

Contenido

Contenido	i
Dedicatoria	v
Agradecimientos	vi
Índice de Tablas	viii
Índice de Figuras	ix
Resumen	xi
Abstract	xii
1 INTRODUCCIÓN	1
2 ANTECEDENTES	3
2.1 Expresión génica	3
2.2 La regulación de la expresión génica	3
2.3 Despliegue Diferencial (DD)	4
2.4 Importancia de Evaluar la Expresión de Genes en Estudios Toxicológicos	6
2.5 Uso del DD en estudios ecotoxicológicos	7
2.6 Fundamento general del DD	8
2.7 Importancia del benzo[a]pireno y el Lindano	9
3 JUSTIFICACIÓN	12
4 HIPÓTESIS	13
5 OBJETIVOS	13
5.1 Objetivo General	13
5.2 Objetivos Específicos	13
6 MATERIALES Y MÉTODOS	15
6.1 Selección y Aclimatación de Peces	15
6.2 Reactivos y compuestos químicos utilizados	15
6.3 Tratamiento con Lindano y benzo[a]pireno	16
6.4 Procedimiento para el DD	18
6.4.1 Extracción del ARN total en Hígado de Peces	19
6.4.2 Análisis de integridad y pureza mediante electroforesis y espectrofotometría.	20
6.4.3 Cuantificación y verificación de la integridad del ARN total	20
6.4.4 Síntesis de ADNc: Transcripción reversa del ARN tratado con DNasa I	21
6.4.5 Amplificación de las cadenas de ADNc por la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) utilizando los cebadores del DD	22

6.4.6	Preparación de gel desnaturalizante de poliacrilamida	24
6.4.7	Análisis y reamplificación por PCR de las bandas diferenciales	24
6.4.8	Ligación de los ADNc en el vector pGEM (PROMEGA) y transformación de células competentes de <i>Escherichia coli</i> de la cepa DH-5 α	25
6.4.9	Verificación de la presencia del inserto en el plásmido	26
6.4.10	Digestión de los plásmidos con la enzima <i>Eco</i> RI	27
6.4.11	Secuenciación y análisis de las secuencias clonadas	27
6.5	Verificación de la expresión diferencial por medio de RT-PCR Cuantitativo	28
6.5.1	Diseño de los cebadores para los ensayos del QRT-PCR	28
6.5.2	Amplificación del ADNc por RT-PCR cuantitativo utilizando los cebadores diseñados y el marcador SYBR Green	28
6.5.2.1	Cuantificación relativa de los datos de PCR por el método C_T , 2^{-ddCT}	29
6.5.3	Amplificación del ADNc por RT-PCR punto final para el tratamiento con benzo[a]pireno	30
6.6	Análisis Estadístico	31
7	RESULTADOS	32
7.1	Integridad y pureza del aislamiento de ARN total	32
7.2	Análisis de la expresión génica de los tratamientos con Lindano y benzo[a]pireno	33
7.2.1	DD del tratamiento con Lindano	34
7.2.1.1	Patrones de expresión diferencial de los tratamientos con Lindano	34
7.2.1.2	Clonación y secuenciación de los ADNc modificados por los tratamientos con el Lindano y el benzo[a]pireno	36
7.2.2	Genes identificados en respuesta al tratamiento con Lindano	39
7.2.3	Efectos del Lindano sobre la expresión genética en <i>Oreochromis niloticus</i>	46
7.2.3.1	Expresión diferencial de los genes inducidos en respuesta a los tratamientos con Lindano	47
7.2.4	DD del tratamiento con benzo[a]pireno	49
7.2.4.1	Patrones de expresión diferencial del tratamiento con benzo[a]pireno	49
7.2.4.2	Clonación y secuenciación de los ADNc modificados por el tratamiento con benzo[a]pireno	51

7.2.5	Genes identificados en respuesta al tratamiento con benzo[a]pireno	53
7.2.6	Efectos del benzo[a]pireno sobre la expresión genética en <i>Oreochromis niloticus</i>	60
7.2.6.1	Expresión diferencial de los genes inducidos en respuesta a los tratamientos con benzo[a]pireno	60
8	DISCUSIÓN	64
9	CONCLUSIONES	73
10	PERSPECTIVAS	74
11	REFERENCIAS	75
12	ANEXO I: Protocolos y procedimientos	98
13	ANEXO II: Secuencia de los genes identificados en los tratamientos de Lindano y benzo[a]pireno en las bases de datos del GenBank	125
14	ANEXO III Artículo: Colli-Dula, R., Zuñiga-Aguilar, J.J., Albores-Medina, A., Zapata-Perez, O. 2009. Identification of genes expressed as a result of lindane exposure in <i>Oreochromis niloticus</i> using differential display Ecotoxicol Environ Saf. 72; 1406-12	160
15	ANEXO IV: Carta de autorización para la realización de los experimentos expedida por el Programa Institucional para el Cuidado y Manipulación de Animales del Laboratorio (PICUAL-CINVESTAV, 2002), de acuerdo a la Norma Oficial mexicana (NOM-062-ZOO-1999)	168