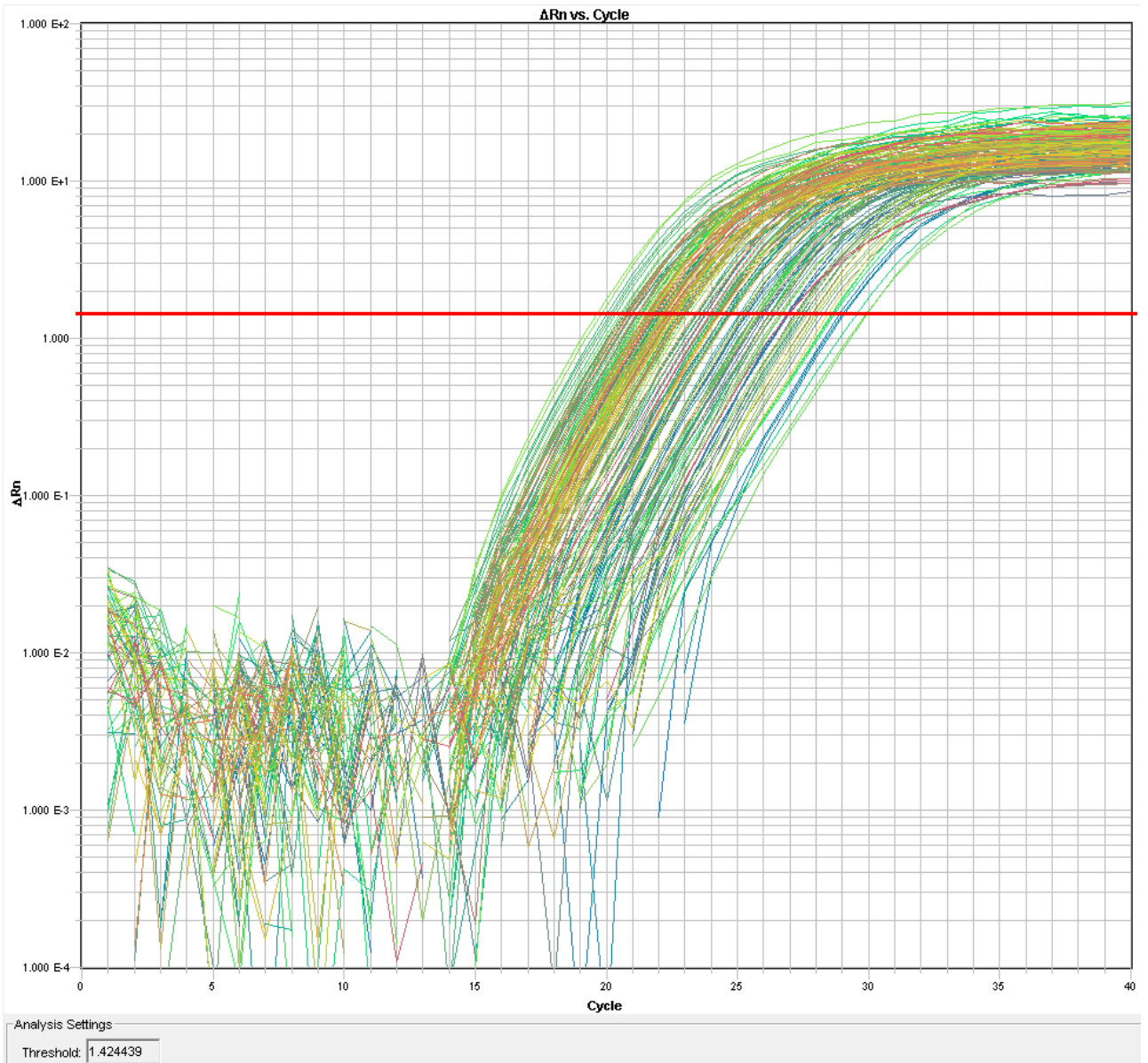




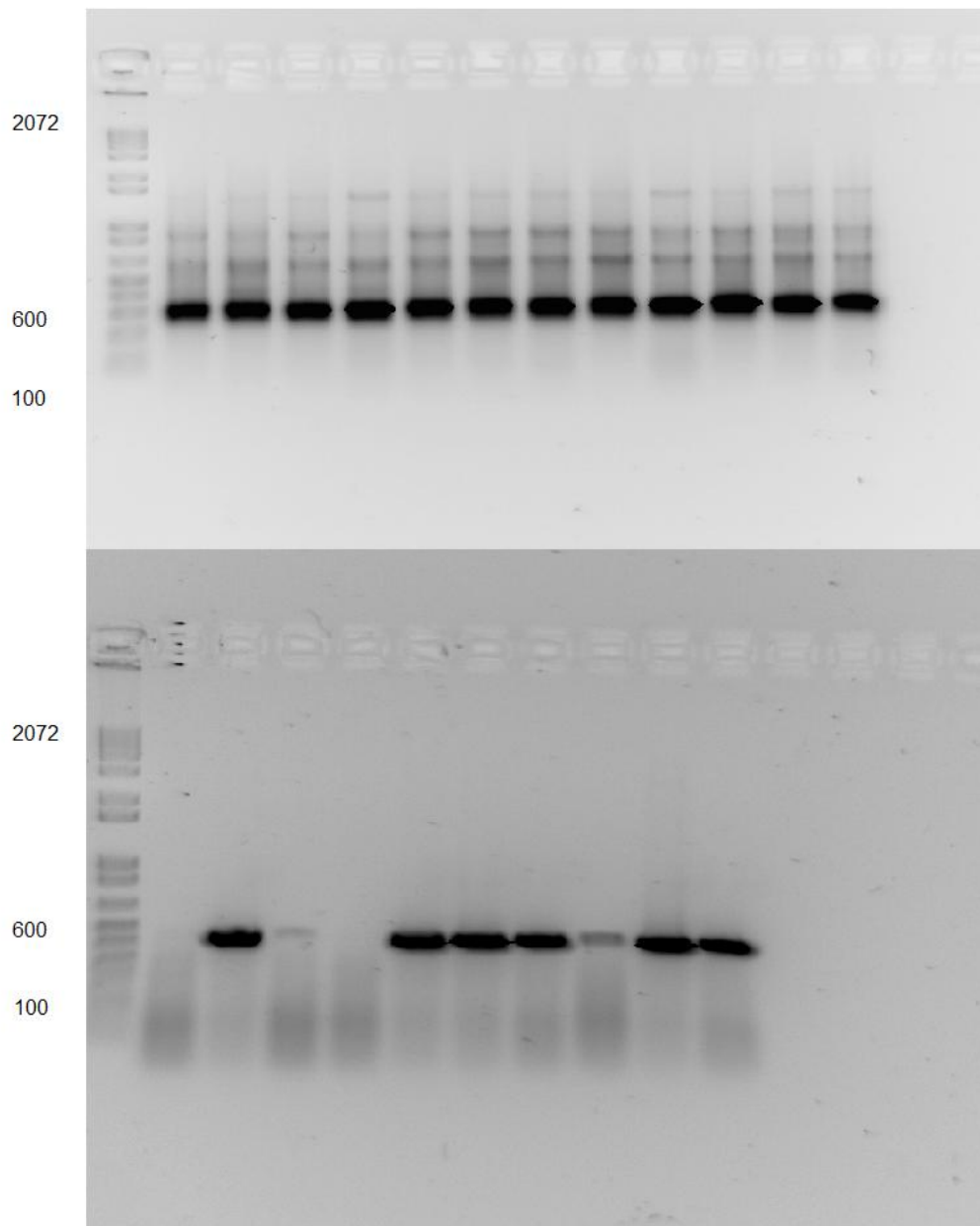
**Figura supl. 10. qRT-PCR de *efa*, gen control en el estudio de la *dnmt1*.** El gen analizado en conjunto con la *dnmt1* para llevar a cabo la función de control es el gen *efa*. La intensidad de fluorescencia de las muestras tiene como valor el Rn. El valor Rn corresponde con la señal normalizada de la intensidad de la fluorescencia producida por la muestra.  $\Delta Rn$  se comprende como el incremento de la señal de fluorescencia en cada punto. Los valores de  $\Delta Rn$  se muestran en el eje de ordenadas mientras que en el eje de abscisas se muestra el número de ciclo. Las  $C_T$  de cada muestra corresponden con el valor de  $\Delta Rn$  en el momento de cruzar el umbral, que en este caso es 0,151.



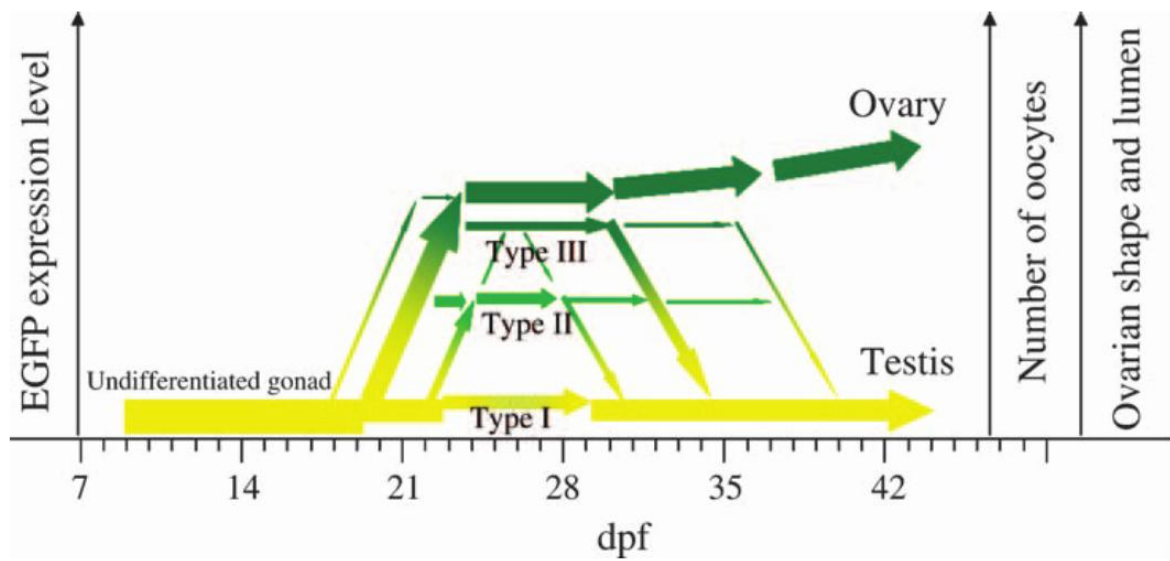
**Figura supl. 11. qRT-PCR de *dnmt3*.** La intensidad de fluorescencia de las muestras tiene como valor el Rn. El valor Rn corresponde con la señal normalizada de la intensidad de la fluorescencia producida por la muestra.  $\Delta Rn$  se comprende como el incremento de la señal de fluorescencia en cada punto. Los valores de  $\Delta Rn$  se muestran en el eje de ordenadas mientras que en el eje de abscisas se muestra el número de ciclo. Las  $C_T$  de cada muestra corresponden con el valor de  $\Delta Rn$  en el momento de cruzar el umbral, que en este caso es 0,301.



**Figura supl. 12. qRT-PCR de *efa*, gen control en el estudio de la *dnmt3*.** El gen analizado en conjunto con la *dnmt3* para llevar a cabo la función de control es el gen *efa*. La intensidad de fluorescencia de las muestras tiene como valor el Rn. El valor Rn corresponde con la señal normalizada de la intensidad de la fluorescencia producida por la muestra.  $\Delta Rn$  se comprende como el incremento de la señal de fluorescencia en cada punto. Los valores de  $\Delta Rn$  se muestran en el eje de ordenadas mientras que en el eje de abscisas se muestra el número de ciclo. Las  $C_T$  de cada muestra corresponden con el valor de  $\Delta Rn$  en el momento de cruzar el umbral, que en este caso es 1,424.



**Figura supl. 13.** Gel de agarosa con muestras amplificadas del gen *vasa:EGFP* por PCR convencional. En la parte superior se analizaron 12 larvas que corresponden a 12 bandas, el primer carril contiene el ladder. El obtener una banda por cada larva analizada implica que la hembra que ha producido esta puesta es homocigota. En la parte inferior sin embargo, se muestra como en algunos de los carriles no se aprecia ninguna banda, esto implica que la hembra es heterocigota, ya que de su descendencia sólo algunas de las larvas presentan el alelo transgénico.



**Figura supl. 14.** Esta gráfica muestra la evolución en los niveles de expresión de EGFP que se pueden producir durante el desarrollo de los peces cebra tanto en machos como en hembras. Las hembras siempre siguen un patrón similar, como se puede observar en la imagen. Los machos, sin embargo, se pueden diferenciar en tres tipos según como se comporten sus niveles de expresión (Wang et al., 2007).