

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 658 267**

51 Int. Cl.:

**A01K 67/027** (2006.01)

**C12N 15/85** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **21.03.2011** **E 11305315 (1)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **29.11.2017** **EP 2368430**

54 Título: **Pez transgénico y usos del mismo**

30 Prioridad:

**24.03.2010 US 730956**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:

**09.03.2018**

73 Titular/es:

**CITY UNIVERSITY OF HONG KONG (100.0%)  
Tat Chee Avenue  
Kowloon, Hong Kong, CN**

72 Inventor/es:

**CHENG, SHUK HAN y  
CHEN, XUE PING**

74 Agente/Representante:

**ARIAS SANZ, Juan**

**ES 2 658 267 T3**

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín Europeo de Patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre Concesión de Patentes Europeas).

## DESCRIPCIÓN

Pez transgénico y usos del mismo

**Campo de la invención**

5 La presente divulgación se refiere en general a un pez transgénico y a su uso en, entre otros, la detección de compuestos estrogénicos y antiestrogénicos, la monitorización de actividad similar a estrógenos en el entorno, y la elucidación de la regeneración hepática.

**Antecedentes de la invención**

10 Se encuentra que muchas sustancias químicas que se han considerado seguras tienen la actividad de alterar el sistema endocrino y producir efectos adversos en organismos. La amplia presencia de estos tipos de compuestos químicos en el entorno ha suscitado la atención y la preocupación mundiales. Debido a los crecientes informes de los efectos estrogénicos de estas sustancias sobre organismos masculinos, la mayoría de los esfuerzos de investigación se han dirigido a agentes de alteración endocrinos similares a estrógenos.

15 Es importante tener un método rápido, sensible, económico y cuantificable para identificar sustancias químicas que pueden imitar estrógenos o interferir con el sistema endocrino estrogénico, y que pueden ayudar a evaluar los efectos biológicos de estas sustancias químicas sobre organismos. De los métodos disponibles actuales, se han investigado los ensayos con líneas celulares *in vitro* y los ensayos con peces transgénicos *in vivo*. Los ensayos con líneas celulares pueden ser rápidos y sensibles, pero no pueden proporcionar información sobre efectos toxicodinámicos y toxicocinéticos en sustancias de prueba sobre organismos. Actualmente, los ensayos con peces transgénicos pueden superar algunas de las deficiencias de los ensayos con líneas celulares. Sin embargo, los  
20 ensayos con peces transgénicos actuales son limitados porque no pueden usarse para monitorizar agentes de alteración endocrinos en especies de agua dulce, y no pueden usarse en un entorno marino.

**Sumario de la invención**

25 Un aspecto de la presente invención se refiere a un casete de expresión que incluye: (i) una secuencia de nucleótidos indicadora que codifica para una proteína indicadora; (ii) una secuencia de nucleótidos reguladora en 5' que responde a estrógenos aislada de un pez medaka de agua salobre de la especie *Oryzias melastigma*, en la que la secuencia de nucleótidos reguladora está unida operativamente en 5' a la secuencia de nucleótidos indicadora para inducir la expresión de la proteína indicadora en presencia de estrógenos o un compuesto similar a estrógenos; y (iii) una región reguladora en 3' unida operativamente en 3' a la secuencia de nucleótidos indicadora, en el que la  
30 secuencia de nucleótidos reguladora en 5' que responde a estrógenos se selecciona del grupo que consiste en SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3 y SEQ ID NO: 4; y la región reguladora en 3' comprende la secuencia de nucleótidos de SEQ ID NO: 5. Ventajosamente, la secuencia de nucleótidos reguladora en 5' que responde a estrógenos se selecciona del grupo que consiste en SEQ ID NO: 2 y SEQ ID NO: 3, y la región reguladora en 3' comprende la secuencia de nucleótidos de SEQ ID NO: 5. Según una realización preferida, la proteína indicadora es una proteína autofluorescente, seleccionada ventajosamente del grupo que consiste en una proteína fluorescente verde  
35 potenciada (EGFP), una proteína fluorescente verde (GFP), una proteína fluorescente azul (BFP), una proteína fluorescente amarilla (YFP) y una proteína fluorescente roja (RFP).

Otro aspecto de la presente invención se refiere a un vector de transformación que incluye un casete de expresión de la presente invención.

40 Otro aspecto de la presente invención se refiere a una célula huésped transducida con un casete de expresión de la presente invención.

Otro aspecto de la presente invención se refiere a una célula transgénica de un animal acuático, donde la célula transgénica incluye al menos un casete de expresión de la presente invención. Ventajosamente, el animal acuático se selecciona del grupo que consiste en una especie *Oryzias* y una especie *Danio*, seleccionada más ventajosamente del grupo que consiste en *Oryzias melastigma* y *Oryzias latipes*.

45 Otro aspecto de la presente invención se refiere a un pez medaka de agua salobre transgénico de la especie *Oryzias melastigma* que incluye al menos un casete de expresión de la presente invención. El pez transgénico presenta una marca observable cuando se expone a un medio líquido que contiene un estrógeno o un compuesto similar a estrógeno. La marca observable incluye la proteína indicadora expresada por el al menos un casete de expresión. Ventajosamente, la marca observable es visible *in vivo*. Según un aspecto, el pez está en una fase de desarrollo seleccionada del grupo que consiste en una fase embrionaria, una fase larvaria y una fase adulta. Según  
50 otro aspecto, el pez es un adulto macho.

Otro aspecto de la presente divulgación se refiere a un método de preparación de un pez medaka de agua salobre transgénico de la especie *Oryzias melastigma* para su uso en la detección de la presencia de un estrógeno o compuesto similar a estrógeno en un medio líquido. Este método implica transformar un pez no transgénico con el  
55 casete de expresión de la presente invención, produciendo de ese modo un pez transgénico que incluye al menos

uno de los casetes de expresión.

También se da a conocer un método de examen de un medio líquido para una sustancia estrogénica.

5 También se da a conocer un método de examen de un medio líquido para una sustancia estrogénica. Este método implica exponer un pez transgénico de la presente invención a un medio líquido que va a someterse a prueba (es decir, que va a someterse a prueba para determinar la presencia de una sustancia estrogénica). Tras esta etapa de exposición, el método implica entonces determinar si el pez transgénico presenta o no una marca observable producida por la expresión inducida del gen indicador (contenido en el pez transgénico). La presencia de la marca observable indica que el medio líquido contiene una sustancia estrogénica.

10 También se da a conocer un método de examen para un compuesto que tiene actividad antiestrogénica. Este método implica las etapas siguientes: (a) proporcionar un primer pez transgénico y un segundo pez transgénico de la presente invención, donde los peces transgénicos primero y segundo son de la misma especie y están sustancialmente en la misma fase de desarrollo; (b) exponer el primer pez transgénico a un primer medio líquido, donde el primer medio líquido incluye un estrógeno o compuesto similar a estrógeno; (c) exponer el segundo pez transgénico a un segundo medio líquido, donde el segundo medio líquido incluye el primer medio líquido y un compuesto de prueba; y (d) comparar la intensidad cuantificada de cualquier marca observable presentada por el primer pez transgénico con la intensidad cuantificada de cualquier marca observable presentada por el segundo pez transgénico, donde una disminución en la intensidad cuantificada de la marca observable en el segundo pez transgénico en comparación con la del primer pez transgénico indica que el compuesto de prueba tiene actividad antiestrogénica.

20 También se da a conocer un método para investigar el efecto de un compuesto estrogénico sobre la regeneración hepática. En general, este método implica realizar una hepatectomía parcial en un pez transgénico adulto de la presente invención, donde la hepatectomía parcial es eficaz para retirar una parte del hígado del pez transgénico; exponer el pez transgénico a un medio líquido de prueba que contiene un compuesto estrogénico de prueba; y analizar el hígado del pez transgénico para detectar cualquier regeneración de tejido hepático.

25 También se da a conocer un método para investigar el efecto de diferentes compuestos estrogénicos sobre la regeneración hepática, en contraposición a investigar un solo compuesto estrogénico. En general, este método implica las etapas siguientes: (a) proporcionar un primer pez transgénico y un segundo pez transgénico de la presente invención, donde los peces transgénicos primero y segundo son adultos de la misma especie; (b) exponer el primer pez transgénico a un primer medio líquido que incluye una primera disolución de compuesto estrogénico de prueba; (c) exponer el segundo pez transgénico a un segundo medio líquido que comprende una segunda disolución de compuesto estrogénico de prueba; (d) cuantificar la intensidad de cualquier marca observable presentada por el primer pez transgénico y el segundo pez transgénico; (e) realizar una hepatectomía parcial en los peces transgénicos primero y segundo, donde la hepatectomía parcial es eficaz para retirar una parte del hígado de los peces transgénicos primero y segundo; (f) repetir las etapas (b) a (d) de este método; y (g) analizar el hígado de los peces transgénicos primero y segundo para comparar los efectos de los compuestos estrogénicos contenidos en el primer medio líquido y el segundo medio líquido sobre cualquier regeneración de tejido hepático.

### Breve descripción de los dibujos

El archivo de patente o solicitud contiene los dibujos siguientes:

40 La figura 1 representa la actividad promotora relativa de diferentes longitudes de la región en el sentido de 5' de omChgH representada por la frecuencia de una larva positiva para GFP derivada de embriones a los que se inyectan secuencias de ácido nucleico que incluyen el promotor de omChgH-EGFP (proteína de fluorescencia verde potenciada) en respuesta a 17β-estradiol.

45 La figura 2 representa los efectos de la señal de poliadenilación de ARNm de diferentes genes sobre la actividad promotora relativa del promotor de omChgH-EGFP de ácido nucleico representada por la frecuencia de larva positiva para GFP derivada de embriones a los que se inyecta ácido nucleico que comprende el promotor de omChgH-EGFP (proteína de fluorescencia verde potenciada) flanqueado por región flanqueante en 3' de olChgH, SV40 o omChgH en respuesta a 17β-estradiol.

50 Las figuras 3A-3G representan la expresión natural e inducida del transgén GFP en pez transgénico producida por la introducción de una secuencia de ácido nucleico que incluye el promotor del transgén de omChgH-EGFP. La expresión de GFP está restringida exclusivamente al hígado del pez hembra adulto (figura 3C), pero no al embrión (figura 3A), la larva (figura 3B) ni el pez macho (figura 3D). Las figuras 3E-3G muestran que la expresión del transgén GFP también puede inducirse en el hígado del embrión, la larva y el pez macho por 17β-estradiol.

La figura 4 representa un diagrama de flujo de una realización del uso de larvas de pez transgénico de la presente invención para analizar la actividad similar a estrógenos de una disolución de prueba.

55 La figura 5 representa la sensibilidad a estrógenos de larvas de pez transgénico de diversos días tras la fecundación.

La figura 6 es un gráfico que muestra que el pH oscila entre 5 y 9 no afecta a la respuesta de larvas de pez transgénico a 17β- estradiol.

La figura 7 es un gráfico que muestra que la salinidad que oscila entre 0 y 35 ppt no afecta a la respuesta de larvas de pez transgénico a 17β-estradiol.

- 5 La figura 8 representa un aumento de periodo de tiempo de la intensidad de señal de GFP en larvas transgénicas en respuesta a estrógenos.

La figura 9 representa una respuesta a la dosis de larvas de pez transgénico a 17β-estradiol.

La figura 10 representa la respuesta a la dosis de larvas de pez transgénico a la hormona sintética 17α- etinilestradiol.

- 10 La figura 11 representa la señal de GFP en hígado inducida por los fitoestrógenos genisteína, genistina, daidzeína y daidzina por separado y su combinación extraídos de leche de soja.

La figura 12 representa la señal de GFP en hígado inducida por los filtros UV BP-3 y 4-MBC por separado y en combinación. Larvas de pez transgénico de una realización de la presente invención se exponen a 4-MBC (5 μM), HMS (5 μM) y la combinación de estos dos compuestos mezclados a la mitad de sus concentraciones (2,5 μM). La  
15 La señal de GFP inducida por su mezcla es significativamente mayor que la de estos dos compuestos.

La figura 13 representa la señal de GFP en hígado inducida por 17β-estradiol solo o en combinación con filtros UV B-MDM, OMC u OD-PABA.

La figura 14 muestra que la señal de GFP en hígado inducida por 17β-estradiol puede aumentarse por HMS de manera dependiente de la dosis.

- 20 La figura 15 muestra que la señal de GFP en hígado inducida por 17β-estradiol puede disminuirse por el almizcle policíclico AHTN.

### Descripción detallada de la invención

En un aspecto, la presente invención se refiere a un pez medaka de agua salobre transgénico de la especie *Oryzias melastigma* que contiene un casete de expresión que incluye una secuencia de nucleótidos reguladora en 5' que responde a estrógenos aislada de un pez medaka, donde la secuencia de nucleótidos reguladora en 5' que responde a estrógenos está unida operativamente en 5' a una secuencia de nucleótidos indicadora, y una región reguladora en 3' unida operativamente en 3' a la secuencia de nucleótidos indicadora, en el que la secuencia de nucleótidos reguladora en 5' que responde a estrógenos se selecciona del grupo que consiste en SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3 y SEQ ID NO: 4; y la región reguladora en 3' comprende la secuencia de nucleótidos de SEQ ID NO: 5. Cuando el pez transgénico se expone a un medio líquido que contiene estrógenos o un compuesto similar a estrógenos, la secuencia de nucleótidos indicadora expresa una proteína indicadora correspondiente que puede detectarse *in vivo* o *in vitro*. El pez transgénico de la presente invención es útil para una variedad de aplicaciones, incluyendo, sin limitación, para su uso en la detección de compuestos estrogénicos y compuestos antiestrogénicos, la monitorización de actividad similar a estrógenos en el entorno, y la elucidación de la regeneración hepática.

- 35 El pez transgénico de la presente invención es de la especie *Oryzias melastigma* (nombre alternativo *Oryzias dancena*) (medaka marina o de agua salobre).

Con respecto al pez medaka de agua salobre (*Oryzias melastigma*), esta especie es una de muchas especies de medaka identificadas como pertenecientes al género *Oryzias* (exponiéndose algunas especies anteriormente en el presente documento). El pez medaka de agua salobre es natural de aguas costeras y aguas dulces en Pakistán, India, Birmania y Tailandia (K. Naruse, Fish Biol. L. Medaka 8:1-9 (1996)), y se desarrolla en aguas de salinidad variable que oscila entre 0 partes por mil (ppt) y hasta 35 ppt. Adicionalmente, este pez medaka de agua salobre tiene varias ventajas para el desarrollo transgénico, incluyendo: (1) tamaño pequeño (2-3 cm para el pez adulto); (2) tiempo de generación relativamente corto (2-3 meses); (3) sexo dimórfico (por ejemplo, las hembras tienen una superficie distal plana de la aleta anal, mientras que la de los machos es convexa debido a radios de la aleta más largos separados); (4) alta capacidad proliíca para reproducirse; (5) huevos y larvas translúcidos (hasta 15 días tras la fecundación), lo que facilita la colocación de las agujas de microinyección de ADN y la observación de los órganos internos; y (6) puede adaptarse a diversas técnicas transgénicas usadas para producir peces transgénicos de otra especie *Oryzias* (por ejemplo, *Oryzias latipes*).

- 50 En cuanto a la capacidad altamente proliíca del pez medaka de agua salobre para reproducirse, el desove de este pez puede inducirse a lo largo de todo el año, y cada par de peces hembra y macho puede producir 20-30 huevos diariamente durante hasta varios meses en condiciones mantenidas de interior (por ejemplo, 28 ± 1°C con un ciclo de luz constante de 14 h de luz/8 h de oscuridad y alimentado con alimento en copos libre de hormonas comercial y artemias (*Artemia salina*)). Los huevos eclosionan habitualmente en de 11 a 15 días a 28 ± 1°C.

5 *Oryzias latipes* se ha usado para producir peces transgénicos que portan una variedad de transgenes (por ejemplo, K. Ozato *et al.*, *Cel Differ.* 19:237-244 (1986); K. Inoue *et al.*, *Cel Difer. Dev.* 27(1):57-68 (1989); E. Tamiya *et al.*, *Nucleic Acids res* 18:1072 (1990); K. Inoue *et al.*, *Cel Differ. Dev.* 29(2):123-128 (1990); J. Lu *et al.*, *Mol. Marine Biol. and Biotechnol.* 1(4/5):366-375 (1992); H. J. Tsai *et al.*, *Mol. Mar. Biol. Biotechnol.* 4(1):1-9 (1995); R. N. Winn *et al.*, *Marine Env. Res.* 40(3):247-265 (1995)). Los estudios han mostrado que las dos especies de medaka de *Oryzias melastigma* y *Oryzias latipes* comparten alta similitud morfológica, fisiológica y genómica, y que es fácil adaptar la técnica transgénica de *Oryzias latipes* a la medaka de agua salobre *Oryzias melastigma* (X. Chen *et al.*, *Ectoxicol. Environ. Saf.* 71:200-208 (2008); X. Chen *et al.*, *Comp. Biochem. Physiol. C. Toxicol. Pharmacol.* 149:647-655 (2009)).

10 En una realización, el pez transgénico de la presente invención se modifica mediante ingeniería genética para contener una o más copias de una secuencia de ácido nucleico linealizada que contiene la región promotora de un gen diana de estrógenos, que está ligada operativamente a la región codificante de un gen indicador (por ejemplo, un gen de proteína de fluorescencia), y luego flanqueada por una secuencia de terminación (por ejemplo, una  
15 secuencia de señal de poliadenilación de ARNm). La secuencia de la región promotora y la secuencia de terminación pueden originarse a partir del mismo gen diana de estrógenos, aunque la presente invención no requiere que tengan el mismo origen.

Una región promotora adecuada se deriva de un gen dependiente de estrógenos. En una realización, un gen dependiente de estrógenos particular dado a conocer puede incluir, sin limitación, los genes de coriogenina H de *Oryzias melastigma* (abreviándose el gen de "omChgH") y *Oryzias latipes* (abreviándose el gen de "olChgH").

20 El gen de omChgH de *Oryzias melastigma* se ha caracterizado como altamente sensible a estrógenos y sustancias similares a estrógenos. La secuencia codificante completa del gen de omChgH de *Oryzias melastigma* se ha determinado y se ha depositado como el n.º de registro de GenBank. EF392365. Tal como se usa en el presente documento, la secuencia codificante del gen de omChgH corresponde a SEQ ID NO: 1, tal como sigue:

```

1      gaattcacta  gtgattacta  tagggcacgc  gtggtcgcagc  gcccgggctg  gtatcgtgag
61     ccatgtatcg  cgtatcgtat  cgtatcgtga  ggtaccagcag  gattcccagc  cctaataatt
121    atggctaaat  actatataatg  tagaaatcta  actggtgta  aaaaagccag  agttttttta
181    atcttcacaa  agaaattggt  ttgcaaatta  atgaaaatcc  aatgcaaaag  ctgtaggac
241    agtcgaagcc  tggacttggt  tggcatcata  ttttattatt  attattatga  ttcctttctt
301    ttgttacccc  ctggcaagtt  catatcaatt  attctgtaat  tctcggatt  ggatcattta
361    ttctttatat  gtgctacatt  ttgacaaaa  aaaatcgata  ttatgaacat  tataccttta
421    caaatctggt  ttacacatct  cctgatttta  caaagaaaat  attatactaa  ttaaactaaa
481    tgtagtgata  aagctccaaa  tttatgtggt  ttattttccc  aaatccatca  ttatttacia
541    tatttcattt  tgtccaaaca  caaaaataaa  gtttcacaac  tagatagatt  atcatgattt
601    tacctctggt  tttttttttt  caattttttt  cctataataa  ctaccagcgc  gtttatcttg
661    aaaaattagt  tattgttctg  tgttctgttc  tacataagag  gattaaggcc  atggagggat
721    taaacgggta  tggataattc  taagtttaaa  gtcagaattc  tgactttttt  ttcctcggaa
781    ttctgacttt  tttcccagaa  ttctggcctt  ttatatattt  tttagaaaga  tttagaaaca
841    tattaaattt  cttactgcta  catttcatct  cgtacctcca  aaaccaaca  tattttgtct
901    ataaagggtg  agcttaaaaa  tatatatattt  ttcaattaa  agaaaataac  tgaaaaactg

```

ES 2 658 267 T3

961 gaatttaatc ttaaaactac caagaagtta tctatttaat cattatgttt acattcaagt  
1021 cgtcttaggg ccacaaggta cttagccttt gctgttattt acaaagacga caatttaagt  
1081 gtatgaagtg atctttataa atcagtcaaa tatatttttt taaatgcact cattcccctt  
1141 tggcagcaag ttgtggcgaa aatcctttat aatcttcaaa ttacaagtat gaacaatatt  
1201 gtttccttta aaacaattag cagtctaadc attttctata atatgaaagt tcatatctta  
1261 tgtagttgaa aagtgtgcta tttttgtaat tgtatttctt tttatatatt ttgcatttag  
1321 tgaactactg cattaactag cttgcaatac ttttcgcatt gtgtctctca taaaaaatat  
1381 agatatgggt atttaaaaaa atgcgtttac tcttaattgt tgccttttgg agtaaaattt  
1441 tatgcttttg tctgtattgc ctttttgaca ttcagaagag gatgcttctg tatgacggcg  
1501 tattaaggcc ttgaggggat catgtctgtg gtgtgactga atgattacat tgatgctggt  
1561 ttacactttg aaaaacacca tttgaaacca agttttgtct cacaattgca tcaaacagaa  
1621 aaaaaacat caaagcaagc taattgaatg ttgattgggt taatccaagt cattacagtt  
1681 tattccacct gagtctagat gattctaaca gattgtttga ctgttgtcaa aatgatccta  
1741 catgaatgca agtccaaagc aagataaatg ctctttctct tcaaatgatt tgacattaat  
1801 ctttccctaa aatttattat tggtcataat attgataaat ctttgtttctg tgatgcatga  
1861 gaccttatca cctaattttg cagtaaagag agtcaactaa aaaattttct gacactcttt  
1921 tgttacttat tatctcatga aatcctttgt actgttttgc cttgggggtt ttattgacta  
1981 acatctcttt aatcacacat aattcaactg ttcataattc caaatatggt ttagcttttg  
2041 ttataacgat ttaagttaca gcaatgtggt ttattttttt ctgattttaa ctgaactatg  
2101 ttgcctttat aaacagttac atgatagtaa taggagtggc ctgatattgc cacacacccc  
2161 tcatcggatg ctatgtcatg gacaaatagc tccactatat ggtcaaact aagtataact  
2221 taagaaagta acagaaaaat ttaattttaa aaaagttttt tttttttttt gtcttttcca  
2281 tttctttatt ttattttatt aaatccaaaa aaagtcaaat cctttacttc tggcacata  
2341 atttttcaaa caatcttttt aaataaaatt attaatttaa gcaaatattc attcacaaaa  
2401 aaaaactttt agagtttgaa aaatgcgaat ttaaagtgtt attattataa tcaatattga  
2461 tttaagttta caaatagatt taaaaaaaa atggaaatct gctatgtttc cttgacagcc  
2521 ttcaaaagtt tcttcttgga aaagttaaac tgttgttttg tgacgggtgt tttttttaa  
2581 cgctttgtct ggatcaatta aagcatagtt tttcacatt tgcgggtttt cacggagaga  
2641 ggaagtttcc tttattgtgt atcctgcctt gactaccagt gacattagag cctgtaacct  
2701 gtcaataaaa gtgacacagt tggccagatc taaagtctcg gatgtgtgt tctggtaaaa  
2761 taaacatatg acaatgaata aaagttagg tccatggac attttgaaaa gggcttttat  
2821 gacctagagt ttgatttgta gataaacccc tttatgtcaa actgtcatca aacacaaccc  
2881 tgatccaaca gcgttaccoc ttagctatca cagttcactt tgtaaatttg tcacaaaaaa  
2941 tgggtcataa tcatcaaaat gaattataat ttctaagaaa ttatagcatt tagatattgc  
3001 acctttttaa acacctcaaa attactgggt tcttttcttt ttattatttc tttagtttta  
3061 agtttgtttt gaaaatgatc ttaatattgc agcggagtag cacgtattta actaaaatta  
3121 aaactactaa ccatgaacat ttttcagcat ttgtgtgggt tagtttttgt gacatgtttg  
3181 catgtagtca tattttgagt ttttgagggt ctttttaaca gctttcagaa gcagtttaac  
3241 catttaaaat taagaaaatt caagctcaga ttacactttt catattatct tagtttgtga  
3301 aaaaatagta ttataatata ttagaagact ttcttctaca caggactacc tgaggtttaa  
3361 acaacacttt atcaactgag aggtagcact gaaatagtgt cgctgcaagt tattaattg  
3421 tttttttttt tttttttttt agctttgct acctagaaac attgtaaaaa aaattactga  
3481 aactttacac attaattttc tgaagacctc atcataatcc atgatgttta acgggttga  
3541 attgcaacta tttttactgc atcataatta ccacatccac tctattaaat tctattccaa  
3601 taccagagtt aaggctagag tttggtacac tacgaccgat ccacagttat gcaacgtaat  
3661 tctgagaaac tatgagtctc ctttattatt cctctatcaa accagtgggt aaggaagtat  
3721 tttaattttt acttaataaa aacttttcaa cattaaacaa tcaaatgtg tgtgctctg  
3781 tctgaattca tttaattatt cgtttaattga ttttctacac aattaatact tgcatatgtt  
3841 ttgctttttt taaatgctaa ctttattaca ttttctgatt ggggctaaaa atcaactgga  
3901 aagaaaatgg ttttttttac acttcattat gtctgtttg ggggtgctgg agcctgtccg  
3961 agttacctca ggggaaaagc cagagtgcac cctgaacatt gagaggcacc acacagacac  
4021 atccatccat gttcttaacc tgcataatcc cttattaagc atgattttgg actgtctgaa  
4081 gaaaagccaa gcaagaacat gccaaagcca cgcaaaaggg tcccaacct cgtttcaacc  
4141 aggaccagct tactgtgagg tgagaccgct aactactgca ccacagtgca gcccatattt  
4201 agacttaatg caatatattg tgttttgggg aagaagctgg agagcctgga ggggaaccagt  
4261 gcatggggaa aacatacaaa cctcacacag caaggatcac atctgcctca gtatgtattt  
4321 ttacagctta ctgtaattaa aaacagtaa aaaaaaaaa ctaaaaaaaaa aacatcaaa  
4381 ttgcccacaaa aagtacatga tttaaaaaaa ggttctgtc tacatgttta catcttaatt  
4441 tgatttaaaa cactaaaaaa tacataagat tgcccccaaa aaatgcaatt ataaaaagca  
4501 catgatttaa aaaaaaaaaag gtatccgtac gtatttttag atcttaattt ggcttaaca  
4561 ctaaaaaata cattagattg ccaaaaaatg caattataaa tatacatggt ttttaataaa  
4621 agccatcagc tgcacatgca ttttgggaaa aaaaggtgtt cttatagaaa aagtcacat  
4681 ccattacaca atttaactgt ttactttgaa taaaaacaca ttactgtgct gctttattat

ES 2 658 267 T3

4741 tgctctcact ctatgggggtt caaactaatg tgtatattgtc atttttgtgc tttgtttagt  
 4801 ggatatctaa cagtatgtca acagactgaa agggcaaaaag aggtaattac ttcctaaaca  
 4861 gctaacatta gattgtttct gtcatggaaa atgcatgaaa acatactgca acaatttatt  
 4921 ttaatgttca ttaagtgtca aggttttttag gattcttgaa atcctcaa atgatatgtta  
 4981 gcgacacata tttgactata atgggtcttct gttatttcat tcatttatgt aacaaaaaca  
 5041 ataacacaaa aatgtacata acttttccatt tactcgagac ctattagtta aaaaaatgtg  
 5101 gaggaatgag ccttttcttt actacgtcga aatataaaaat ttctgagaca taaatcaatt  
 5161 ataaatatac agtataatggc ctgattaaaa aaaagaaaaa aacttttcaa ctgattttgt  
 5221 aatgcagaaa atcatgctta gcacaaccag agcattcgcc aacatataca tttgatgtgg  
 5281 acatcatcct aataacctca tataaaagggt tttttttgac caaaatgtgt acaatatgag  
 5341 gttttgttgc agattcaggg aaaagatcac tttgtttgtc attgcctact atcaaaaca  
 5401 acatttgagg acagataagt tcgagactgc aaagaccctg aaaaggctc catgacctgg  
 5461 atgtcacaaa agcctttcat tcattccaac gcaacgacct gatctggcat ttcacgcaaa  
 5521 ggacagaata gtccacatga attacataaa attgacttaa caaaacacac cctgaagcgt  
 5581 ttgtgattgg gagctacttg gtttgagagg tggagtttga agagcatcaa aggtaaagac  
 5641 acataaatag agcaggagag ggaaatttac acttagggac ccatcgggtc agacagctgt  
 5701 gggaccatgg caaggcactg gagtattacg gttttttccg cactagctct gatatgttct  
 5761 ttcttgccga cccaagtga tgctcagaaa ggccccctc aagaccctaa ggttccatac  
 5821 cctccatact atccacagcc gaagccgcag gaccctcaac acgtttcacc gccttacaac  
 5881 ccaggaagc cgagtatcc aggggaagcca cagtatccag ggaagccgca gagtccacag  
 5941 tatectcaga cccctcagta tcctcagacc cctcagcagc cgcagagtc acagtatcct  
 6001 cagaccctc agtatcctca gaccctcag cagccgcaga gtcctcagta tcctcagtc  
 6061 cctcagtatc ctcagactcc tcagtcctc cagtatcctc agtccctca gtatcctcag  
 6121 actcctcaga atcctcagaa tcctaagggt taggtgatg acagtctca gccttcaact  
 6181 ccgtcaaagc ctagctatcc tcagcctcag gccccccagt acccatctaa gcctcaagct  
 6241 cccagctgc ctcaggcccc ccagtaccca actaagcctc aagctcccca gctgcctcaa  
 6301 gctccccagc tgcctcaggc cccccagtac ccaactaagc ctcaagctcc tcagtatcct  
 6361 caagctctc agcagcctca ggccccccag tacccaacta agcctcaagc tcctcagcag  
 6421 cccaggctc cccagtacc aactaagcct caagctcctc agtaccctca agctcctcag  
 6481 cagcccagc ctcccagta cccaacaaaa cctcagcagc cccagtacc aacaaagcct  
 6541 cagtctcctc agtaccctca agatcctaaa aatccaaatc ctcagaatcc tcctcttcat  
 6601 cctccccctg ttaagagctg tgagggtgccc cgcgatgtga gagtcccatg tggagtcca  
 6661 gacatctctc cttctgcatg cgatgccatt gactgctgtc atgatggcca agcctgctac  
 6721 tttggaacag gaggtaagtg gtttctccag ctgctatgat cagaggcttt ttgtaagggtg  
 6781 acggctgatc gtgcaatcgt cgatcccatc tatttcttct agcaaccgtt cagtgcacca  
 6841 aggacggaca cttcatcgtt gtgggtggcca aggatgtcac cttaccctat ctcgatcttg  
 6901 aaactatctc acttttgga ccgggtcaag aatgtggagc tgttgactct aattcagctt  
 6961 tcgccatcta ctactttccc gtcactcagt gcggcactca tgtcacggta acactcagtc  
 7021 ttgtttatat cttatagtca taagggtcaat ctttgagatt ctatccttct tattgttaaa  
 7081 ttttgaacca ttaaaaggaa gagcccgggg ttatagtcta tgaaaaccgg atgacatcct  
 7141 catatgaagt tggagtggga ccgcttgagg ctattaccag agacagctct tttgagttagg  
 7201 tcatcatttg tgtttagtat caaacagatt tactaatgtc taactaatat ctatcagggg  
 7261 taacagaa atcatgcacag gtattaacac agttcttttt ctcaggctcc tcttccagtg  
 7321 cagataccat gcaacatctg ttgaaactct ggtcgtggaa gtgctgccag tggatagtcc  
 7381 tctttccatt gctgagcttg gaccctcaa tgtgtacttg caaattgcca atggagtatg  
 7441 tcagacaaaag ggtcgcgacg aaggtcagtg cacggcagtc tggcacagcc agtgtggttg  
 7501 tcaaacattt gaaaaagctg cctgtcgtaa cgtttgtttg ctcccacagt ggccgagcc  
 7561 tacactctt tctacacgga tgccgactat cctgtgacca aagtactgag agaaccagtc  
 7621 tatgtggagc ttcaaatcct tggcagaaca gatccaaatc tggttctgac tcttggacgc  
 7681 tgttgggcaa ccacaagccc caatgctttc agtctgccc agtgggacat tttgattgac  
 7741 gggtaaaaaa aaaaaaatct accaattcat tccataaaga ccatttttgt tcaaactaag  
 7801 ctccaaatct cacacttttt agccgaatta ctaaatatct aaccaaccat tacttcttct  
 7861 ttacctttt tccatccaga tgtccatatg aagatgatcg ctacctgtct gcgttgggtc  
 7921 caatcgattc ctctctggt ttgccattcc caactcatca cagacgcttc ttattcaaga  
 7981 tgtttacctt tgttgatcct cattcaatgg aaccactaag ggaaaagggtg ggtactgaat  
 8041 tactcaagta gaggtttaac ttggcttcta acctgtactt ttctttcagg tgtacattca  
 8101 ctgcagcaca gctgcatgag ttccaggaca gggtagcagc tgtgaaccct catgcagcag  
 8161 agaagtagg gggctcattt ataaccgctt acatgttttt tttgttgggt taatgaccat  
 8221 gtccactcat cattggccat gttttgtgtc tttttgtaga aggaagagat actgacgctg  
 8281 tatccattag aacggatgaa agaaagggtt tggatcgtc tggagaagtg ctcatgggtg  
 8341 ccgaagctgc tggacagtct taactgtgaa ccgacagaag ctccagagtt cggaaaaaat  
 8401 aacataacat tatgaaaatc tgtttcatca tggttcagaa ttaaatgcat aaagt

## ES 2 658 267 T3

La secuencia de nucleótidos reguladora en 5' que responde a estrógenos dada a conocer en ella puede incluir, sin limitación, cualquier secuencia de la región promotora del gen de omChgH de SEQ ID NO: 1.

En una realización, una secuencia de nucleótidos reguladora en 5' que responde a estrógenos adecuada de la presente invención comprende una secuencia de nucleótidos que corresponde a SEQ ID NO: 2, tal como sigue:

ctcgtacctc	caaaacccaa	catatTTTTgt	ctataaaggt	tgagcttaaa	aatatatatt	60
TTTTcaatta	aaagaaaata	actgaaaaac	tggaatttaa	tcttaaaact	accaagaagt	120
tatctattta	atcattatgt	ttacattcaa	gtcgtccttag	ggccacaagg	tacttagcct	180
ttgctgttat	ttacaaagac	gacaatttaa	gtgatgaag	tgatctttat	aaatcagtca	240
aatatatatt	tttaaagtca	ctcattcccc	tttggcagca	agttgtggcg	aaaatccttt	300
ataatcttca	aattacaagt	atgaacaata	ttgtttcctt	taaaacaatt	agcagtctaa	360
tcatttttcta	taatatgaaa	gttcatatct	tatgtagtgt	aaaagtgtgc	tattttttgta	420
attgtatttc	TTTTatata	TTTTgcattt	agtgaactac	tgcattaact	agcttgcaat	480
acttttcgca	ttgtgtctct	cataaaaaat	atagatatgg	ttatttaaaa	aaatgcgttt	540
actcttaatt	gttgcctttt	ggagtaaaaat	tttatgcttt	tgtctgtatt	gccttttttga	600
cattcagaag	aggatgcttc	tgtatgacgg	cgtattaagg	ccttgagggg	atcatgtctg	660
tgggtgtgact	gaatgattac	attgatgctg	TTTTacactt	tgaaaatcac	catttgaaac	720
caagttttgt	ctcacaattg	catcaaacag	aaaaaaaaacc	atcaaagcaa	gctaattgaa	780
tgttgattgg	tttaatccaa	gtcattacag	tttattccac	ctgagtctag	atgattctaa	840
cagattgttt	gactgttgtc	aaaatgatcc	tacatgaatg	caagtccaaa	gcaagataaa	900
tgctctttct	cttcaaattg	tttgacatta	atctttccct	aaaatttatt	attggtcata	960
atattgataa	atctttgttt	cgtgatgcat	gagaccttat	cacctaattt	tgcaagtaaag	1020
agagtcaact	aaaaaatttt	ctgacactct	tttgttactt	attatctcat	gaaatccttt	1080
gtactgtttt	gccttggggg	TTTTattgac	taacatctct	ttaatcacac	ataattcaac	1140
tgttcataat	tccaaatatg	TTTTagcttt	tgttataacg	atttaagtta	cagcaatgtg	1200
TTTTatTTTT	ttctgtattt	aactgaacta	tgttgccttt	ataaacagtt	acatgtatgt	1260
aataggagtg	gcctgatatt	gccacacacc	cctcatcgga	tgctatgtca	tggaacaaata	1320
gctccactat	atgggtcaaac	ataagtataa	cttaagaaag	taacagaaaa	atttaattta	1380
aaaaaagttt	TTTTTTTTTT	ttgtcttttc	catttcttta	TTTTattttat	ttaaatccaa	1440
aaaaagtcaa	atcctttact	tctcggcaca	taatttttca	aacaatcttt	ttaaataaaa	1500
ttattaatta	aagcaaatat	tcattcacaa	aaaaaaaaactt	ttagagtttg	aaaaatgcca	1560
atTTaaagt	gtattattat	aatcaatatt	gatttaagtt	tacaaataga	tttaaaaaaa	1620
aaatggaaat	ctgctatggt	tccttgacag	ccttcaaaag	tttccttctg	gaaaagttaa	1680
actgttggtt	tgtgacgggt	TTTTTTTTTT	aacgctttgt	ctggatcaat	taaagcatag	1740
TTTTttcaca	tttgcggttt	ttcacggaga	gaggaagttt	cctttattgt	gtatcctgcc	1800
ctgagtacca	gtgacattag	agcctgtaac	gtgtcaaata	aagtgcacaca	gttggccaga	1860
tctaaagtct	cggatgttgt	gttctggtca	aataaacata	tgacaatgaa	taaaagtTga	1920
ggtcacatgg	acattttgaa	aagggctttt	atgacctaga	gtttgatttg	tagataaacc	1980
cctttatgtc	aaactgtcat	caaacacaa	cctgatccaa	cagcgttacc	ccttagctat	2040
cacagttcac	tttgtaaatt	tgtcacaaaa	aatgggtcat	aatcatcaaa	atgaattata	2100
atttctaaga	aattatagca	tttagatatt	gcaccctttt	aaacacctca	aaattactgg	2160
ttctttttct	ttttattatt	tctttagttt	taagtttgtt	ttgaaaatga	tcttaattatt	2220
gcagcggagt	agcacgtatt	taactaaaaat	taaaactact	aaccatgaac	atTTTTcagc	2280
atTTgtgtgg	tttagttttt	gtgacatggt	tgcatgtagt	catatTTTga	gtTTTTgagg	2340
tgctTTTTaa	cagctttcag	aagcagttta	accatttaaa	attaagaaaa	ttcaagctca	2400
gattacactt	ttcatattat	cttagttttg	gaaaaaatag	tattataata	tattagaaga	2460
ctttcttcta	cacaggacta	cctgaggttt	aaacaacact	ttatcaactg	agaggtagca	2520
ctgaaatgat	tgcgctgcaa	gttattttaa	tgtTTTTTTT	TTTTtatttt	ttagctcttg	2580
ctacctagaa	acattgtaaa	aaaaattact	gaaactttac	acattaattt	tctgaagacc	2640
tcatacataat	ccatgatggt	taacgggttt	gaattgcact	tatttttact	gcatcataat	2700
taccacatcc	actctattaa	attctattcc	aataccagag	ttaaggctag	agtttggtac	2760
actacgaccg	atccacagtt	atgcaacgta	attctgagaa	actatgagtc	tcctttatta	2820
ttcctctatc	aaaccagtgg	tgaaggaagt	atTTtaattt	ttacttaaat	aaaacttttc	2880
aacattaaac	aattcaaattg	tgtgtgcgct	tgtctgaatt	cattttaaata	ttcgTTaatt	2940
gattttctac	acaattaata	cttgcataatg	TTTTgctttt	tttaaattgct	aactttatta	3000
cattttctga	ttggggctaa	aaatcaactg	gaaagaaaat	ggtTTTTTTT	acacttcatt	3060

ES 2 658 267 T3

atgtcctggt	tggggttgct	ggagcctgtc	cgagttacct	caggggaaaa	gccagagtgc	3120
accctgaaca	ttgagaggtc	acacacagac	acatccatcc	atgtttcttaa	cctgctaaat	3180
cccttattaa	gcatgatttt	ggactgtctg	aagaaaagcc	aagcaagaac	atgccaaagtc	3240
cacgcaaaaag	ggtcccaacc	atgctttcaa	ccaggaccag	cttactgtga	ggtgagaccg	3300
ctaactactg	caccacagtg	cagcccatat	ttagacttaa	tgcaatata	tgtgttttgg	3360
ggaagaagct	ggagagcctg	gagggaaacca	gtgcatgggg	aaaacataca	aacctcacac	3420
agcaaggatc	acatctgcct	cagtatgtat	ttttacagct	tactgtaatt	aaaaacagta	3480
aaaaaaaaaa	aactaaaaaa	aaaaacatca	aattgccaca	aaaagtacat	gatttaaaaa	3540
aaggtttctg	tctacatggt	tacatcttaa	tttgatttaa	aacactaaaa	aatacataag	3600
attgccccca	aaaaatgcaa	ttataaaaag	cacatgattt	aaaaaaaaaa	aggtatccgt	3660
acgtattttt	agatcttaat	ttggcttaaa	cactaaaaaa	tacattagat	tgccaaaaaa	3720
tgcaattata	aatatacatg	ttttttaata	aaagccatca	gctgcacatg	cattttggga	3780
aaaaaagggt	gtcttataga	aaaagtccac	atccattaca	caatttaact	gtttactttg	3840
aataaaaaca	cattactgtg	ctgctttatt	attgctctca	ctctatgggg	ttcaaactaa	3900
tgtgtattttg	tcatttttgt	gctttgttta	gtggatatct	aacagtatgt	caacagactg	3960
aaagggcaaa	agaggtaatt	acttcctaaa	cagctaacat	tagattggtt	ctgtcatgga	4020
aatgcatga	aacatactg	caacaattta	ttttaatggt	cattaagtgc	taagggtttt	4080
aggattcttg	aatcctcaa	attgatatgt	tagcgacaca	tatttgacta	taatggtctt	4140
ctgttatttc	attcatttat	gtaacaaaaa	caataacaca	aaaatgtaca	taacttttca	4200
tttactcgag	acctattagt	taaaaaatg	tggaggaaatg	agccttttct	ttactacgtc	4260
gaaatataaa	atctctgaga	cataaatcaa	ttataaatat	acagtatatg	gcctgattaa	4320
aaaaaagaaa	aaaacttttc	aactgatttt	gtaatgcaga	aatcatgct	tagcacaacc	4380
agagcattcg	ccaacatata	catttgatgt	ggacatcatc	ctaataacct	catataaaaag	4440
gttttttttg	accaaaatgt	gtacaatatg	aggttttgtt	gcagattcag	ggaaaagatc	4500
actttgtttg	tcattgccta	ctatcaaaaac	aaacatttga	ggacagataa	gttcgagact	4560
gcaaagacc	tgaaaaggtc	tccatgacct	ggatgtcaca	aaagcctttc	attcattcca	4620
acgcaacgac	ctgactggc	atctcacgca	aaggacagaa	tagtccacat	gaattacata	4680
aaattgactt	aacaaaacac	accctgaagc	gtttgtgatt	gggagctact	tggtttgaga	4740
ggtggagttt	gaagagcatc	aaaggtaaag	acacataaat	agagcaggag	agggaaattt	4800
acacttaggg	acccatcggg	tcagacagct	gtgggacc			4838

La secuencia de nucleótidos reguladora en 5' que responde a estrógenos de SEQ ID NO: 2 corresponde a una región de 4827 pares de bases en el sentido de 5' del gen de omChgH de SEQ ID NO: 1. Los pares de bases 4828-4838 de SEQ ID NO: 2 corresponden a una región no traducida en 5' del gen de omChgH de SEQ ID NO: 1.

- 5 En una realización, una secuencia de nucleótidos reguladora en 5' que responde a estrógenos adecuada de la presente invención comprende una secuencia de nucleótidos que corresponde a SEQ ID NO: 3, tal como sigue:

tttaggattc	ttgaaatcct	caaattgata	tgttagcgac	acatatttga	ctataatggt	60
cttctgttat	ttcattcatt	tatgtaacaa	aaacaataac	acaaaaatgt	acataacttt	120
tcatttactc	gagacctatt	agttaaaaaa	atgtggagga	atgagccttt	tctttactac	180
gtcgaaatat	aaaatttctg	agacataaat	caattataaa	tatacagtat	atggcctgat	240
taaaaaaaaag	aaaaaaactt	ttcaactgat	tttgtaatgc	agaaaaatcat	gcttagcaca	300
accagagcat	tcgccaacat	atacatttga	tgtggacatc	atcctaataa	cctcatataa	360
aaggtttttt	ttgaccaaaa	tgtgtacaat	atgaggtttt	gttgcagatt	cagggaaaag	420
atcactttgt	ttgtcattgc	ctactatcaa	aacaaacatt	tgaggacaga	taagttcgag	480
actgcaaaga	cctgaaaag	gtctccatga	cctggatgct	acaaaagcct	ttcattcatt	540
ccaacgcaac	gacctgatct	ggcatttcac	gcaaaggaca	gaatagtcca	catgaattac	600
ataaaattga	cttaacaaaa	cacaccctga	agcgtttgtg	attgggagct	acttggtttg	660
agaggtggag	tttgaagagc	atcaaaggta	aagacacata	aatagagcag	gagagggaaa	720
tttactactta	gggaccatc	gggtcagaca	gctgtgggac	c		761

La secuencia de nucleótidos reguladora en 5' que responde a estrógenos de SEQ ID NO: 3 corresponde a una región de 750 pares de bases en el sentido de 5' del gen de omChgH de SEQ ID NO: 1. Los pares de bases 751-761 de SEQ ID NO: 3 corresponden a una región no traducida en 5' del gen de omChgH de SEQ ID NO: 1.

10

En una realización, una secuencia de nucleótidos reguladora en 5' que responde a estrógenos adecuada de la presente invención comprende una secuencia de nucleótidos que corresponde a SEQ ID NO: 4, tal como sigue:

gttgcagatt	cagggaaaag	atcactttgt	ttgtcattgc	ctactatcaa	aacaaacatt	60
tgaggacaga	taagttcgag	actgcaaaga	ccctgaaaag	gtctccatga	cctggatgtc	120
acaaaagcct	ttcattcatt	ccaacgcaac	gacctgatct	ggcatttcac	gcaaaggaca	180
gaatagtcca	catgaattac	ataaaattga	cttaacaaaa	cacaccctga	agcgtttgtg	240
attgggagct	acttggtttg	agaggtggag	tttgaagagc	atcaaaggta	aagacacata	300
aatagagcag	gagagggaaa	tttacactta	gggacccatc	gggtcagaca	gctgtgggac	360
c						361

La secuencia de nucleótidos reguladora en 5' que responde a estrógenos de SEQ ID NO: 4 corresponde a una región de 350 pares de bases en el sentido de 5' del gen de omChgH de SEQ ID NO: 1. Los pares de bases 351-361 de SEQ ID NO: 4 corresponden a una región no traducida en 5' del gen de omChgH de SEQ ID NO: 1.

- 5 La región reguladora en 3' dada a conocer en ella puede incluir, sin limitación, una región flanqueante en 3' de coriogenina H que incluye la región no traducida en 3' de coriogenina H (representada como UTR). Según la invención, una región reguladora en 3' adecuada puede incluir la UTR en 3' de omChgH depositada como el n.º de registro de GenBank DQ778335, que corresponde a la secuencia de nucleótidos de SEQ ID NO: 5, tal como sigue:

ctgtgaaccg	acagaagctc	cagagttcgg	aaaaataac	ataacattat	gaaaatctgt	60
ttcatcatgg	ttcagaatta	aatgcataaa	gtgaaaatc	tgttgcaggt	gtttggaatg	120
tattgcaaaa	acaaaacaag	ttgatacata	aaggtagcaa	catttcttca	catttcatgt	180
aaaaaaaaa	aaaaagtttc	ttcacatcag	tatagcaggt	gtgtagatac	agttgacaaa	240
atacaacact	tccaccttaa	tattctatat	ggatcaaatg	tgactgtttt	cagtgaaacg	300
tcacgacaat	aaagtcacat	aatacatttc	acttttacac	aaatttttac	tgtctgtttc	360
tgttcttaaa	catacaagca	ctgaaaacag	agatgaatcc	agtataacca	aacaactcaa	420
acgacaataa	aaaaacaaa	aaaattgttt	tattatttta	aaatgtttta	aaaaagtcca	480
atttttaaat	caaagtaggt	caaccatttt	taatactgga	tcaacaaaca	aaaacaatta	540
acaaaaaaaa	tcagagttaa	tggaaggtaa	acacacacat	ccgtgaagac	aaaaacacaa	600
gattattatt	taaaaactga	actagacagc	ttacttctca	gaaatctgcg	actgtaagga	660
aaactgtttt	ccttgttgct	ttcaattttg	aaaattgaaa	gatgtcaata	aataatttac	720
cctcttgcat	tttgaaaaca	attgtacttt	cttggagaa	tatttggcat	aaatgcatgt	780
ttacatgtgg	atgtcggggt	tttaagcacc	tgctatgggt	agcttgggccc	a	831

- 10 La práctica de la presente invención empleará, a menos que se indique otra cosa, técnicas convencionales de química, biología molecular, microbiología, ADN recombinante e inmunología, que están dentro de las capacidades de una persona experta habitual en la técnica. Tales técnicas se explican en la bibliografía. Véase, por ejemplo, J. Sambrook, E. F. Fritsch y T. Maniatis, 1989, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Segunda Edición, Libros 1-3, Cold Spring Harbor Laboratory Press; Ausubel, F. M. *et al.* (1995 y suplementos periódicos) *Current Protocols in*
- 15 *Molecular Biology*, capítulos 9, 13 y 16, John Wiley & Sons, Nueva York, N.Y.); B. Roe, J. Crabtree, y A. Kahn, 1996, *DNA Isolation and Sequencing: Essential Techniques*, John Wiley & Sons J. M. Polak y James O'D. McGee, 1990, *In Situ Hybridization: Principles and Practice*; Oxford University Press; M. J. Gait (Editor), 1984, *Oligonucleotide Synthesis: A Practical Approach*, Irl Press; D. M. J. Lilley y J. E. Dahlberg, 1992, *Methods of Enzymology: DNA Structure Part A: Synthesis and Physical Analysis of DNA Methods in Enzymology*, Academic Press; *Using*
- 20 *Antibodies: A Laboratory Manual: Portable Protocol NO. 1* by Edward Harlow, David Lane, Ed Harlow (1999, Cold Spring Harbor Laboratory Press, ISBN 0-87969-544-7); *Antibodies: A Laboratory Manual* by Ed Harlow (Editor), David Lane (Editor) (1988, Cold Spring Harbor Laboratory Press, ISBN 0-87969-3,4-2), 1855. *Handbook of Drug Screening*, editado por Ramakrishna Seetala, Prabhavathi B. Fernandes (2001, Nueva York, N.Y., Marcel Dekker, ISBN 0-8247-0562-9); y *Lab Ref: A Handbook or Recipes, Reagents, and Other Reference Tools for use at the*
- 25 *Bench*, Edited Jane Roskams y Linda Rodgers, 2002, Cold Spring Harbor Laboratory, ISBN 0-87969-630-3.

El término "transformación" se refiere a la transferencia de un fragmento de ácido nucleico al genoma de una célula huésped, dando como resultado herencia genéticamente estable. Una "célula huésped" es una célula que se ha transformado o en la que puede realizarse transformación, por una molécula de ácido nucleico exógena. Las células huésped que contienen los fragmentos de ácido nucleico transformados se denominan células "transgénicas", y los organismos que comprenden células transgénicas se denominan "organismos transgénicos".

"Transformado", "transducido", "transgénico" y "recombinante" se refieren a una célula u organismo huésped en el que se ha introducido una molécula de ácido nucleico heteróloga. La molécula de ácido nucleico puede integrarse de manera estable en el genoma de manera conocida generalmente en la técnica y se da a conocer en Sambrook y Russell, citado a continuación. Véase también Innis *et al.* (1995); y Gelfand (1995); e Innis y Gelfand (1999). Por ejemplo, se han obtenido células "transformadas", "transformantes" y "transgénicas" a través del proceso de transformación y contienen un gen extraño integrado en su cromosoma. El término "no transformadas" se refiere a células normales que no se han obtenido a través del proceso de transformación.

Un organismo "transgénico" es un organismo que tiene una o más células que contienen un vector de expresión.

“Células alteradas genéticamente” indica células que se han modificado mediante la introducción de ácidos nucleicos recombinantes o heterólogos (por ejemplo, uno o más constructos de ADN u homólogos de ARN) e incluye además la progenie de tales células que conservan parte o la totalidad de tal modificación genética.

5 Tal como se usa en el presente documento, se pretende que los términos “polinucleótido”, “nucleótido” y “ácido nucleico” sean sinónimos entre sí. “Polinucleótido” se refiere en general a cualquier polirribonucleótido o polidesoxirribonucleótido, que puede ser ARN o ADN no modificado o ARN o ADN modificado. Los “polinucleótidos” incluyen, sin limitación, ADN mono y bicatenario, ADN que es una mezcla de regiones mono y bicatenarias, ARN mono y bicatenario, y ARN que es una mezcla de regiones mono y bicatenarias, moléculas híbridas que comprenden ADN y ARN que pueden ser monocatenarias o, más normalmente, bicatenarias o una mezcla de regiones mono y bicatenarias. Además, “polinucleótido” se refiere a regiones tricatenarias que comprenden ARN o ADN o tanto ARN como ADN. El término polinucleótido también incluye ADN o ARN que contienen una o más bases modificadas y ADN o ARN con estructuras principales modificadas por motivos de estabilidad o por otros motivos. Las bases “modificadas” incluyen, por ejemplo, bases tritiladas y bases inusuales como inosina. Puede obtenerse una variedad de modificaciones para ADN y ARN; por tanto, “polinucleótido” engloba formas modificadas química, 10 enzimática o metabólicamente de polinucleótidos tal como se encuentran normalmente en la naturaleza, así como las formas químicas de ADN y ARN característicos de virus y células. “Polinucleótido” también engloba polinucleótidos relativamente cortos, denominados a menudo oligonucleótidos.

20 Un experto entenderá que numerosos polinucleótidos y ácidos nucleicos diferentes pueden codificar para el mismo polipéptido como resultado de la degeneración del código genético. Además, ha de entenderse que los expertos pueden realizar, usando técnicas de rutina, sustituciones de nucleótidos que no afectan a la secuencia de polipéptido codificada por los polinucleótidos descritos aquí para reflejar el uso de codón de cualquier organismo huésped particular en el que van a expresarse los polipéptidos.

25 Los polinucleótidos descritos en el presente documento pueden comprender ADN o ARN. Pueden ser monocatenarios o bicatenarios. También pueden ser polinucleótidos que incluyen dentro de ellos nucleótidos sintéticos o modificados. Se conocen en la técnica varios tipos diferentes de modificación en oligonucleótidos. Estos incluyen estructuras principales de metilfosfonato y fosforotioato, adición de cadenas de acridina o polilisina en los extremos 3' y/o 5' de la molécula. Para los fines de la presente invención, ha de entenderse que los polinucleótidos descritos en el presente documento pueden modificarse mediante cualquier método disponible en la técnica. Tales modificaciones pueden llevarse a cabo con el fin de potenciar la actividad o la duración *in vivo* de los polinucleótidos.

30 Cuando el polinucleótido es bicatenario, ambas cadenas del dúplex, o bien individualmente o bien en combinación, quedan englobadas por los métodos y las composiciones descritos en el presente documento. Cuando el polinucleótido es monocatenario, ha de entenderse que la secuencia complementaria de ese polinucleótido también está incluida.

35 Los términos “variante”, “homólogo” o “derivado” en relación con una secuencia de nucleótidos incluyen cualquier sustitución de, variación de, modificación de, reemplazo de, delección de o adición de uno (o más) nucleótidos de o a la secuencia.

40 Tal como se indicó anteriormente, con respecto a la identidad de secuencia, un “homólogo” tiene una identidad de al menos el 5%, una identidad de al menos el 10%, una identidad de al menos el 15%, una identidad de al menos el 20%, una identidad de al menos el 25%, una identidad de al menos el 30%, una identidad de al menos el 35%, una identidad de al menos el 40%, una identidad de al menos el 45%, una identidad de al menos el 50%, una identidad de al menos el 55%, una identidad de al menos el 60%, una identidad de al menos el 65%, una identidad de al menos el 70%, una identidad de al menos el 75%, una identidad de al menos el 80%, una identidad de al menos el 85%, una identidad de al menos el 90% o una identidad de al menos el 95% con la secuencia relevante mostrada en las listas de secuencias.

45 En particular, hay una identidad de al menos el 95%, más particularmente una identidad de al menos el 96%, más particularmente una identidad de al menos el 97%, más particularmente una identidad de al menos el 98%, más particularmente una identidad de al menos el 99%. Pueden realizarse comparaciones de homología de nucleótidos usando técnicas bien conocidas en la técnica. Un programa de comparación de secuencias adecuado es el programa GCG Wisconsin Bestfit, que se conoce en la técnica. La matriz de puntuación por defecto tiene un valor de coincidencia de 10 para cada nucleótido idéntico y de -9 para cada falta de coincidencia. La penalización por creación de hueco por defecto es de -50 y la penalización por extensión de hueco por defecto es de -3 para cada nucleótido. Se conocen en la técnica otros métodos diversos sobre cómo calcular la identidad de secuencia.

55 También se da a conocer el nucleótido regulador en 5' que responde a estrógenos que tiene una identidad de secuencia de al menos el 98,1% o más con una secuencia que corresponde a SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3 o SEQ ID NO: 4. En particular, el nucleótido regulador en 5' que responde a estrógenos tiene una identidad de secuencia del 98,2% o más, el 98,3% o más, el 98,4% o más, el 98,5% o más, el 98,6% o más, el 98,7% o más, el 98,8% o más, el 98,9% o más, el 99,0% o más o el 99,1% o más, el 99,2% o más, el 99,3% o más, el 99,4% o más, el 99,5% o más, el 99,6% o más, el 99,7% o más, el 99,8% o más, el 99,9% o más con una secuencia que corresponde a SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3 o SEQ ID NO: 4.

5 Puede emplearse la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) durante los procedimientos implicados en producir y detectar el pez transgénico de la presente invención. Los métodos conocidos de PCR incluyen, pero no se limitan a, métodos que usan cebadores emparejados, cebadores anidados, cebadores específicos individuales, cebadores degenerados, cebadores específicos de genes, cebadores específicos de vectores, cebadores con apareamiento erróneo parcial, y similares.

En un aspecto, la presente invención también se refiere a un casete de expresión para su uso en producir el pez transgénico de la presente invención tal como se definió anteriormente.

10 En una realización, el casete de expresión de la presente invención incluye una secuencia de nucleótidos reguladora en 5' aislada de un pez medaka de agua salobre de la especie *Oryzias melastigma*. Por ejemplo, la secuencia de nucleótidos reguladora en 5' puede derivarse de la región promotora de un gen de coriogenina H de *Oryzias melastigma*, donde el gen de coriogenina H tiene una secuencia de nucleótidos de SEQ ID NO: 1.

15 El casete de expresión de la presente invención incluye una secuencia de nucleótidos reguladora en 5' que se deriva de la región promotora del gen de coriogenina H de *Oryzias melastigma*, donde la secuencia de nucleótidos corresponde a (i) SEQ ID NO: 2 (que corresponde a la región en el sentido de 5' de omChgH de -4827 pb); (ii) SEQ ID NO: 3 (que corresponde a la región en el sentido de 5' de omChgH de -750 pb); y (iii) SEQ ID NO: 4 (que corresponde a la región en el sentido de 5' de omChgH de -350 pb).

20 En otra realización, la secuencia de nucleótidos indicadora del casete de expresión de la presente invención codifica para una proteína indicadora que es una proteína autofluorescente. Los ejemplos adecuados de proteínas autofluorescentes pueden incluir, sin limitación, una proteína fluorescente verde potenciada (EGFP), una proteína fluorescente verde (GFP), una proteína fluorescente azul (BFP), una proteína fluorescente amarilla (YFP), una proteína fluorescente roja (RFP), y similares.

El casete de expresión de la presente invención incluye una región reguladora en 3' que comprende la secuencia de nucleótidos de SEQ ID NO: 5.

25 La presente invención también se refiere a un vector de transformación que contiene el casete de expresión de la presente invención.

La presente invención también se refiere a una célula huésped transducida con el casete de expresión de la presente invención.

30 La presente invención también se refiere a una célula transgénica de un animal acuático, donde la célula transgénica incluye al menos un casete de expresión de la presente invención. Tal como se expone en el presente documento, la célula transgénica puede proceder de un animal acuático que es un pez de agua dulce, de agua salada y de agua salobre. Los ejemplos adecuados de un pez de este tipo se dan a conocer en el presente documento e incluyen, por ejemplo, la especie *Oryzias* y la especie *Danio*.

35 La presente invención también se refiere a un pez transgénico que contiene al menos un casete de expresión de la presente invención. El pez transgénico de la presente invención presenta una marca observable cuando se expone a un medio líquido que contiene un estrógeno o un compuesto similar a estrógeno. La marca observable incluye la proteína indicadora expresada por el al menos un casete de expresión. La marca observable es visible *in vivo* o *in vitro*. El pez transgénico es de la especie *Oryzias melastigma*. En una realización particular, el pez transgénico está en una fase de desarrollo que incluye, sin limitación, una fase embrionaria, una fase larvaria y/o una fase adulta. Más particularmente, el pez transgénico puede ser un adulto macho.

40 El "casete de expresión" de la presente invención también puede denominarse un "constructo recombinante." Se conoce en general en la técnica que los constructos recombinantes contienen una secuencia de control de la expresión (por ejemplo, la secuencia de nucleótidos reguladora en 5' que responde a estrógenos), que está unida operativamente a una secuencia indicadora. Esto significa que un polinucleótido que comprende una secuencia de control de la expresión de interés se clona en un constructo recombinante, de manera que la secuencia de control de la expresión está unida operativamente a una secuencia indicadora. En particular, el indicador es una secuencia heteróloga.

45 Los métodos para obtener los constructos recombinantes son convencionales. Tales métodos, así como muchos de otros métodos de biología molecular usados conjuntamente con la presente invención, se comentan, por ejemplo, en Sambrook, *et al.* (1989), *Molecular Cloning, a Laboratory Manual*, Cold Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y.; Ausubel *et al.* (1995). *Current Protocols in Molecular Biology*, N.Y., John Wiley & Sons Davis *et al.* (1986), *Basic Methods in Molecular Biology*, Elsevier Sciences Publishing, Inc., Nueva York; Hames *et al.* (1985), *Nucleic Acid Hybridization*, IL Press; Dracopoli *et al.* *Current Protocols in Human Genetics*, John Wiley & Sons, Inc.; y Coligan *et al.* *Current Protocols in Protein Science*, John Wiley & Sons, Inc.

55 Las secuencias indicadoras adecuadas serán evidentes para los expertos en la técnica. Por ejemplo, una proteína indicadora adecuada puede incluir proteínas autofluorescentes y enzimas detectables mediante un método histoquímico.

Tal como se indica en otra parte en el presente documento, la proteína fluorescente puede incluir, sin limitación, una proteína fluorescente verde (GFP), una proteína fluorescente verde potenciada (EGFP), una proteína fluorescente roja (CFP y FP roja, RFP), una proteína fluorescente azul (BFP), una proteína fluorescente amarilla (YFP) y variantes fluorescentes de estas proteínas. El gen fluorescente heterólogo puede ser, por ejemplo, un gen que codifica para DsRed2, ZsGreen1 y ZsYellow1. El gen fluorescente heterólogo también puede ser cualquier variación o mutación de estos genes, que codifican para proteínas fluorescentes incluyendo proteína fluorescente verde (GFP), proteína fluorescente verde potenciada (eGFP), proteína fluorescente amarilla (YFP), proteína fluorescente amarilla potenciada (eYFP), proteína fluorescente azul (BFP), proteína fluorescente azul potenciada (eBFP), proteína fluorescente cian (CFP) y proteína fluorescente cian potenciada (eCFP).

Según otra realización, la enzima que puede detectarse mediante un método histoquímico se elige del grupo compuesto por luciferasa,  $\beta$ -galactosidasa,  $\beta$ -glucuronidasa, fosfatasa alcalina, cloramfenicol acetiltransferasa y alcohol deshidrogenasa. Según una realización particular, es luciferasa. Se pretende que el término "luciferasa" indique todas las proteínas que catalizan o inician una reacción bioluminiscente en presencia de un sustrato denominado luciferina. La luciferasa según la invención puede proceder de muchos organismos o sistemas que generan bioluminiscencia (véase la patente estadounidense n.º 6.152.358). Por ejemplo, la luciferasa según la invención puede proceder de *Renilla* (patente estadounidense n.º 5.418.155 y patente estadounidense n.º 5.292.658) o de *Photinus pyralis* o de *Luciola cruciata* (patente estadounidense n.º 4.968.613).

Las técnicas para detectar indicadores de proteína, o bien directamente (por ejemplo, midiendo la cantidad de ARNm de indicador) o bien indirectamente (por ejemplo midiendo la cantidad y/o la actividad de la proteína indicadora) son convencionales. Muchas de estas metodologías y técnica analíticas pueden encontrarse en referencias tales como Current Protocols in Molecular Biology, F. M. Ausubel *et al.*, eds., (una empresa en participación entre Greene Publishing Associates, Inc. y John Wiley & Sons, Inc.), Enzyme Immunoassay, Maggio, ed. (CRC Press, Boca Raton, 1980); Laboratory Techniques in Biochemistry and Molecular Biology, T. S. Work y E. Work, eds. (Elsevier Science Publishers B. V., Ámsterdam, 1985); Principles and Practice of Immunoassays, Price and Newman, eds. (Stockton Press, NY, 1991).

Por ejemplo, pueden determinarse cambios en la expresión de ácidos nucleicos mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), reacción en cadena de la ligasa (LCR), amplificación mediante Q $\beta$ -replicasa, amplificación basada en la secuencia de ácido nucleico (NASBA) y otras técnicas de amplificación mediadas por transcripción; protocolos de presentación diferencial; análisis de transferencias de tipo Northern, ensayos ligados a enzimas, microalineamientos. Pueden encontrarse ejemplos de estas técnicas en, por ejemplo, PCR Protocols A Guide to Methods and Applications (Innis *et al.*, eds, Academic Press Inc. San Diego, Calif. (1990)).

En una realización particular, se mide la cantidad y/o la actividad de un producto de expresión indicador (por ejemplo, una proteína). Puede detectarse un marcador fluorescente, tal como EGFP, detectando su fluorescencia en la célula (por ejemplo, en un embrión de pez medaka de agua salobre). Por ejemplo, la fluorescencia puede observarse bajo un microscopio de fluorescencia. Se prefieren indicadores tales como EGFP, que pueden detectarse directamente sin requerir la adición de factores exógenos, para detectar o evaluar la expresión génica durante el desarrollo embrionario del pez. Un embrión de pez transgénico que porta un constructo recombinante de la invención que codifica para un indicador de EGFP puede proporcionar un sistema *in vivo* en tiempo real rápido para analizar patrones de expresión espacial y temporal de genes de hígado regulados en el desarrollo, y para determinar la presencia de un compuesto estrogénico.

El constructo recombinante de la presente invención puede clonarse en un vector adecuado. Entonces puede usarse el vector, por ejemplo, para propagar el constructo recombinante. En general, antes de introducir un constructo recombinante de la invención en un embrión de pez, es deseable retirar las secuencias del vector. Preferiblemente, el vector/constructo se diseña de modo que el constructo recombinante pueda extraerse con uno o dos enzimas de restricción apropiadas.

Los expertos en la técnica conocen grandes números de vectores adecuados y muchos están disponibles comercialmente. Los siguientes vectores se facilitan a modo de ejemplo: (i) vectores bacterianos, incluyendo pQE70, pQE60, pQE-9 (Qiagen), pBS, pD10, phagescript, psiX174, pBluescript SK, pBSKS, pNH8A, pNH16a, pNH18A, pNH46A (Stratagene), pTRC99a, pKK223-3, pKK233-3, pDR540, pRIT5 (Pharmacia); y (ii) vectores eucariotas, incluyendo pWLNEO, pSV2CAT, pOG44, pXT1, pSG (Stratagene) pSVK3, pBPV, pMSG, pSVL (Pharmacia). Sin embargo, puede usarse cualquier otro plásmido o vector siempre que pueda replicarse y ser viable en el huésped.

En un aspecto, la presente invención proporciona un método para detectar la actividad promotora en una célula de una secuencia de nucleótidos reguladora en 5' que responde a estrógenos de la presente invención. Esto puede realizarse en una célula eucariota introduciendo el constructo recombinante en la célula eucariota, y detectando la presencia y/o la actividad de la secuencia indicadora en la célula. Puede usarse una variedad de células eucariotas; las células adecuadas serán evidentes para el experto. En realizaciones particulares, la secuencia indicadora codifica para EGFP, y la célula eucariota está en o procede de un pez, tal como un pez medaka de agua salobre, o está en o procede de un embrión de pez medaka de agua salobre.

Se dispone de muchos métodos reconocidos en la técnica para introducir polinucleótidos, tales como los constructos

de la presente invención, en células. Los métodos convencionales que pueden emplearse, incluyen, por ejemplo, transfección (por ejemplo, mediada por DEAE-dextrano o precipitación con fosfato de calcio), infección a través de un vector viral (por ejemplo, vectores de retrovirus, adenovirus, virus adenoasociado, lentivirus, retrovirus seudotipado o poxvirus), inyección, tal como microinyección, electroporación, sonoporación, una pistola génica, presentación en liposomas (por ejemplo, Lipofectin®, Lipofectamine® (GIBCO-BRL, Inc., Gaithersburg, Md.), Superfect® (Qiagen, Inc. Hilden, Alemania) y Transfectam® (Promega Biotec, Inc., Madison, Wis.), u otros liposomas desarrollados según procedimientos convencionales en la técnica), o captación mediada por receptor y otros mecanismos de endocitosis.

Los métodos para introducir el constructo recombinante en un embrión de pez se comentan en más detalle en otra parte en el presente documento.

Tal como se usa en el presente documento, “pez transgénico” se refiere a un pez, o a la progenie de un pez, en el que se ha introducido un constructo recombinante exógeno. Un pez en el que se ha introducido un constructo incluye un pez que se ha desarrollado a partir de células embrionarias en las que se ha introducido el constructo. Tal como se usa en el presente documento, un constructo exógeno es un ácido nucleico que se introduce de manera artificial, o que se introdujo originalmente de manera artificial, en un animal. Se pretende que el término introducción artificial excluya la introducción de un constructo a través de la reproducción o cruces genéticos normales. Es decir, se pretende excluir la introducción original de un gen o rasgo en una línea o variedad de animal mediante fecundación cruzada.

Sin embargo, se considera que los peces producidos mediante transferencia, a través de fecundación normal, de un constructo exógeno (es decir, un constructo que se introdujo originalmente de manera artificial) de un pez que contiene el constructo, contiene un constructo exógeno. Tales peces son progenie del pez en el que se ha introducido el constructo exógeno. Tal como se usa en el presente documento, progenie de un pez es cualquier pez que sea descendiente del pez mediante reproducción sexual o clonación, y del que se haya heredado material genético. En este contexto, la clonación se refiere a la producción de un pez genéticamente idéntico a partir de ADN, una célula, o células del pez. El pez del que desciende otro pez se denomina pez progenitor. Tal como se usa en el presente documento, el desarrollo de un pez a partir de una célula o células (células embrionarias, por ejemplo), o el desarrollo de una célula o células en un pez, se denomina proceso de desarrollo mediante el cual células de huevo fecundado o células embrionarias (y su progenie) crecen, se dividen y se diferencian para formar un pez adulto.

En una realización, un pez transgénico de la presente invención es uno cuyas células somáticas y germinales contienen al menos una copia integrada genómicamente de un constructo recombinante de la invención. La invención proporciona además un gameto de pez transgénico, que incluye un óvulo o espermatozoide de pez transgénico, un embrión de pez transgénico, y cualquier otro tipo de célula o agrupación de células de pez transgénico, ya sea haploide, diploide, triploide o de otra cigosidad que tiene al menos una copia integrada genómicamente de un constructo recombinante de la presente invención.

Tal como se usa en el presente documento, el término “embrión” incluye una sola fase de huevo fecundado (es decir, un cigoto) del organismo. En particular, el constructo recombinante se integra en las células somáticas y germinales del pez de manera que es estable y heredable (se transmite de manera estable a través de la línea germinal). El pez o célula de pez transgénico contiene preferiblemente una multiplicidad de copias integradas genómicamente del constructo; más específicamente, las múltiples copias del constructo se integran en el genoma del organismo huésped en una orientación continua de cabeza con cola.

La progenie del pez transgénico que contiene al menos una copia integrada genómicamente del constructo, y el pez transgénico derivado de un huevo, esperma, embrión u otra célula de pez de un pez transgénico de la presente invención, también se incluye en la presente invención. Un pez se “deriva de” un huevo, espermatozoide, embrión u otra célula de pez transgénico si el huevo, espermatozoide, embrión u otra célula de pez transgénico contribuye en ADN al ADN genómico del pez. Por ejemplo, un embrión transgénico de la presente invención puede desarrollarse para dar un pez transgénico de la presente invención; un huevo transgénico de la presente invención puede fecundarse para crear un embrión transgénico de la presente invención que se desarrolla para dar un pez transgénico de la presente invención; un espermatozoide transgénico de la presente invención puede usarse para fecundar un huevo para crear un embrión transgénico de la presente invención que se desarrolla para dar un pez transgénico de la presente invención; y una célula transgénica de la presente invención puede usarse para clonar un pez transgénico de la presente invención. En algunas realizaciones de la presente invención, el pez transgénico es estéril. La presente invención incluye además una línea celular derivada de un embrión de pez transgénico u otra célula de pez transgénico de la presente invención, que contiene al menos una copia de un constructo recombinante de la presente invención. Los métodos de aislamiento de tales células y su propagación son convencionales.

En una realización, el pez transgénico dado a conocer de la presente invención se produce introduciendo un constructo recombinante de la presente invención en células de un pez, particularmente en células embrionarias, y más particularmente en un embrión de una sola célula. Cuando se introduce el constructo de transgén en células embrionarias, se obtiene el pez transgénico permitiendo que el embrión se desarrolle para dar un pez. La introducción de constructos en células embrionarias de un pez, y el posterior desarrollo del pez, se simplifican por el hecho de que los embriones se desarrollan fuera del pez parental.

Los constructos recombinantes dados a conocer pueden introducirse en células de peces embrionarias usando cualquier técnica adecuada. Se han demostrado muchas técnicas para tal introducción de material genético exógeno en peces y otros animales. Estas incluyen microinyección (descrita por, por ejemplo, Culp *et al.* (1991) Proc Natl Acad Sci USA 88, 7953-7957), electroporación (descrita por, por ejemplo, Inoue *et al.* (1990), Cell. Differ. Develop. 29, 123-128; Muller *et al.* (1993), FEBS Lett. 324, 27-32; Murakami *et al.* (1994), J. Biotechnol. 34, 35-42; Muller *et al.* (1992), Mol. Mar. Biol. Biotechnol. 1, 276-281; y Symonds *et al.* (1994), Aquaculture 119, 313-327), bombardeo con pistola de partículas (Zelenin *et al.* (1991), FEBS Lett. 287, 118-120), vectores retrovirales (Lu *et al.* (1997), Mol Mar Biol Biotechnol 6, 289-95), y el uso de liposomas (Szelei *et al.* (1994), Transgenic Res. 3, 116-119).

Los embriones o células embrionarias pueden obtenerse generalmente recogiendo huevos inmediatamente tras su puesta. Generalmente se prefiere que los huevos se fecunden antes o en el momento de la recogida. Esto se logra particularmente colocando juntos peces macho y hembra en un tanque que permite la recogida de huevos en condiciones que estimulan el apareamiento. Tras la recogida de los huevos, una técnica es exponer el embrión para la introducción de material genético retirando el corion. Esto puede realizarse manualmente o, en particular, usando una proteasa tal como pronasa. Una célula de huevo fecundando antes de la primera división celular se considera un embrión de una célula, y la célula de huevo fecundado se considera por tanto una célula embrionaria.

Tras la introducción del constructo de transgén, se permite que el embrión se desarrolle para dar un pez. Esto generalmente sólo consistirá en incubar los embriones en las mismas condiciones usadas para la incubación de los huevos. Sin embargo, las células embrionarias también pueden incubarse brevemente en un tampón isotónico. Si resulta apropiado, puede observarse la expresión de un constructo de transgén introducido durante el desarrollo del embrión.

El pez que alberga un transgén puede identificarse mediante cualquier medio adecuado. Por ejemplo, puede sondarse el genoma del posible pez transgénico para determinar la presencia de secuencias de constructo. Para identificar el pez transgénico que expresa realmente el transgén, puede someterse a ensayo la presencia de un producto de expresión. Se conocen y se usan varias técnicas para tal identificación para animales transgénicos y la mayoría pueden aplicarse a peces transgénicos. El sondaje de un pez transgénico posible o real para determinar las secuencias de ácido nucleico presentes en o características de un constructo de transgén puede llevarse a cabo mediante transferencia de tipo Southern o Northern. Además, la detección puede lograrse usando reacción en cadena de la polimerasa (PCR) u otras técnicas de amplificación de ácido nucleico específicas de secuencia.

Una vez identificados los peces transgénicos "fundadores", puede hacerse que se apareen con peces de tipo silvestre para identificar aquellos peces que comprenden el transgén en sus células germinales. Los peces transgénicos de la presente invención pueden ser o bien machos o bien hembras. Un pez transgénico de la presente invención puede ser homocigoto para el transgén, que es un estado particular para el mantenimiento de líneas de peces transgénicos. Alternativamente, peces homocigotos pueden cruzarse entre sí para producir peces o líneas de peces homocigotos. También pueden producirse diploides homocigotos mediante otros métodos, por ejemplo, interrupción de las segundas divisiones meióticas con presión hidrostática usando una prensa francesa.

Los constructos recombinantes dados a conocer pueden integrarse en el genoma del pez. Sin embargo, el constructo de transgén dado a conocer también puede construirse como un cromosoma artificial. Cromosomas artificiales de este tipo que contienen más de 200 kb se han usado en varios organismos. Los cromosomas artificiales pueden usarse para introducir constructos de transgén muy grandes en peces. Esta tecnología es útil puesto que puede permitir la recapitulación fiel del patrón de expresión de genes que tienen elementos reguladores que se encuentran a muchas kilobases de las secuencias codificantes.

En otra realización, la presente invención incluye una población idéntica genómicamente de peces transgénicos, cada una de cuyas células somáticas y germinales contiene al menos una copia integrada genómicamente de un constructo recombinante de la presente invención. La población idéntica genómicamente es una población unisex y puede ser macho o hembra. Las realizaciones particulares de la población de peces transgénicos idéntica genómicamente son esencialmente tal como se describe para el pez transgénico de la presente invención. En una realización alternativa, la presente invención incluye una población de peces transgénicos, es decir, una línea consanguínea, cuyos miembros no son necesariamente idénticos genómicamente pero son homocigotos con respecto a constructos integrados genómicamente.

La presente invención también se refiere a diversos métodos de uso del pez transgénico de la presente invención. En realizaciones particulares, estos métodos implican la detección de la presencia o ausencia de un compuesto estrogénico en un medio, particularmente en un medio líquido. Más particularmente, tales métodos se basan en la expresión inducida del gen indicador (también denominado en el presente documento la secuencia de nucleótidos indicadora) que está unido operativamente to una secuencia de nucleótidos reguladora en 5' que responde a estrógenos de la presente invención (tal como se describe en otra parte en el presente documento). En general, cuando un pez transgénico de la presente invención se expone a un compuesto estrogénico, la secuencia de nucleótidos reguladora en 5' que responde a estrógenos inducirá la expresión del gen indicador. La expresión del gen indicador da como resultado una marca observable en el pez transgénico, lo que indica la presencia de un compuesto estrogénico. Tal como se usa en el presente documento, una "sustancia o compuesto estrogénico" se refiere a un estrógeno o cualquier sustancia o compuesto similar a estrógeno.

Tal como se usa en el presente documento, un “medio líquido” puede referirse a varios líquidos diferentes. Por ejemplo, puede incluir una muestra de líquido o agua en la que se ha añadido una sustancia de prueba de interés. También puede incluir una muestra de líquido o agua en la que no se ha añadido una sustancia de prueba de interés. Los ejemplos particulares de un medio líquido adecuado para su uso en los métodos de la presente invención pueden incluir agua dulce, agua salobre y agua salada procedente de cualquier fuente de líquido o agua (por ejemplo, ríos, lagos, bahías, estanques, corrientes, océanos, etc.), ya sean estas fuentes naturales o artificiales.

Algunos de los diversos métodos de uso del pez transgénico de la presente invención se proporcionan en general a continuación y más específicamente se proporcionan en la sección de ejemplos del presente documento.

Un método de la presente invención se refiere a un método de examen de un medio líquido para una sustancia estrogénica. Este método implica exponer un pez transgénico de la presente invención a un medio líquido que va a someterse a prueba (es decir, que va a someterse a prueba para determinar la presencia de una sustancia estrogénica). Tras esta etapa de exposición, el método implica entonces determinar si el pez transgénico presenta o no una marca observable producida por la expresión inducida del gen indicador (contenido en el pez transgénico). La presencia de la marca observable indica que el medio líquido contiene una sustancia estrogénica.

En una realización de este método, la etapa de determinación puede incluir microscopía de autofluorescencia *in vivo*, donde el gen indicador codifica para una proteína autofluorescente indicadora.

En otra realización de este método, el método puede incluir además cuantificar la actividad similar a estrógenos de una sustancia de prueba que se ha identificado que es una sustancia estrogénica según la etapa de determinación, donde se identifica que la sustancia de prueba es una sustancia estrogénica si el pez transgénico presenta una marca observable.

En otra realización de este método, la etapa de cuantificación incluye (i) generar al menos una imagen de la marca observable; y (ii) someter la al menos una imagen de la marca observable a software de análisis de imágenes para cuantificar la intensidad de señal de la marca observable.

Otro método de la presente invención se refiere a un método de examen para un compuesto que tiene actividad antiestrogénica. Este método implica las etapas siguientes: (a) proporcionar un primer pez transgénico y un segundo pez transgénico de la presente invención, donde los peces transgénicos primero y segundo son de la misma especie y están sustancialmente en la misma fase de desarrollo; (b) exponer el primer pez transgénico a un primer medio líquido, donde el primer medio líquido incluye un estrógeno o compuesto similar a estrógeno; (c) exponer el segundo pez transgénico a un segundo medio líquido, donde el segundo medio líquido incluye el primer medio líquido y un compuesto de prueba; y (d) comparar la intensidad cuantificada de cualquier marca observable presentada por el primer pez transgénico con la intensidad cuantificada de cualquier marca observable presentada por el segundo pez transgénico, donde una disminución en la intensidad cuantificada de la marca observable en el segundo pez transgénico en comparación con la del primer pez transgénico indica que el compuesto de prueba tiene actividad antiestrogénica.

Otro método de la presente invención se refiere a un método para investigar el efecto de un compuesto estrogénico sobre la regeneración hepática. En general, este método implica realizar una hepatectomía parcial en un pez transgénico adulto de la presente invención, donde la hepatectomía parcial es eficaz para retirar una parte del hígado del pez transgénico; exponer el pez transgénico a un medio líquido de prueba que contiene un compuesto estrogénico de prueba; y analizar el hígado del pez transgénico para detectar cualquier regeneración de tejido hepático.

En una realización de este método, la etapa de análisis puede incluir comparar parámetros de regeneración hepática del pez transgénico tomados en las fases siguientes: (i) antes de la hepatectomía parcial; (ii) tras la hepatectomía parcial pero antes de la etapa de exposición; y (iii) tras la hepatectomía parcial y tras la etapa de exposición. Los parámetros de regeneración hepática adecuados pueden incluir, sin limitación, volumen del hígado, forma del hígado, peso del hígado y/o razón en peso del hígado con respecto al cuerpo. En un aspecto, la determinación de la presencia y/o la intensidad de la marca observable presentada por el pez transgénico es eficaz para ayudar en la medición de los parámetros de regeneración hepática. En una realización particular, los parámetros de forma del hígado y volumen del hígado se miden generando imágenes tridimensionales del hígado usando microscopía confocal combinada con software de análisis de imágenes.

Otro método de la presente invención se refiere a un método para investigar el efecto de diferentes compuestos estrogénicos sobre la regeneración hepática, en contraposición a investigar un solo compuesto estrogénico. En general, este método implica las etapas siguientes: (a) proporcionar un primer pez transgénico y un segundo pez transgénico de la presente invención, donde los peces transgénicos primero y segundo son adultos de la misma especie; (b) exponer el primer pez transgénico a un primer medio líquido que incluye una primera disolución de compuesto estrogénico de prueba; (c) exponer el segundo pez transgénico a un segundo medio líquido que comprende una segunda disolución de compuesto estrogénico de prueba; (d) cuantificar la intensidad de cualquier marca observable presentada por el primer pez transgénico y el segundo pez transgénico; (e) realizar una hepatectomía parcial en los peces transgénicos primero y segundo, donde la hepatectomía parcial es eficaz para

retirar una parte del hígado de los peces transgénicos primero y segundo; (f) repetir las etapas (b) a (d) de este método; y (g) analizar el hígado de los peces transgénicos primero y segundo para comparar los efectos de los compuestos estrogénicos contenidos en el primer medio líquido y el segundo medio líquido sobre cualquier regeneración de tejido hepático.

5 En una realización de este método, la etapa de análisis puede incluir comparar parámetros de regeneración hepática del pez transgénico tomados en las fases siguientes: (i) antes de la hepatectomía parcial; (ii) tras la hepatectomía parcial pero antes de la etapa de exposición; y (iii) tras la hepatectomía parcial y tras la etapa de exposición. Los parámetros de regeneración hepática adecuados pueden incluir, sin limitación, volumen del hígado, forma del hígado, peso del hígado, y/o razón en peso del hígado con respecto al cuerpo. En un aspecto, la determinación de la presencia y/o la intensidad de la marca observable presentada por el pez transgénico es eficaz para ayudar en la medición de los parámetros de regeneración hepática. En una realización particular, los parámetros de forma del hígado y volumen del hígado se miden generando imágenes tridimensionales del hígado usando microscopía confocal combinada con software de análisis de imágenes.

10 En otra realización de este método, el método puede incluir además separar hepatocitos que presentan marcas observables de otras células hepáticas que no presentan marcas observables, donde la separación se realiza usando citometría de flujo.

En otra realización de este método, el método puede incluir además realizar análisis metabólicos y proteómicos de hepatocitos del hígado de los peces transgénicos primero y segundo.

15 A continuación se facilitan realizaciones particulares de diversos aspectos de la presente invención, algunos de los cuales se han descrito anteriormente en general.

#### Clonación de gen de coriogenina H derivado de medaka de agua salobre

25 En una realización particular de la presente invención, el pez medaka de agua salobre que va a usarse en la clonación de un gen de coriogenina H (*omChgH*) y el pez medaka que va a usarse en la introducción del gen transgénico construido, no están limitados particularmente, siempre que pertenezcan a una especie *Oryzias melastigma* (nombre alternativo *Oryzias dancena*). Los peces medaka usados en esta realización de la presente invención se obtuvieron de un criadero comercial en Taiwán. Los peces medaka obtenidos pueden mantenerse en agua dulce, agua salobre, así como en agua de mar. En esta realización de la presente invención, los peces se mantuvieron en 30 ppt de agua de mar artificial a  $28 \pm 1^\circ\text{C}$  con un ciclo de luz constante de 14 h de luz/8 h de oscuridad y alimentados con alimento en copos libre de hormonas comercial y artemias (*Artemia salina*).

30 La región promotora del gen de coriogenina H que responde a estrógenos derivado de *Oryzias melastigma* usada en esta realización de la presente invención se captura tras paseos genómicos secuenciales en bibliotecas de ADN genómico con *Dra I* y *EcoR V* según las instrucciones del fabricante en el kit de paseo genómico (BD Biosciences).

35 En esta realización de la presente invención, la región flanqueante en 3' de coriogenina H incluye la región no traducida en 3' de coriogenina H (representada como UTR) y se aísla la secuencia de ADN genómico parcial en el sentido de 3'. Para clonar la secuencia genómica en el sentido de 3' de 3'-UTR, se identifica la estructura de exones-intrones de coriogenina H. El nucleótido genómico en el sentido de 3' de coriogenina H se aísla usando PCR (reacción en cadena de la polimerasa) inversa. Se aísla una secuencia de la región flanqueante en 3' de coriogenina H de aproximadamente 800 pb de la región terminal de transcripción y se deposita en GenBank con el n.º de registro DQ778335.

#### Construcción del plásmido de transgén

40 En una realización de la presente invención, la región promotora de coriogenina H derivada de *Oryzias melastigma* clonada mediante el método mencionado anteriormente, la secuencia de ADNc de EGFP (es decir, la secuencia de nucleótidos indicadora) y la región flanqueante en 3' de coriogenina H derivada de *Oryzias melastigma* clonada mediante el método mencionado anteriormente, o señal de poli(A) de otros genes, se introducen en un vector. La introducción de estas secuencias de nucleótidos en un vector puede realizarse según un procedimiento de modificación mediante ingeniería genética conocido. De este modo, es posible construir un vector recombinante en el que se insertan la región promotora de coriogenina H derivada de *Oryzias melastigma* unida con la región codificante de EGFP.

45 En esta y otras realizaciones de la presente invención, el vector que va a usarse no está limitado particularmente, siempre que la secuencia promotora, la secuencia codificante y la secuencia de señal de poli(A) se inserten operativamente.

#### Producción de peces transgénicos medaka de agua salobre

55 En un ejemplo, el plásmido de transgén recombinante construido tal como se mencionó anteriormente se linealiza y se transfiere al plasma de huevos fecundados de medaka de agua salobre, obteniendo así peces medaka de agua salobre transgénicos que pueden expresar la EGFP regulada por el promotor insertado de *omChgH* de manera

dependiente de estrógenos, igual que lo hace su omChgH interno. Como huevos fecundados de medaka de agua salobre que van a transferirse en esta y otras realizaciones de la presente invención, se usan embriones en fase de una célula en el plazo de media hora tras la fecundación. La secuencia de transgén recombinante puede transferirse a la única célula de los huevos fecundados por medio de microinyección.

5 Para obtener huevos de medaka de agua salobre en fase de una célula, puede usarse un sistema de tanque de apareamiento para separar los peces macho y hembra el día antes de la microinyección. Los peces macho y hembra se liberan retirando el separador del tanque de apareamiento antes de proceder a la microinyección. En una realización de la presente invención, los huevos fecundados que se han sometido a microinyección se crían a  $28 \pm 1^\circ\text{C}$  durante 2-3 meses hasta que se convierten en peces adultos.

10 Los peces adultos que tienen el gen introducido integrado en su genoma pueden examinarse mediante los métodos siguientes. Primero, los peces adultos se aparean con peces silvestres y se extrae el ADN de sus huevos. Entonces se amplifica el ADN extraído mediante PCR usando cebadores específicos de EGFP, y el producto amplificado se somete a electroforesis. Segundo, los peces adultos se aparean con peces silvestres. Se crían sus huevos hasta la eclosión y entonces se exponen a estrógenos o sustancias químicas similares a estrógenos durante la noche o más tiempo. Estas larvas se comprueban entonces bajo el microscopio de fluorescencia equipado con un filtro de GFP fijado para comprobar si hay expresión de GFP en el hígado. Mediante estos dos métodos, pueden identificarse satisfactoriamente peces medaka de agua salobre que tienen la secuencia de nucleótidos introducida integrada en el genoma de una célula germinal (espermatozoide u óvulo).

20 Posteriormente, los peces medaka de agua salobre que contienen la secuencia de nucleótidos introducida en el genoma de una célula germinal se aparean con peces de tipo silvestre. Su progenie hereda la secuencia de nucleótidos introducida y puede examinarse para determinar la secuencia de nucleótidos introducida mediante los dos métodos mencionados anteriormente. Estos peces pueden pasar el transgén de generación en generación. Los peces de este tipo incluyen un pez medaka de agua salobre transgénico deseado.

25 Sin ningún tratamiento, la expresión de la EGFP introducida en el medaka de agua salobre transgénico se restringe al hígado de las hembras reproductoras que sintetizan alta concentración de estrógenos, y no se observa expresión de EGFP en el hígado de embriones, larvas ni peces macho. Sin embargo, cuando el pez medaka de agua salobre transgénico se expone a estrógenos o sustancias químicas similares a estrógenos, también puede inducirse la expresión del transgén de EGFP en el hígado de embriones, larvas y peces macho. El perfil de expresión de la EGFP introducida concuerda con el perfil de expresión interna de omChgH en esta medaka de agua salobre (X. Chen *et al.* *Ectotoxicol. Environ. Saf.* 71:200-208 (2008)), excepto porque la proteína omChgH es una proteína secretora que se transportará al ovario a través de la circulación sanguínea tras su síntesis en el hígado, mientras que EGFP no es una proteína secretora y permanecerá en el hígado tras su síntesis. Como los peces hembra medaka de agua salobre transgénicos expresan EGFP sin ninguna inducción externa, preferiblemente se usan embriones, larvas y peces medaka de agua salobre transgénicos macho que no expresan EGFP para someter a prueba la actividad similar a estrógenos.

35 Debido a la alta translucencia del pez medaka de agua salobre durante la fase embrionaria y larvaria temprana, la respuesta del pez medaka de agua salobre transgénico a estrógenos o sustancias similares a estrógenos en estas fases puede observarse fácilmente *in vivo* usando un microscopio de fluorescencia. Las larvas en fase temprana (antes de 15 días tras la fecundación), que son las más translúcidas, constituyen una fase particularmente buena para someter a prueba la actividad similar a estrógenos *in vivo*. Además, si los peces medaka de agua salobre transgénicos tratados con estrógenos o compuestos químicos similares a estrógenos se transfieren a agua limpia, la señal de EGFP inducida desaparecerá gradualmente aproximadamente en una semana, y la EGFP puede volver a inducirse si el pez se coloca de nuevo en disolución que contiene estrógenos o sustancias químicas similares a estrógenos.

#### 45 Método de detección de la actividad similar a estrógenos

En un ejemplo, puede detectarse fácilmente si están o no presentes estrógenos o sustancias similares a estrógenos en una muestra de agua de prueba exponiendo el pez medaka de agua salobre transgénico de la presente invención al agua de prueba durante un periodo de tiempo y luego observando el pez transgénico expuesto bajo el microscopio de fluorescencia para comprobar si se induce expresión de EGFP en el hígado o no.

50 Tal como se usa en el presente documento, "agua de prueba" puede ser, pero no se restringe a, agua recogida del entorno (por ejemplo, un río, estuario, agua salobre, etc.), que puede contener una o más de una sustancia similar a estrógenos, o agua a la que se añade una sustancia (por ejemplo, productos farmacéuticos, productos cosméticos, productos alimenticios, etc.), que puede contener estrógenos o sustancias similares a estrógenos, o agua a la que se añade uno o más de un compuesto químico que va a someterse a prueba, que puede actuar por separado, o en combinación, como los estrógenos.

Cuando se somete a prueba un posible compuesto químico estrogénico o sustancia de mezcla, en una realización de la presente invención, las pruebas pueden realizarse en una serie de concentraciones, puesto que cada sustancia química tiene toxicidad variable así como una posible actividad similar a estrógenos; adicionalmente,

también es adecuado y útil incluir una exposición a estrógenos (E2) de concentración conocida como referencia para medir la actividad similar a estrógenos y calcular la equivalencia estrogénica de la sustancia química de prueba. La exposición del pez medaka de agua salobre transgénico al agua de prueba durante 1-2 días será lo suficientemente larga para la mayoría de las muestras. Las condiciones de exposición pueden ser iguales que las de criar el pez medaka de agua salobre.

Una ventaja de este método es que la actividad similar a estrógenos del agua de prueba puede cuantificarse midiendo la intensidad de señal de EGFP inducida en el hígado. Tras un tiempo de exposición apropiado, el pez expuesto al agua de prueba de actividad similar a estrógenos diferente expresará diversas cantidades de EGFP en el hígado, que pueden diferenciarse fácilmente mediante la observación bajo el microscopio de fluorescencia. En una realización, para cuantificar la señal de EGFP inducida, se registrará la imagen de fluorescencia del hígado que expresa EGFP usando una cámara conectada al microscopio de fluorescencia, y la intensidad de señal de EGFP en la zona del hígado puede analizarse mediante software de análisis de imágenes. Cuando también se incluye la exposición a estrógenos de concentración conocida como referencia, la actividad similar a estrógenos del agua de prueba puede convertirse en equivalente de la potencia estrogénica.

Como ejemplos del pez medaka de agua salobre transgénico que pueden usarse para monitorizar fácilmente la actividad similar a estrógenos de agua de prueba, este método puede usarse para examinar rápidamente posibles sustancias químicas estrogénicas, así como para evaluar la actividad similar a estrógenos combinada de mezclas químicas. Cuando se someten a prueba sustancias químicas por separado así como en combinación, puede predecirse el modo de acción de las sustancias químicas. Por ejemplo, algunas sustancias químicas pueden actuar de manera estrogénica y algunas pueden actuar de manera antiestrogénica. Cuando se someten a prueba juntas sustancias químicas del mismo modo de acción, por ejemplo, modo estrogénico, su actividad similar a estrógenos total será mayor que la de cualquiera de ellas sola. Sin embargo, cuando se mezclan entre sí sustancias químicas estrogénicas y anti-estrogénicas, la actividad similar a estrógenos final de la mezcla será menor que la de la sustancia química estrogénica.

#### Ventajas del sistema de detección del pez medaka de agua salobre transgénico

Los diversos aspectos de la presente invención proporcionan varias ventajas. Algunas de estas ventajas se describen a continuación y tales descripciones no pretenden incluir todas las ventajas.

En primer lugar, hay muchas ventajas en el uso del pez transgénico de la presente invención para detectar agentes o acontecimientos estrogénicos. El entorno acuoso es destino final para compuestos químicos naturales y antropogénicos (J.P. Sumpter, *Toxicol. Lett.* 102-103:337-342 (1998)). Los peces que habitan en el agua son modelos medioambientalmente relevantes para la evaluación de riesgos para la salud de los entornos acuáticos. Pese a la distancia evolutiva entre peces y seres humanos, los peces comparten la mayoría de las rutas de desarrollo, mecanismos fisiológicos y sistemas de órganos con los seres humanos (A.R. Cossins y D.L. Crawford, *Nature Rev. Genet.* 6:324-333 (2005)); y, por tanto, ocupan una posición prominente en el campo de la toxicología, el desarrollo así como los estudios biomédicos. Los peces son fáciles de manejar, manipular y observar, y están usándose cada vez más como un modelo animal no mamífero alternativo para reducir o reemplazar los modelos de mamíferos tradicionales en investigación y pruebas. Los peces, particularmente los peces pequeños tales como la medaka japonesa (*Oryzias latipes*) y el pez cebra (*Danio rerio*), se han usado ampliamente como especies modelo de laboratorio en diferentes campos de investigación. Los avances realizados con estos dos modelos de peces de acuario han conducido a la secuenciación completa de sus genomas (E. Ekker *et al.*, *Zebrafish* 4, 239-251 (2003); M. Kasahara *et al.*, *Nature*, 447:714-719 (2007)), y se han establecido numerosas variedades de peces transgénicos para estos dos modelos de investigación, varios de los cuales se han destinado a detectar actividad similar a estrógenos como lo hace la presente invención (T. Kawamura, *Zoolog. Sci.* 19(2): 1355-1361 (2002); T. Ueno *et al.*, *Mech. Dev.* 121(7-8):803-15 (2004); K. Kurauchi *et al.*, *Environ. Sci. Technol.* 39(8):2762-8 (2005); Z. Zeng *et al.*, *Environ. Sci. Technol.* 39(22):9001-8 (2005); T. Hano *et al.*, *Environ. Sci. Technol.* 41(4):1473-9 (2007); M.A. Salam *et al.*, *J Environ Sci Health A Tox Hazard Subst Environ Eng.* 43(3):272-7(2008); J. Legler *et al.*, *Environ. Sci. Technol.* 34:4439-4444 (2000); S.K. Tong *et al.*, *Genesis*, 47(2):67-73 (2009)).

En segundo lugar, resulta ventajoso usar un gen de proteína de fluorescencia como gen indicador, a través del cual puede monitorizarse la actividad similar a estrógenos mediante la medición *in vivo* de la expresión del gen indicador sin sacrificar el pez. De estas variedades transgénicas desarrolladas para detectar la actividad similar a estrógenos, 3 variedades usaron un gen indicador de proteína de fluorescencia (T. Ueno *et al.*, *Mech. Dev.* 121(7-8):803-15 (2004); K. Kurauchi *et al.*, *Environ. Sci. Technol.* 39(8):2762-8 (2005); Z. Zeng *et al.*, *Environ. Sci. Technol.* 39(22):9001-8 (2005)), y han demostrado su ventaja incomparable para la monitorización *in vivo*. Sin embargo, ninguna de estas variedades es lo suficientemente sensible para monitorizar la actividad similar a estrógenos de muestras de agua del entorno sin ningún procesamiento de la concentración.

En tercer lugar, el organismo huésped puede seleccionarse para proporcionar diversas ventajas. Por ejemplo, medaka de agua salobre (*Oryzias melastigma*) comparte la mayoría de las ventajas que tienen los modelos de laboratorio pez cebra (*Danio rerio*) y medaka japonesa (*Oryzias latipes*), mientras que posee la ventaja de desarrollarse en un entorno de salinidad variable que oscila entre agua dulce y agua de mar. La adaptabilidad a un amplio intervalo de salinidad hace de este pez un modelo universal para estudios tanto en agua dulce como en agua

de mar. Y estudios anteriores mostraron que las técnicas de investigación y los recursos de este nuevo modelo pueden adaptarse fácilmente a partir de modelos bien establecidos tales como el pez cebra y medaka japonesa (X. Chen *et al.*, Comp. Biochem. Physiol. C. Toxicol. Pharmacol. 149:647-655 (2009)).

5 En cuarto lugar, un gen específico de hígado dependiente de estrógenos, omChgH, se identifica y se usa en diversas realizaciones de la presente invención. omChgH es una proteína de la envuelta del huevo. El término “dependiente de estrógenos” usado en el presente documento significa que este gen sólo se expresa en presencia de estrógenos o de sustancias químicas similares a estrógenos. El término “específico de hígado” usado en el presente documento significa que la expresión de este gen se restringe exclusivamente al hígado, y no se da en ningún otro órgano. En circunstancias normales (en agua limpia sin ningún tratamiento), este gen sólo se expresa en hembras reproductoras cuando la concentración de estrógenos internos es alta, pero no en embriones, larvas ni peces macho (X. Chen *et al.* Ectotoxicol. Environ. Saf. 71:200-208 (2008)), en los que el nivel de estrógenos internos es casi indetectable. Sin embargo, en presencia de estrógenos o sustancias químicas similares a estrógenos externos, también puede inducirse que este gen se exprese en embriones, larvas y peces macho que no lo expresan. Por tanto, usando un gen de proteína de fluorescencia como marcador indicador regulado por el promotor de omChgH, la expresión inducida de gen de omChgH se representará como la proteína de fluorescencia en el hígado, lo que puede detectarse fácilmente bajo el microscopio de fluorescencia.

Tal como se indicó anteriormente, en un aspecto, la presente invención se refiere al desarrollo de un pez transgénico que contiene una secuencia de nucleótidos integrada genómicamente que comprende un gen de proteína de fluorescencia como marcador indicador regulado por un promotor que responde a estrógenos.

## 20 Ejemplos

Los siguientes ejemplos, aunque son a modo de ejemplo de la presente invención, no deben interpretarse como limitativos específicamente de la invención.

### EJEMPLO 1

#### DESARROLLO DE UN PEZ TRANSGÉNICO

##### 25 *Preparación de ADN genómico de medaka de agua salobre*

Se extrajo ADN genómico (representado como ADNg) de una hembra adulta con intestino disecado. Se trituró la muestra con la mano de un mortero en nitrógeno líquido para dar partículas pequeñas y se incubó con 10 ml de disolución de extracción de ADN (NaCl 150 mM, dodecilsulfato de sodio (SDS) al 0,5%, ácido etilendiaminetetraacético (EDTA) 25 mM, Tris-HCl 10 mM, pH 8,0) y proteinasa K al 1% a 45°C durante más de 4 h. Se añadió el mismo volumen de fenol a la disolución y se mezcló mediante rotación lenta durante 0,5 h. Tras centrifugación a 2.000 rpm durante 10 min, se transfirió la fase acuosa que contenía ADNg a un tubo Politron nuevo (50 ml) y se mezcló con el mismo volumen de fenol/cloroformo en un rotor durante 10 min. Entonces se centrifugó la disolución a 2.000 rpm durante 10 min, y se transfirió la fase acuosa a un nuevo tubo. Se purificó adicionalmente la disolución de ADNg mediante el mismo volumen de cloroformo seguido por centrifugación durante 5 min a 2.000 rpm. Se transfirió la fase acuosa a un nuevo tubo y se precipitó ADNg con mediante etanol absoluto. Se toma cuidadosamente ADNg usando puntas de transferencia, se disuelve en agua libre de nucleasa y se mantiene a -20°C.

##### *Clonación de la región promotora del gen de omChgH derivado de medaka*

Se capturó la región flanqueante en 5' del gen de coriogenina H tras dos rondas de paseo genómico según las instrucciones del fabricante (BD Biosciences). Se realizaron amplificaciones mediante PCR anidada usando dos cebadores específicos de adaptador (GW-AP1: 5'-GTAATACGACTCACTATAGGGC-3' (SEQ ID NO: 6), externo y GW-AP2: 5'-ACTATAGGGCACGCGTGGT-3' (SEQ ID NO: 7), interno; proporcionados en el kit) en combinación con dos cebadores específicos de gen antisentido (representados como GSP). Los GSP usados en el primer paseo genómico en la biblioteca de ADNg con *Dra* I fueron externo: 5'-AACGTGTTGAGGGTCCTGCGGCTTC-3' (SEQ ID NO: 8) e interno: 5'-CTGTGGATAGTATGGAGGGTATGGAACC-3' (SEQ ID NO: 9); y los GSP para el segundo paseo genómico en la biblioteca de ADNg con *Eco*RV se diseñaron basándose en el resultado del primer paseo genómico, y fueron externo: 5'-GTGTAATGGATGTGGACTTTTTCTATAAGACAACC-3' (SEQ ID NO: 10) e interno: 5'-CCCAAATGCATGTGCAGCTGATGGC-3' (SEQ ID NO: 11). Una reacción de PCR de 50 µl contenía 5 µl de 10x tampón PCR, 1 µl de dNTP (10 mM), 1 µl de GSP (10 µM), 1 µl de cebador adaptador (10 µM), 5 µl de biblioteca genómica ligada con adaptador diluida 1/50 (para PCR primaria) o producto de PCR primaria diluido 1/500 (para PCR secundaria) y 1 µl de 50x mezcla de polimerasa BD Advantage 2 (BD Biosciences). El perfil de amplificación para las PCR tanto primaria como secundaria consistió en 5 ciclos de 94°C durante 15 s y 72°C durante 3 min, 5 ciclos de 94°C durante 15 s y 70°C durante 3 min, y 25 ciclos de 94°C durante 15 s y 68°C durante 3 min. Se separaron los productos de la segunda PCR mediante electroforesis y se aisló la banda más nítida, se purificó usando gel Wizard® SV y el sistema PCR Clean-up (Promega), se clonó en el vector pGEM-T Easy (Promega) y se identificó mediante un servicio de secuenciación comercial (Tech Dragon).

##### *Clonación de la región flanqueante en 3' del gen de omChgH derivado de medaka de agua salobre*

Se realizó PCR inversa para clonar la región flanqueante en 3' de omChgH. Tras el análisis mediante endonucleasa de restricción de la secuencia de ADN genómico de la región codificante clonada (n.º de registro de GenBank EF392365) del gen de omChgH, se construyó una biblioteca de ADNg con *Nde* I mediante digestión con *Nde* I (Takara) seguido por ligación con ADN ligasa de T4 (Takara). Se diseñaron los cebadores directo (5'-GAAAATCTGTTTCATCATGGTTCAG-3') (SEQ ID NO: 12) e inverso (5'-TTCACAACCTGGTACCCTGTCCTGG-3') (SEQ ID NO: 13) cerca del extremo 3' de la región codificante de omChgH y en el sentido de 5' del sitio de corte de *Nde* I en 5', respectivamente. Se realizaron las reacciones en un volumen de 50 µl que contenía 5 µl 10x tampón de PCR, 1 µl de dNTP (10 µM), 1 µl de cada cebador (10 µM) y 1 µl de enzima *Taq* (5 U/µl; Takara). El perfil térmico de PCR consistió en una desnaturalización inicial a 95°C durante 4 min, seguido por 35 ciclos de 95°C durante 30 s, 60°C durante 30 s y 72°C durante 1 min. Se identificó el amplicón usando el mismo método que para la región flanqueante en 5' de omChgH.

#### Preparación de plásmidos transgénicos

Construcción de plásmidos omChgH5'-EGFP-olChgH3': En total se capturaron 6595 pb de la región en el sentido de 5' de coriogenina H (n.º de registro de GenBank EF392365) del sitio de inicio de la transcripción tras paseos genómicos secuenciales en bibliotecas de ADNg con *Dra* I y *Eco*R V. En esta realización, se usó el plásmido ChgH-GFP (K. Kurauchi *et al.*, Environ. Sci. Technol. 39(8):2762-8 (2005)) como vector. En este vector, se integraron la región flanqueante en 3' (representada como *olChgH3'*) y la región promotora (representada como *olChgH5'*) de coriogenina H derivada de medaka japonesa (*Oryzias latipes*), entre las que se ligó la región codificante de EGFP. Para un seguimiento más fácil, este vector se representa como *olChgH5'-EGFP-olChgH3'*. Tras el análisis de los sitios de restricción tanto del vector como de la región en el sentido de 5' de omChgH, se amplificó la región en el sentido de 5' de omChgH desde - 4827 hasta + 15 del sitio de inicio de la transcripción usando cebadores con sitios de restricción incorporados: Directo (5'-TGCATG GCATGC TTAATTAA CTGCAG CCCGGG GTCGAC TCGTACCTCCAAAACCCAAC-3') (SEQ ID NO: 14), los sitios de restricción con *Sph* I, *Pac* I, *Pst* I, *Sma* I y *Sal* I está subrayado secuencialmente) e inverso (5'-CTCCAGTGCCTTG **CCATGGT**-3') (SEQ ID NO: 15); el sitio con *Nco* I está subrayado y el codón de inicio de la traducción está en negrita). Se subclonó el fragmento de PCR fragmento en sitios de corte con enzimas de restricción *Sph* I y *Nco* I del vector *olChgH5'-EGFP-olChgH3'* para construir el plásmido omChgH5'-EGFP-olChgH3'.

Adicionalmente, también se construyeron dos mutantes de delección que contenían la región en el sentido de 5' de *omChgH* desde - 750 hasta + 15 y desde - 350 hasta +15 mediante amplificación por PCR y digestión enzimática, respectivamente, usando el plásmido omChgH5'-EGFP-olChgH3' como molde. Los cebadores usados para la amplificación con PCR fueron 5'-TCGACTGCAGTGTCTCACTCTATGGGGTTC-3' (SEQ ID NO: 16) (el sitio de *Pst* I está subrayado, directo) y 5'-CTCCAGTGCCTTG**CCATGGT**-3' (SEQ ID NO: 17) (el sitio de *Nco* I está subrayado, inverso). El amplicón reemplazó entonces la región de - 4827 de *omChgH5'* de *omChgH5'-EGFP-olChgH3'* en los sitios de *Pst* I y *Nco* I de omChgH5'-EGFP-olChgH3'. Se obtuvo el fragmento de - 350 de omChgH5'-EGFP-olChgH3' mediante digestión con *Xho* I y *Eco*R I de -4827 del plásmido omChgH 5'-EGFP-olChgH3'.

Construcción del plásmido *omChgH5'-EGFP-SV40*: Se amplificó la señal de poliadenilación de SV40 (representada como poliA de SV40) a partir del vector DsRed2-1 (Clontech) mediante los cebadores 5'-AGCTACTAGTCCATCTACATGGCCAAGAAG-3' (SEQ ID NO: 18) (directo) y 5'-ATTTTGCCGATTTTCGGCCTATTGGT-3' (SEQ ID NO: 19) (inverso), y se ligó al vector pGEM<sup>®</sup>-T Easy para la amplificación. Tras la digestión mediante *Not* I y *Eco*R I, poliA de SV40 reemplazó a la región *olChgH3'* en el plásmido omChgH5'-EGFP-olChgH3' para construir el plásmido omChgH5'-EGFP-SV40.

Construcción de los plásmidos omChgH5'-EGFP-omChgH3': Se clonó una secuencia de aproximadamente 800 pb de la región flanqueante en 3' de omChgH del extremo terminal de la transcripción (n.º de registro de GenBank DQ778335) mediante PCR inversa descrita anteriormente. Para la construcción de omChgH5'-GFP-omChgH3', se amplificó 3'-UTR de *omChgH* usando los cebadores directo (5'-TGCAGCGCCGCCTGTGAACCGACAGAAG-3') (SEQ ID NO: 20) con inverso (5'-CACGGATGTGTGTTTACC-3') (SEQ ID NO: 21), y se clonó la región flanqueante en 3' mediante los cebadores directo (5'-GAAAATCTGTTTCATCATGGTTCAG-3') (SEQ ID NO: 22) con inverso (5'-TTCACAACCTGGTACCCTGTCCTGG-3') (SEQ ID NO: 23). Entonces se ligaron 3'-UTR y la región flanqueante en 3' usando los kits de clonación BD In-Fusion<sup>™</sup> Dry-Down PCR (Clontech) según las instrucciones. Entonces se amplificó por PCR la región en el sentido de 3' del codón de terminación de la traducción de omChgH mediante los cebadores directo (5'-TGCAGCGCCGCCTGTGAACCGACAGAAG-3) (SEQ ID NO: 24) en combinación con inverso (5'-TTCACAACCTGGTACCCTGTCCTGG-3') (SEQ ID NO: 25). Entonces se ligó el amplicón en el vector pGEM<sup>®</sup>-T Easy para la amplificación. Entonces se subclonó esta secuencia en los sitios de *Not* I y *Eco*R I de los plásmidos omChgH5'-GFP-omChgH3' u omChgH5'-GFP-SV40 para formar los plásmidos omChgH5'-GFPomChgH3'.

#### Microinyección de embriones de peces

Se realizaron microinyecciones en embriones de peces de manera general según Kinoshita *et al.* (Aquaculture, 143(3-4): 267-276 (1996)) con modificaciones. Con el fin de maximizar la frecuencia de incorporación del transgén y reducir el grado de mosaicismo en los fundadores, se microinyectó disolución de transgén en el plasma de huevos fecundados en la fase de una célula. Para la recogida fácil de los huevos recién fecundados, se separaron un pez

macho y uno hembra en cada tanque de apareamiento mediante un separador el día antes de la microinyección. Antes de la microinyección, se retira el separador y pueden recogerse los huevos recién fecundados directamente del abdomen del pez hembra usando un cuentagotas de plástico. Se separaron los huevos entre sí usando dos pinzas finas agarrando filamentos de embriones y haciéndolos girar uno contra el otro. Se realizó la microinyección lo más rápido posible y se controló el tiempo rigurosamente en el plazo de 30 min tras la fecundación.

Se realizaron las inyecciones con la ayuda de un estereomicroscopio o microscopio compuesto, micromanipulador y un aparato de inyección presurizado con gas o aceite. Se mantuvieron los embriones en el intersticio de un soporte de cemento vítreo de fabricación propia sobre un portaobjetos de vidrio. Se linealizaron los constructos de ADN transgénico, se disolvieron en tampón fosfato 10 mM (pH 7,5) que contenía EDTA 1 mM, NaCl 137 nM, KCl 3 mM. Se inyectaron los fragmentos de ADN transgénico linealizados a una concentración que osciló entre 10 y 50 ng/μl.

#### *Actividad promotora de la región en el sentido de 5' de omChgH*

Para analizar una región responsable de la regulación del gen de omChgH, se inyectaron fragmentos que contenían tres tamaños diferentes que oscilaban entre 4827 pb y 350 pb de la región en el sentido de 5' de omChgH fusionada con el indicador del gen de EGFP en embriones de *O. melastigma* de una célula. Se observó la expresión transitoria de GFP en la mayoría de los embriones iniciada a los 3 días tras la inyección. Las eclosiones que sobrevivieron de los embriones con microinyección se expusieron a E2 5,1 nM durante 24 h, y se observó la expresión de GFP usando un estereomicroscopio de fluorescencia. Se calculó la incidencia de eclosiones que expresaban GFP para cada constructo (figura 1). Aunque el porcentaje de peces positivos para fluorescencia de GFP varió ligeramente, se sugirió que los constructos omChgH5'-EGFP-olChgH3' que contenían 4827 pb (-4827) y 758 pb (-758) de la región en el sentido de 5' del gen de omChgH, respectivamente, tenían la misma actividad en promover la expresión específica de hígado dependiente de estrógenos del gen de EGFP en el sentido de 3'. Sin embargo, se observó una disminución obvia de la actividad promotora desde -758 hasta -350 de constructos omChgH5'-EGFP-olChgH3', lo que sugiere la existencia de determinado(s) elemento(s) regulador(es) en *cis* ubicados desde -758 hasta -350 de la región en el sentido de 5' de omChgH. Mientras que la presencia de eclosiones positivas para GFP demostró que 350 pb de la región en el sentido de 5' de omChgH tenían la capacidad de regular la expresión específica de hígado dependiente de estrógenos de su gen en el sentido de 3'.

El análisis informático identificó posibles elementos en *cis* incluyendo la mitad de un sitio 5'-ERE (en la posición de nucleótido -18), un sitio de unión de C/EBP (en la posición de nucleótido -158) y un sitio de elemento de respuesta a estrógenos (ERE; en la posición de nucleótido -253) ubicados dentro de la región en el sentido de 5' de las primeras 350 pb, y otro sitio de unión de C/EBP (en la posición de nucleótido -494) entre la región de -758 y -350 del gen de omChgH, respectivamente. La actividad promotora demostrada mediante -350 del constructo omChgH5'-GFP-olChgH3' sugiere que algunos o los tres posibles elementos en *cis* identificados dentro de las primeras 350 pb de la región en el sentido de 5' son importantes para la regulación de la expresión específica de hígado dependiente de estrógenos del gen en el sentido de 3'. Mientras que la disminución obvia de la incidencia de eclosiones positivas para GFP desde -758 hasta -350 del constructo omChgH5'-GFP-olChgH3' indica que el sitio de unión de C/EBP en la posición de nucleótido -494 de omChgH es importante para la alta regulación en *cis* de la expresión específica de hígado dependiente de estrógenos del gen en el sentido de 3'.

#### *Efectos de regulación de la región flanqueante en 3' de omChgH*

Respecto a algunos genes (por ejemplo *vasa*, *nano*), la región flanqueante en 3' es indispensable para la estabilidad y la ubicación de sus ARNm (M. Tanaka *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 98(5): 2544-2549 (2001); M. Kopranner *et al.*, Genes Dev. 15(21):2877-2885 (2001); H. Kurokawa *et al.*, Dev. Growth Differ. 48(3):209-221 (2006)). En esta realización, se analizó la importancia de la región flanqueante en 3' homogénea en estudios transgénicos de omChgH. Se reemplazó olChgH3' del fragmento omChgH5'-GFPolChgH3' por poliA de SV40 y la región flanqueante en 3' de omChgH, respectivamente. Entonces se inyectaron estos fragmentos en embriones de *O. melastigma* de una célula y se llevó a cabo la observación de la expresión de GFP dependiente de estrógenos durante la fase de eclosión tal como se describió anteriormente y los resultados se resumen en la figura 2. Flanqueado por poliA de SV40, el fragmento de ADN de -4728 de omChgH5'-GFP demostró la capacidad para regular la expresión específica de hígado dependiente de estrógenos de fluorescencia de GFP, y la incidencia de eclosiones positivas para GFP fue incluso un poco mayor que cuando estaba flanqueada por olChgH3' pero menor que cuando estaba flanqueada por omChgH3'. Adicionalmente, también se observaron incidencias mayores de eclosiones positivas para GFP en -750 y -350 de constructos omChgH5'-GFP-omChgH3' que las de sus constructos omChgH5'-GFP-olChgH3' correspondientemente (figura 1). Esto indica fuertemente que la región flanqueante en 3' homogénea es importante para la alta actividad promotora de constructos transgénicos omChgH5'-GFP, y los posibles elementos identificados dentro de la región flanqueante en 3' pueden explicar la diferencia.

Además, los resultados mostraron que se observaba una actividad promotora similar entre -4728 y -758 de los constructos omChgH5'-GFPomChgH3', mientras que se observó una disminución obvia de la actividad promotora en -350 del constructo omChgH5'-GFP-omChgH3' (figura 1). Esto confirmó adicionalmente los resultados anteriores (figura 1) de que 350 pb de la región en el sentido de 5' de omChgH eran suficientes para regular la expresión específica de hígado dependiente de estrógenos de su gen en el sentido de 3', mientras que el sitio de unión de C/EBP en la posición de nucleótido -494 de omChgH potencia la actividad promotora.

*Identificación de peces transgénicos*

Se criaron embriones inyectados durante aproximadamente 2-3 meses hasta peces adultos. Entonces se aparearon estos fundadores (F0) con peces de tipo silvestre de manera individual. Se recogieron sus embriones para la extracción del ADN genómico usando el kit de extracción de ADN genómico Accuprep (Bionner, Corea), y se sometió a prueba la presencia del transgén de EGFP mediante PCR usando cebadores específicos de EGFP (directo: 5'-TGCTGCCCGACAACCACTACC-3' (SEQ ID NO: 26) e inverso: 5'-TTACTTGTACAGCTCGTCCATGC-3' (SEQ ID NO: 27)). Se recogieron más embriones de fundadores (F0) positivos para EGFP y se examinaron las progenies (F1) que portaban el transgén de EGFP mediante la marca de fluorescencia verde tras la exposición a estrógenos (17 $\beta$ -estradiol, 5,1 nM) durante la fase de eclosión. Los peces de F1 que expresaban EGFP en respuesta a estrógenos eran peces transgénicos de línea germinal estables que pueden transferir el transgén a sus progenies. En total se identificaron 11 peces transgénicos de línea germinal. Al exponerse a la misma concentración de estrógenos, se seleccionó la variedad de pez transgénico que mostró ser más sensible a estrógenos para el análisis en detalle.

*Expresión de EGFP transgénica*

Sin ningún tratamiento, la expresión de la EGFP introducida en el medaka de agua salobre transgénico se restringe a las hembras reproductoras que sintetizan alta concentración de estrógenos, y no se observa expresión de EGFP en el hígado de embriones, larvas ni peces macho (figura 3). Sin embargo, cuando el pez medaka de agua salobre transgénico se expone a estrógenos o sustancias químicas similares a estrógenos, también puede inducirse la expresión de EGFP en el hígado de embriones, larvas y peces macho (figura 3). El perfil de expresión de la EGFP introducida concuerda con el perfil de expresión interna de omChgH en esta medaka de agua salobre (X. Chen *et al.* *Ectotoxicol. Environ. Saf.* 71:200-208 (2008)), excepto porque la proteína omChgH es una proteína secretora que se transportará al ovario a través de la circulación sanguínea tras su síntesis en el hígado, mientras que EGFP no es una proteína secretora y permanecerá en el hígado tras su síntesis. Como los peces hembra medaka de agua salobre transgénicos expresan EGFP sin ninguna inducción externa, no es fácil diferenciar la expresión de EGFP interna e inducir EGFP mediante sustancias químicas similares a estrógenos. Sin embargo, los embriones, larvas y peces macho medaka de agua salobre transgénicos que no expresan EGFP, sirven como grandes candidatos para monitorizar la actividad similar a estrógenos, que se presenta como fluorescencia verde, especialmente de larvas recién eclosionadas, que nadan, no se alimentan y son en su mayor parte translúcidas, por lo que es la mejor fase para monitorizar la actividad similar a estrógenos.

## EJEMPLO 2

## EXPERIMENTOS DE EXPOSICIÓN A ESTRÓGENOS

En la técnica actual se establece un régimen de exposición generalizada. La figura 4 presenta un ejemplo de uso de larvas de pez transgénico para analizar la actividad similar a estrógenos de una disolución de prueba. La exposición de peces medaka de agua salobre transgénicos (preferiblemente peces lavara de saco vitelino) a disolución de prueba (que contiene estrógenos o sustancia estrogénicas) se realiza a 28°C. La exposición dura habitualmente 24-48 horas. Tras la exposición, los peces se depositarán en el lado interno de una cubierta de placa Petri en la que se deja una pequeña gota de disolución de prueba. La expresión inducida de EGFP en el hígado de los peces se observará bajo el microscopio de fluorescencia. Las larvas de saco vitelino son pequeñas, la exposición puede llevarse a cabo en utensilios como una placa de 96 pocillos, una placa de 24 pocillos, una placa Petri, etc. para ahorrar reactivos de prueba. Adicionalmente, las larvas recién eclosionadas constituyen la fase transparente, y la transparencia puede mantenerse hasta 15 días tras la eclosión. Tras 15 días, las larvas son cada vez menos transparentes debido al desarrollo de músculos. Las larvas de pez transgénico de 1 a 15 días tras la eclosión tienen sensibilidad a estrógenos similar (figura 5).

En respuesta a diferentes concentraciones de estrógenos o sustancias químicas similares a estrógenos, los peces transgénicos expresan una cantidad variable de proteína EGFP que se presenta como intensidad de señal de GFP variable bajo el microscopio de fluorescencia. La intensidad de señal de GFP aumenta con los estrógenos o sustancias químicas similares a estrógenos siempre que estas sustancias no alcancen la concentración para producir toxicidad letal. Para cuantificar la actividad similar a estrógenos de la disolución de prueba, se registra la imagen fluorescente del hígado de los peces usando una cámara conectada con el microscopio de fluorescencia. La intensidad de señal de GFP en el hígado puede medirse entonces usando algún software de análisis de imágenes tal como Metamorph (Universal Imaging). Para reducir la interferencia de la autofluorescencia de los peces, sólo se seleccionó la zona del hígado de los peces para el análisis. La intensidad de señal promedio de la zona marcada manualmente calculada usando el mismo software se consideró como la intensidad de señal de GFP. Pueden compararse fotos de hígado de peces registradas usando el mismo ajuste de parámetros de imagen usando directamente la intensidad de señal de GFP, pudiendo también comprarse las fotos registradas usando diversos ajustes de parámetros de imagen siempre que cada grupo contenga un control de referencia común.

Teniendo en cuenta que las muestras de agua del entorno y otros reactivos de prueba pueden tener valores de salinidad y pH variables, se investigaron los efectos de salinidad y pH diferentes sobre la sensibilidad de peces medaka de agua salobre transgénicos a estrógenos. Se usó agua de diferentes valores de pH (por ejemplo, 6,0, 7,0,

8,0 y 9,0) o diferentes salinidades (por ejemplo, < 5 ppt, agua dulce; 15 ppt, agua salobre; 30 ppt, agua marina común; y 35 ppt, agua marina de alta salinidad) como disolución de prueba, en la que se añadió la misma concentración de estrógenos (por ejemplo, 5,1 nM). Se expusieron peces medaka de agua salobre transgénicos recién eclosionados a estas disoluciones durante un periodo de tiempo (por ejemplo, 24 horas). Se registraron los hígados de los peces y se midió su intensidad de señal de GFP tal como se describió anteriormente. El análisis estadístico de la intensidad de señal de GFP en hígado inducida por estrógenos demostró que ni el pH diferente (que osciló entre 6,0 y 9,0; figura 6) ni la salinidad diferente (que osciló entre 0 y 35 ppt; figura 7) afectaron a la sensibilidad de este pez medaka de agua salobre transgénico para monitorizar la actividad similar a estrógenos.

### EJEMPLO 3

#### 10 ANÁLISIS DE LA ACTIVIDAD SIMILAR A ESTRÓGENOS

##### *Estrógenos naturales*

La estrona (E1), el 17 $\beta$ -estradiol (E2) y el estriol (E3) son estrógenos esteroideos naturales. Estos tres estrógenos pueden inducir la expresión de GFP en hígado en larvas de medaka de agua salobre transgénico de la presente invención a nivel de nM. De ellos, E2 se ha estudiado de manera intensiva, y se usa frecuentemente como estrógeno convencional para evaluar la actividad similar a estrógenos de reactivos de prueba. Usando larvas transgénicas de la presente invención, la señal de GFP inducida por E2 puede observarse habitualmente en el plazo de 24 horas, y la señal de GFP aumenta con la concentración creciente de E2. A concentraciones de E2 mayores (por ejemplo, 102 ó 1020 nM), la intensidad de señal de GFP inducida puede observarse incluso en el plazo de 4 horas tras el comienzo de la exposición, y la señal aumenta con el tiempo de exposición (figura 8), y alcanza la saturación en el plazo de 24 horas. A concentraciones de E2 bajas, sin embargo, se tardará más tiempo para que la señal de GFP inducida se acumule y llegue a ser detectable. Por tanto, exponiendo las larvas de pez medaka de agua salobre transgénico a diferentes concentraciones de E2 durante un periodo de tiempo (tal como 24 horas), obteniendo imágenes del hígado que expresa GFP, y midiendo luego la intensidad de señal de GFP en hígado inducida usando un software de análisis de imágenes, puede establecerse una curva patrón que correlaciona la intensidad de señal de GFP y la concentración de E2 (curva patrón de GFP-E2; figura 9). Usando el mismo régimen, y también incluyendo una exposición a concentración de E2 conocida como referencia, puede evaluarse entonces la actividad similar a estrógenos de reactivos de prueba como la potencia estrogénica equivalente refiriendo la señal de GFP en hígado inducida a la de la curva patrón de GFP-E2.

##### *Estrógenos sintéticos*

El 17 $\alpha$ -etinilestradiol (EE2) y el éter 3-metilico de etinilestradiol, los compuestos activos de píldoras anticonceptivas, son estrógenos sintéticos. EE2 se ha estudiado ampliamente y su actividad estrogénica es incluso más fuerte que la de E2 (K. Kurauchi *et al.*, Environ. Sci. Technol. 39(8):2762-8 (2005); J. Legler *et al.*, Environ. Technol. 36: 4410-4415 (2002); véanse la figura 9 y la figura 10). Exponiendo las larvas de pez transgénico a la misma concentración (por ejemplo en nM) de EE2 y éter 3-metilico de etinilestradiol durante el mismo periodo de tiempo (por ejemplo 24 horas), la señal de GFP en hígado inducida también es la misma entre EE2 y éter 3-metilico de etinilestradiol, que es más fuerte que la inducida por E2. La figura 10 representa la respuesta dependiente de la dosis de la señal de GFP en hígado de la presente invención a EE2.

##### *Fitoestrógenos de leche de soja*

La leche de soja contiene una alta concentración de fitoestrógenos tal como genisteína, genistina, daidzeína y daidzina. Se afirma que el consumo diario de leche de soja es bueno para la salud de los seres humanos, especialmente de mujeres peri- y posmenopáusicas, en muchos aspectos (E Lydeking-Olsen *et al.* Eur J Nutr. 43(4): 246-257 (2004); MS Kurzer. J Nutr. 133: 1983S-1986S (2003)). Puesto que los fitoestrógenos como la genisteína, genistina, daidzeína y daidzina son estrógenos débiles, los estudios anteriores con peces transgénicos intentaron detectar, pero no lo consiguieron, la actividad estrogénica de la genisteína (S Scholz *et al.* Environ Toxicol Chem. 24(10): 2553-2561 (2005)). Un estudio reciente encontró que la actividad similar a estrógenos de la genisteína pura o la genisteína en combinación con daidzeína no era tan fuerte como la de la leche de soja (G Rando *et al.* Toxicol Appl Pharmacol. 237(3): 288-297 (2009)). Puesto que los efectos farmacéuticos de la leche de soja dependen de su actividad similar a estrógenos, es importante medir la actividad similar a estrógenos de la leche de soja. Usando larvas de pez medaka transgénico de la presente invención, puede observarse una señal de GFP débil en el hígado tras exponer las larvas a estos cuatro fitoestrógenos por separado a altas concentraciones durante un periodo de tiempo (por ejemplo 48 horas). Para someter a prueba la actividad similar a estrógenos de la leche de soja, en primer lugar se extraerán los fitoestrógenos en la leche de soja según procedimientos establecidos. Brevemente, se liofiliza la leche de soja y se extraen sus fitoestrógenos usando metanol. Se evapora entonces el agua de la disolución de extracción hasta la sequedad y los fitoestrógenos vuelven a disolverse en metanol. Entonces pueden cuantificarse la concentración de cada fitoestrógeno mediante HPLC (cromatografía de alta resolución), y puede evaluarse fácilmente la actividad similar a estrógenos de los fitoestrógenos extraídos midiendo la intensidad de señal de GFP inducida en larvas de pez transgénico tras su exposición a su dilución en agua. Se encontró que diferentes marcas de leche de soja tienen actividad similar a estrógenos variable, y las actividades similares al estrógeno de la mayoría de las leches de soja son mayores que las de cualquiera de los cuatro fitoestrógenos solos (por ejemplo,

figura 11).

#### *Agentes de alteración endocrinos estrogénicos industriales*

El 4-nonifenol (NP) y el bisfenol A (BPA) son agentes de alteración endocrinos bien conocidos originados durante actividades industriales. Pueden imitar a los estrógenos para inducir la expresión de genes que responden a estrógenos tales como los genes del receptor de estrógenos, la vitelogenina y la coriogenina (C. Lee *et al.*, J Health Sci, 48(5): 441-445 (2002)). El estudio anterior también mostró que estos dos compuestos químicos pueden inducir la expresión de genes de coriogenina en el organismo huésped de la presente invención (*Oryzias melastigma*) (X. Chen *et al.* Ectoxicol. Environ. Saf. 71:200-208 (2008)). Se ha notificado la detección de NP (K. Kurauchi *et al.*, Environ Sci Technol, 39: 2762-2768 (2005)) y BPA (pero no de NP, Z. Zeng *et al.*, Environ Sci Technol, 39: 9001-9008 (2005)) usando peces transgénicos. Estos dos compuestos químicos también pueden inducir la expresión de GFP en el pez transgénico de la presente invención.

#### *Compuestos químicos estrogénicos cosméticos*

La benzofenona-3 (BP3), 3-(4'-metilbenciliden-alcanfor) (4-MBC), homosalato (HMS), octil-dimetil-PABA (OD-PABA), 4-terc-butil-4'-metoxidibenzoilmetano (BMDM) y octil-metoxicinamato (OMC) son los bloqueantes de UV usados más frecuentemente en cremas solares y cosméticos incluyendo barras de labios, lociones cutáneas, tintes capilares, champús y otros numerosos productos como moldeadores, tinta en chorro, neumáticos y material textil. En general, se añaden altos porcentajes de filtros UV (por ejemplo hasta el 10% para BP-3 y el 6% para 4-MBC, NR Janjua *et al.*, J Eur Acad Dermatol Venereol. 22(4):456-61 (2008)) en los productos y hay un uso creciente de combinaciones de diferentes filtros UV para absorber luz UVA, UVB y UVC. Los filtros UV entran en la sangre humana poco después de su aplicación (NR Janjua *et al.*, J Eur Acad Dermatol Venereol. 22(4):456-61 (2008)), y están presentes en la leche materna de mujeres que usaron productos que contienen filtros UV cosméticos (M Schlumpf *et al.*, Int J Androl, 31(2): 144-151 (2008)). Estudios recientes mostraron que muchos filtros UV presentan actividad estrogénica induciendo receptores de estrógenos (PY Kunz & K Fent. Toxicol Appl Pharmacol. 217(1): 86-99 (2006); PY Kunz & K Fent. Toxicol Appl Pharmacol. 234(1): 77-88 (2009)). Sin embargo, un estudio usando pez cebra transgénico no detectó la actividad similar a estrógenos de filtros UV (R Schreurs *et al.* Arch Toxicol. 76: 257-261 (2002)). Usando larvas de *O. melastigma* transgénicas de la presente invención, se encontró que BP-3 y 4-MBC pueden inducir expresión de GFP en el hígado tras algún periodo de exposición (por ejemplo 24 horas) a una concentración mayor de 0,65  $\mu\text{M}$ , y la actividad estrogénica de la mezcla de BP-3 y 4-MBC es significativamente mayor que la de estos dos compuestos por separado (figura 12). Aunque los compuestos BMDM, OMC, OD-PABA y HMS, no pueden inducir la expresión de GFP en el hígado de larvas de *O. melastigma* transgénicas, el agonismo estrogénico de BMDM, OMC y OD-PABA puede identificarse fácilmente mediante la exposición binaria con E2 (figura 13), y HMS puede potenciar la actividad estrogénica de  $17\beta$ -estradiol de manera dependiente de la dosis (figura 14).

#### EJEMPLO 4

##### ANÁLISIS DE LA ACTIVIDAD ANTIESTROGÉNICA

#### 35 *Almizcle policíclico*

La 6-acetil-1,1,2,4,4,7-hexametilтетralina (AHTN) es uno de los almizcles policíclicos usados más ampliamente. Este compuesto se usa como componente de fragancia en cosméticos y productos de limpieza domésticos. Según los informes de evaluación de riesgos de HERA en 2004, AHTN se produce en un volumen anual de 1000 a 5000 toneladas en una planta de los Países Bajos y RU, respectivamente. Según las evaluaciones de riesgos de HERA, AHTN no es tóxico para los seres humanos basándose en el consumo diario actual. Sin embargo, la distribución ubicua, la alta acumulación en el entorno (A Peck *et al.* Environ Sci Technol. 40: 5629-5635 (2006)), y la bioacumulación en organismos incluyendo los seres humanos (H Nakata *et al.* Environ Sci Technol. 41: 2216-2222 (2007); S Lignel *et al.* Environ Sci Technol. 42: 6743-6748 (2008)) aumentan la preocupación de los científicos. AHTN ha resultado ser un antagonista de estrógenos (RHMM Schreurs *et al.* Environ Sci Technol. 38: 997-1002 (2004); RHMM Schreurs *et al.* Toxicol Sci. 83: 264-272 (2005)). La actividad antagonista de estrógenos de AHTN también puede evaluarse muy fácilmente usando el pez medaka transgénico de la presente invención. Simplemente con la exposición de larvas de pez medaka transgénico a E2 (por ejemplo 0,04  $\mu\text{M}$ ) o E2 en combinación con AHTN (por ejemplo 5  $\mu\text{M}$ ) durante un periodo de tiempo (por ejemplo 24 horas), y luego la medición de la intensidad de señal de GFP inducida por E2 con/sin la presencia de AHTN. La señal de GFP más débil inducida por E2 en presencia de AHTN indica que este compuesto químico es un antagonista de estrógenos (figura 15).

#### EJEMPLO 5

##### APLICACIÓN DEL PEZ *ORYZIAS MELASTIGMA* TRANSGÉNICO PARA ESTUDIAR LA REGENERACIÓN HEPÁTICA

El hígado desempeña un papel fundamental en la homeostasis metabólica mediante el metabolismo, síntesis, almacenamiento y redistribución de nutrientes, hidratos de carbono, grasas y vitaminas. Al mismo tiempo, el hígado también es el principal órgano detoxificante del organismo a través de la eliminación de productos de desecho y xenobióticos mediante la conversión metabólica la excreción biliar. El hígado de los vertebrados superiores,

incluyendo los seres humanos, puede regular de manera precisa su crecimiento y su masa y posee alta capacidad para regenerarse tras una lesión. Un estudio reciente reveló que el hígado de los peces también se regenera tras hepatectomía parcial de una manera muy similar a la descrita para mamíferos (NG Kan *et al.* FASEB J. fj.09-131730v1 (2009)). Puesto que los peces comparten la mayoría de las rutas de desarrollo, mecanismos fisiológicos y sistemas de órganos con los seres humanos (AR Cossins y DL Crawford. Nature Rev Genet. 6: 324-333 (2005)), usar un pez como organismo modelo para la estudios de regeneración hepática puede ayudar a comprender los mecanismo moleculares y celulares que subyacen a la regeneración hepática. El uso del pez *O. melastigma* transgénico de la presente invención, que contiene el marcador de GFP para hepatocitos en respuesta a agentes de alteración endocrinos estrogénicos, será muy útil para revelar los efectos de diferentes agentes de alteración endocrinos estrogénicos sobre la regeneración hepática.

Las lesiones producidas por hepatectomía parcial de un lóbulo completo, un lóbulo parcial y pequeñas cirugías por raspado se realizan usando protocolos empleados en el estudio de regeneración hepática previo en el pez cebra (NG Kan *et al.* FASEB J. fj.09-131730v1 (2009)). Para estudiar la regeneración hepática, se usará un pez adulto transgénico de la presente invención. Brevemente, se priva de comida a un pez medaka adulto durante un día y se le anestesia con disolución de triclaína al 0,015% antes de la cirugía. Entonces se abre el cuerpo ventral del pez mediante una incisión de 3-4 mm y se extrae cuidadosamente el lóbulo ventral del hígado de la cavidad peritoneal y se extirpa por la base del lóbulo con especial cuidado. Para la resección de lóbulo parcial y las cirugías por raspado de superficie, se expone el lóbulo ventral y se introduce un pequeño trozo de tejido del extremo del hígado o se introduce un pequeño raspado usando pinzas afiladas. Entonces se coloca de nuevo el hígado restante cuidadosamente en la cavidad peritoneal y se cierra la pared corporal con GLUture (Abbott Laboratories). Entonces se coloca el pez en agua dulce para su recuperación. También se someten peces tratados de manera simulada a mismo procedimiento excluyendo la resección del hígado.

Para analizar los efectos de los agentes de alteración endocrinos sobre el proceso de regeneración hepática, se tratará al pez con/sin E2 u otro(s) agente(s) de alteración endocrino(s). Se registran parámetros tales como el peso del pez completo y del hígado, y también se registra la forma del hígado dependiendo de su señal de GFP usando un microscopio confocal, y puede medirse su volumen usando software de análisis de imágenes (por ejemplo Metamorph, Universal Imaging).

También se investigan los cambios en la morfología del hígado durante la regeneración hepática. Se deseca el hígado de los peces en diferentes fases de la regeneración y se fija en paraformaldehído (PFA) al 4%/solución salina tamponada con fosfato (PBS) a 4°C durante la noche, se lava con PBS que contiene Tween 20 al 0,1%, se sumerge previamente en medio O.C.T. (Tissue Tek) durante dos horas y luego se embebe en O.C.T. y se congela a -80°C durante más de 3 h antes de cortarse a un grosor de 10 µM usando un criostato Leica. Se realiza la tinción inmunohistoquímica de los cortes según protocolos convencionales. Se incluyen anticuerpos tales como anticuerpo anti-antígeno nuclear de células en proliferación (PCNA), anticuerpo anti-proxl, anticuerpo anti-β-catenina y anticuerpo anti-tubulina.

También se investigan la alteración metabólica y proteómica de los hepatocitos del hígado para comprender la regeneración hepática y los efectos de agentes de alteración endocrinos sobre los mecanismos de regeneración hepática. Se anestesia profundamente a peces que se recuperan de una hepatectomía parcial con disolución de triclaína y se desecan los hígados y se incuban en disolución al 0,25% de tripsina/PBS durante 5 min. Se tritura el hígado hasta obtener una suspensión de células individuales pipeteando suavemente y se recoge mediante centrifugación (1000 g, 7 min). Se procesa la suspensión celular para citometría de flujo y se recogen los hepatocitos marcados con GFP y se realiza extracción de proteínas según un protocolo de proteínas convencional. Entonces se separan las proteínas extraídas usando geles NuPAGE Novex Bis-Tris (Invitrogen) a 200V durante 15 min, y se tiñen con kit Colloidal Blue (Invitrogen). Se cortan las bandas de proteínas y se elimina la tinción con disolución de eliminación de tinción (el 60% de agua, el 30% de metanol y el 10% de ácido acético). Tras secarse en un dispositivo Speed Vac (Savant), se digiere el gel con el kit Trypsin Profile IGD (Sigma). Los digestos de proteína sometidos a tripsinización se secan mediante el dispositivo Speed Vac y se resuspenden en ácido fórmico al 0,1% en agua. Se analizan los péptidos mediante HPLC-EM/EM (HPLC: cromatografía de líquidos de alta resolución, sistema DIONEX Ultimate 300; EM/ES: espectrometría de masas en tándem, BRUKER MicrOTOF-QII). Adicionalmente, se emplea la técnica iTRAQ (marcaje isobárico para cuantificación relativa y absoluta) para el análisis cuantitativo de las proteínas. El análisis iTRAQ se lleva a cabo según el protocolo de Nature Protocol publicado (RY Tweedie-Cullen y M Livingstone-Zatchej. Nat Proc. DIO: 10.1038/nprot.2008.89 (2008)). Como técnica de apoyo, también se usa electroforesis en gel por diferencia de fluorescencia bidimensional (2-D DIGE) para analizar los cambios proteómicos de los hepatocitos durante la regeneración hepática. Este análisis se realiza según un protocolo de Nature Protocol (NS Tannu y SE Hemby. Nat Protoc. 1(4): 1732-1742 (2006)).

A partir de lo anterior, aunque se han representado y descrito realizaciones específicas en detalle en el presente documento, resulta evidente para los expertos en la técnica relevante que pueden realizarse diversas modificaciones, adiciones, substituciones, y similares sin apartarse del espíritu de la invención y por tanto se considera que están dentro del alcance de la invención tal como se define en las reivindicaciones que siguen.

BIBLIOGRAFÍA

A continuación se facilita una lista de la bibliografía citada en el presente documento:

- Legler J, Van den Brink CE, Brouwer A, Murk AJ, Van der Saag PT, Vethaak AD, Van der Burg B. Development of a stably transfected estrogen receptor-mediated luciferase reporter gene assay in the human T47D breast cancer cell line. *Toxicol Sci*, 1999, 48: 55-66.
- 5 Chen X, Li VW, Yu RM, Cheng SH. Choriogenin mRNA as a sensitive molecular biomarker for estrogenic chemicals in developing brackish medaka (*Oryzias melastigma*). *Ecotoxicol Environ Saf*, 2008, 71: 200-208.
- Chen X, Li L, Wong CKC, Cheng SH. Rapid adaptation of molecular resources from zebrafish and medaka to develop an estuarine / marine model. *Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol*, 2009, 149: 647-655.
- 10 Ekker SC, Stemple DL, Clark M, Chien CB, Rasooly RS, Javois LC. Zebrafish genome project: bringing new biology to the vertebrate genome field. *Zebrafish*, 2007, 4: 239-251.
- Kasahara M, Naruse K, Sasaki S, Nakatani Y, Qu W, Ahsan B, Yamada T, Nagayasu Y, Doi K, Kasai Y, Jindo T, Kobayashi D, Shimada A, Toyoda A, Kuroki Y, Fujiyama A, Sasaki T, Shimizu A, Asakawa S, Shimizu N, Hashimoto S, Yang J, Lee Y, Matsushima K, Sugano S, Sakaizumi M, Narita T, Ohishi K, Haga S, Ohta F, Nomoto H, Nogata K, Morishita T, Endo T, Shin IT, Takeda H, Morishita S, Kohara Y. The medaka draft genome and insights into vertebrate genome evolution. *Nature*, 2007, 447: 714-719.
- 15 Inoue K, Takei Y. Diverse adaptability in oryzias species to high environmental salinity. *Zool Sci*, 2002, 19: 727-734.
- Naruse K. Classification and phylogeny of fishes of the genus *Oryzias* and its relatives. *Fish Biol J Medaka*, 1996, 8: 1-9.
- Ozato K, Kondoh H, Inohara H, Iwamatsu T, Wakamatsu Y, Okada TS. Production of transgenic fish: introduction and expression of chicken  $\delta$ -crystallin gene in *medaka* embryos. *Cell Differ*, 1986, 19: 237-244.
- 20 Inoue K, Ozato K, Kondoh H, Iwamatsu T, Wakamatsu Y, Fujita T, Okada TS. Stage-dependent expression of the chicken  $\delta$ -crystallin gene in transgenic fish embryos. *Cell Differ Dev*, 1989, 27: 57-68.
- Inoue K, Yamashita S, Hata J, Kabeno S, Asada S, Nagahisa E, Fujita T. Electroporation as a new technique for producing transgenic fish. *Cell Differ Dev*, 1990, 29(2): 123-128.
- 25 Tamiya E, Sugiyama T, Masaki K, Hirose A, Okoshi T, Karube I. Spatial imaging of luciferase gene expression in transgenic fish. *Nucleic Acids Res*, 1990, 18(4): 1072.
- Lu JK, Chen TT, Chrisman CL, Andrisani OM, Dixon JE. Integration: expression, and germ-like transmission of foreign growth hormone genes in medaka (*Oryzias latipes*). *Mol Mar Biol Biotechnol*, 1992, 1(4/5): 366-375.
- 30 Tsai HJ, Wang SH, Inoue K, Takagi S, Kimura M, Wakamatsu Y, Ozato K. Initiation of the transgenic lacZ gene expression in medaka (*Oryzias latipes*) embryos. *Mol. Mar Biol Biotechnol*, 1995, 4(1): 1-9.
- Winn RN, Van Beneden RJ, Burkhart JG. Transfer, Methylation and Spontaneous Mutation Frequency of  $\Phi$ X174am3cs70 sequences in Medaka (*Oryzias latipes*) and Mummichog (*Fundulus heteroclitus*): Implications for Gene Transfer and Environmental Mutagenesis in Aquatic Species. *Marine Environ Res*, 1995, 40(3): 247-265.
- Cossins AR, Crawford DL. Fish as models for environmental genomics. *Nature Rev Genet*, 2005,6:324-333.
- 35 Sumpter JP. Xenoendocrine disrupters-environmental impacts. *Toxicol Lett*, 1998, 102-103: 337-342.
- Kawamura T, Sakai S, Omura S, Hori-e R, Kawahara T, Kinoshita M, Yamashita I. Estrogen inhibits development of yolk veins and causes blood clotting in transgenic medaka fish over expressing estrogen receptor. *Zoolog Sci*, 2002, 19(12): 1355-61.
- 40 Ueno T, Yasumasu S, Hayashi S, Iuchi I. Identification of choriogenin cis-regulatory elements and production of estrogen-inducible, liver-specific transgenic Medaka. *Mech Dev*, 2004, 121(7-8): 803-15.
- Kurauchi K, Nakaguchi Y, Tsutsumi M, Hori H, Kurihara R, Hashimoto S, Ohnuma R, Yamamoto Y, Matsuoka S, Kawai S, Hirata T, Kinoshita M. In vivo visual reporter system for detection of estrogen-like substances by transgenic medaka. *Environ Sci Technol*, 2005, 39(8): 2762-8.
- 45 Zeng Z, Shan T, Tong Y, Lam SH, Gong Z. Development of estrogen-responsive transgenic medaka for environmental monitoring of endocrine disrupters. *Environ Sci Technol*, 2005, 39(22): 9001-8.
- Hano T, Oshima Y, Kinoshita M, Tanaka M, Mishima N, Ohyama T, Yanagawa T, Wakamatsu Y, Ozato K, Honjo T. Quantitative bioimaging analysis of gonads in olvas-GFP/ST-II YI Medaka (transgenic *Oryzias latipes*) exposed to ethinylestradiol. *Environ Sci Technol*, 2007, 41(4): 1473-9.

- Salam MA, Sawada T, Ohya T, Ninomiya K, Hayashi S. Detection of environmental estrogenicity using transgenic medaka hatchlings (*Oryzias latipes*) expressing the GFP-tagged choriogenin L gene. *J Environ Sci Health A Tox Hazard Subst Environ Eng*, 2008, 43(3): 272-7.
- 5 Legler J, Broekhof JLM, Brouwer A, Lanser PH, Murk AJ, van der Saag PT, Vethaak AD, Wester P, Zivkovic D, van der Burg B. A novel *in vivo* bioassay for (xeno-)estrogens using transgenic zebrafish. *Environ Sci Technol*, 2000, 34: 4439-4444.
- Legler J, Zeinstra LM, Lanser PH, Bogerd J, Brouwer, Vethaak ADVoogt PD, Murk AJ, van der Burg B. Comparison of *in vivo* and *in vitro* reporter gene assay for short-term screening of estrogenic activity. *Environ Sci Technol*, 2002, 36: 4410-4414.
- 10 Tong SK, Mouriec K, Kuo MW, Pellegrini E, Gueguen MM, Brion F, Kah O, Chung BC. A *cyp19a1b-gfp* (aromatase B) transgenic zebrafish line that expresses GFP in radial glial cells. *Genesis*, 2009, 47(2): 67-73.
- Kinoshita M, Toyohara H, Sakaguchi M, Inoue K. A stable line of transgenic medaka (*Oryzias latipes*) carrying the CAT gene. *Aquaculture*, 1996, 143 (3-4): 267-276.
- 15 Tanaka M, Kinoshita M, Kobayashi D, Nagahama Y. Establishment of medaka (*Oryzias latipes*) transgenic lines with the expression of green fluorescent protein fluorescence exclusively in germ cells: A useful model to monitor germ cells in a live vertebrate. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2001, 98 (5): 2544-2549.
- Kopranner M, Thisse C, Thisse B, Raz E. A zebrafish *nanos*-related gene is essential for the development of primordial germ cells. *Genes Dev*, 2001, 15 (21): 2877-2885.
- 20 Kurokawa H, Aoki Y, Nakamura S, Ebe Y, Kobayashi D, Tanaka M. Time-lapse analysis reveals different modes of primordial germ cell migration in the medaka *Oryzias latipes*. *Dev Growth Differ*, 2006, 48 (3): 209-221.
- Lee C, Jeon SH, Na JG, Choi YJ, Park K. Sensitive of mRNA expression of vitellogenin, choriogenin and estrogen receptor by estrogenic chemicals in medaka *Oryzias latipes*. *J Health Sci*, 2002, 48(5): 441-445.
- Janjua NR, Kongshoj B, Andersson AM, Wulf HC. Sunscreens in human plasma and urine after repeated wholebody topical application. *J Eur Acad Dermatol Venereol*, 2008, 22(4): 456-61.
- 25 Schlumpf M, Durrer S, Faass O, Ehnes C, Fuetsch M, Gaille C, Henseler M, Hofkamp L, Maerkel K, Reolon S, Timms B, Tresguerres JA, Lichtensteiger W. Developmental toxicity of UV filters and environmental exposure: a review. *Int J Androl*, 2008, 31(2): 144-51.
- Kunz PY, Fent K. Estrogenic activity of UV filter mixtures. *Toxicol Appl Pharmacol*, 2006, 217(1): 86-99.
- 30 Kunz PY, Fent K. Estrogenic activity of ternary UV filter mixtures in fish (*Pimephales promelas*) - an analysis with nonlinear isobolograms. *Toxicol Appl Pharmacol*, 2009, 234(1): 77-88.
- Peck AM, Linebaugh EK Hornbuckle KC. Synthetic musk fragrances in Lake Erie and Lake Ontario sediment ores. *Environ Sci Technol*, 2006, 40: 5629-5635.
- Lignell S, Darnerud P, Aune M, Cnattingius S, Hajslova J, Setkova L, Glmn A. Temporal trends of synthetic musk compounds in mother's milk and associations with personal use of perfumed products. *Environ Sci Technol*, 2008, 42: 6743-6748.
- 35 Kurzer MS. Phytoestrogen supplement use by women. *J Nutr*, 2003, 133: 1983S-1986S.
- Lydeking-Olsen E, Beck-Jensen JE, Setchell KD, Holm-Jensen T. Soymilk or progesterone for prevention of bone loss--a 2 year randomized, placebo-controlled trial. *Eur J Nutr*, 2004, 43(4): 246-57.
- 40 Rando G, Ramachandran B, Rebecchi M, Ciana P, Maggi A. Differential effect of pure isoflavones and soymilk on estrogen receptor activity in mice. *Toxicol Appl Pharmacol*, 2009, 237(3): 288-97.
- Kan NG, Junghans D, Izipisua Belmonte JC. Compensatory growth mechanisms regulated by BMP and FGF signaling mediate liver regeneration in zebrafish after partial hepatectomy. *FASEB J*, 2009. fj.09-131730v1.
- Cossins AR, Crawford DL. Fish as models for environmental genomics. *Nature Rev Genet*, 2005,6:324-333.
- 45 Tweedie-Cullen RY, Livingstone-Zatchej M. Quantitative analysis of protein expression using iTRAQ and mass spectrometry. *Nat Protoc*, 2008, DIO: 10.1038/nprot.2008.89.
- Tannu NS, Hemby SE. Two-dimensional fluorescence difference gel electrophoresis for comparative proteomics profiling. *Nat Protoc*, 2006, 1(4): 1732-1742.

#### Lista de secuencias

ES 2 658 267 T3

<110> UNIVERSIDAD DE LA CIUDAD DE HONG KONG  
 CHENG, Shuk Han  
 CHEN, Xue Ping

5 <120> PEZ TRANSGÉNICO Y USOS DEL MISMO

<130> H84-B-35052 EP

<150> Documento US 12/730.956

10 <151> 24-03-2010

<160> 27

<170> PatentIn versión 3.5

15

<210> 1

<211> 8455

212> ADN

213> *Oryzias melastigma*

20

<400> 1

gaattcacta	gtgattacta	tagggcacgc	gtggctcgacg	gcccgggctg	gtatcgtgag	60
ccatgtatcg	cgtatcgtat	cgtatcgtga	ggtaccagc	gattcccagc	cctaataatt	120
atggcctaaat	actatatatg	tagaaatcta	actgttgtta	aaaagccag	agttttttta	180
atcttcacaa	agaaattggt	ttgcaaatta	atgaaaatcc	aatgcaaaag	ctgttaggac	240
agtcgaagcc	tggacttggt	tggcatcata	ttttattatt	attattatga	ttcctttctt	300
ttgttacc	ctggcaagtt	catatcaatt	attctgtaat	tctcggatt	ggatcattta	360
ttctttatat	gtgctacatt	ttgacaaaa	aaaatcgata	ttatgaacat	tataccttta	420
caaatctggt	ttacacatct	cctgatttta	caaagaaaat	attatactaa	ttaaactaaa	480
tgtagtata	aagctccaaa	tttatttggt	ttattttccc	aatccatca	ttatttacia	540
tatttcattt	tgtccaaaca	caaaaataaa	gtttcacaac	tagatagatt	atcatgattt	600
tacctctggt	tttttttttt	caattttttt	cctataataa	ctaccaggc	gtttatcttg	660
aaaaattagt	tattgttctg	tgttctgttc	tacataagag	gattaaggcc	atggaggaat	720
taaacgggta	tggataattc	taagttaaa	gtcagaattc	tgactttttt	ttcctcggaa	780
ttctgacttt	tttcccagaa	ttctggcctt	ttatatattt	tttagaaaga	tttagaaaca	840
tattaaattt	cttactgcta	catttcatct	cgtacctcca	aaaccaaca	tattttgtct	900
ataaagggtg	agcttaaaaa	tatatatttt	ttcaattaa	agaaaataac	tgaaaaactg	960
gaatttaatc	ttaaaactac	caagaagtta	tctatttaat	cattatgttt	acattcaagt	1020
cgtcttaggg	ccacaaggta	cttagccttt	gctgttattt	acaagacga	caatttaagt	1080
gtatgaagtg	atctttataa	atcagtcaaa	tatatttttt	taaagcact	cattcccctt	1140
tggcagcaag	ttgtggcgaa	aatcctttat	aatcttcaaa	ttacaagtat	gaacaatatt	1200
gtttccttta	aaacaattag	cagtctaadc	atcttctata	atatgaaagt	tcatatctta	1260
tgtagttgaa	aagtgtgcta	tttttgtaat	tgtatttctt	tttatatatt	ttgcatttag	1320
tgaactactg	cattaactag	cttgaatac	ttttcgcatt	gtgtctctca	taaaaaatat	1380

ES 2 658 267 T3

agatatggtt atttaaaaa atgcgtttac tcttaattgt tgccttttgg agtaaaatth 1440  
 tatgcttttg tctgtattgc ctttttgaca ttcagaagag gatgcttctg tatgacggcg 1500  
 tattaaggcc ttgagggtat catgtctgtg gtgtgactga atgattacat tgatgctgth 1560  
 ttacactttg aaaatcacca tttgaaacca agttttgtct cacaattgca tcaaacagaa 1620  
 aaaaaacat caaagcaagc taattgaatg ttgattggth taatccaagt cttacagth 1680  
 tattccacct gagtctagat gattctaaca gattgthtga ctgttgthca aatgatccta 1740  
 catgaatgca agtccaaagc aagataaatg ctctttctct tcaaattgatt tgacattaat 1800  
 ctttccctaa aattttattat tggtcataat attgataaat ctttgthtctg tgatgcatga 1860  
 gaccttatca cctaattttg cagtaaagag agtcaactaa aaaattttct gacactctth 1920  
 tgttacttat tatctcatga aatcctttgt actgttttgc cttggggtht ttattgacta 1980  
 acatctctth aatcacacat aattcaactg ttcataattc caaatatgth ttagctthtth 2040  
 ttataacgat ttaagttaca gcaatgtgth ttattttttt ctgtatttaa ctgaactatg 2100  
 ttgcccttat aaacagttac atgtatgtaa taggagthggc ctgatattgc cacacacccc 2160  
 tcatcggatg ctatgtcatg gacaaatagc tccactatat ggtcaaacat aagtataact 2220  
 taagaaagta acagaaaaat ttaatttaa aaaagthttt ttttttttt gtcttttcca 2280  
 tttctttatt ttatttattt aaatccaaa aaagtcaaat cttttacttc tcggcacata 2340  
 atttttcaaa caatctttth aaataaaatt attaattaa gcaaatattc attcacaaaa 2400  
 aaaaacttht agagthtthgaa aaatgcgaat ttaaagthtth attattataa tcaatattga 2460  
 tthaagthta caaatagatt taaaaaaaa atggaaatct gctatgthtth cttgacagcc 2520  
 ttcaaaagth tcttctgga aaagthtaac tgttgthttht tgacggthgth tttttthtaa 2580  
 cgctthttht ghatcaatta aagcatagth tttcacatt tgcggthttht cacggagaga 2640  
 ggaagthtthc tttattgtgth atcctgthct gagtaccagth gacattagag cctgthaacgth 2700  
 gtcaataaaa gtgacacagth tggccagatc taaagtctcg gatgthttht tctgthcaaa 2760  
 taaacatath acaatgaata aaagthgagth tcacatggac atttthgaaaa gggctthttht 2820  
 gacctagagth ttgattthgta gataaacccc tttatgthca actgthcatca aacacaaccc 2880  
 tgatccaaca gcgthacccc ttagctatca cagthtactth tgthaaattth tcaaaaaaa 2940  
 tgggthcataa tcatcaaaaat gaattataat ttctaagaaa ttatagcatt tagatattgc 3000  
 acctthtthaa acacctcaaa attactgtht tctthtctth ttattattthc tttagthttht 3060  
 agthtthttht gaaaatgath ttaattthgc agcggagthg cacgthattth actaaaatta 3120  
 aaactactaa ccatgaacat ttttcagcat ttgtgthgtht tagthtthttht gacatgthtthg 3180  
 catgthagthca tattthgagth tttthgagthg cttthtaaca gctthtcagaa gcagthtthaac 3240  
 cattthaaat taagaaaatt caagthcaga ttacacttht catattatct tagthtthtthg 3300  
 aaaaatagth ttataatata ttagaagact ttctthctaca caggactacc tgagthtthaa 3360  
 acaacactth atcaactgag aggthagcact gaaatathgth cgctgcaagth tattthaatthg 3420  
 tttttthttht tttattthttht agctctthgct acctagaaac attgthaaaa aaattactga 3480

ES 2 658 267 T3

aactttacac attaatTTTT tgaagacctc atcataatcc atgatgttta acgggTTTTga 3540  
attgcactta tttttactgc atcataatta ccacatccac tctattaaat tctattccaa 3600  
taccagagtt aaggctagag tttggtacac tacgaccgat ccacagttat gcaacgtaat 3660  
tctgagaaac tatgagtctc ctttattatt cctctatcaa accagtgggtg aaggaagtat 3720  
tttaatTTTT acttaaataa aacttttcaa cattaaaciaa ttcaaatgtg tgtgcgtctg 3780  
tctgaattca ttttaattatt cgttaattga ttttctacac aattaatact tgcataatggt 3840  
ttgctTTTTT taaatgctaa ctttattaca ttttctgatt ggggctaaaa atcaactgga 3900  
aagaaaatgg ttttttttac acttcattat gtcctgtttg ggggttgctgg agcctgtccg 3960  
agttacctca ggggaaaagc cagagtgcac cctgaacatt gagaggtcac acacagacac 4020  
atccatccat gttcttaacc tgctaaatcc cttattaagc atgattttgg actgtctgaa 4080  
gaaaagccaa gcaagaacat gccaaagtcca cgcaaaaggg tcccaacat gctttcaacc 4140  
aggaccagct tactgtgagg tgagaccgct aactactgca ccacagtgca gccatattt 4200  
agacttaatg caatatattg tgTTTTggg aagaagctgg agagcctgga gggaaaccagt 4260  
gcatggggaa aacatacaaa cctcacacag caaggatcac atctgcctca gtatgtattt 4320  
ttacagctta ctgtaattaa aaacagtaaa aaaaaaaaaa ctaaaaaaaaaa aaacatcaaa 4380  
ttgccacaaa aagtacatga tttaaaaaaaaa ggTTTTctgtc tacatgttta catcttaatt 4440  
tgatttaaaa cactaaaaaaaa tacataagat tgcccccaaa aaatgcaatt ataaaaagca 4500  
catgatttaa aaaaaaaaaag gtatccgtac gtatttttag atcttaattt ggcttaaaca 4560  
ctaaaaaata cattagattg ccaaaaaatg caattataaa tatacatggt ttttaataaa 4620  
agccatcagc tgcacatgca ttttgggaaa aaaaggttgt cttatagaaa aagtccacat 4680  
ccattacaca atttaactgt ttactttgaa taaaaacaca ttactgtgct gctttattat 4740  
tgctctcact ctatgggggt caaactaatg tgtatttgtc atttttgtgc tttgtttagt 4800  
ggatatctaa cagtatgtca acagactgaa agggcaaaag aggtaattac ttcctaaaca 4860  
gctaacatta gattgtttct gtcatggaaa atgcatgaaa acatactgca acaatttatt 4920  
ttaatgttca ttaagtgtca aggttttttag gattcttgaa atcctcaaat tgatagtta 4980  
gcgacacata tttgactata atggcttct gttatttcat tcatttatgt acaaaaaaca 5040  
ataacacaaa aatgtacata acttttcatt tactcgagac ctattagtta aaaaaatgtg 5100  
gaggaatgag ctttttcttt actacgtcga aatataaaat ttctgagaca taaatcaatt 5160  
ataaatatac agtatatggc ctgattaaaa aaaagaaaaa aacttttcaa ctgattttgt 5220  
aatgcagaaa atcatgctta gcacaaccag agcattcgc aacatataca tttgatgtgg 5280  
acatcatcct aataacctca tataaaaggt ttttttgac caaaatgtgt acaatatgag 5340  
gttttgttgc agattcaggg aaaagatcac tttgtttgtc attgcctact atcaaaacia 5400  
acatttgagg acagataagt tcgagactgc aaagaccctg aaaaggctc catgacctgg 5460  
atgtcacaaa agcctttcat tcattccaac gcaacgacct gatctggcat ttcacgcaaa 5520

ES 2 658 267 T3

ggacagaata gtccacatga attacataaa ättgacttaa cāaaacacac cctgaagcgt 5580  
 ttgtgattgg gagctacttg gtttgagagg tggagtttga agagcatcaa aggtaaagac 5640  
 acataaatag agcaggagag ggaaatttac acttagggac ccatcgggtc agacagctgt 5700  
 gggaccatgg caaggcactg gagtattacg gttttttccg cactagctct gatatgttct 5760  
 ttcttggcga cccaagtgga tgctcagaaa ggccccctc aagaccctaa ggttccatac 5820  
 cctccatact atccacagcc gaagccgag gaccctcaac acgtttcacc gccttacaac 5880  
 ccagggagc cgagctatcc agggaagcca cagtatccag ggaagccgca gagtccacag 5940  
 tctctcaga cccctcagta tcctcagacc cctcagcagc cgagagctcc acagtatcct 6000  
 cagaccctc agtatcctca gaccctcag cagccgcaga gtcctcagta tcctcagtcc 6060  
 cctcagtatc ctcagactcc tcagtcccct cagtatcctc agtcccctca gtatcctcag 6120  
 actcctcagt atcctcagaa tcctaagggtg tatgggtgatg acagttctaa gccttcaact 6180  
 ccgtcaaagc ctagctatcc tcagcctcag gccccccagt acccatctaa gcctcaagct 6240  
 ccccagctgc ctcaggcccc ccagtaccca actaagcctc aagctcccca gctgcctcaa 6300  
 gctccccagc tgccctcaggc cccccagtac ccaactaagc ctcaagctcc tcagtatcct 6360  
 caagctcctc agcagcctca ggccccccag tacccaacta agcctcaagc tcctcagcag 6420  
 ccccaggctc ccagctacc aactaagcct caagctcctc agtaccctca agctcctcag 6480  
 cagccccagg ctccccagta cccaacaaaa cctcagcagc cccagctacc aacaaagcct 6540  
 cagtctcctc agtaccctca agatcctaaa aatccaaatc ctcagaatcc tcctcttcat 6600  
 cctccccctg ttaagagctg tgagggtgcc cgcgatgtga gagtcccatg tggagttcca 6660  
 gacatctctc cttctgcatg cgatgccatt gactgctgtc atgatggcca agcctgctac 6720  
 tttggaacag gaggtaagtg gtttctccag ctgctatgat cagaggcttt ttgtaagggtg 6780  
 acggctgatc gtgcaatcgt cgatcccatc ttttcttct agcaaccgtt cagtgcacca 6840  
 aggacggaca cttcatcgtt gtggtggcca aggatgtcac cttacccat ctcgatcttg 6900  
 aaactatttc acttttgga ccgggtcaag aatgtggagc tgttgactct aattcagctt 6960  
 tcgcatctca ctactttccc gtcactcagt gcggcactca tgtcacggta aactcagtc 7020  
 ttgtttatat cttatagtca taaggtaaat ctttgagatt ctatccttct tattgttaaa 7080  
 ttttgaacca ttaaaaggaa gagccccggg ttatagtcta tgaaaaccgg atgacatcct 7140  
 catatgaagt tggagttgga ccgcttgag ctattaccag agacagctct tttgagtagg 7200  
 tcatcatttg tgtttagtat caaacagatt tactaatgtc taactaatat ctatcagggg 7260  
 taaacagaat catgcacagt gtattaacac agttcttttt ctcaggctcc tcttccagtg 7320  
 cagataccat gcaacatctg ttgaaactct ggtcgtggaa gtgctgccag tggatagtcc 7380  
 tctttccatt gctgagcttg gaccctcaa tgtgtacttg caaattgcca atggagtatg 7440  
 tcagacaaag ggctgcgacg aaggtcagtg cacggcagtc tggcacagcc agtgtgtttg 7500  
 tcaaacattt gaaaaagctg cctgtcgtaa cgtttgtttg ctcccacagt ggcggcagcc 7560  
 tacacctctt tctacacgga tgccgactat cctgtgacca aagtactgag agaaccagtc 7620

ES 2 658 267 T3

tatgtggacg	ttcaaatcct	tggcagaaca	gatccaaatc	tggttctgac	tcttggacgc	7680
tgttgggcaa	ccacaagccc	caatgctttc	agtctgcccc	agtgggacat	tttgattgac	7740
gggtaaaaaa	aaaaaaatct	accaattcat	tccataaaga	ccatttttgt	tcaaactaag	7800
ctccaaatct	cacacttttt	agccgaatta	ctaaatatct	aaccaacat	tacttcttct	7860
ttaccttttt	tccatccaga	tgtccatgatg	aagatgatcg	ctacctgtct	gcgttggttc	7920
caatcgattc	ctcctctggt	ttgccattcc	caactcatca	cagacgcttc	ttattcaaga	7980
tgtttacctt	tgttgatcct	cattcaatgg	aaccactaag	ggaaaagggtg	gggtactgaat	8040
tactcaagta	gaggtttaac	ttggcttcta	acctgtactt	ttctttcagg	tgtacattca	8100
ctgcagcaca	gctgcatgcg	ttccaggaca	gggtaccagt	tgtgaaccct	catgcagcag	8160
aagaagtagg	gggctcattt	ataaccgttc	acatgttttt	tttgttggtg	taatgacat	8220
gtccactcat	cattggccat	gttttgtgtc	tttttgtaga	aggaagagat	actgacgctg	8280
tatccattag	aacggatgaa	agaaagggtg	tggtatcgtc	tggagaagtg	ctcatggtgg	8340
ccgaagctgc	tggacagtct	taactgtgaa	ccgacagaag	ctccagagtt	cggaaaaaat	8400
aacataacat	tatgaaaatc	tgtttcatca	tggttcagaa	ttaaattgcat	aaagt	8455

<210> 2

<211> 4838

5 <212> ADN

<213> *Oryzias melastigma*

<400> 2

ES 2 658 267 T3

ctcgtacctc	caaaacccaa	catatthttgt	ctataaaggt	tgagcttaaa	aatatatatt	60
ttttcaatta	aaagaaaata	actgaaaaac	tggaatttaa	tcttaaaact	accaagaagt	120
tatctattta	atcattatgt	ttacattcaa	gtcgtcttag	ggccacaagg	tacttagcct	180
ttgctgttat	ttacaaagac	gacaatttaa	gtgtatgaag	tgatctttat	aaatcagtca	240
aatatattht	tttaaattga	ctcattcccc	tttggcagca	agttgtggcg	aaaatccttt	300
ataatcttca	aattacaagt	atgaacaata	ttgthttcctt	taaaacaatt	agcagtctaa	360
tcattthtcta	taatatgaaa	gthcataatct	tatgtagttg	aaaagtgtgc	tattthttgta	420
attgtatttc	thtttatata	thttgcattt	agtgaactac	tgcatthact	agcttgcaat	480
actthttcgca	ttgtgtctct	cataaaaaat	atagatatgg	ttattthaaaa	aaatgcgtht	540
actctthaatt	gthtgctthtt	ggagthaaaat	thttatgctth	tgtctgtatt	gcctthtttga	600
cattcagaag	aggatgcttc	tgtatgacgg	cgtattthagg	ccttgagggt	atcatgtctg	660
tggtgtgact	gaatgattac	attgatgctg	thttacactt	tgaaaatcac	catttgaaac	720
caagthttgt	ctcacaattg	catcaaacag	aaaaaaaaacc	atcaaagcaa	gctaattgaa	780
tgttgattgg	thtaatccaa	gtcattacag	thttattccac	ctgagtctag	atgattctaa	840
cagattgtht	gactgttgtc	aaaatgatcc	tacatgaatg	caagtccaaa	gcaagataaa	900
tgctctthtct	cttcaaattga	thttgacatta	atctthtccct	aaaattthatt	attggtcata	960
atattgataa	atctthtghtt	cgtgatgcat	gagaccttht	caccthaatt	tgcagthaaag	1020

ES 2 658 267 T3

agagtcaact aaaaaatfff ctgacactct tttgttactt attatctcat gaaatccttt 1080  
 gtactgffff gccttgggggt ttttattgac taacatctct ttaatcacac ataattcaac 1140  
 tgttcataat tccaaatatg ttttagcttt tgttataacg atttaagtta cagcaatgtg 1200  
 ttttattfff ttctgtatff aactgaacta tgttgccctt ataaacagtt acatgtatgt 1260  
 aataggagtg gcctgatatt gccacacacc cctcatcgga tgctatgtca tggacaaata 1320  
 gctccactat atgggtcaaac ataagtataa cttagaagag taacagaaaa atttaattta 1380  
 aaaaaagfff tttttttfff ttgtcttttc catttcttta ttttatttat ttaaatacaa 1440  
 aaaaagtcaa atcctttact tctcggcaca taatftttca aacaatcttt ttaaataaaa 1500  
 ttattaatta aagcaaatat tcattcacia aaaaaactt ttagagtttg aaaaatgcga 1560  
 atttaagtt gtattattat aatcaatatt gatttaagtt tacaataga tttaaaaaaa 1620  
 aatggaaat ctgctatgft tccttgacag cttcaaaag tttccttctg gaaaagttaa 1680  
 actgttgttt tgtgacggtg ttttttttta aacgctttgt ctggatcaat taaagcatag 1740  
 ttttttcaca tttgcggttt ttcacggaga gaggaagttt cttttattgt gtatcctgcc 1800  
 ctgagtacca gtgacattag agcctgtaac gtgtcaaata aagtacaca gttggccaga 1860  
 tctaaagtct cggatgttgt gttctggtca aataaacata tgacaatgaa taaaagttga 1920  
 ggtcacatgg acattttgaa aagggtcttt atgacctaga gtttgatttg tagataaacc 1980  
 cttttatgtc aaactgtcat caaacacac cctgatccaa cagcgttacc ccttagctat 2040  
 cacagttcac tttgtaaatt tgtcacaaaa aatgggtcat aatcatcaaa atgaattata 2100  
 atttctaaga aattatagca tttagatatt gcaccttttt aaacacctca aaattactgg 2160  
 tttcttttct ttttattatt tctttagttt taagtttggt ttgaaaatga tcttaatatt 2220  
 gcagcggagt agcacgtatt taactaaaat taaaactact aacctgaac atttttcagc 2280  
 atttgtgtgg tttagttttt gtgacatgft tgcatgtagt catattttga gtttttgagg 2340  
 tgctttttta cagctttcag aagcagttta accatttaaa attaagaaaa ttcaagctca 2400  
 gattacactt tcatattat cttagtttgt gaaaaaatag tattataata tattagaaga 2460  
 ctttcttcta cacaggacta cctgaggttt aaacaacact ttatcaactg agaggtagca 2520  
 ctgaaatatg tgcgctgcaa gttatttaat tgtttttttt tttttatttt ttagctcttg 2580  
 ctacctagaa acattgtaaa aaaaattact gaaactttac acattaattt tctgaagacc 2640  
 tcatcataat ccatgatgft taacgggttt gaattgcact tatttttact gcatcataat 2700  
 taccacatcc actctattaa attctattcc aataccagag ttaaggctag agtttggtac 2760  
 actacgaccg atccacagtt atgcaacgta attctgagaa actatgagtc tcctttatta 2820  
 ttctctatc aaaccagtgg tgaaggaagt attttaattt ttacttaaat aaaacttttc 2880  
 aacattaaac aattcaaatg tgtgtgcgfc tgtctgaatt catttaatta ttcgttaatt 2940  
 gattttctac acaattaata cttgcatatg ttttgctttt tttaaatgct aactttatta 3000  
 cattttctga ttggggctaa aatcaactg gaaagaaaat ggtttttttt aacttcatt 3060

ES 2 658 267 T3

atgtcctggt tggggttgct ggagcctgtc cgagttacct cāggggaaaa gccagagtgc 3120  
 accctgaaca ttgagagggtc acacacagac acatccatcc atgttcttaa cctgctaaat 3180  
 cccttattaa gcatgatttt ggactgtctg aagaaaagcc aagcaagaac atgccaagtc 3240  
 cacgcaaaaag ggtcccaacc atgctttcaa ccaggaccag cttactgtga ggtgagaccg 3300  
 ctaactactg caccacagtg cagcccatat ttagacttaa tgcaatatat tgtgttttgg 3360  
 ggaagaagct ggagagcctg gagggaacca gtgcatgggg aaacataca aacctcacac 3420  
 agcaaggatc acatctgcct cagtatgtat ttttacagct tactgtaatt aaaaacagta 3480  
 aaaaaaaaaa aactaaaaaa aaaaacatca aattgccaca aaaagtacat gatttaaaaa 3540  
 aaggtttctg tctacatggt tacatcttaa tttgatttaa aactactaaa aatacataag 3600  
 attgccccca aaaaatgcaa ttataaaaag cacatgattt aaaaaaaaaa aggtatccgt 3660  
 acgtattttt agatcttaat ttggcttaaa cactaaaaaa tacattagat tgccaaaaaa 3720  
 tgcaattata aatatacatg ttttttaata aaagccatca gctgcacatg cattttggga 3780  
 aaaaaagggt gtcttataga aaaagtccac atccattaca caatttaact gtttactttg 3840  
 aataaaaaca cttactgtg ctgctttatt attgctctca ctctatgggg ttcaaactaa 3900  
 tgtgtatttg tcatttttgt gctttgttta gtggatatct aacagtatgt caacagactg 3960  
 aaagggcaa agaggttaatt acttctaaa cagctaacat tagattgttt ctgtcatgga 4020  
 aatgcatga aacatactg caacaattta ttttaatggt cattaagtgc taaggttttt 4080  
 aggattcttg aaatcctcaa attgatatgt tagcgacaca tatttgacta taatggtcct 4140  
 ctggtatttc attcatttat gtaacaaaa caataacaca aaaatgtaca taacttttca 4200  
 tttactcgag acctattagt taaaaaatg tggaggaatg agccttttct ttactacgtc 4260  
 gaaatataaa atttctgaga cataaatcaa ttataaatat acagtatatg gcctgattaa 4320  
 aaaaaagaaa aaaacttttc aactgatttt gtaatgcaga aatcatgct tagcacaacc 4380  
 agagcattcg ccaacatata catttgatgt ggacatcatc ctaataacct catataaaag 4440  
 gttttttttg accaaaatgt gtacaatatg aggttttgtt gcagattcag ggaaaagatc 4500  
 actttgtttg tcattgccta ctatcaaac aaacatttga ggacagataa gttcgagact 4560  
 gcaaagacc tgaaaagggtc tccatgacct ggatgtcaca aaagcctttc attcattcca 4620  
 acgcaacgac ctgatctggc atttcacgca aaggacagaa tagtccacat gaattacata 4680  
 aaattgactt aacaaaacac accctgaagc gtttgtgatt gggagctact tggtttgaga 4740  
 ggtggagttt gaagagcatc aaaggtaaag acacataaat agagcaggag agggaaattt 4800  
 acacttaggg acccatcggg tcagacagct gtgggacc 4838

<210> 3

<211> 761

5 <212> ADN

<213> *Oryzias melastigma*

<400> 3

ES 2 658 267 T3

tttaggattc ttgaaatcct caaattgata tgtttagcgac acatatttga ctataatggt 60  
 cttctgttat ttcattcatt tatgtaacaa aaacaataac acaaaaatgt acataacttt 120  
 tcatttactc gagacctatt agttaaaaa atgtggagga atgagccttt tctttactac 180  
 gtcgaaatat aaaatttctg agacataaat caattataaa tatacagtat atggcctgat 240  
 taaaaaaaag aaaaaaactt ttcaactgat tttgtaatgc agaaaatcat gcttagcaca 300  
 accagagcat tcgccaacat atacatttga tgtggacatc atcctaataa cctcatataa 360  
 aagggttttt ttgaccaaaa tgtgtacaat atgaggtttt gttgcagatt cagggaaaag 420  
 atcactttgt ttgtcattgc ctactatcaa aacaacatt tgaggacaga taagttcgag 480  
 actgcaaaga ccctgaaaag gtctccatga cctggatgtc acaaaagcct ttcattcatt 540  
 ccaacgcaac gacctgatct ggcatttcac gcaaaggaca gaatagtcca catgaattac 600  
 ataaaattga cttacaacaaa cacaccctga agcgtttgtg attgggagct acttggtttg 660  
 agaggtggag tttgaagagc atcaaaggta aagacacata aatagagcag gagagggaaa 720  
 tttacactta gggacccatc gggtcagaca gctgtgggac c 761

5 <210> 4  
 <211> 361  
 <212> ADN  
 <213> *Oryzias melastigma*

10 <400> 4  
 gttgcagatt cagggaaaag atcactttgt ttgtcattgc ctactatcaa aacaacatt 60  
 tgaggacaga taagttcgag actgcaaaga ccctgaaaag gtctccatga cctggatgtc 120  
 acaaaagcct ttcattcatt ccaacgcaac gacctgatct ggcatttcac gcaaaggaca 180  
 gaatagtcca catgaattac ataaaattga cttacaacaaa cacaccctga agcgtttgtg 240  
 attgggagct acttggtttg agaggtggag tttgaagagc atcaaaggta aagacacata 300  
 aatagagcag gagagggaaa tttacactta gggacccatc gggtcagaca gctgtgggac 360  
 c 361

15 <210> 5  
 <211> 831  
 <212> ADN  
 <213> *Oryzias melastigma*

20 <400> 5

ES 2 658 267 T3

ctgtgaaccg acagaagctc cagagttcgg aaaaaataac ataacattat gaaaatctgt 60  
 ttcacatggt ttcagaatta aatgcataaa gtgaaaaatc tggtgcaggt gtttggaatg 120  
 tattgcaaaa acaaaacaag ttgatacata aaggtagcaa catttcttca catttcatgt 180  
 aaaaaaaaaa aaaaagtttc ttcacatcag tatagcaggt gtgtagatac agttgacaaa 240  
 atacaacact tccaccttaa tattctatat ggatcaaatg tgactgtttt cagtgaaacg 300  
 tcacgacaat aaagtcacat aatacatttc actttttacac aaatttttac tgtctgtttc 360  
 tgttcttaaa catacaagca ctgaaaacag agatgaatcc agtataacca aacaactcaa 420  
 acgacaataa aaaaaacaaa aaaattgttt tattatttta aaatgtttta aaaaagttca 480  
 atttttaaat caaagtaggt caaccatttt taatactgga tcaacaaca aaaacaatta 540  
 acaaaaaaaaa tcagagttta tggaaggtaa acacacacat ccgtgaagac aaaaacacaa 600  
 gattattatt taaaaactga actagacagc ttacttctca gaaatctgcg actgtaagga 660  
 aaactgtttt ccttgttgct ttcaatttgt aaaattgaaa gatgtcaata aataatttac 720  
 cctcttgcat tttgaaaaca attgtacttt cttggaagaa tatttggcat aaatgcatgt 780  
 ttacatgtgg atgtcggggt ttaagcacc tgctatggtg agcttgggcc a 831

5 <210> 6  
 <211> 22  
 <212> ADN  
 <213> Artificial

10 <220>  
 <223> Cebador

<400> 6  
**gtaatacgac tcactatagg gc 22**

15 <210> 7  
 <211> 19  
 <212> ADN  
 <213> Artificial

20 <220>  
 <223> Cebador

<400> 7  
**actatagggc acgctggt 19**

25 <210> 8  
 <211> 25  
 <212> ADN  
 <213> Artificial

30 <220>  
 <223> Cebador

35 <400> 8  
**aacgtgtga gggctctgcg gcttc 25**

<210> 9  
 <211> 28  
 <212> ADN

<213> Artificial  
 <220>  
 <223> Cebador  
 5 <400> 9  
 ctgtggatag tatggagggt atggaacc 28  
 <210> 10  
 <211> 35  
 <212> ADN  
 <213> Artificial  
 10 <220>  
 <223> Cebador  
 15 <400> 10  
 gtgtaatgga tgtggacttt ttctataaga caacc 35  
 <210> 11  
 <211> 26  
 <212> ADN  
 <213> Artificial  
 20 <220>  
 <223> Cebador  
 25 <400> 11  
 cccaaaatgc atgtgcagct gatggc 26  
 30 <210> 12  
 <211> 25  
 <212> ADN  
 <213> Artificial  
 35 <220>  
 <223> Cebador  
 40 <400> 12  
 gaaaatctgt ttcatcatgg ttcag 25  
 <210> 13  
 <211> 24  
 <212> ADN  
 <213> Artificial  
 45 <220>  
 <223> Cebador  
 50 <400> 13  
 ttcaactg gtaccctgct ctgg 24  
 <210> 14  
 <211> 58  
 <212> ADN  
 <213> Artificial  
 55 <220>  
 <223> Cebador  
 60 <400> 14  
 tgcattgcat gcttaattaa ctgcagcccg gggctgactc gtacctcaa aaccaaac 58

<210> 15  
 <211> 20  
 <212> ADN  
 <213> Artificial  
 5  
 <220>  
 <223> Cebador  
 <400> 15  
 10 **ctccagtgcc ttgccatggt** 20  
 <210> 16  
 <211> 31  
 <212> ADN  
 15 <213> Artificial  
 <220>  
 <223> Cebador  
 20 <400> 16  
**tcgactgcag tgctctcact ctatggggtt c** 31  
 <210> 17  
 <211> 20  
 25 <212> ADN  
 <213> Artificial  
 <220>  
 <223> Cebador  
 30 <400> 17  
**ctccagtgcc ttgccatggt** 20  
 <210> 18  
 <211> 30  
 35 <212> ADN  
 <213> Artificial  
 <220>  
 40 <223> Cebador  
 <400> 18  
**agctactagt ccatctacat ggccaagaag** 30  
 45 <210> 19  
 <211> 25  
 <212> ADN  
 <213> Artificial  
 50 <220>  
 <223> Cebador  
 <400> 19  
 55 **attttgccga ttcggccta ttggt** 25  
 <210> 20  
 <211> 29  
 <212> ADN  
 <213> Artificial  
 60 <220>  
 <223> Cebador  
 <400> 20

**tgacgaggcc gctgtgaac cgacagaag 29**  
 <210> 21  
 <211> 20  
 5 <212> ADN  
 <213> Artificial  
 <220>  
 <223> Cebador  
 10 <400> 21  
**cacggatgtg tgtgttacc 20**  
 <210> 22  
 15 <211> 25  
 <212> ADN  
 <213> Artificial  
 <220>  
 20 <223> Cebador  
 <400> 22  
**gaaaatctgt tcatcatgg tcag 25**  
 25 <210> 23  
 <211> 24  
 <212> ADN  
 <213> Artificial  
 30 <220>  
 <223> Cebador  
 <400> 23  
**ttcacaactg gtaccctgctc ctgg 24**  
 35 <210> 24  
 <211> 29  
 <212> ADN  
 <213> Artificial  
 40 <220>  
 <223> Cebador  
 <400> 24  
 45 **tgacgaggcc gctgtgaac cgacagaag 29**  
 <210> 25  
 <211> 24  
 <212> ADN  
 50 <213> Artificial  
 <220>  
 <223> Cebador  
 55 <400> 25  
**ttcacaactg gtaccctgctc ctgg 24**  
 <210> 26  
 <211> 21  
 60 <212> ADN  
 <213> Artificial  
 <220>

ES 2 658 267 T3

<223> Cebador

<400> 26

tgctgccgga caaccactac c 21

5

<210> 27

<211> 23

<212> ADN

<213> Artificial

10

<220>

<223> Cebador

<400> 27

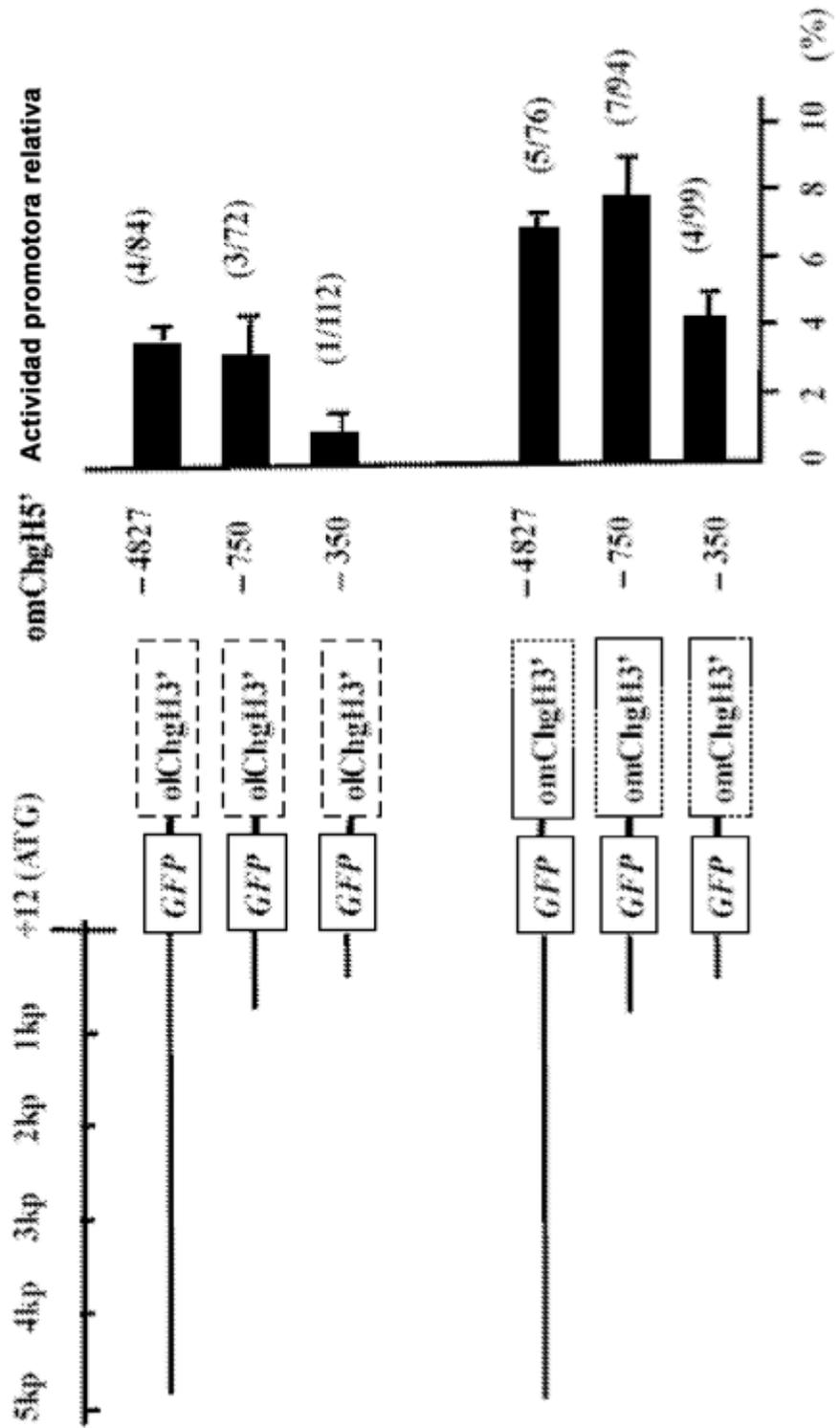
ttactgtac agctcgtcca tgc 23

15

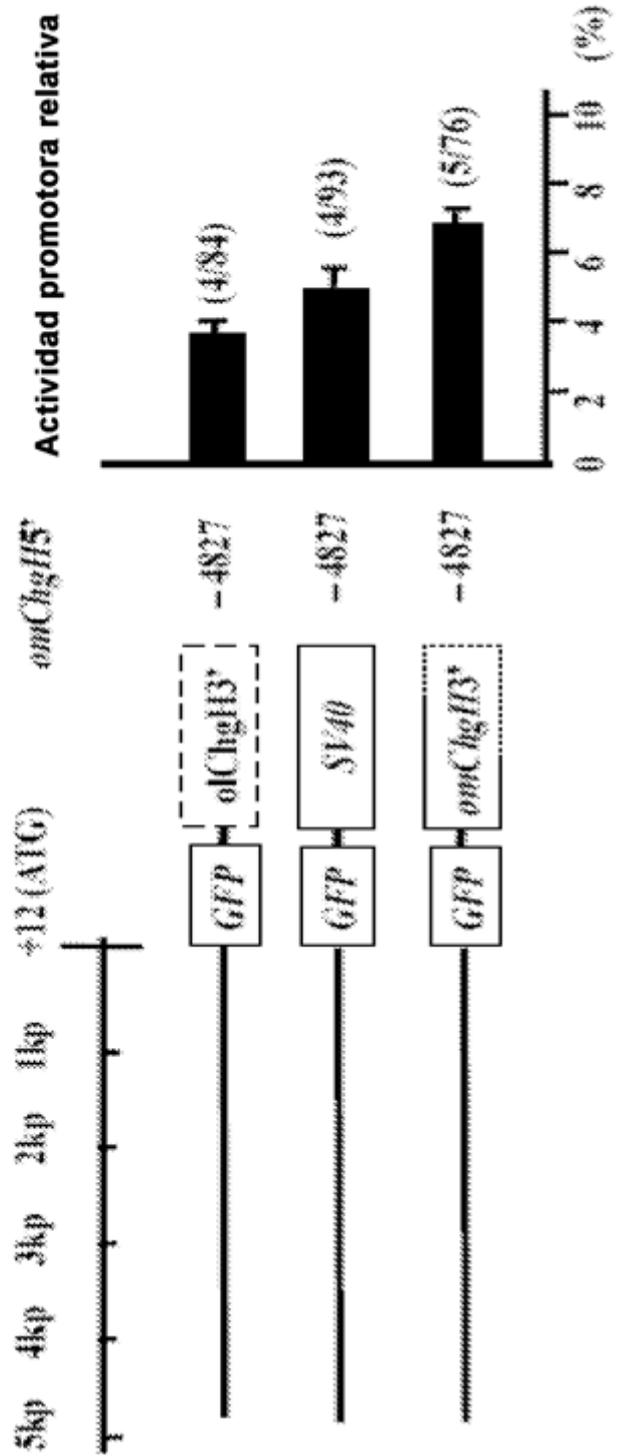
**REIVINDICACIONES**

1. Casete de expresión que comprende:  
una secuencia de nucleótidos indicadora que codifica para una proteína indicadora;  
una secuencia de nucleótidos reguladora en 5' que responde a estrógenos aislada de un pez medaka de agua salobre de la especie *Oryzias melastigma*, en la que la secuencia de nucleótidos reguladora está unida operativamente en 5' a la secuencia de nucleótidos indicadora para inducir la expresión de la proteína indicadora en presencia de estrógenos o un compuesto similar a estrógenos; y  
una región reguladora en 3' unida operativamente en 3' a la secuencia de nucleótidos indicadora en el que  
la secuencia de nucleótidos reguladora en 5' que responde a estrógenos se selecciona del grupo que consiste en SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3, y SEQ ID NO: 4; y  
la región reguladora en 3' comprende la secuencia de nucleótidos de SEQ ID NO: 5.
2. Casete de expresión según la reivindicación 1, en el que  
la secuencia de nucleótidos reguladora en 5' que responde a estrógenos se selecciona del grupo que consiste en SEQ ID NO: 2 y SEQ ID NO: 3, y  
la región reguladora en 3' comprende la secuencia de nucleótidos de SEQ ID NO: 5.
3. Casete de expresión según la reivindicación 1 ó 2, en el que la proteína indicadora es una proteína autofluorescente.
4. Casete de expresión según la reivindicación 1 ó 2, en el que la proteína indicadora se selecciona del grupo que consiste en una proteína fluorescente verde potenciada (EGFP), una proteína fluorescente verde (GFP), una proteína fluorescente azul (BFP), una proteína fluorescente amarilla (YFP) y una proteína fluorescente roja (RFP).
5. Vector de transformación que comprende el casete de expresión según las reivindicaciones 1 a 4.
6. Célula huésped transducida con el casete de expresión según las reivindicaciones 1 a 4.
7. Célula transgénica de un animal acuático, comprendiendo dicha célula transgénica al menos un casete de expresión según las reivindicaciones 1 a 4.
8. Célula transgénica según la reivindicación 7, en la que el animal acuático se selecciona del grupo que consiste en una especie *Oryzias* y una especie *Danio*.
9. Célula transgénica según la reivindicación 8, en la que la especie *Oryzias* se selecciona del grupo que consiste en *Oryzias melastigma* y *Oryzias latipes*.
10. Pez transgénico de una especie *Oryzias* que comprende:  
al menos un casete de expresión según las reivindicaciones 1 a 4,  
en el que el pez transgénico presenta una marca observable cuando se expone a un medio líquido que contiene un estrógeno o un compuesto similar a estrógeno, y  
en el que la marca observable comprende la proteína indicadora expresada por el al menos un casete de expresión.
11. Pez transgénico según la reivindicación 10, en el que la marca observable es visible *in vivo*.
12. Pez transgénico según la reivindicación 10 u 11, en el que el pez está en una fase de desarrollo seleccionada del grupo que consiste en una fase embrionaria, una fase larvaria y una fase adulta.
13. Pez transgénico según las reivindicaciones 10 a 12, en el que el pez es un adulto macho.
14. Método de preparación de un pez transgénico de una especie *Oryzias* para su uso en la detección de la presencia de un estrógeno o compuesto similar a estrógeno en un medio líquido, comprendiendo dicho método:  
transformar un pez no transgénico con el casete de expresión según las reivindicaciones 1 a 4, produciendo de ese modo un pez transgénico que comprende al menos uno de dichos casetes de expresión.

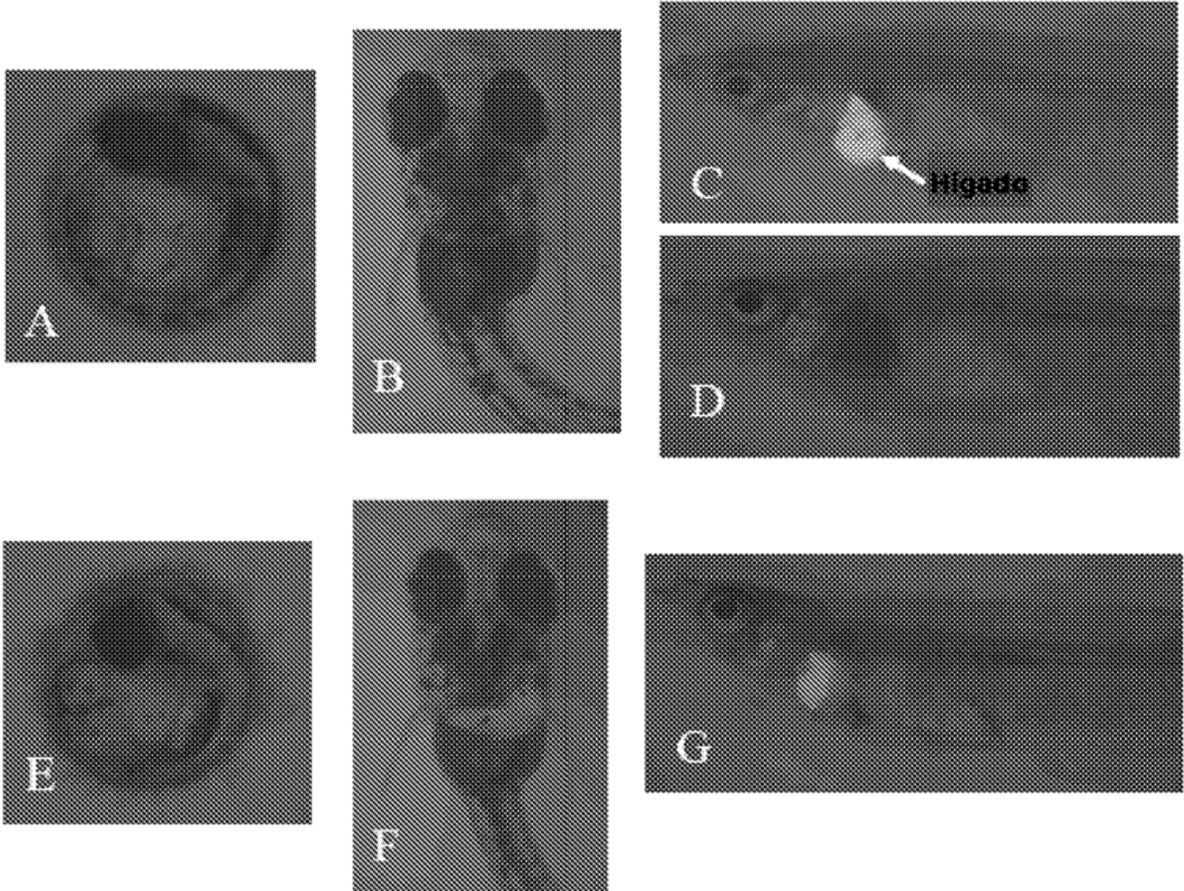
**Fig. 1**



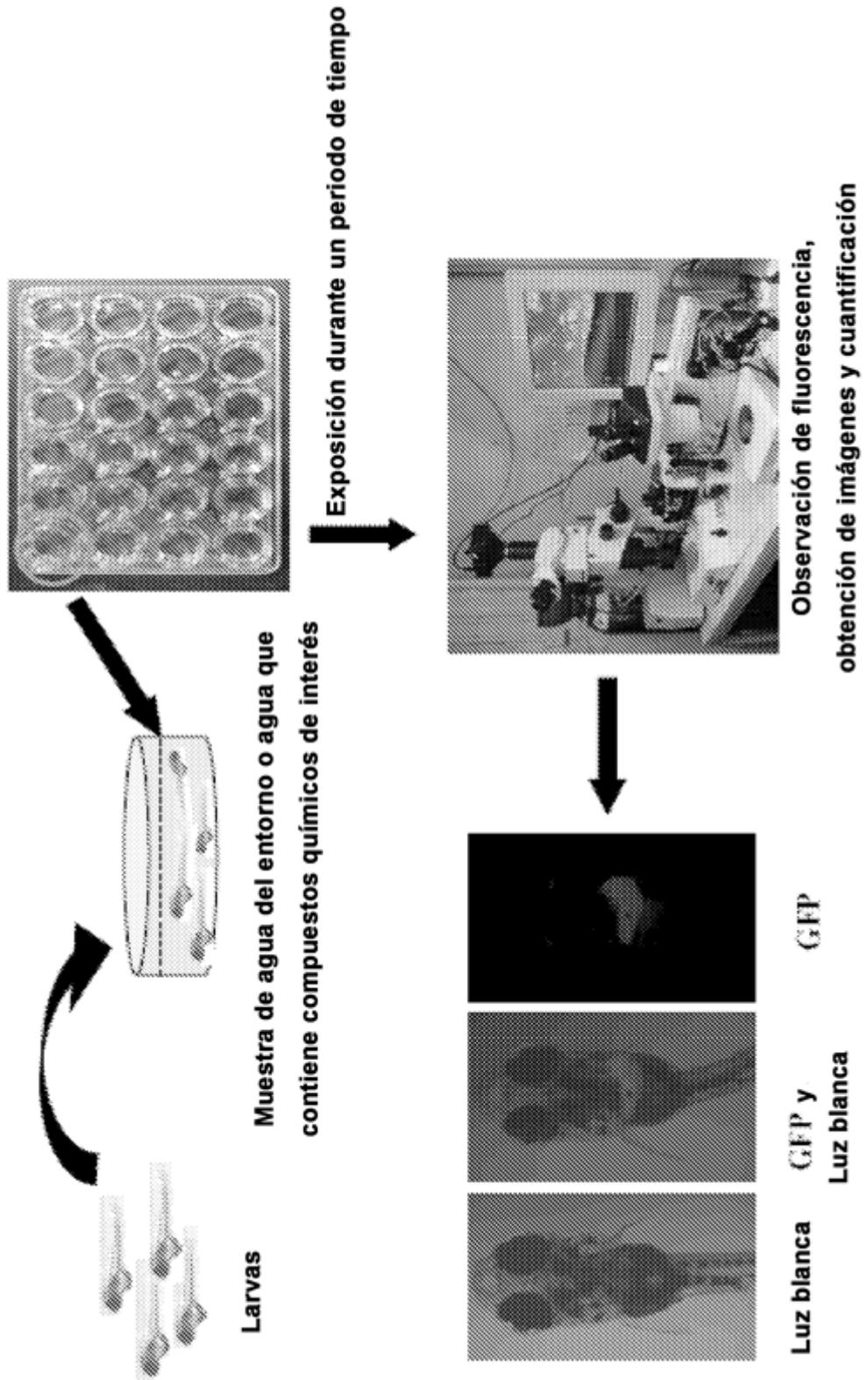
**Fig. 2**



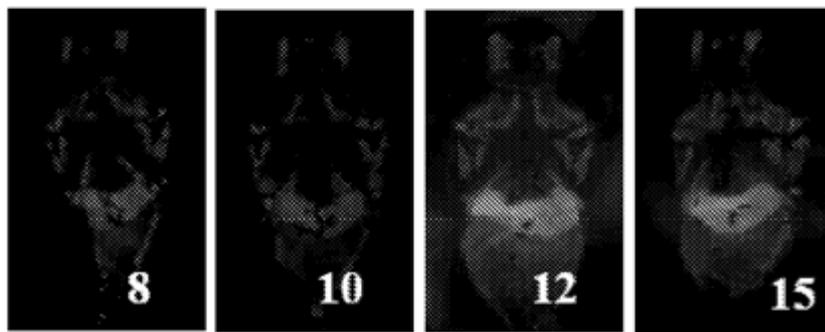
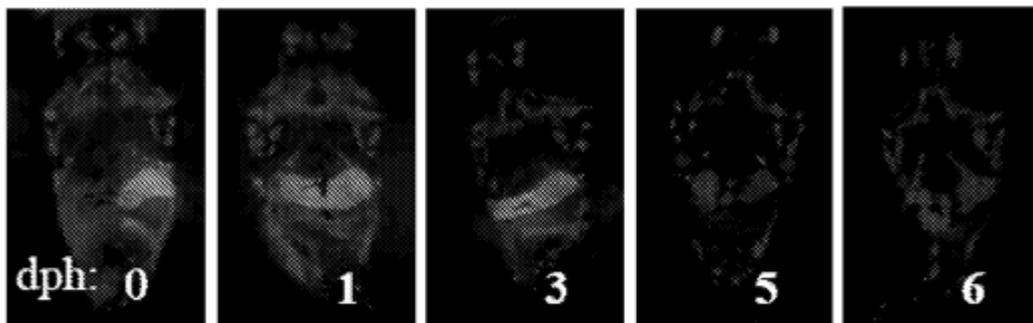
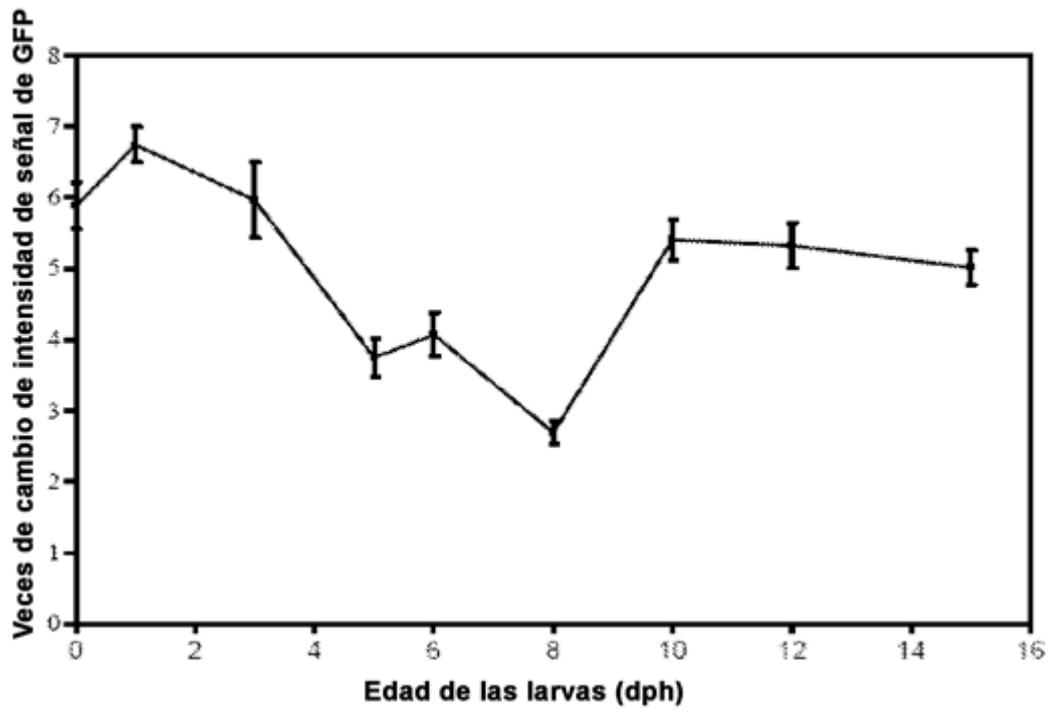
**Fig. 3**



**Fig. 4**

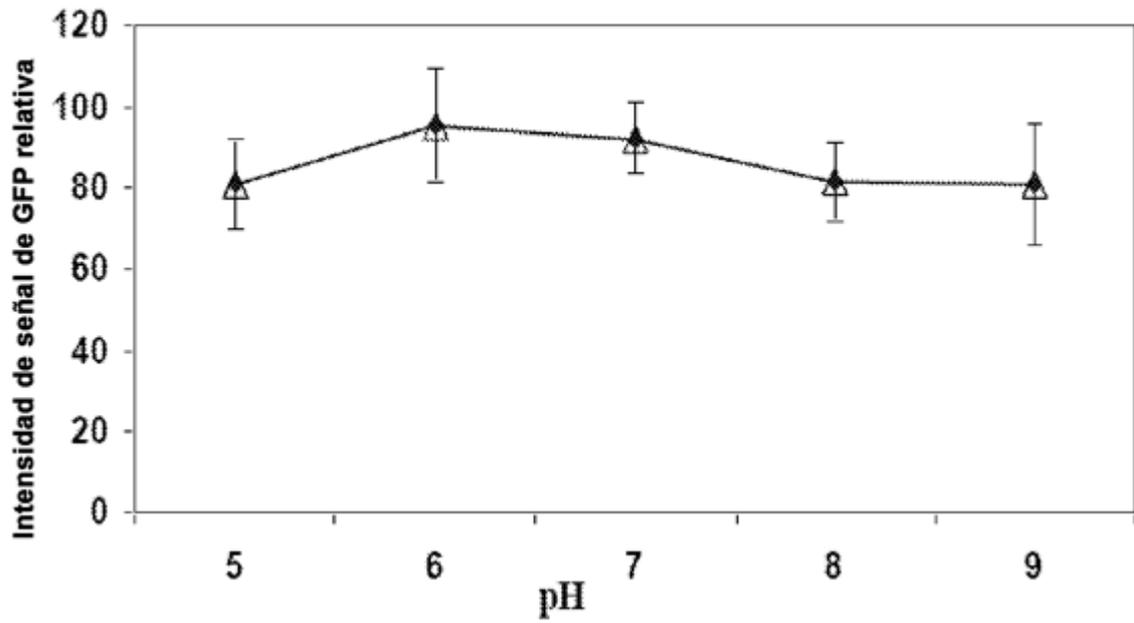


**Fig. 5**

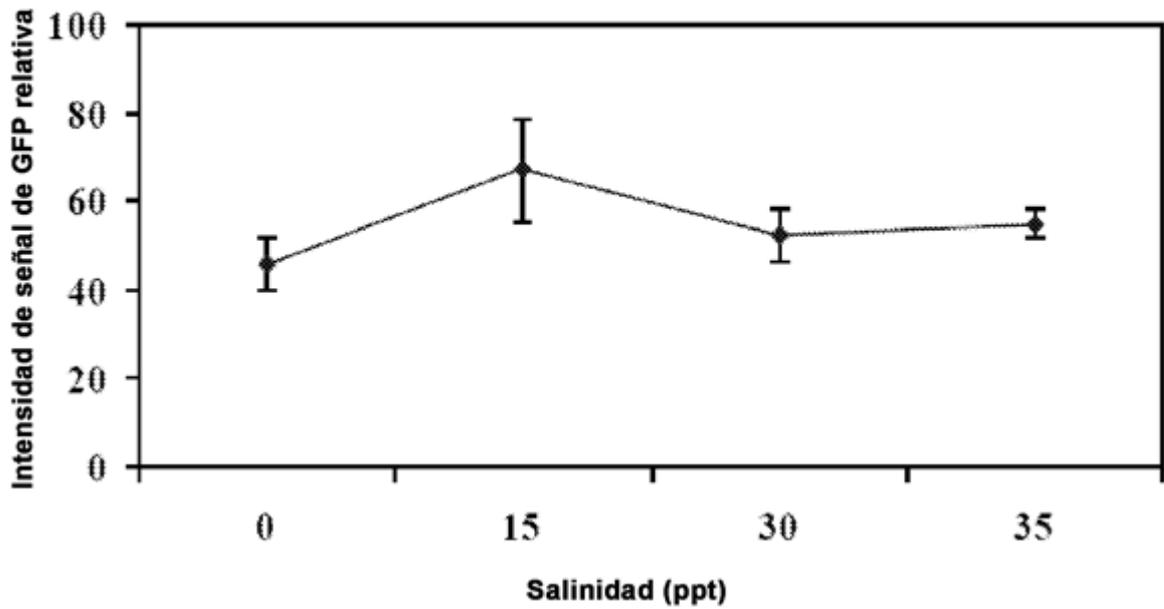


dph: días tras la eclosión

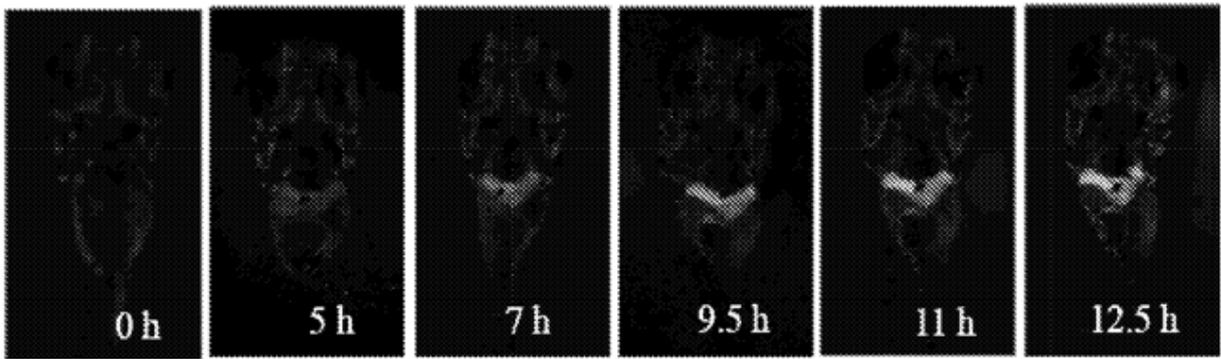
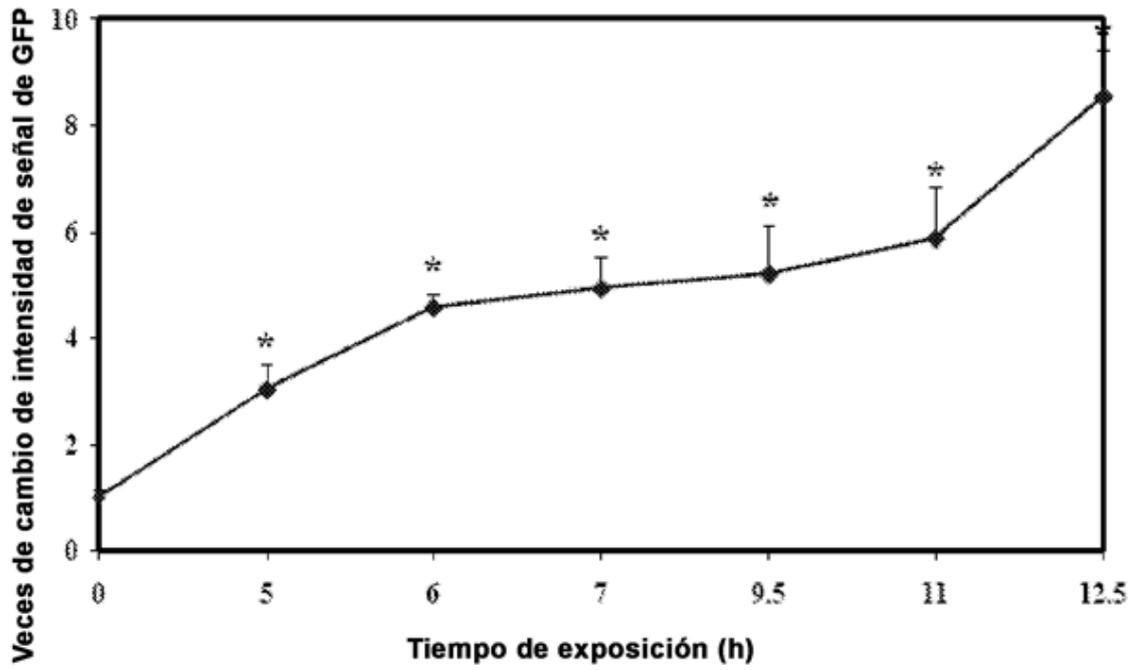
**Fig. 6**



**Fig. 7**

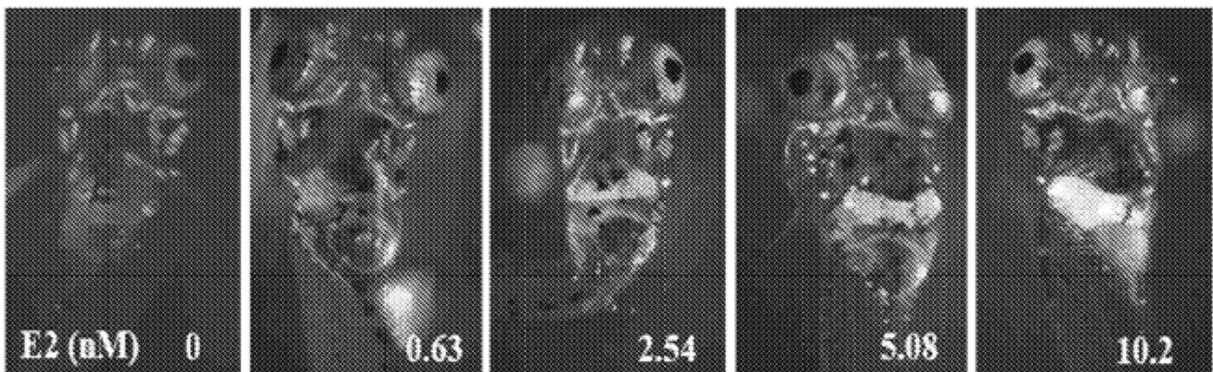
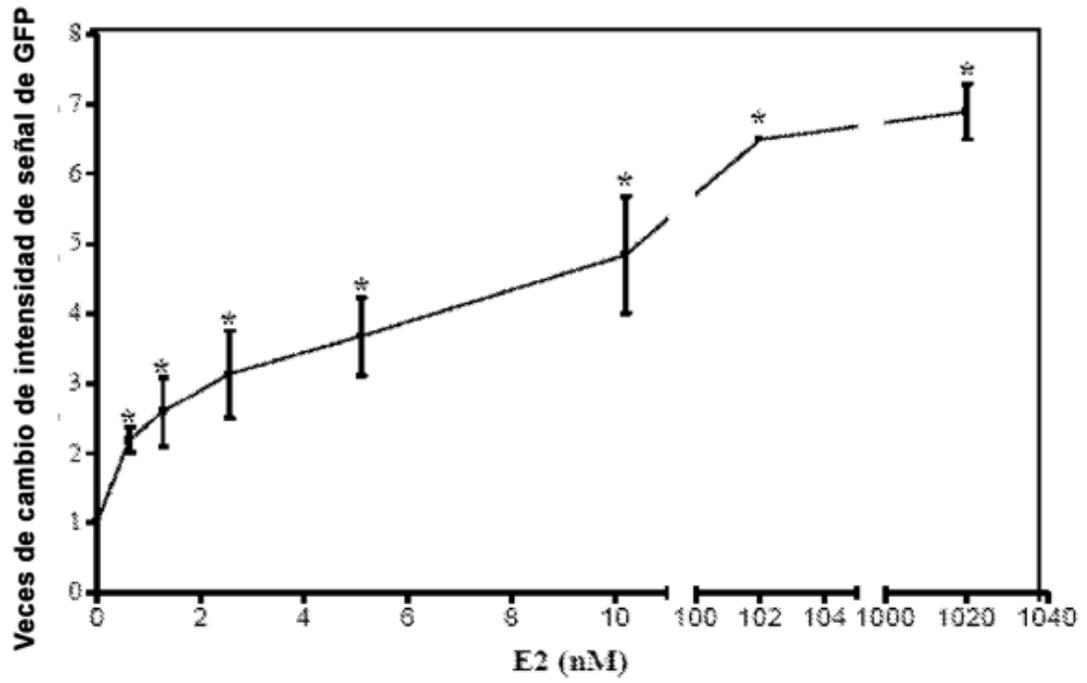


**Fig. 8**



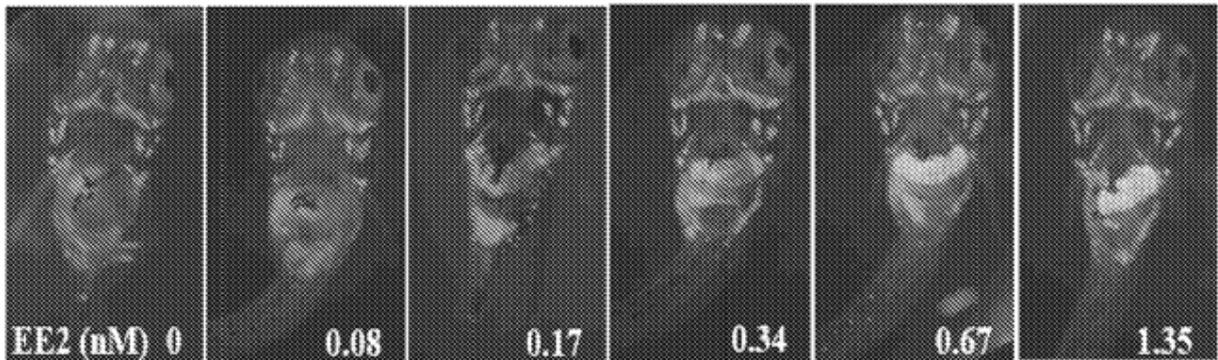
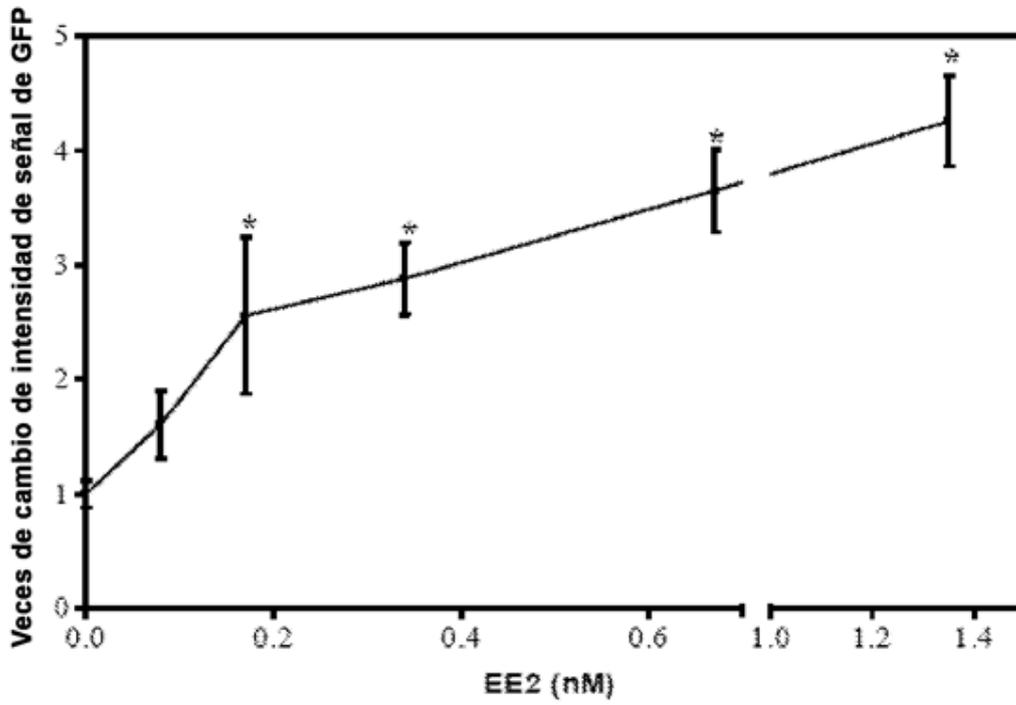
\*p<0,05

**Fig. 9**



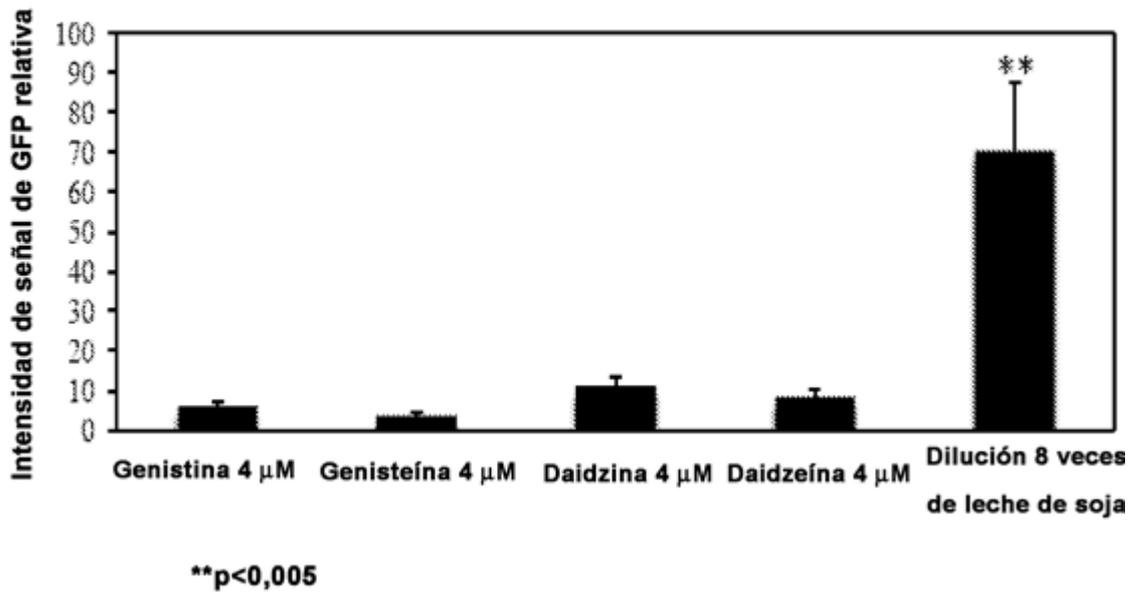
\*p<0,05

**Fig. 10**

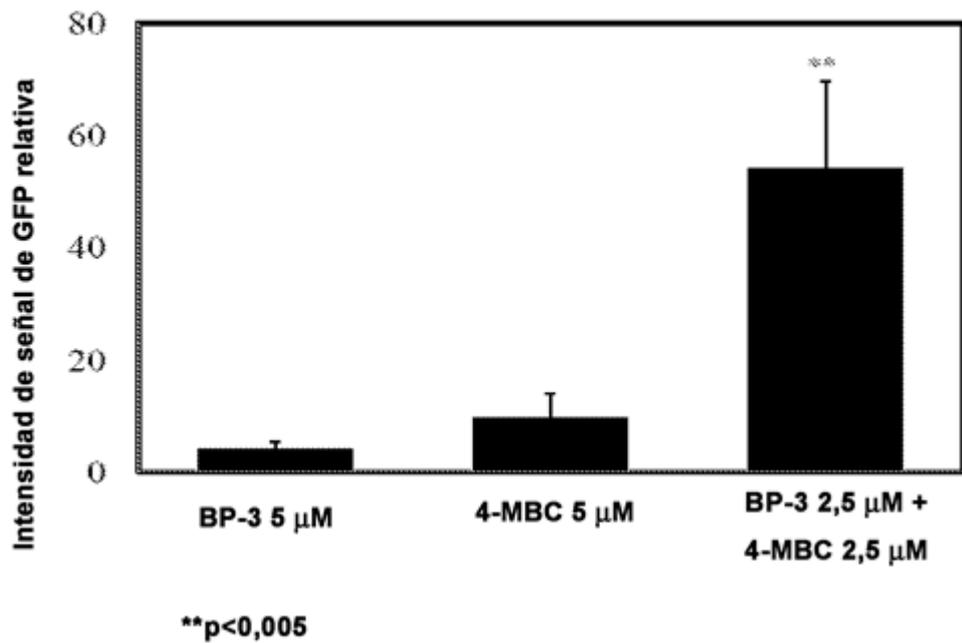


\*p<0,05

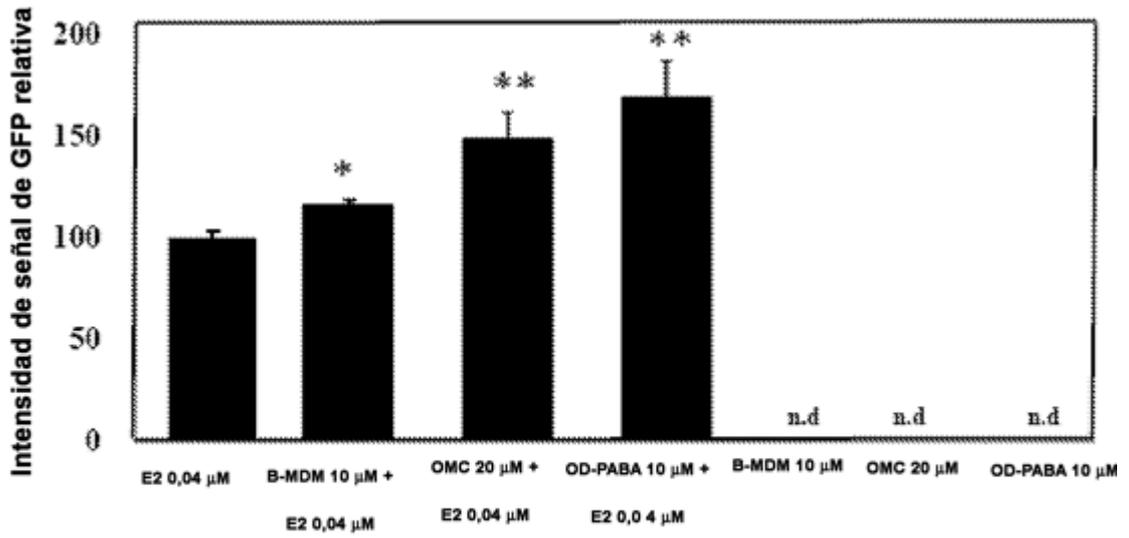
**Fig. 11**



**Fig. 12**

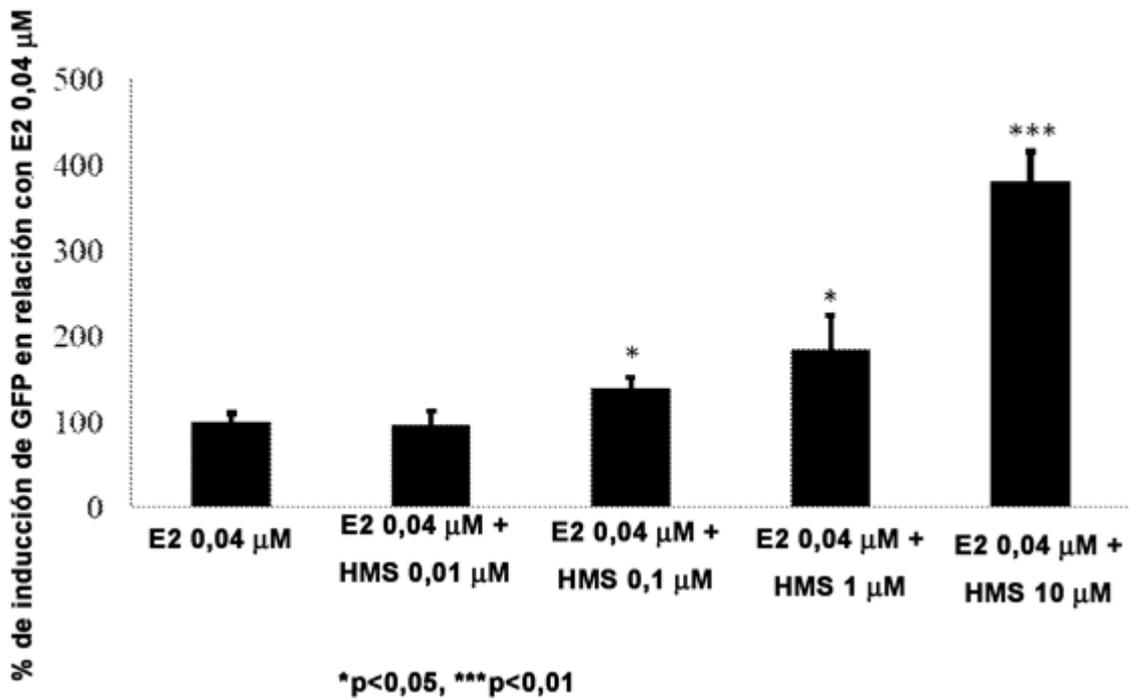


**Fig. 13**



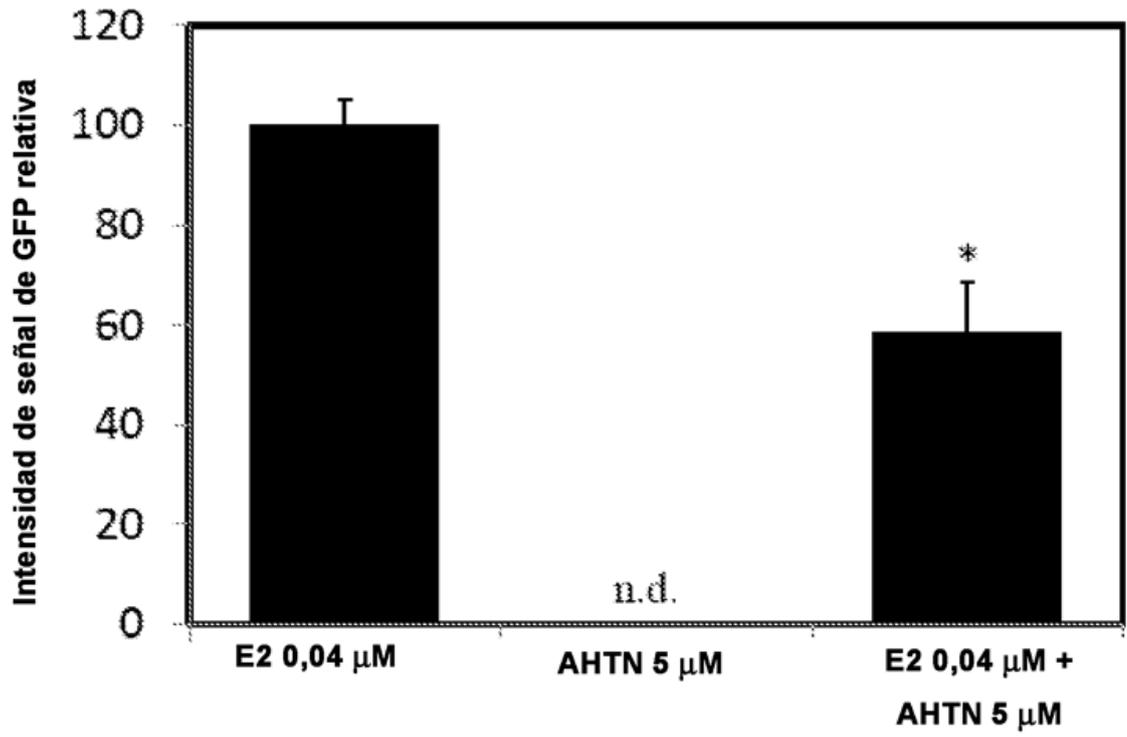
\*p<0,05, \*\*p<0,005

**Fig. 14**



\*p<0,05, \*\*\*p<0,01

**Fig. 15**



\*p < 0,05