



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**  
**POSGRADO EN CIENCIAS DEL MAR Y LIMNOLOGÍA**

**EVALUACIÓN DE LA EXPRESIÓN RELATIVA DE LOS GENES  
BIOMARCADORES CYP1A, MT Y VTG EN *Gambusia yucatan* EN  
CENOTES DE YUCATÁN CON RESPECTO A MÚLTIPLES GENES DE  
REFERENCIA**

**TESIS**

QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADÉMICO DE:  
**MAESTRO(A) EN CIENCIAS**

(CON ÉNFASIS EN QUÍMICA ACUÁTICA)

PRESENTA:

**MARÍA CONCEPCIÓN GÓMEZ MALDONADO**

**TUTOR PRINCIPAL:**

**DRA. GABRIELA RODRÍGUEZ FUENTES**  
UNAM Unidad de Química en Sisal

**COMITÉ TUTOR:**

**Dra. Alejandra García Gasca**  
CIAD Unidad Mazatlán

**Dra. Clara Elizabeth Galindo Sánchez**  
CICESE Baja California

**Dra. Cecilia Robles Mendoza**  
UNAM Facultad de Ciencias en Sisal

**Dra. Elsa Noreña Barroso**  
UNAM Unidad de Química en Sisal

**SISAL, HUNUCMÁ, YUCATÁN, MÉXICO., NOVIEMBRE, 2018.**



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



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

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

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

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



**EVALUACIÓN DE LA EXPRESIÓN RELATIVA DE LOS GENES  
BIOMARCADORES CYP1A, MT Y VTG EN *Gambusia yucatanana* EN  
CENOTES DE YUCATÁN CON RESPECTO A MÚLTIPLES GENES DE  
REFERENCIA**

**TESIS**

QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADÉMICO DE:  
**MAESTRO(A) EN CIENCIAS**

CON ÉNFASIS EN QUÍMICA ACUÁTICA

PRESENTA:  
**MARÍA CONCEPCIÓN GÓMEZ MALDONADO**

**TUTOR PRINCIPAL:**  
**DRA. GABRIELA RODRÍGUEZ FUENTES**  
UNAM Unidad de Química en Sisal

**COMITÉ TUTOR:**  
**Dra. Alejandra García Gasca**  
CIAD Unidad Mazatlán  
**Dra. Clara Elizabeth Galindo Sánchez**  
CICESE Baja California  
**Dra. Cecilia Robles Mendoza**  
UNAM Facultad de Ciencias en Sisal  
**Dra. Elsa Noreña Barroso**  
UNAM Unidad de Química en Sisal

**SISAL, HUNUCMÁ, YUCATÁN, MÉXICO., NOVIEMBRE, 2018.**

Evaluar y aminorar el deterioro ambiental hoy en día es más complejo que hace 25 años atrás. Esto se debe principalmente a las consecuencias no predecibles del uso de casi 100.000 productos químicos que la sociedad moderna está produciendo en una escala tal, que están amenazando el ambiente<sup>1</sup>. Las actividades humanas se ejercen en todas las direcciones, contribuyendo cada vez más al desequilibrio de los sistemas naturales, producto del desarrollo industrial, el incremento de la población y la introducción de una amplia gama de sustancias químicas que no están presentes en forma natural<sup>2</sup>.

<sup>1</sup>Jørgensen,1998.; <sup>2</sup>Branco, 1984

## **AGRADECIMIENTOS**

Este documento representa la suma de esfuerzos y el apoyo de las personas que me han acompañado en este camino.

### **A MI FAMILIA**

*Mis padres*

**Raúl Ernesto Gómez Rodríguez**

**María Concepción Maldonado Martínez**

Gracias por apoyarme, acompañarme e impulsarme en mis sueños con todo su amor y cariño.

*Mi hermano Nanosinx.*

*Mis tías*

**Leydi Susana Maldonado Martínez**

**Guadalupe Aracelly Maldonado Martínez**

Que siempre se preocupan y cuidan de mi.

*A mi adorada compañía peluda*

**Reyna Brawny**

### **A MIS AMIGOS**

Por que en su compañía viví momentos realmente especiales, que a pesar del tiempo y la distancia siempre recordaré con mucha alegría.

**Mafer, Luis fer, Adán, Blanca, Meritxell, Lucy y Miri** que en varias ocasiones me recibió en su hogar para poder avanzar en el trabajo de laboratorio, gracias por la confianza y amistad.

### **A MIS MAESTROS**

**Dr. Roberto Vazquez Euan**

Gracias por sus consejos y por compartirme sus conocimientos al inicio de este proyecto.

**M. en C. Karla Susana Escalante Herrera**

Por tu enorme paciencia para enseñarme y explicarme acerca de las técnicas de laboratorio y su correcta aplicación en Biología Molecular.

**M. en C. Eduardo Rafael Pacheco Góngora**

Muchas gracias por su apoyo y gran paciencia en la parte estadística utilizando R.

**L.C.C. Omar Chiyeán Cámara**

Gracias por tu ayuda en los problemas técnicos que presenté y tus consejos.

**A MI COMITÉ TUTOR**

**Dra. Cecilia Robles Mendoza**

**Dra. Clara Elizabeth Galindo Sánchez**

**Dra. Elsa Noreña Barroso**

**Dra. Silvia Alejandra García Gasca**

Mi agradecimiento más sincero por ayudarme a enriquecer este trabajo, por su tiempo y sus palabras de ánimo.

**A MI DIRECTORA DE TESIS:**

**Dra. Gabriela Rodríguez Fuentes**

A quien expreso mi profundo agradecimiento por que sin su apoyo no hubiese sido posible para mí realizar este proyecto, gracias por confiar en mi, por orientarme y enseñarme a ser una mejor persona y científica. Usted es un gran ejemplo a seguir.

**AL POSGRADO DE CIENCIAS DEL MAR Y LIMNOLOGÍA PCML**

Por darme la oportunidad de estudiar en esta área.

**A CONACYT**

Por su apoyo y patrocinio brindado durante la realización de este proyecto

# CONTENIDO

## TABLA DE CONTENIDO

<b>1. INTRODUCCIÓN.....</b>	<b>13</b>
<b>2. ANTECEDENTES .....</b>	<b>14</b>
2.1 LA IMPORTANCIA DEL ESTUDIO DE LOS BIOMARCADORES EN ECOTOXICOLOGÍA.....	14
2.2 GENES BIOMARCADORES EVALUADOS EN ESTE ESTUDIO .....	21
CITOCROMO 4501A (CYP1A) .....	21
METALOTIONEÍNAS (MT) .....	30
VITELÓGENINA (VTG).....	35
2.3 GENES DE CONTROL INTERNO O DE REFERENCIA UTILIZADOS PARA EL ANÁLISIS DE LA EXPRESIÓN DE RNA EN PCR EN TIEMPO REAL (qPCR).....	37
GENES DE REFERENCIA UTILIZADOS EN ESTE PROYECTO .....	38
2.4 DESCRIPCIÓN GENERAL DE LA ZONA DE ESTUDIO .....	39
SITIOS DE MUESTREO .....	40
2.5 GAMBUSIA YUCATANA COMO ESPECIE CENTINELA EN YUCATÁN .....	49
<b>3. JUSTIFICACIÓN .....</b>	<b>51</b>
<b>4. PREGUNTAS DE INVESTIGACIÓN.....</b>	<b>52</b>
<b>5. HIPÓTESIS .....</b>	<b>52</b>
<b>6. OBJETIVO GENERAL.....</b>	<b>53</b>
<b>7. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....</b>	<b>53</b>
<b>8. MATERIALES Y MÉTODOS.....</b>	<b>54</b>
8.1 OBTENCIÓN DE MUESTRAS Y ACONDICIONAMIENTO .....	55
8.2 EXTRACCIÓN DE RNA.....	55
8.3 CUANTIFICACIÓN DE RNA.....	56
8.4 SÍNTESIS DE DNA COMPLEMENTARIO .....	57
8.5 VALIDACIÓN DEL OLIGONUCLEÓTIDO CUANTITATIVO ESPECÍFICO E1FA Y DEL OLIGONUCLEÓTIDO CUANTITATIVO RPL7.....	57
8.6 PCR TIEMPO REAL .....	60
8.6.1. ESTANDARIZACIÓN DE REACCIÓN DE PCR EN TIEMPO REAL .....	60
8.6.2.- ANÁLISIS DE LA CURVA DE FUSIÓN PARA DETERMINAR LA ESPECIFICIDAD DE LOS AMPLICONES.....	62
8.6.3.- PARÁMETROS DE LA RECTA ESTÁNDAR DE LAS CURVAS DE CALIBRACIÓN .....	63
8.6.4.- DETERMINACIÓN DE LA EFICIENCIA $10^{-1/Pendiente}$ .....	65
8.7 ANALISIS DE ESTABILIDAD DE LOS GENES DE REFERENCIA .....	65
BestKeeper. ....	65
GeNorm.....	66
REFFINDER: BESTKEEPER, geNORM y NORMFINDER .....	66
8.8 METODOS PARA CALCULAR LA EXPRESION RELATIVA DE LOS GENES .....	67
DELTA CT COMPARATIVOS .....	67
CURVA ESTÁNDAR PARA CUANTIFICACIÓN RELATIVA .....	68
MÉTODO DE LA MEDIA GEOMÉTRICA DE MÚLTIPLES GENES DE REFERENCIA.....	70
8.9 ANÁLISIS ESTADÍSTICO .....	71
8.10 CORRELACION ENTRE GENES BIOMARCADORES Y CONTAMINANTES.....	73

<b>9. RESULTADOS Y DISCUSIÓN</b> .....	<b>75</b>
9.1 VALIDACIÓN DEL OLIGONUCLEÓTIDO CUANTITATIVO ESPECÍFICO E1FA Y DEL OLIGONUCLEÓTIDO CUANTITATIVO RPL7 .....	75
BLAST y BIOEDIT .....	75
9.2 ANÁLISIS DE LA CURVA DE FUSIÓN PARA DETERMINAR LA ESPECIFICIDAD DE LOS AMPLICONES .....	79
9.3 PARÁMETROS DE LA RECTA ESTÁNDAR DE LAS CURVAS DE CALIBRACIÓN .....	80
9.4 DETERMINACIÓN DE LA EFICIENCIA RELATIVA $10^{-(1/PENDIENTE)}$ .....	82
9.5 ANÁLISIS DE ESTABILIDAD DE LOS GENES DE REFERENCIA .....	83
■ BESTKEEPER .....	83
■ geNORM .....	86
■ REFFINDER: BESTKEEPER, geNORM y NORMFINDER .....	87
9.5.1 VARIACIÓN DE LA EXPRESIÓN DEL CT DE LOS GENES DE REFERENCIA CON RESPECTO AL LARGO TOTAL Y EL SEXO .....	89
9.6 EXPRESIÓN RELATIVA CON RESPECTO A UN SOLO GEN DE REFERENCIA .....	93
9.7 EXPRESIÓN RELATIVA CON RESPECTO A LA MEDIA GEOMÉTRICA DE MÚLTIPLES GENES DE REFERENCIA Y SU ANÁLISIS ESTADÍSTICO .....	97
9.8 CORRELACIÓN DE LA EXPRESIÓN RELATIVA DE LOS GENES BIOMARCADORES CYP1A, MT Y VTG CON RESPECTO AL LARGO TOTAL .....	107
9.9 CORRELACION ENTRE GENES BIOMARCADORES Y CONTAMINANTES .....	108
PLAGUICIDAS ORGANOCORADOS DETECTADOS EN AGUA Y SEDIMENTOS .....	108
CORRELACIÓN ENTRE LOS GENES BIOMARCADORES E HIDROCARBUROS AROMÁTICOS POLICÍCLICOS DETECTADOS EN AGUA .....	119
CORRELACIÓN ENTRE LOS GENES BIOMARCADORES Y METALES EN PESADOS DETECTADOS EN AGUA .....	121
CORRELACIÓN ENTRE GENES BIOMARCADORES Y PLAGUICIDAS ORGANOFOSFORADOS	127
<b>10. CONCLUSIONES</b> .....	<b>132</b>
<b>LITERATURA CITADA</b> .....	<b>134</b>
<b>ANEXOS</b> .....	<b>150</b>

## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1. Mecanismo de acción del citocromo P450. Este esquema es una simplificación del mecanismo de acción del citocromo P450 (CYP). En él, el Fe<sup>3+</sup> representa al hierro del grupo heme del CYP oxidado, RH y ROH a los sustratos y productos respectivamente. En este ciclo de óxido-reducción se liberan anión superóxido (O<sub>2</sub><sup>•-</sup>) y peróxido de hidrógeno (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>). Imagen basada a partir de la propuesta de Coon (1992)..... 22
- Figura 2. Modelo de transducción de señal mediado por el heterodímero AhR/ARNT .... 25
- Figura 3. Representación esquemática de las rutas activadas por la hipoxia liderada por la sobre regulación de los genes implicados en la supervivencia de la célula y la baja regulación de CYP1A1 y CYP1A2 debido a la disminución de la disponibilidad de ARNT. El O<sub>2</sub> ↓ representa hipoxemia, AhR el receptor aril hidrocarburos, ARNT el translocador nuclear del receptor aril hidrocarburos, NF1 es el factor nuclear 1, EPO eritropoyetina, HIF1 factor inducible por hipoxia, IGF-2 factor de crecimiento insulínico tipo 2, VEGF factor de crecimiento endotelial vascular. Imagen basada y modificada de C. Fradette y P. du Souich, 2004. .... 29
- Figura 4. El promotor del gen de la MT. Juárez Rebollar D & Méndez Armenta M 2014.34

Figura 5. Mapa de la zona geohidrológica del anillo de cenotes. Consejo de cuenca de la Península de Yucatán. 2012. Comité Técnico de Aguas Subterráneas para la zona metropolitana de Mérida COTASMEY .....	40
Figura 6. Sitios de muestreo en la península de Yucatán. Google Earth. ....	40
Figura 7. Entrada al Rancho Santa Julia Estación 6, Celestún.....	42
Figura 8. Cenote abierto del Rancho Santa Julia .....	42
Figura 9. Cenote X'Batun en San Antonio Mulix, Umán. ....	43
Figura 10. Cenote Yaxcopoil ubicado en la ex- hacienda y comisaria del mismo nombre en Umán. ....	44
Figura 11. Entrada del cenote Nah- Yah en Pixán, Tecoh.....	44
Figura 12.- Entrada al cenote Yaxbacaltún en Homún. ....	46
Figura 13. Cenote Chen Vazquez en Santo Domingo, Buctzotz. ....	47
Figura 14. Cenote del Rancho X'labón seleccionado como sitio de muestreo. ....	48
Figura 15. Pez Gambusia yucatanana macho.....	49
Figura 16. Mapa de la distribución del pez Gambusia yucatanana. ....	49
Figura 17. Diagrama de la metodología realizada.....	54
Figura 18. Banda del producto de pcr purificado en gel de agarosa.....	58
Figura 19. Banda del producto de pcr purificado en gel de agarosa.....	59
Figura 20. Diagrama de diluciones.....	63
Figura 21. Curvas estándar de amplificación. ....	64
Figura 22. Verificación de la eficiencia y de la linealidad de la curva estándar. ....	64
Figura 23. Sustitución de los valores en la ecuación de la recta. ....	68
Figura 24. Diagrama de procedimiento para la evaluación estadística en R Studio. ....	71
Figura 25. Resultados del BLAST de la secuencia que corresponde a E1Fa. ....	75
Figura 26. Cromatograma de la secuencia Forward del gen E1Fa .....	76
Figura 27. Cromatograma de la secuencia Reverse del gen E1Fa .....	76
Figura 28. Alineamiento de las secuencias F y R en BIOEDIT .....	77
Figura 29. Resultados del BLAST de la secuencia que corresponde a E1Fa. ....	78
Figura 30. Resultados del BLAST de la secuencia que corresponde a RpL7. ....	78
Figura 31. Curva de disociación de los oligonucleótidos.....	79
Figura 32. a) Curva de amplificación b) curva estándar de $\beta$ - Actina. Concentraciones a 1.1458 ng/ $\mu$ l, .3819ng/ $\mu$ l, .1273 ng/ $\mu$ l y 0.0424 ng/ $\mu$ l .....	80
Figura 33. a) Curva de amplificación b) curva estándar de E1Fa. Concentraciones a 68.75 ng, 1.1458 ng/ $\mu$ l, .3819ng/ $\mu$ l, .1273 ng/ $\mu$ l y 0.0424 ng/ $\mu$ l .....	80
Figura 34. a) Curva de amplificación b) curva estándar de RpL7. Concentraciones a 68.75 ng, 1.1458 ng/ $\mu$ l, .3819ng/ $\mu$ l, .1273 ng/ $\mu$ l y 0.0424 ng/ $\mu$ l .....	80
Figura 35. a) Curva de amplificación b) curva estándar de CYP Concentraciones a 1.1458 ng/ $\mu$ l, .3819ng/ $\mu$ l, .1273 ng/ $\mu$ l y 0.0424 ng/ $\mu$ l .....	81
Figura 36. a) Curva de amplificación b) curva estándar de MT Concentraciones a 1.1458 ng/ $\mu$ l, .3819ng/ $\mu$ l, .1273 ng/ $\mu$ l y 0.0424 ng/ $\mu$ l .....	81
Figura 37. a) Curva de amplificación b) curva estándar de VTG Concentraciones a 1.1458 ng/ $\mu$ l, .3819ng/ $\mu$ l, .1273 ng/ $\mu$ l y 0.0424 ng/ $\mu$ l .....	81
Figura 38. Gráfica de estabilidad de los genes de referencia candidatos en peces calibradores hembras en refFinder. ....	88
Figura 39. Gráfica de estabilidad de los genes de referencia candidatos en peces calibradores machos en refFinder.....	88
Figura 40. Expresión de $\beta$ - Actina en cada grupo de tamaño de machos y hembras ....	91
Figura 41. Expresión de E1Fa en cada grupo de tamaño de machos y hembras. ....	92
Figura 42. Expresión de RpL7 en cada grupo de tamaño de machos y hembras. ....	92

Figura 43. Evaluación de la expresión relativa de MT usando E1Fa en machos como gen de referencia. a) Método de los CT comparativos $\Delta\Delta$ CT y b) el Método de la curva estándar. E6:Rancho Santa Julia; E9:San Antonio Mulix "X´Batún"; E10:Yaxcopoil; E13: Nah-yah; E19:Yaxbacaltún; E22: Chen Vázquez; E25:Rancho X´labón Subim. ....	94
Figura 44. Evaluación de la expresión del gen CYP1A en machos utilizando $\beta$ -Actina como gen de referencia a) Método de los CT comparativos $\Delta\Delta$ CT y b) el Método de la curva estándar. E6:Rancho Santa Julia; E9:San Antonio Mulix "X´Batún"; E10:Yaxcopoil; E13: Nah-yah; E19:Yaxbacaltún; E22: Chen Vázquez; E25:Rancho X´labón Subim. ....	95
Figura 45. Expresión relativa de CYP1A utilizando el método de los CT Comparativo utilizando distintos genes de referencia: a) B-Actina b) E1Fa y c) RPL7. E6:Rancho Santa Julia; E9:San Antonio Mulix "X´Batún"; E10:Yaxcopoil; E13: Nah-yah; E19:Yaxbacaltún; E22: Chen Vázquez; E25:Rancho X´labón Subim.....	96
Figura 46. Gráfica de la expresión del gen biomarcador CYP1A en machos con respecto a la media geométrica de múltiples genes de referencia. E6:Rancho Santa Julia; E9:San Antonio Mulix "X´Batún"; E10:Yaxcopoil; E13: Nah-yah; E19:Yaxbacaltún; E22: Chen Vázquez; E25:Rancho X´labón Subim.....	99
Figura 47. Gráfica de la expresión del gen biomarcador CYP1A en hembras con respecto a la media geométrica de múltiples genes de referencia. E6: Rancho Santa Julia; E9: San Antonio Mulix "X´Batún"; E10: Yaxcopoil; E13: Nah-yah; E19: Yaxbacaltún; E22: Chen Vázquez; E25: Rancho X´labón Subim.....	99
Figura 48. Gráfica de la expresión del gen biomarcador MT en machos con respecto a la media geométrica de múltiples genes de referencia. E6: Rancho Santa Julia; E9: San Antonio Mulix "X´Batún"; E10: Yaxcopoil; E13: Nah-yah; E19: Yaxbacaltún; E22: Chen Vázquez; E25: Rancho X´labón Subim. ....	102
Figura 49. Gráfica de la expresión del gen biomarcador MT en hembras con respecto a la media geométrica de múltiples genes de referencia. E6: Rancho Santa Julia; E9: San Antonio Mulix "X´Batún"; E10: Yaxcopoil; E13: Nah-yah; E19: Yaxbacaltún; E22: Chen Vázquez; E25: Rancho X´labón Subim. ....	103
Figura 50. Gráfica de la expresión del gen biomarcador VTG en machos con respecto a la media geométrica de múltiples genes de referencia. E6: Rancho Santa Julia; E9: San Antonio Mulix "X´Batún"; E10: Yaxcopoil; E13: Nah-yah; E19: Yaxbacaltún; E22: Chen Vázquez; E25: Rancho X´labón Subim. ....	105
Figura 51. Gráfica de la variación espacio-temporal de HCH en agua de los cenotes muestreados en el proyecto PAPIIT IA200214. El límite de HCH en agua corresponde a lo establecido por la Ley Federal de derechos en materia de Aguas Nacionales CONAGUA 2016. ....	108
Figura 52. Gráfica de la variación espacio-temporal de HCH en sedimentos de los cenotes muestreados en el proyecto Papiit IA200214. El límite de HCH en sedimentos corresponde al valor de LEL (Lowest Effect Level) en las tablas de referencia y proyección rápida SQuiRTs (NOAA, 2008). ....	109
Figura 53. Gráfica de la variación espacio-temporal de clordanos en agua de los cenotes muestreados en el proyecto Papiit IA200214. El límite de clordanos en agua corresponde a la ley federal de derechos en materia de agua nacionales Conagua 2016 .....	110
Figura 54. Gráfica de la variación espacio-temporal de clordanos en sedimentos de los cenotes muestreados en el proyecto Papiit IA200214. El límite de clordanos en sedimentos corresponde al valor de LEL (Lowest Effect Level) en las tablas de referencia y proyección rápida SQuiRTs (NOAA, 2008). ....	111

Figura 55. Gráfica de la variación espacio-temporal de aldrín, dieldrín y endrín en agua de los cenotes muestreados en el proyecto Papiit IA200214. La línea negra horizontal corresponde al valor del límite máximo permitido en Aldrín por Conagua 2016. ....	113
Figura 56.- Gráfica de la variación espacio-temporal de aldrín, dieldrín y endrín en sedimentos de los cenotes muestreados en el proyecto Papiit IA200214. El límite de aldrín, dieldrín y endrín en sedimentos corresponde al valor de LEL (Lowest Effect Level) en las tablas de referencia y proyección rápida SQuiRT (NOAA, 2008). ....	114
Figura 57. Gráfica de la variación espacio-temporal de DDT en agua de los cenotes muestreados en el proyecto Papiit IA200214. El límite de DDT establecido por la Ley Federal de Derechos Conagua 2016. ....	115
Figura 58. Gráfica de la variación espacio-temporal de DDT en sedimentos de los cenotes muestreados en el proyecto Papiit IA200214. El límite de DDT en sedimentos corresponde al valor de LEL (Lowest Effect Level) en las tablas de referencia y proyección rápida SQuiRT (NOAA, 2008). ....	116
Figura 59. Gráfica de la variación espacio-temporal de metoxicloro en sedimentos de los cenotes muestreados en el proyecto Papiit IA200214. El límite de metoxicloro en sedimentos corresponde al valor LEL (Lowest Effect Level) en las tablas de referencia y proyección rápida SQuiRTs (NOAA, 2008). ....	118
Figura 60. Gráfica de la variación espacio-temporal de PAH en la zona de estudio muestreada en octubre 2015. ....	119
Figura 61. Gráfica de la variación espacio-temporal de PAH en la zona de estudio muestreada en mayo 2016. ....	120
Figura 62. Gráfica de la variación espacio-temporal del cadmio en agua de los cenotes muestreados en el proyecto Papiit IA101914. ....	121
Figura 63. Gráfica de la variación espacio-temporal de plomo en agua de los cenotes muestreados en el proyecto Papiit IA101914. ....	123
Figura 64. Gráfica de la variación espacio-temporal de níquel en agua de los cenotes muestreados en el proyecto Papiit IA101914. ....	124
Figura 65. Gráfica de la variación espacio-temporal de Cobre en agua de los cenotes muestreados en el proyecto Papiit IA101914. ....	126
Figura 66. Gráfica de la variación espacio-temporal de Clorpirifos en sedimentos de los cenotes muestreados en el proyecto Papiit IA200214. ....	127
Figura 61. Insertar secuencia en Formato Fasta en Blast. ....	162
Figura 68. Ejemplo de cromatograma generado por Bioedit. ....	163

## LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Clasificación y descripción general de los biomarcadores. ....	16
Tabla 2. Localización de las estaciones de muestro definidas para el proyecto. ....	41
Tabla 3. Taxonomía de Gambusia yucataná. ....	50
Tabla 4. Características del par de oligonucleótidos Forward y Reverse del gen RpL7 de Poecilia formosa. ....	58
Tabla 5. Condiciones de amplificación de los genes evaluados. ....	61
Tabla 6. Características de los oligonucleótidos utilizados en este estudio. ....	61
Tabla 7. Valores de los CT's del gen de referencia y el gen diana. ....	67

Tabla 8. Cálculos para el método de la curva estándar. ....	69
Tabla 9. Expresión relativa utilizando múltiples genes de referencia, ejemplo .....	70
Tabla 10. Eficiencia relativa de las reacciones de qPCR para cada uno de los genes analizados. ...	82
Tabla 11. Resultado del análisis de BestKeeper en hembras.....	84
Tabla 12. Resultado del análisis de BestKeeper en machos. ....	84
Tabla 13. Coeficiente de correlación de Pearson (r) entre genes de referencia. ....	84
Tabla 14. Coeficiente de correlación de Pearson (r) entre genes de referencia y el índice BestKeeper. ....	85
Tabla 15. Análisis de regresión entre los genes de referencia frente a BestKeeper. ....	85
Tabla 16. Resultado de la estabilidad de expresión de los genes de referencia en hembras. ....	86
Tabla 17. Resultado de la estabilidad de expresión de los genes de referencia en machos.....	86
Tabla 18. Correlación de Pearson generado por GeNorm de qBase+. ....	87
Tabla 19. Ranking de los genes de referencia más estables obtenido mediante la herramienta RefFinder de Cotton EST Database North Carolina. ....	87
Tabla 20. p-valor obtenido de la prueba Dunn Test para evaluar variación del CT de $\beta$ -Actina en machos y hembras con respecto al largo total. ....	90
Tabla 21. Resultado de la prueba de medianas Mann-Whitney entre la expresión en CT de cada gen de referencia con respecto a hembras y machos del mismo grupo de tamaño basado en el Largo Total. ....	91
Tabla 22. Diferencias de las estaciones con respecto al control en temporada de lluvias y secas en machos y hembras. ....	100
Tabla 23. Diferencias entre estaciones en ambas temporadas en machos y hembras. ....	100
Tabla 24. Diferencias en la expresión de CYP1A entre machos y hembras en ambas temporadas. ....	100
Tabla 25. Diferencias de las estaciones con respecto al control en temporada de lluvias y secas en machos y hembras. ....	103
Tabla 26. Diferencias entre estaciones en ambas temporadas en machos y hembras. ....	104
Tabla 27. Diferencias en las estaciones entre las temporadas 1 y 2 en peces machos y hembras. ....	104
Tabla 28. Diferencias en la expresión de MT entre machos y hembras en ambas temporadas. ....	104
Tabla 29. Diferencia entre estaciones con respecto al control en temporada de secas peces macho. Expresión del gen VTG. ....	106
Tabla 30. Diferencia entre estaciones de la temporada de secas en peces macho. Expresión del gen VTG. ....	106
Tabla 31. Matriz de correlación de Spearman entre genes biomarcadores en peces machos y plaguicidas organoclorados en agua y sedimentos. ....	129
Tabla 32. Matriz de correlación de Spearman entre genes biomarcadores en peces hembras y plaguicidas organoclorados en agua y sedimentos. ....	130
Tabla 33. Tabla de componentes del kit iScript Reverse Transcription Supermix BIORAD .....	154
Tabla 34. Tiempo de duración en las etapas de retrotranscripción. ....	154
Tabla 35. Reactivos para la PCR punto final. ....	156
Tabla 36. Cálculos para encontrar volúmenes con concentraciones definidas I. ....	156
Tabla 37. Cálculos para encontrar volúmenes con concentraciones definidas II. ....	157
Tabla 38. Cálculos para encontrar volúmenes con concentraciones definidas III. ....	157
Tabla 39. Cálculos para encontrar volúmenes con concentraciones definidas IV. ....	157
Tabla 40. Expresión relativa de CYP1A en cada organismo evaluada por los 3 métodos. DD: Delta CT comparativo, CE: Curva estándar y 3GENES: Media Geométrica con múltiples genes de referencia. ....	164
Tabla 41. Expresión relativa de MT en cada organismo evaluada por los 3 métodos. DD: Delta CT comparativo, CE: Curva estándar y 3GENES: Media Geométrica con múltiples genes de referencia. ....	165
Tabla 42. Expresión relativa de VTG en cada organismo evaluada por los 3 métodos. DD: Delta CT comparativo, CE: Curva estándar y 3GENES: Media Geométrica con múltiples genes de referencia. ....	166

## ABSTRACT

In the Yucatan Peninsula, ground water is the main water supply for human, agricultural and industrial activities. However, several studies point to the presence of organochlorine pesticides, toxic metals, and household waste from soil fertilizers, pest control and animal or human manure; the infiltration of these pollutants in urban and rural areas represent a serious risk because the Ring of Sinkholes has been shown to be a zone of high permeability, and many reports have emphasized the vulnerability of karstic aquifers to antropogenic contamination. The use of sentinel species and biomarkers to monitor water quality has been implemented in many programs worldwide, but unfortunately studies related with the measurement and effects of those pollutants in native organisms are scarce. Thus, it is necessary to obtain scientific information about the effects of xenobiotics in local species to improve risk assessment studies and prevent irreversible effects in wild populations. In the present study, a local species, the mosquitofish *Gambusia yucatana*, was selected because of its wide distribution, high sensitivity and availability, to asses the relative expresion of three biomarker genes (CYP1A, MT and VTG) in seven water bodies during rainy and dry seasons.

# 1. INTRODUCCIÓN

El Estado de Yucatán carece de aguas superficiales como los ríos; debido a la naturaleza kárstica de las rocas de la entidad el agua es susceptible a la contaminación proveniente de la escorrentía agrícola en época de lluvias que trae consigo desechos de origen animal y humano, plaguicidas, metales y nutrientes que pueden amenazar la calidad el agua del acuífero.

El uso de biomarcadores moleculares en organismos nativos es una manera efectiva de evaluar la presencia de compuestos xenobióticos que representan un riesgo ecológico potencial para las poblaciones humanas en las fuentes de abastecimiento de agua (Chambers et al., 2002) como lo son los cenotes del estado. Este método es particularmente importante en regiones como la Península de Yucatán donde las fuentes de abastecimiento de agua para consumo humano están en constante exposición a descargas de aguas negras residenciales y/o lixiviados de productos agrícolas o industriales (Kiel-Martínez, 2012). Para poder proponer un programa de biomonitoreo efectivo es fundamental identificar tanto la estrategia como los biomarcadores adecuados, es importante la selección de un método de evaluación que proporcione una interpretación más confiable. En este proyecto se eligió al pez *Gambusia yucatana* como bioindicador de contaminación antropogénica para el estudio de la expresión relativa de los genes biomarcadores Citocromo P450 1A (CYP4501A también nombrado como CYP1A), Metalotioneína (MT) y vitelogenina (VTG), estos tres biomarcadores han sido ampliamente utilizados por los cambios en sus patrones de expresión ya que se encuentran involucrados en la biotransformación de compuestos xenobióticos, transporte intracelular de metales y efectos estrogénicos respectivamente (Van der Oost et al., 2003; Huang et al., 2014). La zona de muestreo abarca siete cuerpos de agua distribuidos a lo largo del anillo de cenotes en temporada lluvias de 2015 y temporada de secas 2016.

## 2. ANTECEDENTES

### 2.1 LA IMPORTANCIA DEL ESTUDIO DE LOS BIOMARCADORES EN ECOTOXICOLOGÍA

Los biomarcadores han sido ampliamente estudiados en campo desde finales de los años 80 (Bayne., et al. 1985; Huggett., et al. 1992; Paekall y Shugart.,1993; Stagg., 1998), posteriormente fueron evaluados para su aplicación en la evaluación del riesgo para la salud ambiental (Vainio, 2001), los biomarcadores son herramientas que permiten evaluar *in vivo* e *in vitro* el seguimiento de efectos biológicos por contaminación y estrés ambiental (Rendon-von Ostén et al., 2005) basado en la medición de respuestas bioquímicas, celulares, fisiológicas o conductuales que pueden estar relacionados a la exposición de sustancias químicas en el medio (Martín-Díaz et al., 2004); asimismo los biomarcadores tienen el potencial de medir los cambios en las respuestas de un organismo, a nivel población, comunidad o ecosistema, cada una de estas respuestas representa una señal integrada de nivel de contaminación de una determinada zona y, por consiguiente, constituye un indicador de nivel de riesgo toxicológico al que puede ser sometida una determinada población natural (Chambers et al., 2002). Por tanto, los biomarcadores pueden proporcionar información tanto sobre la amplitud de la respuesta del organismo en función de la entidad del ataque químico, como la conexión entre los efectos de una sustancia contaminante y los diversos niveles de organización estructural, además pueden evidenciar efectos nocivos a muy bajas concentraciones y durante periodos cortos de exposición (Bayne et al.,1985; Palacio,2007), esto permite que los biomarcadores puedan utilizarse para establecer criterios de calidad ambiental en el control de las descargas de aguas residuales municipales e industriales en la implementación de estrategias de biorremediación ante daños irreversibles en el medio ambiente y en la defensa en actividades relacionadas con los contaminantes en caso de litigio ambiental (Toro-Restrepo, 2011; Martín-Díaz et al., 2004).

La experiencia adquirida en el uso de los biomarcadores a través de los años ha llevado al desarrollo y validación de métodos analíticos para peces, las especies objetivo más comunes, sin embargo la validación de los métodos, aunque básica y necesaria para el proceso de interpretación de datos no es suficiente; el potencial total de usar un enfoque basado en biomarcadores como herramienta para la evaluación ambiental es a menudo criticado por la falta de análisis estadísticos integrados, es necesario mejorar la interpretación de las variaciones entre

varios biomarcadores utilizados para el diagnóstico ambiental, lo que significa que requiere una metodología capaz de evaluar variaciones globales de un conjunto de biomarcadores (Beliaeff y Burgeot, 2002), es decir, un mayor grupo de biomarcadores proporcionaría una base más sólida para la interpretación de estudios ecotoxicológicos (Narbone et al.1999; Marshall et al. 1999) permitiendo que la información pueda resumirse en un conjunto de datos multivariantes.

La evaluación de biomarcadores en una muestra de organismos bioindicadores de una o más zonas sospechosas de contaminación y confrontados con organismos control o procedentes de una zona control permiten establecer el peligro potencial al que están sometidas la o las comunidades objeto de estudio (EULA,1999). Además, pueden indicar el efecto de un contaminante a largo plazo en función de la exposición a un nivel de contaminación que sobrepasa los niveles de homeostasis o compensación (Underwood y Peterson, 1998; Focardi,1999).

Los biomarcadores se encuentran diferenciados en tres tipos:

- Biomarcador de exposición o de dosis interna: Evalúa en el organismo la presencia de una sustancia exógena, un metabolito o el producto de interacción entre el agente xenobiótico y una molécula o célula diana (Arango, 2011). Es una medida de la concentración del agente en algún compartimento del cuerpo del individuo (Nordberg, 2010).
- Biomarcador de Efecto: Es el biomarcador más potente por que el organismo sentinela responde de manera medible a la acción de un contaminante al evaluar la alteración bioquímica, fisiológica o de comportamiento producida (Nadeau et al 2001; Arango, 2011). Es el parámetro biológico que refleja la interacción del químico con los receptores biológicos, como estas alteraciones anteceden al daño estructural, su detección permite la identificación precoz de exposiciones excesivas o peligrosas y tomar medidas preventivas (Ramirez, 2006).
- Biomarcador de susceptibilidad: Es un indicador de la capacidad heredada o adquirida de un organismo para responder a la exposición de una sustancia xenobiótica, señalan individuos con una sensibilidad aumentada de las moléculas diana o un metabolismo que causa una respuesta aumentada frente una dosis conocida (Nordberg, 2010).

Algunos biomarcadores pueden pertenecer a dos categorías, tal es el caso del gen Hsp70 considerado como un biomarcador de exposición, pero también un biomarcador de efecto ya que los tóxicos conocidos alteran la expresión génica en los tejidos de estos animales en contraste con una simple acumulación de Hsp (Nadeau et al 2001).

Asímismo los biomarcadores responden a distintos niveles de organización que pueden ir desde biomoléculas hasta poblaciones y comunidades, este estudio se enfoca en los biomarcadores moleculares, sin embargo, en la tabla 1 se puede encontrar una descripción breve de la clasificación y uso de los biomarcadores en la medición de contaminación ambiental.

Tabla 1. Clasificación y descripción general de los biomarcadores.

BIOMARCADORES	DESCRIPCIÓN
<p><b>BIOQUÍMICOS- MOLECULARES</b></p> <p>Algunas respuestas moleculares y bioquímicas son:</p> <p><b>1.-La inducción del citocromo P450</b></p> <p><b>2.- La inhibición de la colinesterasa</b></p> <p><b>3.- La inducción de metalotioneínas</b></p> <p><b>4.- La inducción de vitelogenina</b></p> <p><b>5.- La inducción de porfirinas</b></p> <p><b>6.-Activación de proteínas de choque térmico</b></p> <p><b>7.- Activación de receptores del ácido retinoico</b></p>	<p>Los biomarcadores bioquímicos y moleculares de la contaminación ambiental pueden ser definidos como macromoléculas (ácidos nucleicos, proteínas, lípidos o carbohidratos), para los cuales una alteración en su estructura o función puede ser usada como una indicación de la exposición a xenobióticos. La expresión génica generalmente se basa en modelos de interacciones químicas a nivel molecular y celular, son frecuentemente muy específicas debidas a la especificidad de los receptores de proteína por la estructura química. Sin embargo, la debilidad radica en que sus efectos no son específicos para una sola causa y la baja relevancia de los efectos ecológicos. Las respuestas de una especie centinela pueden ser muy inconstantes debido a factores biológicos inherentes (edad, sexo, estado reproductivo), a la variabilidad genética (en términos de tasa toxicocinética, metabolismo y susceptibilidad a los xenobióticos), y a la exposición de mezclas complejas de xenobióticos y compuestos químicos naturales. Se ha trabajado mucho en peces, pero se sabe poco en invertebrados, lo cual, limita la selección de organismos indicadores. Por lo tanto, muchos de estos métodos están en etapa de investigación pues, aunque algunos biomarcadores como los enzimáticos pueden ser muy sensibles, la detección de la respuesta no necesariamente tiene implicaciones para la salud del organismo, y el comportamiento normal del biomarcador no necesariamente implica una buena calidad ambiental su ausencia de efectos nocivos (Southward, 1982; Hodson, 2002; Theodorakis y Virgin, 2002; Virgin y Theodorakis, 2002; Palacio, 2007; Rhee et al., 2007).</p>

<p style="text-align: center;"><b>FISIOLOGICOS E INDICES DE CONDICIÓN</b></p> <p>Entre ellos se encuentran:</p> <p><b>1.- Los hematológicos</b></p> <p><b>2.- Neurotransmisores</b> + Catecolaminas</p> <p><b>3.- Hormonas de estrés</b> + Cortisol + Corticoesteroides</p> <p><b>4.- Índices organosomáticos.</b> + Índice hepatosomático + Índice gonadosomático</p> <p><b>5.- Índice morfométrico</b> + Largo relativo del gonopodió</p> <p><b>6.- Índice de fecundidad específica</b></p> <p><b>7.- Factor de condición de Fultón (k)</b></p> <p style="text-align: center;"><b>DE FISIOLÓGIA ENERGÉTICA</b></p> <p>1.-Crecimiento potencial (CP)</p>	<p>Son biomarcadores de la salud del organismo relacionados con el estrés. Una de sus ventajas es la facilidad para coleccionar los datos, además, son de gran relevancia ecológica, dado que proveen de un vínculo entre el estrés fisiológico y los impactos al nivel de población. Sin embargo, debido a que pueden responder a muchas causas hay mucha incertidumbre acerca de la interpretación, y del gran número de factores ambientales y biológicos que pueden influir en la respuesta que ha generado inconsistencia entre los estudios. Por lo tanto, la capacidad de diagnóstico de las mediciones fisiológicas puede ser fortalecida por la medición de covariables (edad, sexo, tamaño, estación, hábitat, etc.) y la distribución espacial y temporal de las respuestas y los tensores (Bayne et al., 1976; Bayne et al., 1985; Widdows, 1985; Widdows y Donkin, 1991; Barton, Morgan y Vijayan, 2002; Hodson, 2002; Rodríguez-de Vera, 2017). La evaluación de la polución ambiental, usando mediciones fisiológicas energéticas en conjunto con los análisis químicos de los contaminantes en sus tejidos, ha sido llevada a cabo con éxito en muchas situaciones de campo, al detectar y cuantificar los efectos de la polución. Estas mediciones no solo proveen de información sobre los procesos clave de adquisición, gasto y energía disponible para crecer y reproducirse, sino que también reflejan algunos de los principales mecanismos de toxicidad. Se ha observado que la tasa de crecimiento es una respuesta fisiológica fundamental del funcionamiento de un organismo, y provee de una de las mediciones de estrés más sensibles. En la evaluación del presupuesto energético se realizan mediciones que integran varios procesos fisiológicos, tales como el crecimiento potencial (CP), la relación oxígeno-nitrógeno y los índices de condición. De todas las mediciones antes mencionadas, la más utilizada es el CP, dado que integra las respuestas fisiológicas básicas (alimentación, digestión respiración y excreción), y cualquier alteración en uno o varios de estos procesos puede afectar la energía total disponible para crecer y reproducirse. La mayor ventaja de los modelos energéticos es la integración de los efectos a través de los distintos niveles de</p>
---	--

	<p>organización y entre los tensores naturales y antropogénicos (Widdows, 1982, 1985; Widdows y Donkin, 1991; Widdows y Salked, 1992; Smaal y Widdows, 1994; Beyers y Rice, 2002; Shuhong, Huasheng y Xinhong, 2005). Otro biomarcador energético que fue desarrollado en 1997 es el CEA (Cellular Energy Allocation), el cual mide el balance energético en los organismos mediante la evaluación de cambios bioquímicos de la energía disponible (carbohidratos, proteínas y lípidos) y el consumo de energía (transporte de electrones y aspectos respiratorios) en la célula. Este biomarcador se ha utilizado para evaluar PAHs en anfípodos (<i>Gammarus setosus</i>, <i>Onisimus litoralis</i>) y bivalvos (<i>Lyocima fluctuosa</i>) (Verslycke et al., 2004; Coen, Robbens y Janssen, 2006; Olsen et al., 2007).</p>
<p><b>FENOTÍPICOS</b></p> <p><b>1.- Malformación del esqueleto</b></p> <p><b>2.-Defectos embríonicos</b></p> <p><b>3.-Anormalidades en el opérculo</b></p> <p><b>4.- Sexos invertidos fenotípicamente.</b></p>	<p>Los fenotipos aberrantes responden a un conjunto de anomalías y son indicadores de que hubo un problema durante el desarrollo, donde la causa puede ser o no ambiental. Algunos ejemplos son: la malformación del esqueleto es asociada generalmente a hidrocarburos clorados, anormalidades en el opérculo por efluentes de papeleras, defectos embríonicos por la presencia de contaminantes orgánicos (Au,2004; Pawert et al., 1998), inversión de sexos fenotípicamente por exposición de estrógenos o andrógenos en etapas selectas puede conducir a poblaciones fenotípicamente masculinas o femeninas donde los machos genéticos tendrán gónadas femeninas y características sexuales secundarias y las hembras genéticas se parecerán y actuarán como peces macho (Arcand y Benson, 2009).</p>
<p><b>HISTOPATOLÓGICOS</b></p> <p><b>1.- Erosión de la aleta</b></p> <p><b>2.-Hiperplasia epidérmica</b></p> <p><b>3.- Lesiones en organos hígado, branquias, riñon etc.</b></p> <p><b>4.-Alteración en la forma y función de las gónadas</b></p>	<p>Las alteraciones histopatológicas en los tejidos de los peces son biomarcadores de efecto de la exposición a factores estresantes ambientales, esta categoría de biomarcadores tiene la ventaja de permitir examinar órganos y células diana específicos, ya que se ven afectados en condiciones in vivo (Hugget et al., 1992) y las lesiones detectadas representan una integración de los efectos acumulativos de los tensores fisiológicos y bioquímicos. Por lo tanto, pueden ser vinculados a la exposición, subsecuente</p>

<p><b>5.-Contenido lipopigmentoso</b></p> <p><b>6.-Proliferación del peroxisoma</b></p>	<p>metabolismo de contaminantes químicos, a las respuestas bioquímicas y fisiológicas tempranas y potencialmente a los niveles de organización superior.</p> <p>Son una herramienta útil ya que pueden evaluar los efectos de exposición presentes o <i>a priori</i> de tóxicos al nivel individual, representando el nivel intermedio de organización biológica</p> <p>Por ejemplo: La erosión de la aleta suele ser indicativo de estrés indirecto y sustancias tóxicas en el agua, hiperplasia epidérmica asociada por tóxicos y estrés ambiental, el contenido lipopigmentoso y proliferación del peroxisoma por estrés oxidativo causado por PAH y petróleo (Au,2004; Pawert et al., 1998), lesiones en órganos por presencia de contaminantes emergentes (Pawert et al., 1998; Au,2004;) alteración de las gónadas (testículos y ovarios) por compuestos hormonales y surfactantes (Velasco-Santa María et al., 2010; Sridevi et al., 2013; Depiereux et al., 2014; Liu et al., 2014; Oropesa et al., 2014; Abdel-Moneim et al., 2015; Shen et al., 2015); estas alteraciones pueden ocasionar a largo plazo cambios con efecto negativo en la dinámica poblacional de las especies expuestas.</p> <p>Estos cambios pueden ser detectados <i>in situ</i> en animales silvestres, eliminando el uso de organismos en laboratorio, lo cual tiene menos relevancia ecológica, y extrapolar los resultados a diferentes especies en su ambiente natural. Pese a que muchos factores naturales o metodológicos pueden afectar la apariencia del tejido y la diagnosis de la patología, este biomarcador puede ser útil en los monitoreos y evaluaciones ambientales si se combina con otros biomarcadores o bioindicadores, e involucra otras disciplinas como la química analítica, la inmunología, la biología reproductiva, etc. (Moore, 1985, 1988a, 1988b; Moore y Lowe, 1985; Myers y Fournie, 2002).</p>
<p><b>BIOMARCADORES POBLACIONALES</b></p> <p><b>1.- Pérdida del Fitness</b></p> <p><b>2.- Pérdida de capacidad reproductiva</b></p>	<p>La capacidad de una población para crecer y reproducirse, representa un prerrequisito primario de sobrevivencia, siendo este último un criterio importante en la evaluación de la calidad ambiental (Toro-Restrepo, 2011). En algunos casos, los cambios en el comportamiento sexual, la pérdida de la capacidad reproductiva</p>

<p><b>3.-Disminución de la población</b></p> <p><b>4.- Cambios en el ratio sexual</b></p>	<p>(FAO, 1997; Hauser, 2002) y la variación en el ratio sexual (Oropesa et al., 2017) suelen ser indicadores de presencia de disruptores endócrinos en el medio acuático; asimismo la disminución de la población puede ser indicador de una mortalidad inducida por la pesca, contaminación o cambio climático (Krug, 1998).</p>
---	---

Los biomarcadores han sido sugeridos como una herramienta práctica para el manejo ambiental, pero su inclusión no ha sido universalmente aceptada debido al número de preguntas sin resolver sobre su sensibilidad, utilidad y reproducibilidad. Sin embargo, en los últimos años están siendo incorporados en la evaluación del riesgo ambiental (Environmental Risk Assessment, ERA) por la legislación europea, con el fin de asegurar que los cuerpos de agua sean mantenidos o restaurados, así como garantizar la protección de los ecosistemas acuáticos de gran valor, e incluso se ha propuesto el índice de respuesta de biomarcadores (Biomarker Response Index, BRI ó IBR) el cual se basa en un conjunto de biomarcadores a diferentes niveles de respuesta biológica, que puedan proveer de una medida integrada de la salud general de los invertebrados (Hagger et al., 2006; Hagger et al., 2008). En la evaluación del riesgo ambiental se están utilizando biomarcadores en peces tales como las enzimas Tipo I (EROD y CYP1A), productos de biotransformación (PAH en bilis y metabolitos de PAH en tejido), parámetros reproductivos (VTG), parámetros genotóxicos (aductos del DNA hepático) y la herramienta más moderna y poderosa, la proteómica ambiental, la cual puede indicar el modo de acción sobre las células que puede ser específico al contaminante y así proveer evidencias más directas del mecanismo químico de toxicidad (Van der Oost et al., 2003; Tairova et al., 2009; Ricciardi et al., 2010; Tomanek, 2011).

## 2.2 GENES BIOMARCADORES EVALUADOS EN ESTE ESTUDIO

### CITOCROMO 4501A (CYP1A)

Se trata de un complejo multienzimático que consta de un grupo de hemoproteínas asociadas con el retículo endoplasmático liso. El papel del citocromo P450 es convertir sustancias orgánicas lipofílicas, endógenas y xenobióticas en compuestos solubles en agua (biotransformación) para facilitar su eliminación del cuerpo, este proceso se lleva a cabo en dos fases llamadas:

#### 1. Reacciones de fase 1

- **Oxidación** - Las reacciones de oxidación catalizadas por el sistema CYP son la hidroxilación de alifáticos, alquenos e hidrocarburos aromáticos, la epoxidación, la O-desalquilación, la N-desalquilación, la deshalogenación y la formación de N-óxidos. Es la reacción más común para la degradación de los xenobióticos, donde muchos compuestos lipofílicos se hacen más solubles en agua, facilitando su excreción del organismo (Dhainaut y Scaps, 2001). Dentro de los compuestos endógenos que pueden ser transformados por el CYP, se encuentran los ácidos grasos, los esteroides, las prostaglandinas, así como las cetonas, mientras que dentro de los compuestos exógenos podemos mencionar a una gran variedad de fármacos, hidrocarburos aromáticos policíclicos (PAHs), bifenilos policlorados (PCBs), hidrocarburos aromáticos halogenados (HAHs) y dioxinas.
- **Hidrólisis** - Las reacciones de hidrólisis son generalmente llevadas a cabo en el hígado de peces, donde las enzimas involucradas en la reacción son diversas; sin embargo, en general los ésteres, amidas y epóxidos son los tipos de compuestos que sufren este tipo de transformación.
- **Reducción** - Los compuestos organoclorados y un gran número de xenobióticos que contienen grupos funcionales como aldehídos, cetonas y alcoholes son susceptibles a la reducción.

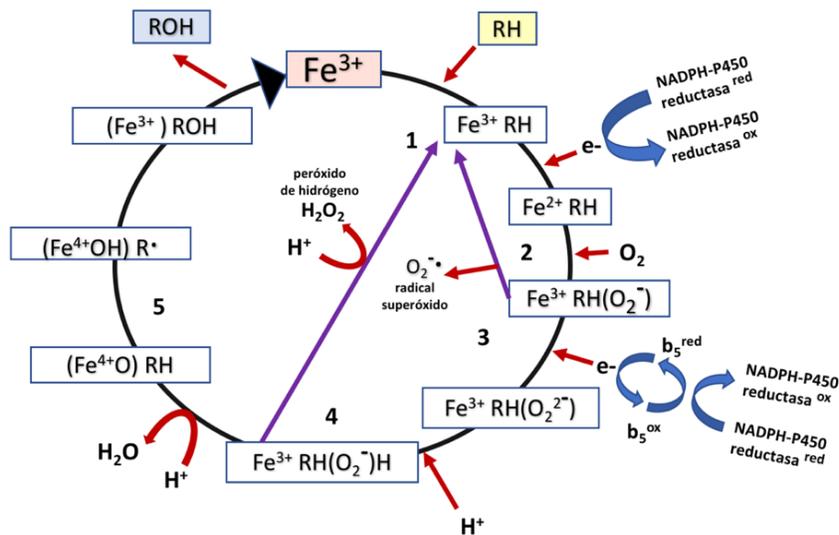


Figura 1. Mecanismo de acción del citocromo P450. Este esquema es una simplificación del mecanismo de acción del citocromo P450 (CYP). En él, el  $\text{Fe}^{3+}$  representa al hierro del grupo heme del CYP oxidado, RH y ROH a los sustratos y productos respectivamente. En este ciclo de óxido-reducción se liberan anión superóxido ( $\text{O}_2^{\bullet-}$ ) y peróxido de hidrógeno ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ). Imagen basada a partir de la propuesta de Coon (1992).

La reacción principal que catalizan los CYP450 es la mono- oxidación, se describe a continuación en cinco pasos y se apoya en la figura 1.

**Paso 1.** Comienza con la incorporación del xenobiótico (RH) al centro catalítico de la enzima que en ese momento tiene al átomo de Fe del grupo prostético hemo, en estado oxidado  $\text{Fe}^{3+}$ . Esta reacción es dependiente del NADPH que suministra el electrón necesario para para la reducción a  $\text{Fe}^{2+}$ .

**Paso 2.** El oxígeno molecular entra en el centro catalítico de la enzima y se une al grupo hemo donde el electrón de  $\text{Fe}^{2+}$  es transferido a la molécula de oxígeno.

**Paso 3.** Un segundo electrón es donado por el citocromo  $\text{b}_5$  y reduce a la molécula de oxígeno unida. En este paso existe la posibilidad de formación del radical anión superóxido uno de los causantes del estrés oxidativo. La descomposición del CYP oxigenado es descrita como una de las mayores fuerzas radicales superóxido de los sistemas biológicos y su producción depende de la isoforma del CYP, la naturaleza del

sustrato unido (si lo hay) y de la eficiencia de la entrada del segundo electrón (Guengerich, 1995).

**Paso 4.** Con un  $2H^+$  se libera uno de sus átomos como  $H_2O$ ; sin embargo, la reacción puede tomar una ruta alternativa para permitir la formación de peróxido de hidrógeno  $H_2O_2$ .

**Paso 5.** El oxígeno se une al hierro generando un radical libre sustrato ( $R\cdot$ ) que posteriormente se une a un hidroxilo se generando finalmente el grupo hidroxilado ( $ROH$ ) que se libera del ciclo para ser excretado por la orina y dejando disponible el hierro oxidado  $Fe^{3+}$  para iniciar nuevamente el proceso.

## 2. Reacciones de fase II

Una vez que los xenobióticos han sido transformados por las reacciones de Fase I, éstos son inmediatamente conjugados con sustratos endógenos como carbohidratos, aminoácidos, péptidos, grupos metilo, acetilo o sulfato inorgánico, en las que el complejo formado incrementa su polaridad y facilita así su excreción del organismo.

De particular interés para la vigilancia de la contaminación es que en los vertebrados la expresión del gen CYP1A y la actividad enzimática pueden ser fuertemente inducidos por una serie de compuestos químicos que pertenecen a clases comunes de contaminantes ambientales que suelen ser sustancias altamente hidrofóbicas y con estructuras moleculares parcialmente planares (UNEP/RAMOGGE,1999) como, por ejemplo:

- Dioxinas
- Productos a base de Policlorobifenilos o bifenilos policlorados PCBs (Arechlor®, Kanechlor®)
- Hidrocarburos aromáticos policíclicos PAHs (ejemplo: benzo(a)pireno).
- Compuestos orgánicos halogenados HAHs (ejemplo: herbicidas y plaguicidas).
- Medicamentos planos (nicotina, cafeína, teofilina, haloperidol, triptilina, amitriptilna y latacrine, clomopramina, mirtazapina, olanzapina, clozapina, paracetamol, propranolol, 7-etoxiresorufina, fenacetina, fenobarbital, omeprazol, primidona, rifampicina, etc.)

- Bloqueadores solares
- Otras sustancias con aros de benceno (gasolina, disolventes de grasas, pinturas, pegamento, adhesivos, productos de limpieza)

La inducción de las isoenzimas CYP1A ha atraído el interés de los ecotoxicólogos por su aplicación en bioensayos subletales de campo. Su interés también se ha centrado en la biotransformación de estos xenobióticos que, a diferencia de los compuestos endógenos normales, tienden a ser deletéreos ya que su transformación podría conducir a una especie más reactiva químicamente (Heidelberger, 1973). Los estudios muestran que estos metabolitos intermedios son capaces de unirse al DNA y promover la mutagénesis. En el caso particular de los peces, diferentes subfamilias del CYP han sido aisladas e identificadas en diferentes órganos como hígado, riñón, intestino y ovario. La actividad del citocromo P450 en vertebrados marinos, y en cierta medida también en invertebrados, ha demostrado ser uno de los indicadores más sensibles de contaminación ambiental (Payne, 1977) ya que esta evaluación se basa en un conocimiento sólido de las propiedades y la regulación de este complejo enzimático (Stegeman, 1989). Los estudios de toxicidad demuestran que este biomarcador es un indicador del estrés por contaminación más sensible que otras variables fisiológicas como la osmorregulación y el metabolismo energético (Nikunen, 1985). Este sistema responde con relativa rapidez a una variedad de contaminantes ambientales orgánicos, así como a mezclas complejas incluyendo efluentes municipales e industriales. La inducción se puede detectar con rapidez y las actividades elevadas de P450 pueden persistir durante semanas después de que la exposición a contaminantes haya cesado (Klopper-Sams y Stegeman, 1989). Desde hace un par de décadas, varias de estas enzimas también han sido incluidas en los programas de Monitoreo Ambiental (George, 1994).

### **Los compuestos exógenos como PAH y PO pueden inducir la actividad de CYP1A.**

Los hidrocarburos aromáticos policíclicos PAHs pueden inducir las enzimas de CYP1A en el hígado (Wittayalertpanya, 2003; Coutiño et al. 2010; Muntané, 2009), de la misma forma los plaguicidas organoclorados PO y las dioxinas también pueden inducir CYP1A debido a que ambos estimulan el receptor de hidrocarburos de arilo AhR (también llamado receptor de dioxinas o receptor citosólico Ah) que es un factor de transcripción que junto a la proteína ARNT

(translocadora nuclear del receptor Ah) forma un complejo con el receptor activado que reconoce una secuencia nucleica específica localizada en el sitio promotor del gen CYP1A1 (Figura 2).

En ausencia de sustrato, la forma latente de AhR se encuentra asociada a dos moléculas del chaperón HSP90 (Heat Shock Protein 90) (Perdew 1988; Wilhelmsson et al.,1990), a una molécula de la chaperonina p23 (Kazlauskas et al.,1999) y a una de la proteína XAP2 (Hepatitis B virus X-Associated Protein 2) (Meyer et al., 1998), también conocida como ARA9 (AhR-Associated protein 9) (Carver & Bradfield, 1997) o AIP (AhR-Interacting Protein) (Ma & Whitlock, 1997). La unión a HSP90 mantiene al AhR en la conformación necesaria para la unión del sustrato y limita la entrada del AhR en el núcleo por bloqueo de la señal de localización nuclear NLS (Nuclear Localización Signal) (Ikuta et al. 1998). Tras la unión al sustrato, la NLS es reconocida por las importinas  $\alpha$  y  $\beta$ , transportadores solubles que median la entrada a través del poro celular (Adam, 1999) y transportan el AhR al núcleo celular una vez dentro AhR se acumula rápidamente donde forma un heterodímero transcripcionalmente activo con ARNT (AhR Nuclear Translocator) (Gu et al., 2000).

Esta heterodimerización disocia el complejo HSP90-XAP2-p23 del AhR (Kazlauskas et al.1999, Lees y Whitelaw, 1999).

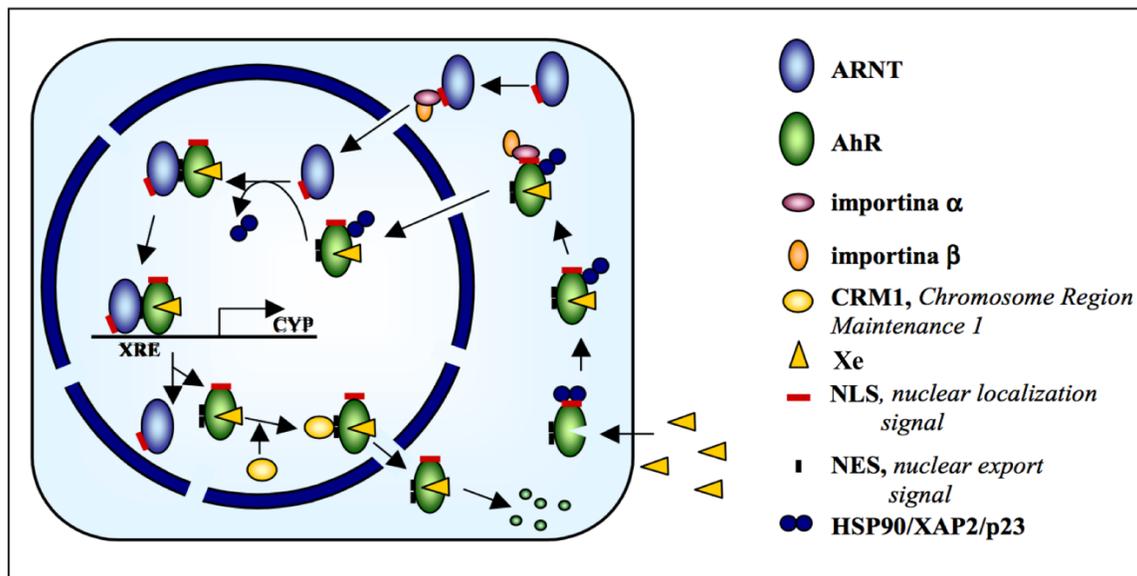


Figura 2. Modelo de transducción de señal mediado por el heterodímero AhR/ARNT mostrando los cambios en la distribución celular de los componentes tras la activación por unión de ligando. Modificado de Ikuta et al. (2000).

El heterodímero activo AhR/ARNT se une a elementos reguladores de respuesta a elementos xenobióticos y dioxinas XREs o DREs (*Xenobiotics o Dioxin Response Elements*) situados en

regiones potenciadoras/promotoras de genes diana incrementando así la transcripción de los mismos (Rowlands y Gustafsson, 1997).

Mientras AhR está heterodimerizando con ARNT y se encuentra unido a las secuencias XRE del DNA, el AhR permanece en el núcleo ya que la secuencia de exportación nuclear NES (*Nuclear Export Signal*), localizada en el dominio bHLH, se encuentra protegida por la interacción proteína-proteína y no es accesible. Tras la activación del gen diana CYP1A1 (que también conocida como *Aril-hidrocarburo-hidroxilasa* o por las siglas *AHH* ya que cataliza las reacciones en las que se hallan implicados aril-hidrocarburo) el AhR se disocia de ARNT, con lo que la región NES, ahora accesible, es reconocida por CRM1 (*Chromosome Region Maintenance 1*) y el receptor es exportado al citosol (Ikuta et al., 1998) donde es ubiquitinado y degradado por el proteosoma (Ma y Baldwin, 2000; Roberts y Whitelaw, 1999). Los genes diana para el AhR identificados hasta la fecha codifican para enzimas implicadas en la detoxificación metabólica, tanto de la Fase I (*Cyp1A1*, *Cyp1A2* y *Cyp1B1*) como de la Fase II (NADPH: quinona oxidoreductasa, *Nqo1*; aldehído deshidrogenasa 4, *Aldh4*; UDP-glucuronosiltransferasa 1A6, *Ugt1a6*; glutatión-S- transferasa Ya, *Gsta1*) (Hankinson, 1995; Rowlands y Gustafsson, 1997; Fujii-Kuriyama y Mimura, 2005).

La inducción de CYP1A1 (una enzima del citocromo P450, cuya actividad enzimática representativa es el ERO) en peces expuestos a PAHs es un hecho comprobado, esta proteína no es inducida en peces control, mantenidos en agua limpia. La inducción del CYP1A1 implica una activación transcripcional del gen CYP1A1 que resulta en un incremento de los niveles del mRNA y de la síntesis de las monooxigenasas del Citocromo P450 correspondientes.

Asímismo, el aumento de la actividad de CYP1A puede generar un aumento en la producción de las Especies Reactivas del Oxígeno ERO y la exposición a una producción continua de ERO puede conducir a un desajuste en el balance entre la producción de radicales libres y habilidad de la célula a defenderse de ellos, conocido como estrés oxidante, un ejemplo del daño producido por este estrés es la lipoperoxidación (LPO). Existen evidencias de que en el proceso del ciclo de óxido-reducción del CYP y su sustrato se generarían especies reactivas de oxígeno como el anión superóxido ( $O_2^{\bullet-}$ ) y peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ), además del radical libre sustrato ( $R^{\bullet}$ ) que, al unirse a un radical hidroxilo, generaría finalmente el producto hidroxilado (ROH) (Coon, Ding y Pernecky, 1992; Orellana y Guajardo 2004; Guengerich 2012; Krest et al., 2013).

## LOS METALES PUEDEN MODIFICAR LA ACTIVIDAD DE CYP1A

La evidencia sugiere que la exposición a metales pesados altera la actividad de la enzima CYP1A1 pudiendo afectar su vía de señalización del Ahr (Anwar-Mohamed et al.2009), induciendo y suprimiendo la expresión CYP1A (Costa et al. 2009) aún en presencia de inductores fuertes conocidos del CYP1A (Brüschweiler et al. 1996; Vakharia et al. 2001; Spink et al. 2002).

**Cadmio.** Elbekai y El-Kadi (2005) señalan que el  $Cd^{+2}$  es capaz inducir la transcripción de CYP1A en el hígado, asimismo demostraron que el estrés oxidante inducido por metales pesados desempeña un papel en la inducción transcripcional del gen CYP1A y la inhibición postraduccional de la actividad CYP1A, en las células hepáticas 1c1c7 el estrés oxidante es mediado por  $Cd^{+2}$  (y otros metales como  $As^{+3}$  y  $Cr^{+6}$ ) donde interviene en la activación de la transcripción CYP1A1 y paradójicamente, también intervienen en la regulación negativa de la actividad CYP1A1, indicando que estos metales específicos son modificadores de la actividad de CYP1A1. Elbekai y El-Kadi (2007) también examinaron la capacidad de  $Cd^{+2}$  para activar directamente la AhR in vitro y encontraron que el  $Cd^{+2}$  puede activar la AhR indirectamente al producir un complejo inducible proteína-DNA que representa el AhR transformado unido al XRE, AhR tiene un papel en la inducción de mRNA CYP1A1 mediada por metales, sin embargo también se encontró que esta inducción es dependiente del tiempo, en su experimento, el mRNA inducido por  $Cd^{+2}$  alcanzó un máximo de 3h seguido de una disminución a las 6 h encontrándose con una caída significativa de mRNA de CYP1A a las 12h después del tratamiento, esta evidencia indica que  $Cd^{+2}$  actúa como inductor por múltiples mecanismos, aunque el efecto no persistente de los metales es probablemente debido a su depuración celular por mecanismos metabólicos y / u oxidativos (Aposhian et al., 2004). Es aparente que  $Cd^{+2}$  induce la expresión de mRNA aumentando la velocidad de transcripción del gen CYP1A y disminuyendo la degradación de los transcriptos de mRNA debido a que  $Cd^{+2}$  es un estabilizador de la proteína CYP1A lo que aumenta su vida media, por otra parte, el por qué es más frecuente que asocien el incremento de los metales pesados en la inhibición de CYP1A es porque se ha verificado el papel de ROS en la inhibición de la actividad CYP1A1 por  $Cd^{+2}$  (Elbekai y El-Kadi, 2005); las ROS inducidas por metal pueden oxidar los grupos tiol en los residuos de cisteína, directa o indirectamente a través de la formación de especies de nitrógeno reactivo de la proteína CYP1A que causa pérdida de función proteica (Bogdan, 2001; Nzengue et al., 2008), causa lipoperoxidación y los

lipoperóxidos producidos pueden reaccionar con el DNA y las proteínas alterando las funciones celulares, además las ROS también pueden interactuar con el hemo  $\text{Fe}^{+2}$  que conduce a la destrucción del hemo ya la inactivación enzimática (Lowe et al., 1998). Por otra parte, se ha demostrado que el  $\text{Cd}^{+2}$  induce la expresión de la NADPH oxidasa (NOXs) en riñón (Thijssen et al. 2007), y la actividad en hepatocitos (Souza et al., 2009) (Las NOXs son una familia de enzimas transmembranales que generan ERO), puede reemplazar al Fe y Cu en varias proteínas de membrana y citosólicas como la ferritina, generando un incremento en el radical  $\text{OH}\cdot$ -reacción vía reacciones de Fenton, que puede generar una alteración en la homeostasis del Cu, Zn y la inhibición de enzimas antioxidantes (como la catalasa CAT, la glutatión reductasa GR, la glutatión peroxidasa GPX, el ascorbato peroxidasa y el superóxido dismutasa SOD) involucradas en el estrés inducido por Cd (Nzengue et al., 2012) dando como resultado la acumulación del ERO.

**Plomo.** CYP1A presenta una correlación positiva ante la presencia de  $\text{Pb}^{2+}$ ,  $\text{Pb}^{2+}$  es capaz de incrementar los niveles de RNAm de CYP1A sin afectar la vida media de RNAm y los niveles de proteína, indicando un rol predominante en la modulación transcripcional por este metal, es importante mencionar que también el  $\text{Pb}^{2+}$  puede disminuir la actividad de CYP1A, en ausencia o presencia de PAHs (Anwar-Mohamed et al.2009).

**Níquel.** El  $\text{Ni}^{2+}$  actúa como un imitador de la hipoxia al activar el factor de transcripción alfa HIF-1 $\alpha$  y las respuestas transcriptómicas similares a la hipoxia (Luczak y Zhitkovich, 2017; Maxwell y Salnikov, 2004; Salnikow *et al.* 2000). Se ha demostrado que la activación sostenida de la vía HIF-1 $\alpha$  está correlacionada con la administración intracelular de iones  $\text{Ni}^{2+}$ , ante esta afirmación Davidson et al. (2005) informaron que el níquel soluble penetra en las células por el transportador de iones metálicos divalentes y compite con sitios de hierro en prolil-hidroxilasas (dioxigenasas dependientes de Fe), una vez en ellas las desactiva (Costa et al. 2005). La inhibición de HIF-prolil-hidroxilasa (PHD) disminuye la unión de la proteína Von Hippel-Lindau (responsable de la destrucción del factor de transcripción inducible por la hipoxia) y estabiliza la proteína HIF-1 $\alpha$ , dando como resultado una activación sostenida y masiva de la vía HIF-1 $\alpha$  (Davidson et al., 2005, 2006; Salnikow K, Zhitkovich A., 2008; Salnikow *et al.* 2000, 2003). El factor-1 $\alpha$  inducible por hipoxia (HIF-1 $\alpha$ ) se transloca al núcleo donde se dimeriza con HIF-1 $\beta$  o ARNT (es el mismo compuesto con distintos nombres dependiendo su función en el momento) para formar HIF-1 (Figura 3). Dado que ARNT es también un socio de heterodimerización de AhR, la hipoxia reducirá la disponibilidad de ARNT y por lo tanto inhibir la regulación de CYP1A (CYP1A1 y CYP1A2) (Chan et al, 1999; Park H.,1999).

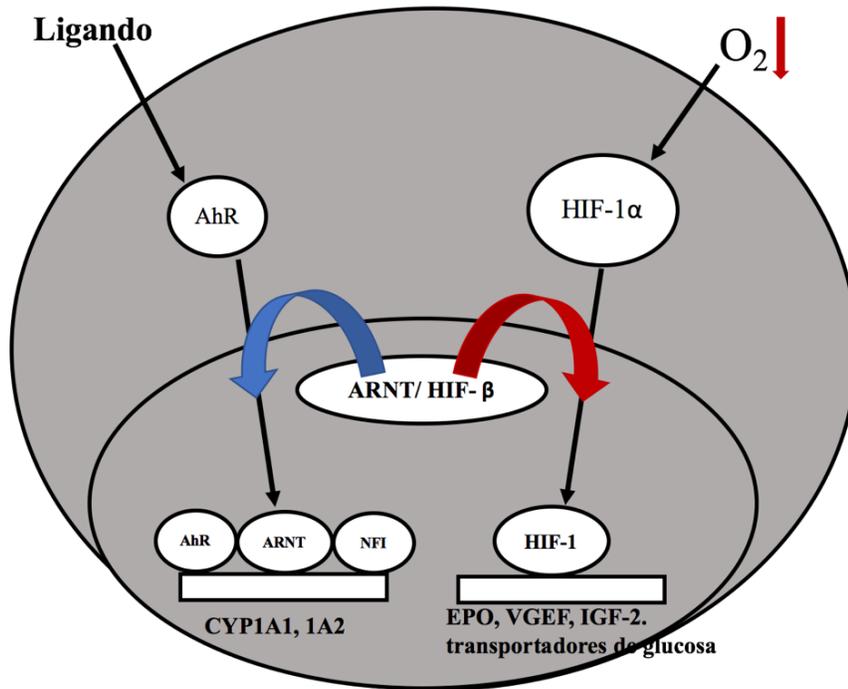


Figura 3. Representación esquemática de las rutas activadas por la hipoxia liderada por la sobre regulación de los genes implicados en la supervivencia de la célula y la baja regulación de CYP1A1 y CYP1A2 debido a la disminución de la disponibilidad de ARNT. El O<sub>2</sub> ↓ representa hipoxemia, AhR el receptor aril hidrocarburos, ARNT el translocador nuclear del receptor aril hidrocarburos, NF1 es el factor nuclear 1, EPO eritropoyetina, HIF1 factor inducible por hipoxia, IGF-2 factor de crecimiento insulínico tipo 2, VEGF factor de crecimiento endotelial vascular. Imagen basada y modificada de C. Fradette y P. du Souich, 2004.

## **METALOTIONEÍNAS (MT)**

Las Metalotioneínas (MTs) son proteínas citosólicas no enzimáticas, de cadena única, bajo peso molecular, que carecen de aminoácidos aromáticos y en el caso de presentarlos su número es bajo, son termoestables y solubles en agua, con un alto contenido en metal y azufre, ricas en cisteínas capaces de unirse a Cd, Cu, Hg, Zn, Co, Bi, Ni y Ag, específicamente a los cationes  $\text{Cu}^{+1}$ ,  $\text{Cd}^{+2}$  y  $\text{Zn}^{+2}$ . Son responsables del transporte de metales, ya sean esenciales o no, su función principal es regular el “pool” intracelular de zinc y cobre (George y Olsson, 1994). Son proteínas inducibles ya que cuando el organismo está expuesto a ciertos metales la célula produce más metalotioneínas (Dhainaut y Scaps, 2001). Se presentan, principalmente, en el citoplasma celular, pero también se han detectado en el núcleo y en los lisosomas (Riordan y Richards, 1980). Aunque están presentes en un gran número de tejidos diferentes, se encuentran predominantemente en el hígado y riñón de vertebrados, y en la glándula digestiva e intestino de invertebrados (Roesijadi, 1992). Fueron descritas por primera vez en el año 1957, al identificar una proteína que unía cadmio en riñón de caballo (Kägi y Vallee, 1960). Posteriormente fue aislada en los principales grupos de invertebrados, incluyendo nematodos, anélidos, artrópodos, equinodermos y moluscos (Roesijadi y Fowler, 1991; Dallinger et al., 1993; Berger et al., 1995). Son proteínas que están ampliamente distribuidas, presentes en procariotas, protistas, hongos, plantas y animales (Kägi y Kojima, 1987). La síntesis de MT puede ser inducida por una gran variedad de estímulos, entre los que se incluyen ciertos metales, hormonas, toxinas y el estrés (Klaassen et al., 1999). Algunos de factores que inducen la síntesis de metalotioneínas son (Klaassen et al., 1999; Winge y Miklossy, 1982; Albergoni y Piccinni, 1998):

- Iones metálicos (Cd, Zn, Mg, Cu, Hg, Pb, Cr, Bi, Ni, Ag, Co)
- Factores de estrés (temperaturas elevadas; exposición a radiación X y UV; elevada presión parcial de  $\text{O}_2$ ; falta de alimento; infección; estrés físico; hipotermia; alteración de la salinidad)
  - Hormonas y mensajeros secundarios (glucocorticoides; progesterona; estrógeno; insulina; glucagón; adenosina; AMPc; diacilglicerol)
- Agentes inflamatorios (liposacáridos, dextrano, endotoxina)
- Agentes citotóxicos (Etanol; butirato; agentes alquilantes; ácidos grasos; cloroformo; di(2-etilexil) ftalato; tetracloruro de carbono; formaldehído; etionina; uretano; D-penicilamina; estradiol)

Fuente: Klaassen et al., 1999.

El aspecto más importante que distingue a los metales de otros contaminantes tóxicos es el hecho de no ser biodegradables, una vez en el ambiente pueden permanecer durante cientos de años, su toxicidad radica en la unión poco específica de los metales a macromoléculas biológicamente importantes como son los grupos prostéticos de enzimas o metaloproteínas, de forma que pueden alterar su conformación y actividad biológica. Este tipo de unión no específica, constituye la forma principal de toxicidad de los metales (Mas y Arola, 1993), excesivas concentraciones de metales pesados en agua afectan a los organismos acuáticos de diferentes maneras, desde la disminución de su metabolismo y crecimiento, hasta la muerte, ya que las elevadas concentraciones pueden causar la asfixia debido a la coagulación de las mucosidades sobre las branquias. (Robles et al., 2012). Los metales llegan a los tejidos de los animales acuáticos a través de las superficies expuestas al medio y del alimento, las branquias y el tracto digestivo son las principales superficies que permiten el paso de los metales. El transporte desde la superficie permeable hasta los distintos órganos tiene lugar por medio del líquido circulante (sangre o hemolinfa). Los metales se unen de forma más o menos inespecífica a las proteínas presentes en este líquido y son transportados a todos los tejidos, los órganos en los que se suele producir una mayor acumulación son el riñón y el hígado (o la glándula digestiva en los animales invertebrados), siendo el riñón la vía principal de excreción (Díaz-Mayans et al., 1993). Los principales factores que afectan la entrada de metal son su forma química, la presencia de otros metales, el pH, la salinidad, la especie animal y la fase del ciclo de vida.

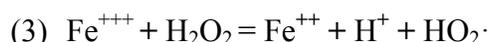
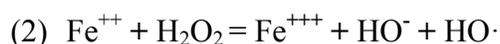
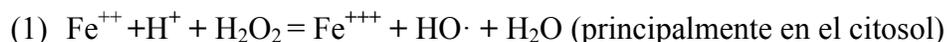
La inducción de la síntesis de MT requiere la participación de secuencias específicas de DNA, denominadas MRE (elementos de respuesta al metal), y se cree que son los sitios de unión de unos factores de transcripción encargados de la regulación de los metales. Los MREs están presentes en múltiples copias, en la región promotora de los genes (Hammer, 1986). La síntesis se inicia con la unión de los metales a inhibidores de los factores de transcripción, de forma que, tras la unión, dichos factores de transcripción quedan libres para unirse al promotor del gen y producir la síntesis de MT que se unirán al exceso de metal (Palmiter, 1994). La expresión de las MTs puede verse alterada por cambios en la estructura del gen, como amplificación y metilación, así como por la diferenciación y desarrollo celular. En contraste con las bien conocidas propiedades estructurales de esta proteína, su función es todavía materia de discusión, sin embargo, diversos estudios extensivos que utilizan muchos organismos diferentes. Hamer (1986) indican que estas proteínas tienen tres funciones fisiológicas principales:

1. Desintoxicación de metales pesados que penetran en las células a concentraciones tóxicas (Goering y Klaassen, 1984), que está fuertemente respaldada por la inducibilidad de genes MT por metales pesados acumulados dentro de la célula (Hamer et al., 1985);
2. Homeostasis interna de Cu y Zn (a) manteniendo las concentraciones intracelulares de cationes libres de Zn y Cu a un nivel bajo uniendo exceso de metales en una forma no tóxica, así como (b) actuando como almacenamiento de Cu y Zn Para uso posterior y reactivación de apoproteínas que requieren estos metales para su actividad (Brouwer et al., 1986).
3. Participación en funciones metabólicas, incluyendo la eliminación de radicales libres (Thornalley y Vasak, 1985; Brouwer y Brouwer, 1998) y protección contra los daños debidos a las radiaciones ionizantes (Karin, 1985) y, como se ha propuesto recientemente, la regulación de la expresión génica (Roesijadi et al., 1998).

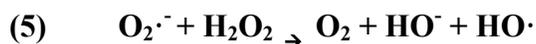
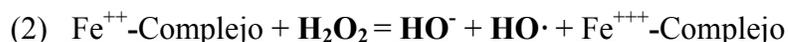
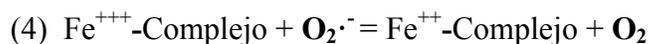
Las metalotioneínas han sido utilizadas como biomarcadores de contaminación por metales naturales o antropogénicos en medios acuáticos en diversos estudios, la erosión y la lixiviación química de suelos y rocas constituyen la aportación más importante por procesos de origen natural, sin embargo, actualmente la cantidad de metales procedentes de la actividad industrial y minera, iguala o excede a la liberada al medio acuático por procesos naturales. El uso de este biomarcador para la biomonitorización del impacto ambiental del metal ha sido validado y se han llevado a cabo varios ejercicios de biomonitoreo utilizando este índice en diversas áreas del Mediterráneo (Viarengo et al., 1988a; Pavicic et al., 1991; Galdies 1995; PNUMA, 1997a, 1997b; Tambutté et al., 1998). Son muy numerosos los estudios realizados sobre distintos aspectos de las Metalotioneínas de peces. En muchos de los experimentos realizados, tras inyectar intraperitonealmente metales a los peces, se encontraron elevadas concentraciones de MT en distintos órganos (Ariyoshi et al., 1990; George et al., 1996; Castaño et al., 1998). Se ha demostrado que los niveles de MT se incrementan en función de la dosis de metal recibida (George y Young, 1986; George, 1989; Hogstrand y Haux, 1991; George et al., 1992; Castaño et al., 1998) o en función del tiempo transcurrido tras la administración (Beyer et al., 1997). Experimentos consistentes en la exposición de peces a metales en el agua también encontraron inducción de MT (Roch y McCarter, 1984; Hogstrand y Haux, 1991; Cosson, 1994). Todos estos hallazgos llevaron a considerar la MT como un biomarcador de exposición a metales (Roesijadi, 1992; Livingstone, 1993).

### Las metaloproteínas pueden actuar como agentes prooxidantes

El  $\text{H}_2\text{O}_2$  puede reaccionar con metales divalentes (libres o unidos a proteínas) para producir el radical hidroxilo  $\text{HO}\cdot$  (ecuaciones 1 y 2), o bien producir el radical perhidroxilo (ecuación 3) por la vía de reacción de Fenton (Fridovich, 1997; García-Triana, 2001), un ejemplo se puede observar en las siguientes reacciones:

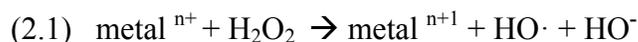


De forma similar  $\text{H}_2\text{O}_2$  y el  $\text{O}_2\cdot^-$  (anión superóxido) pueden reaccionar con el grupo prostético de metalotioneínas que contienen hierro (ej. con la dihidroxiácido dehidrasa, la 6 fosfogluconato dehidrasa, las fumarasas A y B o la aconitasa); para dar lugar a la reacción de Haber Weiss (5) (García-Triana, 2001; Jones, 2008):



La reacción (5) es la suma de las reacciones de Fenton (4) y (2). Las reacciones de Haber Weiss son catalíticamente lentas a menos que un ion de un metal de transición reaccione con el peróxido de hidrógeno  $\text{H}_2\text{O}_2$  para generar el radical hidroxilo  $\text{HO}\cdot$  y oxidar el metal (Halliwell y Gutteridge, 1999, 2007).

Varios elementos pueden catalizar reacciones como las de Fenton con distintas eficiencias, dependiendo del potencial redox: los catalizadores más activos son Fe (II), Cu (I), Cr (III), (IV), (V), (VI) y (VII), mientras que Co (II) y Ni (II) pueden reaccionar con  $\text{H}_2\text{O}_2$  para generar  $\text{HO}\cdot$  en presencia de agentes que contienen tiol (Inoue y Kawanishi, 1989; Shi et al., 1994)



## Las metaloproteínas pueden actuar como agentes antioxidantes

La expresión del gen MT puede ser una respuesta inducida por el estrés oxidante como protección al daño oxidativo (Sato y Bremmer, 1993; Chubatsu y Meneghini, 1993; Dalton et al., 1996; Viarengo et al., 1999). La participación de la MT dentro del sistema antioxidante de la célula se debe principalmente a la gran cantidad de grupos tioles que conforman su estructura (~30%) que poseen gran afinidad a los radicales libres como las ERO (especies reactivas del oxígeno ROS en inglés generadas por el desajuste en el balance de la producción de radicales libres y la habilidad de la célula a defenderse de ellos (Valle y Falchuk, 1993; Ebadi et al., 1996; Klaassen et al., 2009). Las MT son inducidos por las ERO mediante la interacción de estas con los elementos de respuesta antioxidante (ARE, del inglés *Antioxidante Response Element*). Estos ARE son secuencias de DNA presentes en los promotores de los genes de MT a los que se unen factores de transcripción específicos (Chiaverini y De 2010).

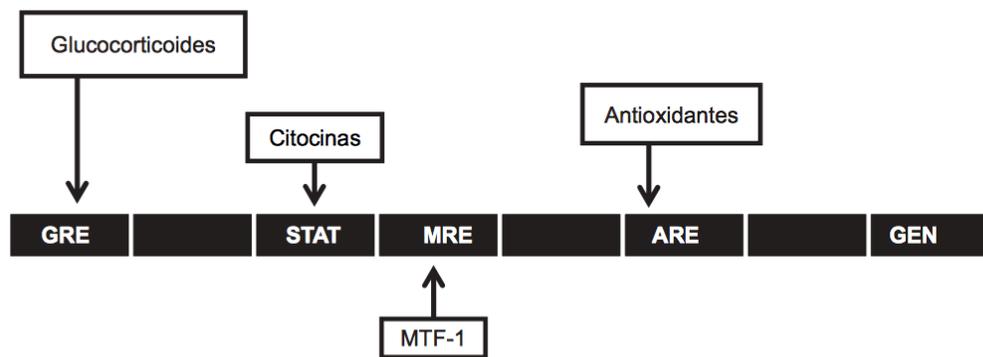


Figura 4. El promotor del gen de la MT. Juárez Rebollar D & Méndez Armenta M 2014.

La figura 4 muestra que el promotor del gen de la MT contiene varios elementos de respuesta para regular su transcripción.

Estos elementos son activados por el factor de transcripción de metal 1 **MTF-1**.

Los **ARE** elementos de respuesta a antioxidantes (antioxidant response elements) que se activa como respuesta al estado redox.

Los **MRE** (metal responsive elements) elementos de respuesta a metales es activado por el MTF-1.

Los **GRE** elementos de respuesta a glucocorticoides (glucocorticoid responsive elements) que es activado por transductor de señales y activador STAT (signal transducer and activador of transcription, las cuales son señalizadas por citocinas). Muchos promotores de genes MT

contienen secuencias ARE (Andrews, 2000). Presentan una secuencia consenso GTGACNNNGC, e intervienen en la respuesta a agentes oxidantes, así como a algunos metales y diversos compuestos xenobióticos (Dalton et al. 1997).

## **VITELOGENINA (VTG)**

La vitelogenina (VTG) es potencialmente un biomarcador ideal para la estrogenicidad por químicos que ha sido explorado por muchas especies de peces tanto para ensayos *in vivo* como *in vitro* (Pelissero et al.,1991; Jobling y Sumpter, 1993; Pelissero et al.,1993; Purdom et al., 1994; Sumpter, 1995) es una fosfolipoproteína de alto peso molecular característica de las hembras en vertebrados ovíparos, precursora de la yema de huevo su importancia radica en la nutrición del embrión en desarrollo basado en los compuestos energéticos derivados de ella, los cuales son incorporados a los folículos en crecimiento que más tarde constituirán el vitelo del huevo, ya que transporta importantes cantidades de material lipídico (principalmente triglicéridos), carbohidratos y grupos fosfato (Gapp et al., 1979; Ho et al.,1982; Gavaud,1986; Carnevaly y Belvedere, 1991; Jones et al., 2000; Hamman et al., 2003); también tiene una función acarreadora de calcio y su presencia facilita la solubilidad de esta proteína tan compleja en el plasma, el calcio se une a la VTG en regiones que más tarde se convertirán en fosfovitas (Vargas, 2000). En vertebrados, la vitelogenina es sintetizada y secretada por los hepatocitos en respuesta a la estimulación estrogénica en hembras maduras (Wahli, 1988; Lazier y MacKay, 1991), normalmente es indetectable en hembras inmaduras y en machos pero en años recientes se descubrió que la producción de vitelogenina puede ser inducida en machos y hembras inmaduras de varios vertebrados por la exposición a estrógenos ambientales o xenoestrógenos (sustancias químicas que no pertenecen al organismo de manera natural y que poseen una bioactividad similar a la de los estrógenos endógenos) (Heppell et al., 1995; Allner et al.,1999; Cheek et al., 2001; Brasfield et al.,2002, Hamman et al 2003; Gillesby y Zacharewski, 1998; Jones et al., 2000) gracias a su inherente capacidad de unión con el receptor de estrógenos en el hígado que provoca un estímulo en la transcripción de ciertos genes, por lo que la presencia de esta proteína inducible por estrógenos en un animal se puede tomar como evidencia de exposición a estrógenos endógenos o exógenos o imitadores de estrógenos (Palmer y Palmer, 1995; Palmer et al., 1998) que pueden afectar el crecimiento, la maduración sexual de los vertebrados y así como la implicación en la promoción del cáncer (Colburn y Clement, 1992).

Existe una gran cantidad de compuestos que pueden actuar como xenoestrógenos.

Ejemplos de estos compuestos son:

- Fitoestrógenos (genisteína, daidzeína cumestano)
- Herbicidas (alacloro, atrazina, nitrofen)
- Insecticidas (organofosforados, organoclorados, piretroides y carbamatos)
- Fungicidas (benomilo, mancozeb, tributilo de estaño, vinclozolin)
- Bifenilos policlorinados PCBs (Residuos de la producción del cloro, PVC, lubricantes, refrigerantes y aceites industriales)
- Dioxinas
- Plastificantes (ftalatos, P-nonifenol, octifenol, bisfenol A)
- Metales pesados (plomo, mercurio, cadmio).
- Productos domésticos (detergentes y surfactantes)
- Productos farmacéuticos (dietilbestrol, etinilestradiol)
- Desechos Industriales y domésticos, donde puede existir mezcla de estos compuestos (De Rosa et al.,1998; Jones et al., 2000)

Idealmente estos productos deberían ser evaluados para la estrogenicidad antes de su uso o liberación al medio ambiente (Schmidt, 1994).

Los efectos que este tipo de compuestos tienen sobre una gran variedad de microorganismos han sido bien documentados, existiendo evidencia en varios grupos de animales. Algunos ejemplos reportados acerca de los efectos de compuestos xenoestrogénicos son:

- Inducción de vitelogenina y muerte celular en hepatocitos de *Ameriurus nebulosus* (Holland et al., 1999)
- Inducción de VTG y reducción de los niveles de esteroides en *Cyprinus carpio* y *Stizostedion vitreum* capturados cerca de una planta de tratamiento de aguas negras (Folmar et al., 1996, 2000)
- Ovocitos en testículos, al igual que un incremento de VTG en plasma de *Platichthys flesus* colectados en un estuario contaminado por fábricas de gas y aceite (Allen et al., 1999).
- Feminización, disminución de los niveles de testosterona y malformaciones en el tracto reproductivo en caimanes macho del lago Apopa en Florida expuestos a altas concentraciones de DDT, DDE y otros compuestos después de un derrame químico (Guillette, 1994)

## **2.3 GENES DE CONTROL INTERNO O DE REFERENCIA UTILIZADOS PARA EL ANÁLISIS DE LA EXPRESIÓN DE RNA EN PCR EN TIEMPO REAL (qPCR)**

El control interno o gen de referencia se caracteriza por presentar una expresión constante e invariable en todas las muestras que no puede ser modificada por las condiciones de estudio o por la respuesta a un tratamiento experimental. La literatura nos muestra que no se han identificado genes de referencia óptimos (los genes utilizados habitualmente varían considerablemente entre muestras), sin embargo, este método de normalización es el más utilizado (McCurley y Callard, 2008).

La medición de los niveles de transcripción constituye el fundamento de la biología molecular, independientemente de la técnica utilizada la cuantificación de las muestras manejadas son generalmente normalizadas usando genes de control ó referencia (Stürzenbaum y Kille 2001) en todos los casos deben ser esenciales para el mantenimiento celular (Finnegan et al., 1993), deben ser expresados en forma ubicua en todos los tejidos y su transcripción no debe ser afectada en el contexto experimental que está siendo investigado (Stürzenbaum y Kille, 2001). No existe ningún gen cuya expresión no varía en ninguna de las condiciones, por lo que el usuario debe valorar cuál sería el mejor control endógeno para su experimento.

La elección correcta de los genes de referencia para la normalización de PCR en tiempo real es esencial para reflejar datos fiables sobre los procesos biológicos de las proteínas objeto de estudio (Robinson, Sutherland y Sutherland, 2007). Además, se ha demostrado que el uso de un solo gen como gen de referencia es susceptible a tener errores en la interpretación de los resultados de la qPCR (Lee et al., 2002). En consecuencia, para normalizar las expresiones de genes cuando se trabaja con qPCR, es necesario utilizar más de un gen de referencia, sobre todo cuando no se puede encontrar un único gen de referencia con características óptimas para realizar cuantificación relativa (Huggett et al., 2005; Robinson, Sutherland y Sutherland, 2007).

## GENES DE REFERENCIA UTILIZADOS EN ESTE PROYECTO

Los genes de referencia utilizados en este proyecto son:

### ❖ $\beta$ -ACTINA

Es uno de los componentes principales de los microfilamentos y es fundamental en el desarrollo embrionario, adhesión celular, migración, citocinesis, mantenimiento de la polaridad celular (Hundt et al., 2014; Bunnell et al., 2011). Debido a que  $\beta$ -actina es la más dinámica de las dos isoformas de actina citoplásmica (Bergeron et al., 2010), puede ser específicamente requerida para la rápida reorganización del citoesqueleto de actina durante la división celular. Luxenburg et al. (2011) señalan que la  $\beta$ -Actina es importante para mantener la correcta forma de la célula durante la mitosis. Es uno de los genes de referencia más utilizados debido a que tiene los niveles de expresión más estables en comparación con otros controles internos (Huggett et al. 2005; Stürzenbaum y Kille 2001; Raff et al.1997).

### ❖ FACTOR DE ELONGACIÓN 1 $\alpha$ (E1F $\alpha$ )

El factor de elongación 1 alfa es una proteína citosólica que participa en uno de los tres pasos de la traducción de la proteína (inicio, elongación, terminación), la elongación, donde una vez terminada la fase de iniciación comienza el proceso de traducción de la información del mRNA a una proteína funcional, la elongación es un proceso secuencial de formación de enlaces peptídicos. (Devlin, 2000). En cada paso la peptidil transferasa ribosómica transfiere el péptido creciente desde su tRNA transportador hasta el grupo alfa amino del aminoácido que forma parte del aminoacil-tRNA especificado por el siguiente codón, en células eucariotas, el tRNA cargado llega al ribosoma gracias a la acción de un factor de elongación denominado E1Fa (Baynes y Dominiczak, 2006). Para que sea activo el factor de elongación debe tener asociada una molécula de GTP; cuando el complejo aminoacil-tRNA-EF1a-GTP se une al lugar A, el GTP se hidroliza a GDP. Eso provoca una disociación de EF1a-GDP del complejo ribosómico aminoacil-tRNA, permitiendo que continúe la síntesis de proteínas. (Smith, Marks y Lieberman, 2006). El ciclo de elongación se repite de forma continua deslizándose gradualmente el ribosoma sobre el mRNA en el sentido 5' -> 3' hasta llegar a encontrar un triplete de terminación. El Factor de Elongación 1 $\alpha$  se ha establecido para ser un buen control invariante para ajustar las diferencias en la carga de tubo a tubo y/o degradación (Dostal et al., 1994) también se ha identificado que en el pez cebra es uno de los genes con mayor estabilidad durante su desarrollo y diversos tejidos (McCurley y Callard, 2008).

### ❖ **PROTEINA RIBOSOMAL L7 (RPL7)**

Diversos autores sugieren los genes de proteína ribosomal de subunidades largas como control interno para la normalización de los datos en tiempo real (Rebouças, 2013). Rpl7 es una de las proteínas ribosómicas que se encuentra en las subunidades grandes (50S, 60S, 70S y 80S), juega un papel regulador en la biosíntesis de las proteínas, inhibe la traducción libre de células de mRNAs (Odintsova et al., 2003), está implicada en la unión entre el ribosoma y el retículo endoplasmático (Lin et al. 1987,1991; Wu, Liu y Lin, 2007), es asociada con la iniciación, elongación y terminación de la traducción de diversos factores (por el ribosoma 70S) (Carlson et al., 2017) y participa como coactivador del receptor de estrógenos alpha (Duncan, Jimenez y Carruth, 2009). Diversos estudios señalan que Rpl7 es un buen candidato como gen de referencia debido a su alta estabilidad (Xingping, Lan y Zuobing., 2015)

## **2.4 DESCRIPCIÓN GENERAL DE LA ZONA DE ESTUDIO**

El “anillo de cenotes” es un sistema hidrológico único en México y el mundo, producto del impacto de un gran meteoro que al fracturar las capas superficiales de la corteza terrestre propició esta alineación anular de afloramientos del manto freático, tiene aproximadamente 5 kilómetros de ancho con un radio de 90 km (180 km de diámetro) cuyo centro cae en la localidad de Chicxulub Puerto (municipio de Progreso), ha mostrado ser una zona de alta permeabilidad cuyo flujo de agua subterránea se presenta del sureste hacia el noroeste (Escolero et al., 2000).

Parte del perímetro del Anillo de Cenotes se encuentra en tierra continental, abarcando 27 municipios (de este a oeste) del Estado de Yucatán: Celestún, Umán, Abalá, Chocholá, Maxcanú, Kopomá, Opichén, Muna, Chapab, Sacalum, Tecoh, Tekit, Cuzamá, Homún, Huhí, Kantunil, Izamal, Dzoncahuich, Tekal de Venegas, Quintana Roo, Sotuta, Sudzal, Tunkás, Cenotillo, Buctzotz, Dzilam González y Dzilam de Bravo. El anillo de cenotes conforma una red cavernosa muy compleja, que actúa como un vertedero y línea de conducción de grandes masas de agua. Son sitio de descanso en la ruta de diversas aves acuáticas durante sus migraciones al sur del continente y presentan endemismos de peces de agua dulce y de anfibios de la región (FIR 2009-2012).

## SITIOS DE MUESTREO

Los sitios de estudio comprenden de 7 cuerpos de agua distribuidos en las tres áreas de la zona geohidrológica que comprende el anillo de cenotes de Yucatán, conocidas como área de recarga, área de tránsito y área de descarga (Figuras 5 y 6).

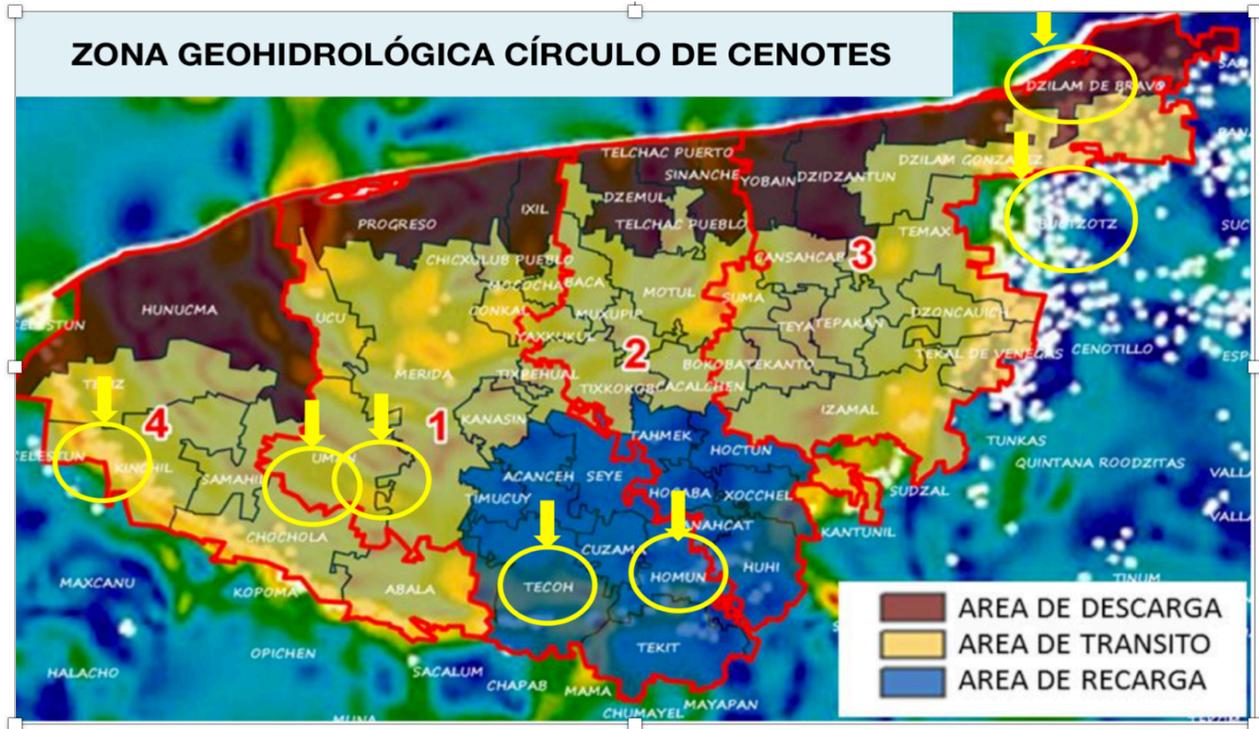


Figura 5. Mapa de la zona geohidrológica del anillo de cenotes. Consejo de cuenca de la Península de Yucatán. 2012. Comité Técnico de Aguas Subterráneas para la zona metropolitana de Mérida COTASMEY

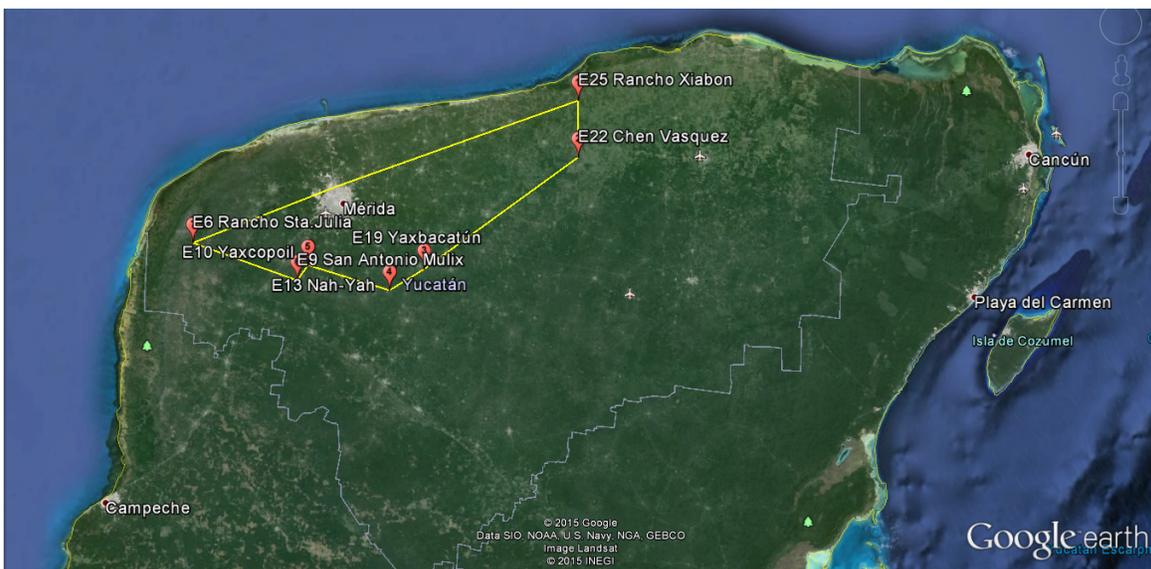


Figura 6. Sitios de muestreo en la península de Yucatán. Google Earth.

El área de recarga se caracteriza por tener suelos permeables o medianamente permeables que permiten que gran parte de las precipitaciones se infiltren en el suelo llegando a recargar las partes más bajas de la cuenca, son zonas son particularmente delicadas desde el punto de vista de la contaminación hídrica, ya que, las sustancias contaminantes una vez que entran en los acuíferos permanecen allí durante períodos muy largos (Bedoya-Soto, 2009); el agua infiltrada en el área de recarga es recibida en el área de tránsito y circula hasta el área de descarga donde el agua mana en distintas clases de surgencias.

En la tabla 2 se presenta la ubicación geográfica de cada sitio de muestreo, el municipio donde pertenece, tipo de área dentro de la zona geohidrológica del anillo de cenotes de Yucatán y su distancia desde la ciudad de Mérida, Yucatán, México.

Tabla 2. Localización de las estaciones de muestro definidas para el proyecto.

<b>Nº de Estación</b>	<b>Nombre</b>	<b>N</b>	<b>W</b>	<b>Área</b>	<b>Distancia desde Mérida en Km</b>
<b>E25</b>	<b>Rancho Xlabón Subim</b> Municipio: Dzilam de Bravo	21°21' 35.2"	88°39'33.4"	<b>Descarga</b>	107.96
<b>E22</b>	<b>Chen Vázquez</b> Municipio: Buctzotz	21°08'54.2"	88°39'28.2"	<b>Tránsito</b>	102.22
<b>E19</b>	<b>Yaxbacaltún</b> Municipio: Homún	20°43'37.2"	89°16'05.3"	<b>Recarga</b>	50.35
<b>E13</b>	<b>Nah-Yah</b> Municipio: Tecoh	20°38'47.4"	89°24'16.6"	<b>Recarga</b>	48.71
<b>E10</b>	<b>Yaxcopoil</b> Municipio: Umán	20°44'11.13"	89°43'55.4"	<b>Tránsito</b>	34.48
<b>E9</b>	<b>San Antonio Mulix</b> <b>"X'Batún"</b> Municipio: Umán	20°40'44.1"	89°46'26.7"	<b>Tránsito</b>	41.93
<b>E6</b>	<b>Rancho Sta. Julia</b> Municipio: Celestún	20°48'47.9"	90°11'46.8"	<b>Tránsito</b>	73.79

## **RANCHO SANTA JULIA**

### **CLAVE: E6**

La estación 6 se encuentra dentro de la zona geohidrológica de tránsito y consta de un cenote tipo abierto ubicado dentro del Rancho Santa Julia dedicado a la crianza y producción de carne bovina en el municipio de Celestún, se puede acceder fácilmente a este cuerpo de agua caminando unos pocos metros monte adentro. Este cuerpo de agua se encuentra a pocos metros del área de ganado, presenta malezas acuáticas y signos de eutrofización, es posible que estas características estén asociadas con el transporte de los residuos fecales y plaguicidas para el control de plagas (Figuras 7 y 8).



Figura 7. Entrada al Rancho Santa Julia Estación 6, Celestún.

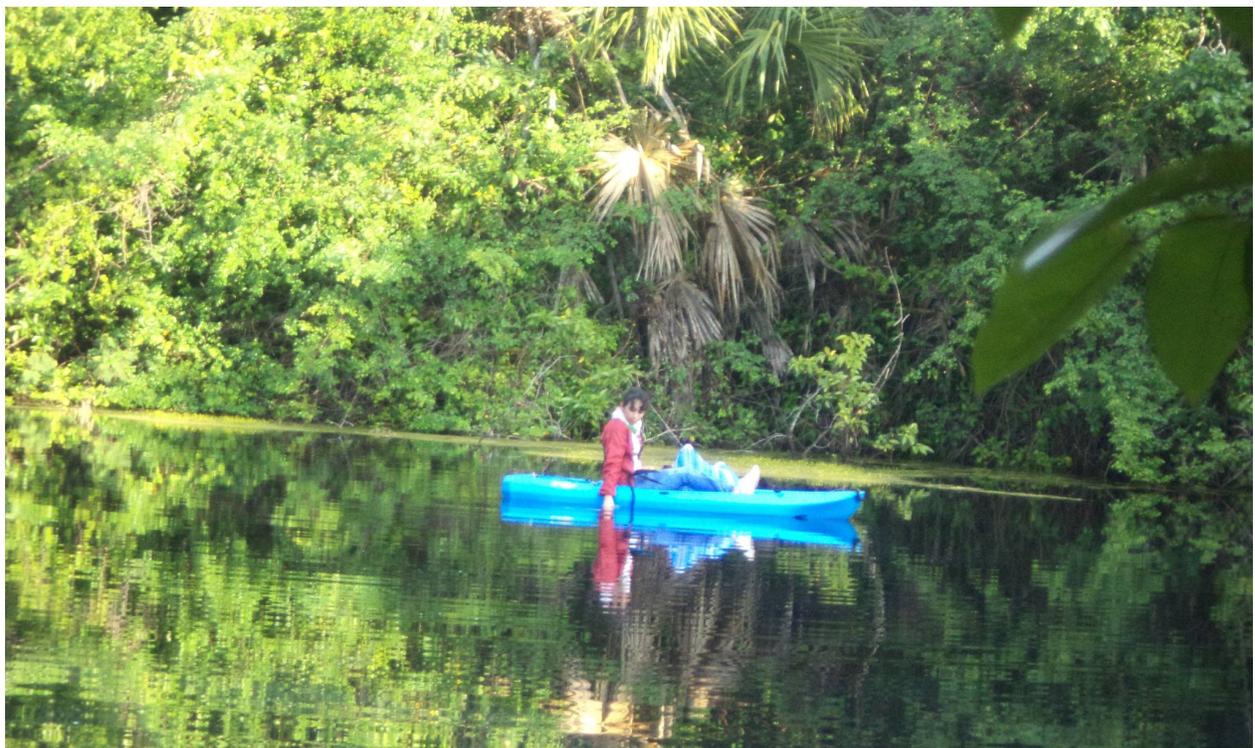


Figura 8. Cenote abierto del Rancho Santa Julia

**SAN ANTONIO MULIX**  
**CLAVE: E9**

Dentro del áreas de tránsito del anillo de cenotes de Yucatán se encuentra el cenote X´Batun que es de tipo abierto y se encuentra localizado en una zona forestal y turística en la población de San Antonio Mulix, Umán a 49 km de Mérida. Se caracteriza por tener agua con una coloración cristalina azul turquesa y es uno de los pocos cenotes que cuenta con vegetación acuática. Tiene un área grande con poca profundidad, que permite el snorkeling y el buceo en el interior de su caverna. En los terrenos aledaños se practica la agricultura para autoconsumo espacialmente para producir maíz. Derrien et al (2014) señalan la presencia de bajos niveles de esteroides que pueden estar relacionados con la contaminación de aguas residuales domésticas/ animales y degradación de la materia orgánica (Figura 9).



Figura 9. Cenote X´Batun en San Antonio Mulix, Umán.

**YAXCOPOIL**  
**CLAVE: E10**

La estación 10 se ubica dentro de área de tránsito de la zona hidrogeológica, en la localidad del mismo nombre y perteneciente al municipio de Umán. El cenote “El Yaxcopoil” se encuentra dentro de las once mil hectáreas que conformaban ex-hacienda Henequenera y ganadera del mismo nombre. Actualmente los terrenos aledaños se utilizan para milpa de autoconsumo, con pequeñas regiones para el ganado bovino, mientras que en las afueras de localidad se encuentran establecidas grandes extensiones de granjas avícolas (Figura 10).



Figura 10. Cenote Yaxcopoil ubicado en la ex- hacienda y comisaria del mismo nombre en Umán.

**NAH-YAH**  
**CLAVE: E13**

+



Figura 11. Entrada del cenote Nah- Yah en Pixán, Tecoh.

El cenote Nah Yah encuentra en la localidad de Pixyá en el municipio de Tecoh dentro del área de recarga del anillo de cenotes de Yucatán, tiene una alta actividad turística y una dimensión de 40 metros de ancho y 30 metros de profundidad. Las actividades en la localidad se basan principalmente en la agricultura de maíz, frijol, hortalizas y algunos frutales como sandía, jícama y algunas variedades de chiles, la crianza del ganado bovino, porcino y aves de corral. Según Polanco Rodríguez et al. (2015), existe una alta degradación del agua en el municipio de Tecoh, señala que durante la temporada de lluvias 2011 se detectó la presencia de metabolitos de lindano, un insecticida organoclorado que es moderadamente tóxico y puede ser moderadamente peligroso para los humanos si se manipula incorrectamente o sin precaución (International Agency for Research on Cancer IARC), además puede representar un peligro tóxico para las especies acuáticas y terrestres al entrar en la cadena alimentaria y dar lugar a bioacumulación y biomagnificación, específicamente para los peces, además es bastante persistente en el ambiente; también se encontró altas concentraciones de aldehído de endrina (un producto de la degradación de la endrina al ser expuestas a altas temperaturas) con una concentración cercana a 0.6 pmm sobrepasando el límite de concentración permitido de 0.00002 ppm establecido por las Norma Mexicana NOM-127-SSA1-1994, esto nos indica el uso de endrina en zonas aledañas al cuerpo acuático, se utiliza como insecticida en cultivos de maíz y actúa también como avicida y rodenticida, es tóxico para un amplio rango de seres vivos y muy tóxica en organismos acuáticos. Su elevada persistencia en los suelos junto con su baja solubilidad en agua, pero alta en grasas provoca que las condiciones para bioconcentrarse en los organismos vivos sea elevada. Derrien et al. (2014) detectaron cantidades significativas de coprostanol tanto en época de lluvias como de secas, es un biomarcador de contaminación fecal, un indicador de contaminación reciente por aguas domésticas, y esto podría estar asociado por el grado de rezago social y pobreza de la localidad y del municipio, según el informe CONEVAL 2010: 153 viviendas de Pixyá no cuentan con excusado o sanitario y 170 carecen de drenaje mientras que en todo el municipio de Tecoh 887 viviendas no cuentan con excusado o sanitario y 1,122 viviendas carecen de drenaje (Figura 11).

## YAXBACALTÚN CLAVE: E19

Yaxbacaltún es un cenote de tipo semiabierto localizado en el municipio de Homún que se encuentra dentro del área geohidrológica de recarga, actualmente su aprovechamiento está destinado para actividades turísticas. En un pasado Homún fue utilizado para el cultivo de Henequén, actualmente se produce maíz, frijol, tomate, chile, y cítricos; tiene producción ganadera con bovinos, porcinos y actividad avícola y apícola (Figura 12).



Figura 12.- Entrada al cenote Yaxbacaltún en Homún.

**CHEN VAZQUEZ**  
**CLAVE: E22**

El cenote Chen Vazquez, es un cenote de tipo semiabierto que se localiza en la comisaría de Santo Domingo que pertenece a Buctotz, es utilizado como un área recreacional por habitantes de la población, sus aguas presentan signos de eutrofización. Polanco-Rodríguez et al. (2015) reportaron la presencia de metabolitos de lindano durante la temporada de secas 2011, asimismo Arroyo-Silva (2017) encontró que la expresión de CYP1A en músculo de *Gambusia yucatanana* se asoció a los compuestos PAHs presentes en este cuerpo de agua. El municipio de Buctotz se caracteriza por tener 2/3 de la producción ganadera y agrícola en el estado (Figura 13).



Figura 13. Cenote Chen Vazquez en Santo Domingo, Buctotz.

## **RANCHO X'LABÓN SUBIM**

### **CLAVE: E25**

El cenote X'labón se encuentra dentro del terreno con el mismo nombre ubicado en el municipio de Dzilam Bravo y pertenece al área de descarga del anillo de cenotes en la cuenca geohidrológica de Yucatán. Varios trabajos señalan existencia de compuestos contaminantes en este cuerpo de agua. En el estudio de Polanco-Rodríguez et al. (2015) señalan una alta degradación en la calidad del agua en el municipio de Dzilam Bravo, en el período de secas 2011 se encontró en el cenote X'labón altas concentraciones de heptacloro con una concentración de 13.61 ppm cuando el límite establecido por la Norma Mexicana NOM-127-SSA1-1994 es de 0.00008 ppm, también se reportó la presencia endrina tanto en época de lluvias como de secas con concentraciones de 0.7 ppm y 1.3 ppm respectivamente sobrepasando el límite de 0.00002 ppm, se detectó sulfato de endosulfan con concentraciones 0.15 ppm sobrepasando el limite concentración permitida de 0.00002 establecido por la Norma Mexicana NOM-127-SSA1-1994, además se encontró 4,4 DDE (diclorofenildicloroetileno, compuesto similar al DDT) con una concentración de 0.3 ppm sobrepasando el límite de 0.001 ppm establecido por la Norma Mexicana NOM-127-SSA1-1994, así como metabolitos de lindano. Se presentan signos de eutrofización. El rancho tiene actividad ganadera con bovinos y porcinos, crianza de aves de corral así como actividad agrícola a escasos metros de distancia (Figura 14).



Figura 14. Cenote del Rancho X'labón seleccionado como sitio de muestreo.

## 2.5 GAMBUSIA YUCATANA COMO ESPECIE CENTINELA EN YUCATÁN



Figura 15. Pez *Gambusia yucatanana* macho

La especie *Gambusia yucatanana* (figura 15), conocida en la península de Yucatán con el nombre de guayacon yucateco, se incluye dentro del orden Cyprinodontiformes, familia Poeciliidae. Está distribuida desde Veracruz hasta Guatemala y Belice y toda la península de Yucatán, incluso en cenotes tierra adentro, estuarios y manglares, aunque tiende a ser costero (Miller et al. 2005) como se aprecia en la figura 16.



Figura 16. Mapa de la distribución del pez *Gambusia yucatanana*.

Esta especie es muy abundante y se puede encontrar en agua dulce, salobre y salada. Es la especie más eurihalina del género y existen incluso poblaciones marinas (Miller et al. 2005); tiene una tolerancia en condiciones hipersalinas de por lo menos 34 ppt (Carter, 1981), puede vivir en un rango de pH de 7.5 - 8.3 y generalmente a una temperatura de 22°C a 28°C (Lucinda, 2003), y el valor máximo de temperatura crítica registrada para la especie *G. yucatanana* es de 42.4 °C (Heath et al., 1993). La longitud total máxima para las hembras es 8.0 cm y para los machos 5.5 cm (Lucinda, 2003) Los machos se caracterizan por presentar un órgano intromitente denominado gonopodio, que introducen en las hembras (Constantz, 1989; Ghedotti, 2000). Son vivíparos y efectúan su reproducción interna mediante un órgano copulador o gonopodio el cual es

indispensable para la identificación de la mayoría de las especies (Pérez-León y Schmitter-Soto, 2007). Nada en cardúmenes bajo la película superficial, cerca del mangle, para refugiarse (Lucinda, 2003). El complejo de *G. yucatanana* en México y Centroamérica consta de dos subespecies (Greenfield, 1985), distinguibles principalmente por características gonopodiales. En el norte de la península de Yucatán y la región del Petén se presentaría *G. yucatanana mientras* que en las poblaciones del sur de la península de Yucatán y Belice corresponderían a *Gambusia yucatanana australis*. Es una especie omnívora planctófaga que incluye en su alimentación dípteros, gasterópodos, ostrácodos, quelicerados, odonatos y plecópteros según su disponibilidad (Mondragón y Rodas, 2001). En la tabla 3 se presenta la taxonomía de *Gambusia yucatanana*.

Tabla 3. Taxonomía de *Gambusia yucatanana*.

<b>Taxonomía de <i>Gambusia yucatanana</i></b>	
<b>Reino</b>	<b>Animalia</b>
<b>Filo</b>	<b>Chordata</b>
<b>Clase</b>	<b>Actinopterygii</b>
<b>Orden</b>	<b>Cyprinodontiformes</b>
<b>Familia</b>	<b>Poeciliidae</b>
<b>Género</b>	<b><i>Gambusia</i></b>
<b>Especie</b>	<b><i>G. yucatanana</i></b>
<b>Regan 1914</b>	

Las especies dentro de la familia Poeciliidae son importantes en las investigaciones de diferentes campos, como la genética, oncología, ecología y en la biología del desarrollo (Meffe y Snelson, 1993). Esto se debe a que los poecílicos responden fácil y rápidamente a las diferentes condiciones ambientales con cambios genotípicos (Reznick et al., 1990) y fenotípicos (Rodd et al., 1997). Se han realizado muchos estudios para entender como los poecílicos responden a varios factores ecológicos, particularmente la depredación (Downhower et al., 2000), los factores abióticos (Brown- Peterson y Peterson, 1990) y la estabilidad ambiental (Stearns, 1983).

### 3. JUSTIFICACIÓN

A nivel nacional se reconoce que el acuífero de Yucatán es la gran reserva de agua dulce del país y la principal fuente de abastecimiento en todas las actividades humanas del estado, sin embargo, el acelerado crecimiento poblacional, agropecuario e industrial ha traído como consecuencia un aumento en la explotación de los cuerpos de agua superficiales, subterráneos e inevitablemente su contaminación gradual, frente la amenaza de la pérdida de la calidad del agua en el acuífero se han realizado diversos estudios que señalan la presencia de plaguicidas organoclorados y/o metales tóxicos como mercurio, plomo, cadmio y residuos domésticos debido a que representan un riesgo principalmente en poblaciones rurales que dependen directamente de la extracción de este recurso para satisfacer sus necesidades; ante la falta de una norma oficial mexicana que regule el uso, aprovechamiento y conservación de los cenotes la implementación de un programa de monitoreo de contaminación ambiental basado en el estudio de genes biomarcadores en organismos locales podría ser útil en la detección de posibles alertas de contaminación en los cuerpos de agua del estado.

Los estudios relacionados con la medición y efectos de estos contaminantes en organismos nativos del estado son escasos, en este proyecto se propone al pez *Gambusia yucatana*, una especie de gran abundancia, fácil captura y de amplia distribución en todo el estado como organismo biomarcador de contaminación en el estudio de los genes CYP1A que responde agentes con efecto oxidante, MT encargado principalmente del transporte de metales hacia el interior de la célula y VTG que se activa ante la presencia de compuestos con capacidad estrogénica.

## 4. PREGUNTAS DE INVESTIGACIÓN

Con respecto a la metodología:

1. ¿Cuál es el mejor gen de referencia para medir expresión génica en *G. yucatanana*?
2. ¿Qué tan variables son los genes de referencia seleccionados con respecto al sexo, y el largo total?
3. ¿Qué método es el más efectivo para la evaluación de la expresión relativa?
4. ¿Es más conveniente el uso de múltiples genes de referencia al mismo tiempo en comparación a usar uno sólo?

Con respecto a los resultados de los sitios de muestreo

1. ¿Se presentará expresión diferencial en los peces colectados de los cuerpos de agua?
2. ¿Existen diferencias estacionales y espaciales en la expresión de CYP1A, MT en peces de ambos sexos y VTG en machos?
3. ¿Existe una relación entre el sexo y la expresión de CYP1A y MT?
4. ¿Existe una relación entre el largo total y la expresión de CYP1A, MT en peces de ambos sexos y VTG en machos?
5. ¿Se presentará correlación entre los genes biomarcadores y los contaminantes detectados en agua y sedimentos de los sitios de muestreo?

## 5. HIPÓTESIS

1.- Los genes CYP1A, MT y VTG han sido ampliamente estudiados y utilizados en otras especies de peces como biomarcadores de exposición y efecto de xenobióticos debido que representan una herramienta importante en programas de monitoreo de la contaminación ambiental en otros países. Estos genes se encuentran presentes en el pez *Gambusia yucatanana*, por lo tanto, si los cuerpos de agua elegidos en este estudio presentan compuestos xenobióticos biodisponibles, se observará una expresión distinta de los genes CYP1A, MT y VTG respecto a organismos que se encuentran libres de contaminación. Para este estudio se tomará en cuenta si existe variabilidad entre el largo total y el sexo de *Gambusia yucatanana* en la expresión de los genes diana y de referencia.

## 6. OBJETIVO GENERAL

1. Estandarización del método de expresión relativa para la cuantificación de los genes CYP1A, MT y VTG en el pez *Gambusia yucatanana* obtenido de los cenotes de Yucatán, México bajo distintos escenarios de contaminación.

## 7. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Evaluar la estabilidad de los genes de referencia para cuantificar la expresión relativa de los genes biomarcadores CYP1A, MT y VTG.
2. Evaluar la variabilidad de los genes de referencia con respecto al sexo y el largo total *Gambusia yucatanana*.
3. Evaluar la expresión relativa con respecto a un gen de referencia con el método de CT comparativo y el método de la curva estándar.
4. Evaluar la expresión relativa con respecto a múltiples genes de referencia utilizando la media geométrica de los tres genes seleccionados.
5. Seleccionar el método más óptimo para la evaluación de la expresión de los genes biomarcadores CYP1A, MT, VTG de *Gambusia yucatanana*.
6. Determinar si existen diferencias estacionales y espaciales en las medidas de *Gambusia yucatanana* con respecto a los niveles de expresión genética de CYP1A, MT y VTG.
7. Determinar si existe diferencias entre hembras y machos con respecto a la expresión de los genes CYP1A y MT.
8. Evaluar si existe correlación entre la expresión relativa de los genes biomarcadores los contaminantes ambientales detectados en el agua y sedimento de los sitios de muestreo.

# 8. MATERIALES Y MÉTODOS

## MATERIALES Y MÉTODOS

La figura 17 muestra de forma resumida la metodología empleada en este trabajo.

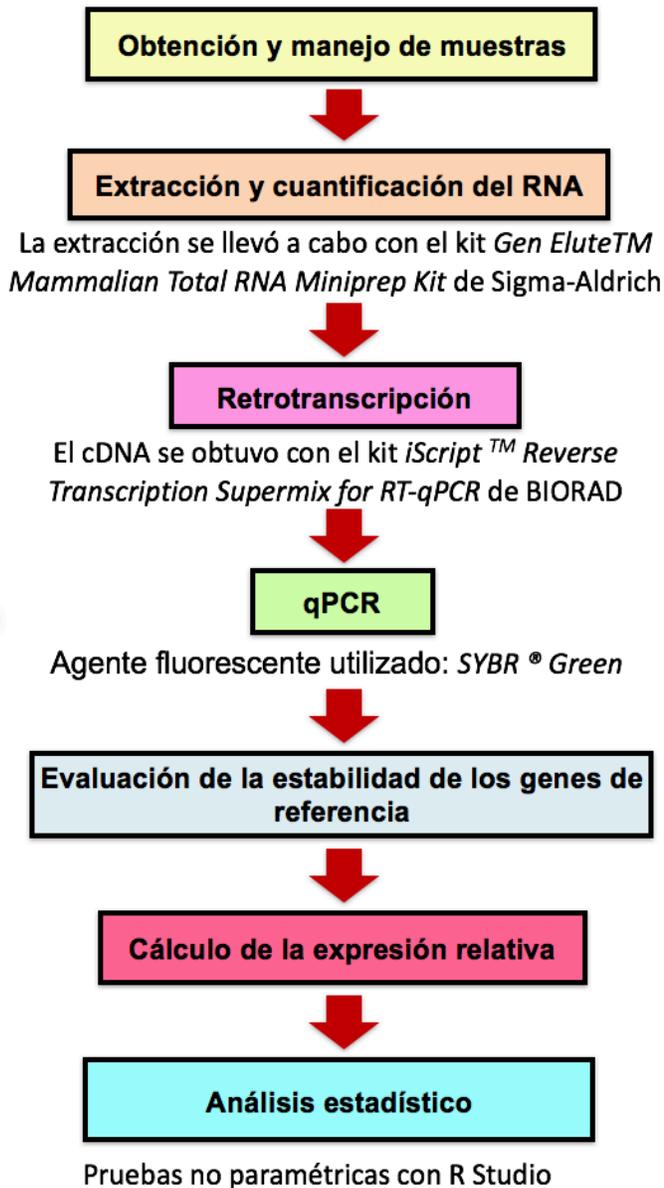


Figura 17. Diagrama de la metodología realizada.

## 8.1 OBTENCIÓN DE MUESTRAS Y ACONDICIONAMIENTO

- **Peces utilizados como calibradores**

Un grupo de peces la especie *Gambusia yucatanana* fué capturado en los cenotes de Yucatán y trasladado al laboratorio donde fueron depurados por 30 días a 22°C, en la primera semana el agua purificada contenía azul de metileno (dosis de 1.25 ppm, 1 gota por cada 20L) como preventivo y terapéutico contra hongos bacterias y protozoarios, también se adicionó un producto conocido como “bacteria líquida” para la prevención de la contaminación ya que su función es generar una microbiota capaz de metabolizar amoniaco y nitritos provenientes de los desperdicios de los peces y otros organismos en descomposición en las peceras, después de la primera semana el tratamiento con azul de metileno fue eliminado.

- **Muestras a cuantificar**

Se colectaron 10 peces *Gambusia yucatanana* por cada uno de los siete cuerpos de agua establecidos para el estudio, estos fueron capturados con redes de pesca manuales y posteriormente fueron sacrificados por choque hipotérmico, se registraron las medidas del largo total, la largo patrón, y el ancho procurando que las muestras tuvieran un valor igual o mayor de 1.8 cm de largo total, seguidamente fueron disectados y el contenido abdominal se conservó en RNA later ® en tubos de microcentrífuga que se mantuvieron en hielo hasta su arribo al laboratorio donde se conservaron a -70°C hasta su procesamiento.

## 8.2 EXTRACCIÓN DE RNA

Esta técnica permite obtener RNA a partir de pequeñas cantidades de tejido y células en cultivo o suspensión de origen humano, vegetal, animal o bacteriano. Así mismo el RNA obtenido si se realiza el procedimiento con precaución está libre de contaminación con DNA y proteínas y finalmente puede ser utilizado en transcripción reversa también llamado retrotranscripción. Para la extracción del RNA en las muestras de contenido abdominal de los peces se utilizó el kit *Gen Elute™ Mammalian Total RNA Miniprep Kit* de la marca Sigma-Aldrich y se siguió el protocolo del ANEXO 1.

### 8.3 CUANTIFICACIÓN DE RNA

Posterior a la extracción de RNA se realizó la cuantificación y el análisis de la calidad de las moléculas obtenidas utilizando el espectrofotómetro NanoDrop 2000 THERMO SCIENTIFIC del laboratorio de Ecotoxicología Acuática del Cinvestav Unidad Mérida. Las instrucciones para su uso se encuentran en el ANEXO 2.

Después de cuantificar fué necesario evaluar la pureza del RNA de la muestra, para conocer con precisión la calidad de RNA de la muestra las proporciones de absorbancia 260/280 y 260/230 deben ser analizadas.

Los ácidos nucleicos absorben a 260nm y si son puros generalmente producen una relación 260/280nm  $\sim$ 1,8 para DNA y  $\sim$ 2,0 para RNA, los índices menores a 1.8 sugieren mala calidad, contaminación por proteínas, fenol u otros compuestos (que absorben fuertemente a 280nm), rangos entre 1.8 - 2.2 indica buena calidad y que están libres de impurezas, datos mayores a 2.2 señalan mala calidad, contaminación con polifenoles y polisacáridos.

En cuanto a la concentración de RNA se considera que valores menores a 10 ng/ $\mu$ L indican una extracción baja, protocolo ineficiente o cantidad de tejido insuficiente, valores entre 11-30 ng/ $\mu$ L se asocia a una extracción media y un protocolo medio eficiente, y valores  $31 <$  ng/ $\mu$ L representa una extracción óptima, protocolo muy eficiente y cantidad de tejido suficiente.

\*Nota: El índice 260/230 es una segunda medida de la pureza propio de un ácido nucleico "puro" que se encuentra comúnmente en el rango de 1.8 -2.2, las relaciones de pureza que son significativamente inferiores a los valores esperados pueden indicar que la técnica de aislamiento utilizada puede requerir una mayor optimización debido a contaminantes que absorben a 230nm. Se menciona este dato ya que aparece en la tabla que arrojan los resultados del NanoDrop, pero no es útil para este estudio

## 8.4 SÍNTESIS DE DNA COMPLEMENTARIO

A la reacción RT-PCR se le llama PCR de retrotranscripción o transcripción reversa es una técnica que permite sintetizar DNA complementario (cDNA) a partir de moléculas de RNA usando para ello la enzima transcriptasa reversa. El cDNA obtenido es la cadena complementaria de la cadena molde de RNA.

En este proceso se generan copias de RNA en forma de cDNA y se conserva la secuencia de RNA a amplificar. Dado que el RNA usualmente es de una sola hebra y es sensible al calor, es necesario hacer una transcripción reversa (RT) antes de iniciar la amplificación por PCR ya que el cDNA es estable al calor y puede resistir la metodología PCR.

Los equipos en donde se realiza la reacción son llamados termocicladores, los cuales están diseñados para establecer un sistema homogéneo en donde las condiciones de temperatura y tiempo necesarios no se modifiquen en cada uno de los ciclos. Al final de la reacción, para corroborar si se amplificó la secuencia blanco de interés, los productos de la PCR o también llamados amplicones son analizados en geles de agarosa para confirmar si la reacción fue exitosa. El cDNA se obtuvo utilizando el kit *iScript<sup>TM</sup> Reverse Transcription Supermix for RT-qPCR* de BIORAD, el protocolo utilizado se encuentra en el ANEXO 3.

## 8.5 VALIDACIÓN DEL OLIGONUCLEÓTIDO CUANTITATIVO ESPECÍFICO E1FA Y DEL OLIGONUCLEÓTIDO CUANTITATIVO RPL7

**E1FA.** Para la obtención de oligonucleótido cuantitativo específico del gen *EIFa* en *Gambusia yucatana*, se partió de una secuencia formada de los peces *Sparus aurata* y *Dicentrarchus labrax*, primero se realizó un pcr punto final (ANEXO 4) para observar si las secuencias amplifican con el cDNA complementario de *Gambusia yucatana*, una vez confirmado que ha amplificado se procedió a purificar el producto de PCR usando el kit comercial Zymoclean<sup>TM</sup> Gel DNA Recovery (ver ANEXO 5) debido a que los productos de PCR suelen contener restos de nucleótidos y de cebadores que interfieren en la secuenciación, para corroborar que el producto de PCR esté purificado se inyecta un poco en un gel de electroforesis y en él debe verse un único producto como en la figura 18.

Para enviar a secuenciar el producto de PCR purificado se prepara una mezcla con un volumen final de 16  $\mu\text{L}$  donde 15  $\mu\text{L}$  serán del producto de PCR purificado y 1  $\mu\text{L}$  del primer a 10mM; se enviaron a secuenciar 2 muestras una con el primer Forward y otra con el primer Reverse al IBT UNAM, posteriormente los resultados de las secuencias fueron analizados mediante el uso de BLAST Y BIOEDIT (ANEXO 7 y 8, respectivamente)

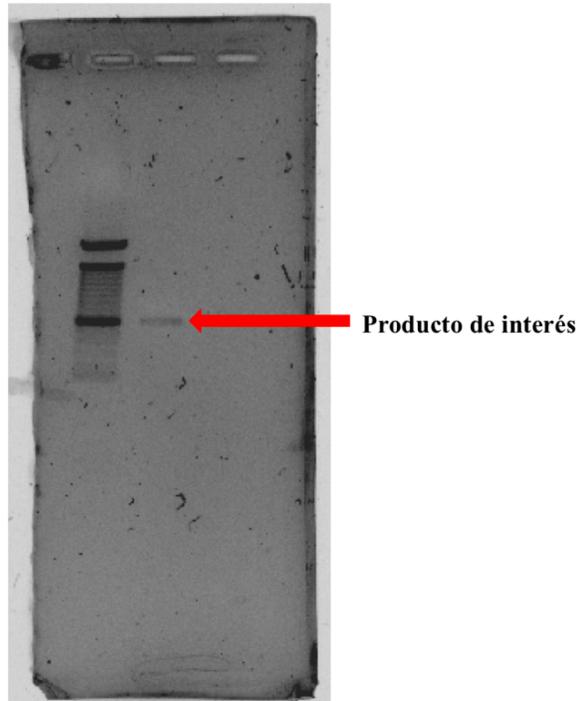


Figura 18. Banda del producto de pcr purificado en gel de agarosa.

**RPL7.** La elección del gen Rpl7 estuvo basada en los resultados con respecto a su estabilidad en el artículo de Zhu et al. (2016), de donde se tomó el oligonucleótido cuantitativo específico para *Poecilia formosa* (características en la tabla 4) para probar con el cDNA de *Gambusia yucatanana* en qPCR.

Tabla 4. Características del par de oligonucleótidos Forward y Reverse del gen Rpl7 de *Poecilia formosa*.

Gen	Secuencia (5'-3')	Longitud	Amplicón (pb)	T °C Alineamiento
<b>Rpl7</b> Poecilia formosa	F- TCAGAGGTATCAATGGTGTCCC R- CAGCTTGACAAACACACCGT	22 20	92	63

Siguiendo el procedimiento del ANEXO 4, se amplificó el gen RPL7 en punto final utilizando cDNA de *Gambusia yucatanana* y los oligonucleótidos de *Poecilia formosa*, posteriormente el producto de PCR generado se purificó con el kit comercial Zymoclean™ Gel DNA Recovery de acuerdo con las indicaciones del ANEXO 5, en la figura 19 se aprecia el producto purificado libre de dímeros.

Al igual que E1Fa se preparó una mezcla con un volumen final de 16  $\mu$ L donde 15  $\mu$ L es del producto de PCR purificado y 1  $\mu$ L del primer a 10mM.

La mezcla se envió a secuenciar al IBT UNAM, asimismo los resultados de las secuencias fueron analizados mediante el uso de BLAST y BIOEDIT (ANEXO 7).

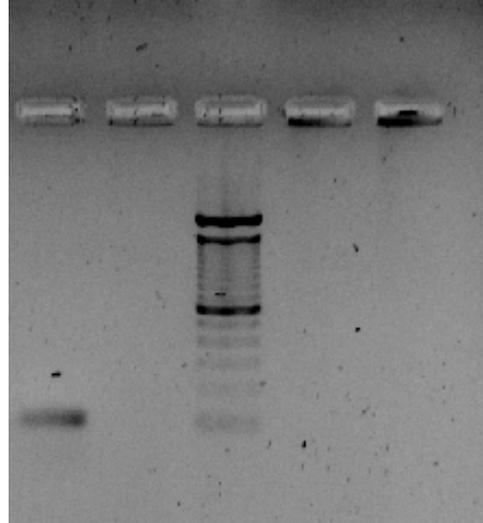


Figura 19. Banda del producto de pcr purificado en gel de agarosa.

## 8.6 PCR TIEMPO REAL

La clave en la PCR cuantitativa es la posibilidad de detectar en tiempo real la amplificación de un gen de interés mediante la cuantificación de la fluorescencia emitida durante cada ciclo de la PCR que será proporcional a la cantidad de DNA que se está amplificando. Por lo general para que sea válida esta técnica requiere realizar en paralelo una curva de calibración en las mismas condiciones para conocer la cantidad total de DNA que se está amplificando. Debido a la elevada sensibilidad de la técnica, uno de los puntos más importantes a la hora de realizar una PCR en Tiempo Real, es la calidad del material de partida. Por ello, la extracción de los ácidos nucleicos de la muestra toma un papel crítico y fundamental. En estudios ecotoxicológicos es utilizado eficazmente para evaluar los niveles de expresión de genes marcadores biológicos en virtud de la inducción de xenobióticos contaminantes.

Los oligonucleótidos que fueron amplificados en qPCR Tiempo Real fueron:

**$\beta$ -ACTINA, CYP1A, MT Y VTG.** Los oligonucleótidos cuantitativos específicos de  $\beta$ -actina, CYP1A, MT Y VTG en *Gambusia yucatanana* fueron tomados del estudio previo de Vazquez-Euán et al. (2016).

**FACTOR DE ELONGACIÓN 1 $\alpha$  (E1F $\alpha$ ).** La secuencia del gen E1F $\alpha$  se obtuvo de los peces *Sparus aurata* y *Dicentrarchus labrax*, a partir de estos se generaron los oligonucleótidos cuantitativos específicos para *Gambusia yucatanana*.

**PROTEINA RIBOSOMAL L7 (RPL7).** Las secuencias de los oligonucleótidos del gen rpL7 corresponden al pez *Poecilia formosa* y fue obtenida del artículo de Zhu et al. (2016).

### 8.6.1. ESTANDARIZACIÓN DE REACCIÓN DE PCR EN TIEMPO REAL

Las reacciones en PCR Tiempo Real se llevaron a cabo por triplicado en un termociclador CFX96 de BIORAD con capacidad de microplacas placas de 96 pocillos. En cada uno de ellos se cargaron 15 $\mu$ L de la siguiente mezcla de reacción: 7.5  $\mu$ L de SYBR Green, 4.5  $\mu$ L de agua PISA estéril, 1 $\mu$ L de oligonucleótido Forward a 10mM, 1 $\mu$ L de oligonucleótido Reverse a 10mM y 1 $\mu$ L de cDNA (12.5 ng/  $\mu$ L). Se incluyeron controles negativos (NTC) por cada mezcla de reacción para descartar posibles contaminaciones cruzadas entre muestras. Los resultados de las

reacciones de qPCR se presentaron en forma de valores (CT- threshold cycles o CP-Crossing Points) que fueron utilizados para calcular los niveles de expresión génica. El protocolo que se utilizó para correr las muestras en qPCR fué la misma para todos los genes evaluados con el iQ5 Optical System Software Versión 2.1. Se estableció una temperatura de 95 °C por 10 minutos como desnaturalización inicial, posteriormente en el ciclo 2 se programaron 35 repeticiones con 30 segundos a 95 °C para la desnaturalización y 1 minuto a 60 °C y a 63°C para el gen rpL7 para el alineamiento sin la fase de extensión, por último, para la generación de la curva Melt 1 min a 95 °C en el Ciclo 3 y 91 repeticiones de 20 segundos a 50 °C en el ciclo 4, ver tabla 5.

Tabla 5. Condiciones de amplificación de los genes evaluados.

Desnaturalización inicial	Desnaturalización	Alineamiento	Curva Melt	
Ciclo 1	Ciclo 2 35x		Ciclo 3	Ciclo 4 91x
Paso 1	Paso 1	Paso 2	Paso1	Paso 1
95 °C	95 °C	60 °C	95 °C	50 °C
10:00 min	0:30 seg	1:00 min	1:00 min	0:20 seg

Nota: Los oligonucleótidos del gen rpL7 trabaja con una temperatura de alineamiento de 63°C.

Los valores CT resultantes de cada muestra se añadieron a una hoja de cálculo promediados si su variación intrínseca presentó un valor  $\leq 0.20$ . En la tabla 6 se muestran todos los oligonucleótidos utilizados en las reacciones de qPCR.

Tabla 6. Características de los oligonucleótidos utilizados en este estudio.

Gen	Secuencia (5´-3´)	Longitud	Amplificación (pb)	Tm	Específico Cuantitativo <i>G. yucatanana</i>
<b>β-Actina</b>	F- ACTGGGACGACATGGAGAAG R- CGTACATGGCAGGAGTGTTG	20 20	100	60	Si
<b>E1Fα</b>	F- GCGCTCACTTCCTTGGTGA R- GCTGCTGGTGTGGTGAGTT	19 20	179	60	Si
<b>RpL7</b>	F-TCAGAGGTATCAATGGTGTCCC R-CAGCTTGACAAACACACCGT	22 20	92	63	No
<b>CYP1A</b>	F- CCTCGCTGAAGATTTTGTCC R- TCCGGTCCTCACAGTGATCT	20 20	100	60	Si
<b>MT</b>	F- GAAAAGCTGCTGCTCTTGCT R- AGGCTCCTCACTGACAGCAG	20 20	100	60	Si
<b>VTG</b>	F- GCTGAAGCTTGTGGAACCTC R- CAGTTGTTTCAGGTCCCTGGT	20 20	-	60	Si

### **8.6.2.- ANÁLISIS DE LA CURVA DE FUSIÓN PARA DETERMINAR LA ESPECIFICIDAD DE LOS AMPLICONES.**

Mediante el uso de fluoróforos intercalantes como el *SYBR*® *Green* es posible identificar productos específicos de qPCR mediante el análisis de la temperatura de disociación que se expresa en una curva cuya forma se relaciona con el contenido de GC, tamaño de los amplicones y la secuencia de los mismos (Ririe et al., 1997). Para asegurar que los oligonucleótidos utilizados amplificaran un solo producto, se llevaron a cabo curvas de fusión (también conocidas como curvas de disociación o de melting) para cada uno de ellos a distintas diluciones teniendo en cuenta que estos se disocian a una temperatura más alta que los artefactos como dímeros de oligonucleótidos (Ririe et al., 1997).

### 8.6.3.- PARÁMETROS DE LA RECTA ESTÁNDAR DE LAS CURVAS DE CALIBRACIÓN

#### 3.1 Diluciones seriadas para generar la recta estándar

Para obtener el valor de la eficiencia y de la pendiente para el cálculo de la eficiencia relativa de la reacción es necesario generar una recta estándar por medio de diluciones seriadas. Se realizan los cálculos para una dilución 1:3 para un cDNA a 12.5 ng/μL, tomando en cuenta que para la reacción de qPCR se cuenta con 5.5μL del volumen entre el agua y el templado (Figura 20).

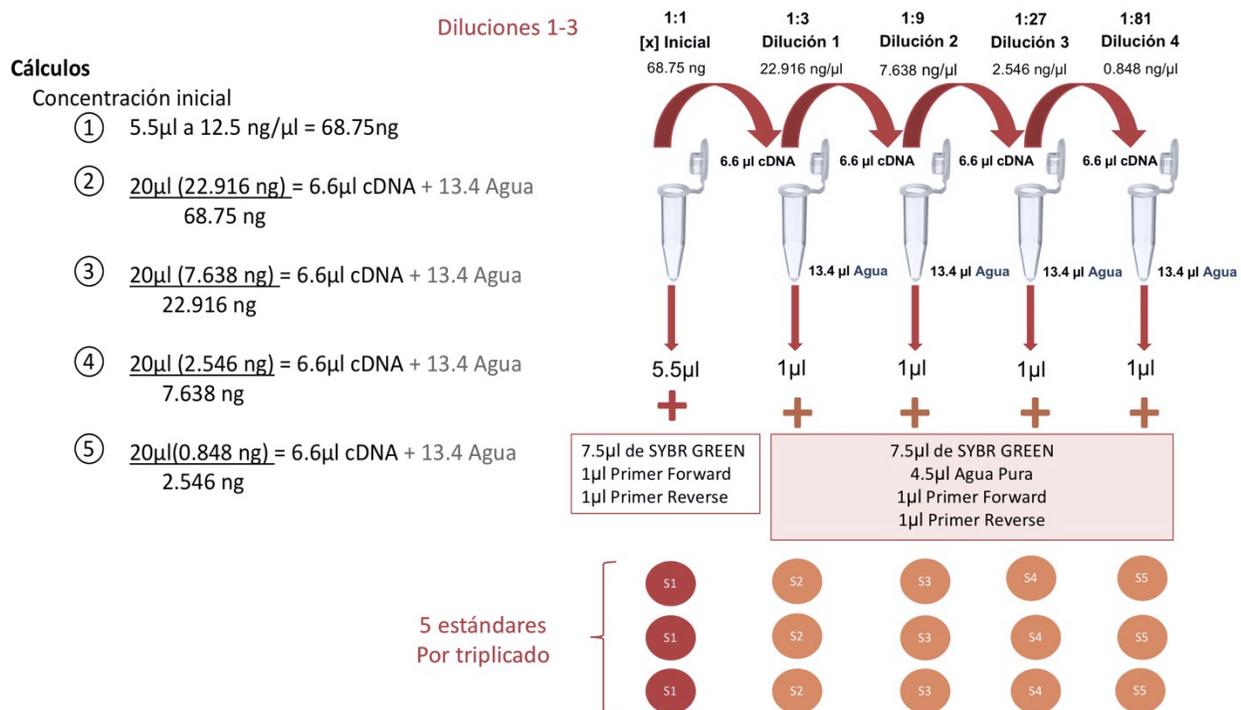


Figura 20. Diagrama de diluciones

Para obtener el estándar 1 necesitamos poner en cada pocillo 5.5 μL de cDNA a 12.5ng/ μL para tener una concentración de 68.75 ng a los cuales se les adiciona 7.5μL de SYBR GREEN + 1μL del oligonucleótido forward+ 1 μL del oligonucleótido reverse. Para el estándar 2 que corresponde a la primera dilución 1:3 se adiciona a un tubo de pcr 13.4 de agua + 6.6 de cDNA a 12.5ng/μl donde el volumen total obtenido será de 20 μL de los cuales se tomara 1 μL como templado para cada pocito en la reacción de qPCR; en la segunda dilución 1:9 que corresponde al estándar 3, se toman 6.6 μL de la primera dilución y se pasan a un nuevo tubo de pcr con 13.4 μl de Agua del volumen total se toma 1 μL como templado en la reacción de pcr para cada pocillo, en el estándar 4 1:27 se agregan 6.6 μL de la segunda dilución, se adicionan 13.4 μL de agua y del volumen total se toma 1 μL para la reacción qPCR en cada pozo, por último para el estándar 5

1:81 se adicionan 6.6  $\mu\text{L}$  de la tercera dilución en 13.4  $\mu\text{L}$  de agua, se toma 1  $\mu\text{L}$  del volumen final y se utiliza como templado en la reacción de qPCR en cada pozo.

La amplificación de diluciones seriales de cDNA permitió la generación de curvas paralelas para evaluar la eficiencia de amplificación del gen, con la finalidad de conocer el rango de concentración de cDNA en el que la fluorescencia incrementa proporcionalmente en función a la abundancia inicial del templado. En la figura 21 se aprecia un ejemplo de las curvas de amplificación separadas entre sí a concentraciones distintas.

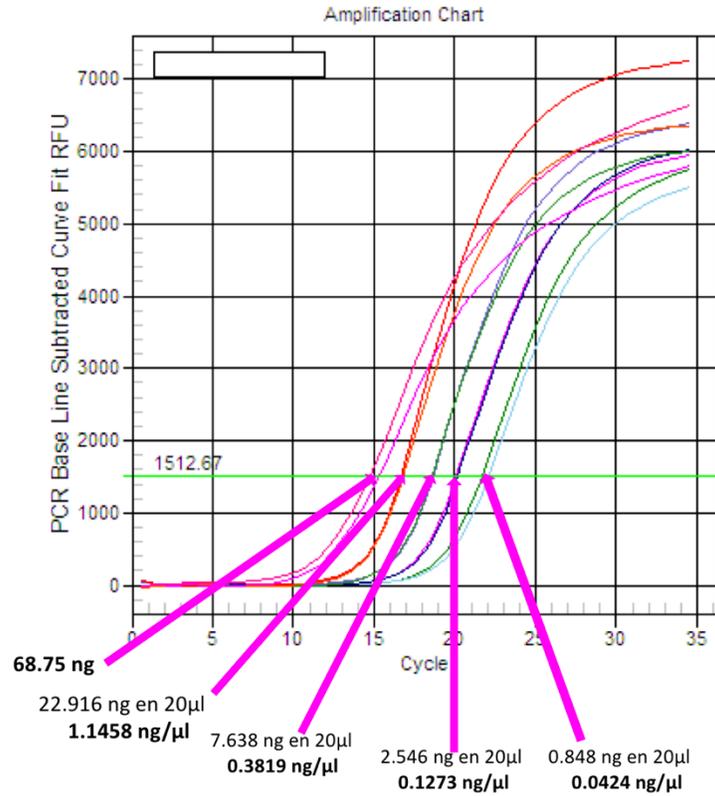


Figura 21. Curvas estándar de amplificación.

Esto permite la validación del método de cuantificación para futuros análisis, toda vez que los valores de eficiencia sean mayores a 90% y que la linealidad sea igual o mayor 0.99 como se presenta en la figura 22.

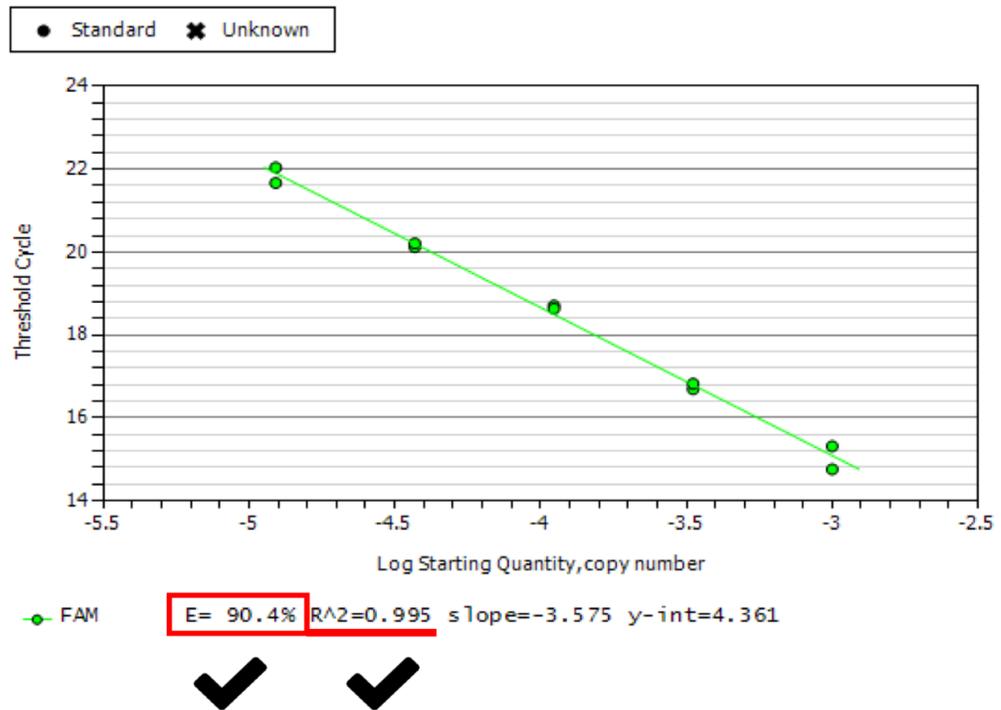


Figura 22. Verificación de la eficiencia y de la linealidad de la curva estándar.

#### 8.6.4.- DETERMINACIÓN DE LA EFICIENCIA 10 <sup>- (1/Pendiente)</sup>

La eficiencia de la PCR en tiempo real es la capacidad de la reacción de duplicar el número de copias de las cadenas de DNA o cDNA en cada ciclo (Bustin y Nolan 2004). La determinación de la eficiencia de las reacciones se obtiene mediante la fórmula  $(10^{-(1/\text{pendiente})})$  (Higuchi et al., 1993b), refiriéndose a la pendiente generada en la curva estándar a partir de los valores de Ct obtenidos después de realizar diluciones seriadas cDNA. La obtención de pendiente es importante en el método de la curva estándar para el cálculo de la expresión relativa y para encontrar la eficiencia relativa, un dato fundamental para el análisis de estabilidad de los genes de referencia en programas como el BestKeeper en hoja de cálculo Excel, el geNORM de qBASE, y en el cálculo de la expresión relativa cuando se utilizan múltiples genes de referencia.

#### 8.7 ANALISIS DE ESTABILIDAD DE LOS GENES DE REFERENCIA

La estabilidad de la expresión génica estándar es un requisito previo elemental para la normalización interna de los datos de expresión génica diana y muchos de los denominados genes de referencia con una expresión estable asumida pueden presentar una regulación hacia arriba o hacia abajo en algunas condiciones experimentales.

**BestKeeper.** Es una aplicación gratuita de hoja de cálculo que sirve para determinar los mejores genes de referencia o ver los niveles de expresión de genes de interés analizando un máximo de 10 genes a través de un índice. Para el procesamiento de datos se tienen en cuenta los puntos de cruce (CP ó CT). Para analizar la estabilidad de la expresión de los genes candidatos a genes de referencia, se realiza una estadística descriptiva con los CP: media geométrica (GM), media aritmética, valor mínimo y máximo, desviación estándar y coeficiente de variación. Estos resultados se corrigen con el valor de la eficiencia de la qPCR. Con los datos de la estadística descriptiva se puede hacer una primera estimación de la estabilidad inspeccionando los valores de desviación estándar (SD) y coeficiente de variación (CV). Según la variación observada, se pueden ordenar del nivel de expresión más estable, que muestra la menor variación, al menos estable, con la variación mayor. Cualquier gen con  $SD > 1$  puede considerarse inadecuado como gen de referencia. De aquellos genes considerados con una expresión estable, se calcula el *Índice BestKeeper* para cada muestra como la media geométrica de los CP de este gen candidato (ecuación *BestKeeper Index*), donde  $z$  es el número total de genes candidatos incluidos.

Posteriormente, para estimar las relaciones entre todas las posibles parejas de genes candidatos, se realizan numerosos análisis de correlación, utilizando el coeficiente de correlación de Pearson, obteniendo un valor  $p$  de significación. Todos esos genes altamente correlacionados se combinan en el Índice BestKeeper. Por último, se calcula la correlación entre cada gen candidato con el índice, para describir la relación que hay entre ambos y la contribución del gen candidato en el índice, mediante el coeficiente de correlación de Pearson y el coeficiente de determinación, con sus respectivos valores  $p$ . Serán adecuados aquellos genes con valores significativos. (Pfaffl et al. 2004; <http://www.gene-quantification.de/BestKeeper.html>).

**GeNorm.** Es un algoritmo popular para determinar los genes más estables de referencia de un conjunto de genes de referencia candidatos probados en un panel de muestra dado. A partir de esto, se puede calcular un factor de normalización de la expresión génica para cada muestra basándose en la media geométrica de un número definido por el usuario de genes de referencia. Este programa se encuentra disponible en el software de qBASE+ de Biogazelle y es muy útil para normalizar un conjunto muy grande de genes en comparación con BestKeeper que sólo acepta hasta 10 genes de referencia (Vandesompele *et al.* 2002).

### **REFFINDER: BESTKEEPER, geNORM y NORMFINDER**

RefFinder es una herramienta completa basada en la web, fácil de usar, desarrollada para evaluar y seleccionar genes de referencia a partir de extensos conjuntos de datos experimentales. Integra los principales programas computacionales disponibles actualmente (geNorm, Normfinder, BestKeeper y el método comparativo Ct) para comparar y clasificar los genes de referencia candidatos probados. Basándose en los rankings de cada programa, asigna un peso apropiado a un gen individual y calcula la media geométrica de sus pesos para el ranking final general.

**NormFinder.** Calcula el valor de estabilidad para cada gen de referencia candidato, utiliza un modelo basado en el análisis de la variancia (ANOVA) para estimar variaciones inter e intra grupales evitando la selección artificial de genes co-regulados y provee una medición directa de la variación de expresión para cada gen. Los genes con la menor variación entre grupos en combinación con el promedio más bajo de variación dentro del grupo, serían los más estables, y por tanto, los más adecuados para ser utilizados como genes de referencia,

El link en funcionamiento (verificado el 28/08/2017) pertenece a COTTON EST DATABASE

East Carolina: <http://150.216.56.64/referencegene.php?type=reference>

## 8.8 METODOS PARA CALCULAR LA EXPRESION RELATIVA DE LOS GENES

### • DELTA CT COMPARATIVOS

Este método se basa en el modelo Delta- Delta Ct desarrollado por PE Applied Biosystems (2006), uno de los más utilizados para obtener cuantificaciones rápidas de muchos genes ya que no tiene en cuenta la eficiencia de la reacción. Los valores obtenidos para cada gen (gen diana) son normalizados con los niveles de Ct obtenidos para un gen calibrador. Para ello se utilizó la fórmula  $2^{-\Delta\Delta Ct}$ , los valores utilizados se muestran en la tabla 7.

1.  $\Delta Ct$  de la muestra = Ct (gen diana de la muestra) – Ct (gen de referencia de la muestra)  
*Cts obtenidos de la amplificación de la muestra experimental*
2.  $\Delta Ct$  del calibrador = Ct (gen diana del calibrador)- Ct (gen de referencia del calibrador)  
*Cts obtenidos de la amplificación de la muestra control o calibrador*
3.  $\Delta\Delta Ct$  =  $\Delta Ct$  de la muestra –  $\Delta Ct$  del calibrador
4.  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  = Incremento de expresión del gen diana sobre el calibrador =  
*Expresión relativa*

Ejemplo:

Tabla 7. Valores de los CT's del gen de referencia y el gen diana.

	Gen Diana: CYP1A	Gen de referencia: B-Actina
Calibrador o control	23.21	19.91
Muestra problema 1	21.02	22.405

Procedimiento:

1.  $\Delta Ct$  de la muestra = 21.02 - 22.405 = **-1.38**
2.  $\Delta Ct$  del calibrador = 23.21 - 19.91 = **3.3**
3.  $\Delta\Delta Ct$  = -1.38 - (3.3) = **- 4.68**
4.  $2^{-(-4.68)} =$  **25.6342361**

**Donde el valor 25.6342361 quiere decir que el gen diana CYP1A se está expresando 25.63 veces más que el control.**

El límite establecido como indicador de sobreexpresión de los genes diana es partir de 1.5 expresiones relativas del gen con respecto al gen de referencia, por lo tanto, esta muestra presenta una sobreexpresión de CYP1A.

- **CURVA ESTÁNDAR PARA CUANTIFICACIÓN RELATIVA**

Los experimentos de curva estándar para cuantificación relativa determinan el cambio de expresión de un gen diana en una muestra en relación con el mismo gen diana de una muestra de referencia. Para conseguir los resultados, se utiliza una curva estándar construida a partir de una dilución seriada de cantidad conocida; este método requiere de genes dianas, estándares, muestras, una muestra de referencia y un control endógeno (Applied Biosystems: **Guide to Performing Relative Quantitation of Gene Expression Using Real-Time Quantitative PCR**. 2004.)

**Paso 1.** Obtener los  $C_T$ 's de todas las muestras en todos los genes diana y de referencia evaluados.

**Paso 2.** Preparar diluciones seriadas para generar los estándares con los que se construyen las curvas de calibración de cada gen, ponerlas en una microplaca por triplicado y correr qPCR. Una vez obtenida la curva estándar se extraen los valores de la pendiente (slope) y del intercepto de y (y-int) para sustituir los valores en la ecuación de la recta para cada gen (sea de referencia o diana) utilizado. El valor de y es el valor del CT de cada muestra de cada gen (Figura 23).

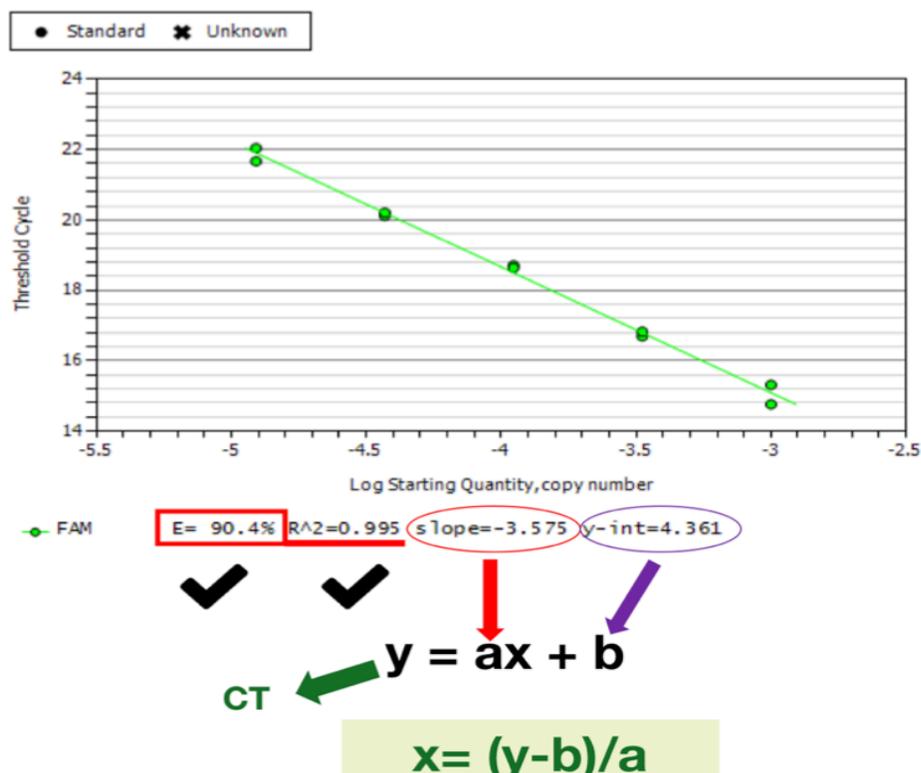


Figura 23. Sustitución de los valores en la ecuación de la recta.

**Paso 3.** Se sustituyen los valores en la ecuación de la recta y se normaliza con respecto al valor del calibrador como se aprecia en la tabla 8.

Tabla 8. Cálculos para el método de la curva estándar.

<b>Paso 1.- Sustitución de los valores del control en la ecuación de la recta y obtención del valor normalizador del Calibrador o control.</b>	
<b>Gen de Referencia B-Actina</b>	<b>Gen Diana CYP1A</b>
Pendiente= -3.178 Intercepto de Y= 7.586 CT=19.91	Slope= -3.534 Intercepto de Y= 10.195 CT=23.21
<b>Sustitución en la ecuación de la recta</b> (19.91-7.586) / -3.178)	<b>Sustitución en la ecuación de la recta</b> (23.21-10.195) /-3.534
Potencia (10, X) = 0.000132461	Potencia (10, X) = 0.000207589
<b>Se divide</b> <b>0.000207589 / 0.000132461</b> <b>Se obtiene el valor de expresión del control para normalizar la muestra</b> <b>= <u>1.567165768</u></b>	
<b>Paso 2.- Sustitución de los valores de la muestra en la ecuación de la recta y normalización con respecto al control</b>	
<b>Gen de referencia B-Actina</b>	<b>Gen Diana CYP1A</b>
Pendiente= -3.178 Intercepto de Y= 7.586 CT= 22.405	Slope= -3.534 Intercepto de Y= 10.195 CT= 21.02
<b>Sustitución en la ecuación de la recta</b> X= (22.405-7.586) / -3.178)	<b>Sustitución en la ecuación de la recta</b> (21.02-10.195) /-3.534
Potencia (10, X) = 2.17513E-05	Potencia (10, X) = 0.000864766
<b>Se divide</b> <b>0.000864766 /2.17513E-05</b> <b>= 39.75693089</b>	
<b>Se divide para normalizarlo con respecto al control</b> <b>39.75693089/ <u>1.567165768</u> = 25.36868256</b> <b>La muestra presenta una expresión relativa 25.58919095 veces con respecto al control.</b>	

- **MÉTODO DE LA MEDIA GEOMÉTRICA DE MÚLTIPLES GENES DE REFERENCIA**

El método propuesto por Vandesompele et al. (2002), demuestra que el uso de más de un gen de referencia y que la normalización utilizando la media geométrica de estos genes genera resultados más confiables que al usar sólo uno, al disminuir la variación intrínseca entre ellos refuerza la estabilidad de los datos que servirán como control o referencia. En la tabla 9 se detalla el procedimiento utilizado para obtener la expresión relativa de cada muestra normalizado con multiples genes de referencia.

Tabla 9. Expresion relativa utilizando múltiples genes de referencia, ejemplo

	CT de los genes			
	Gen diana: CYP1A	Gen de referencia: B-Actina	Gen de referencia: E1FA	Gen de referencia: RpL7
<b>Calibrador o control</b>	22.687	24.23	22.978	19.69
<b>Muestra problema 1</b>	22.785	23.025	25.06	18.72
<b>Paso 1.-</b> Multiplicar el CT del gen por el logaritmo de la eficiencia relativa del mismo gen.				
<b>Control de CYP1A (A)</b> $22.687 * \text{LOG}(1.91) = 6.3758$		<b>Muestra CYP1a (A')</b> $22.785 * \text{LOG}(1.91) = 6.4033$		
<b>Control de B-Actina</b> $24.23 * \text{LOG}(2.06) = 7.605$		<b>Muestra de B-Actina</b> $23.025 * \text{LOG}(2.06) = 7.2267$		
<b>Control de E1Fa</b> $22.978 * \text{LOG}(1.90) = 6.4052$		<b>Muestra de E1Fa</b> $25.06 * \text{LOG}(1.90) = 6.9855$		
<b>Control de RpL7</b> $19.69 * \text{LOG}(2.06) = 6.1800$		<b>Muestra de RpL7</b> $18.72 * \text{LOG}(2.06) = 5.8755$		
<b>Paso 2.-</b> Promediar los resultados de los genes de referencia (controles B y muestras B')				
$B = (7.605 + 6.4052 + 6.1800) / 3$ <b>B = 6.7300</b>		$B' = (7.2267 + 6.9855 + 5.8755) / 3$ <b>B' = 6.6959</b>		
<b>Paso 3.-</b> Aplicar la fórmula				
$2^{((\text{Control de CYP1a de la muestra} - \text{Promedio de los genes de referencia de la muestra}) - (\text{Muestra de CYP1A} - \text{Promedio de los genes de referencia del control}))}$				
$2^{((A' - B') - (A - B))}$				
$2^{((6.4033 - 6.6959) - (6.3758 - 6.7300))} = \mathbf{1.0436}$				
<i>Esto significa que el gen CYP1A se está expresando 1.0436 veces con respecto al control, se expresa de manera similar a los controles por tanto esta muestra no presenta sobreexpresión de CYP1A.</i>				

## 8.9 ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Los análisis estadísticos de las muestras fueron realizados en el software de R Studio, en el siguiente diagrama se describe el procedimiento general para la evaluación de diferencias significativas o no significativas (Figura 24).

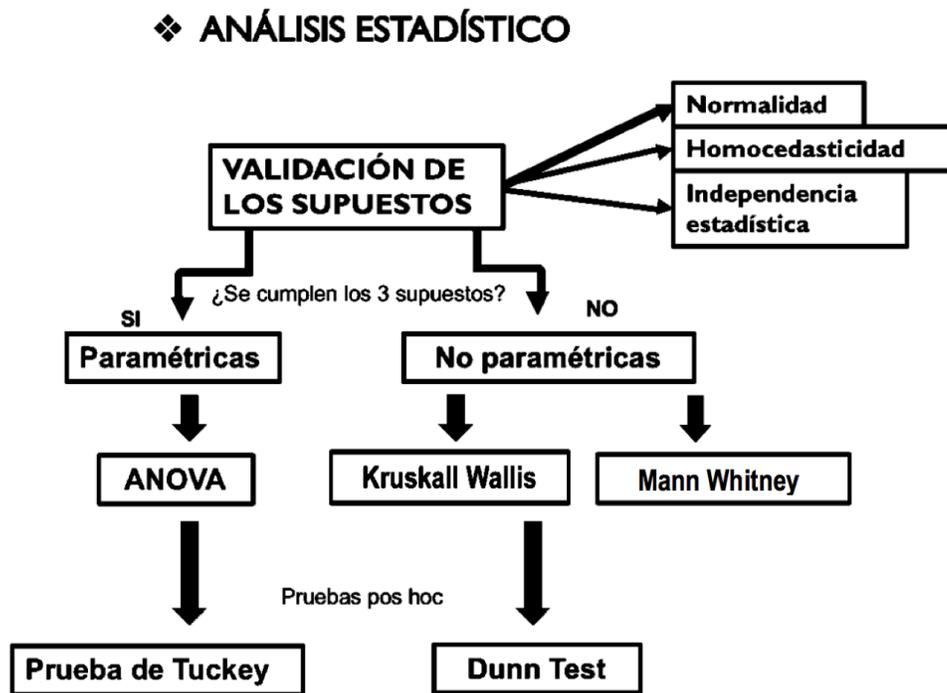


Figura 24. Diagrama de procedimiento para la evaluación estadística en R Studio.

Primero se evaluaron los datos para saber si eran paramétricos o no paramétricos, posteriormente se evaluaron todos de manera no paramétrica para homogenizar los resultados.

Para el análisis en R Studio de la estabilidad de los CT (o CP) de los genes de referencia con respecto al sexo y la morfometría se evaluó:

- Si existen diferencias entre la expresión de los genes de referencia  $\beta$ -Actina, E1F $\alpha$  y RpL7 con respecto al largo total.
- Si la expresión del gen de referencia varía entre machos y hembras.

Para el análisis en R Studio de los resultados de la expresión relativa con respecto a múltiples genes de referencia se evaluaron:

- Si existe diferencia en la expresión relativa de los genes CYP1A y MT entre hembras y machos entre estaciones y entre las temporadas 1 y 2.
- Si existe diferencia en la expresión relativa del gen VTG cuantificado en machos entre las estaciones y entre las temporadas 1 y 2.
- Si existen diferencias en la expresión de CYP1A, MT y VTG con respecto al control.

Notas:

- Temporada 1 corresponde a octubre 2015 en época de lluvias y temporada 2 corresponde a mayo 2016 en época de secas.
- En la temporada 2 no se capturaron muestras de peces macho en la estación E13 que corresponde al cenote Nah Yah, mientras que en la estación 22 el número de muestras de peces hembra es 1 por lo que su resultado, aunque no es representativo puede darnos una idea muy general de la expresión de los genes biomarcadores.

## 8.10 CORRELACION ENTRE GENES BIOMARCADORES Y CONTAMINANTES

De manera exploratoria se realizó correlaciones de Spearman para visualizar el comportamiento de la expresión relativa de los genes en relación con diversos tipos de contaminantes ambientales detectados en el agua y sedimento de los sitios de muestreo. Los datos de plaguicidas organoclorados, PAHs y plaguicidas organofosforados detectados en los sitios de muestreo fueron extraídos de los proyectos “IA200214” y “Biomarcadores de balance redox para la evaluación de la contaminación por plaguicidas en *Gambusia yucatanana*: un estudio de monitoreo de cenotes en Yucatán, México” que se lleva a cabo en la Unidad Química en Sisal bajo la dirección de la Dra. Gabriela Rodríguez Fuentes; mientras que los datos de metales detectados en agua corresponde al proyecto PAPIIT IA101914 a cargo de la Dra. Flor Árcega Cabrera de la Unidad Química en Sisal.

Se evaluaron las correlaciones entre los datos de:

- Expresión relativa de los genes CYP1A, MT y VTG de machos y hembras de la temporada 1 vs contaminantes.
- Expresión relativa de los genes CYP1A, MT y VTG de machos y hembras de la temporada 2 vs contaminantes.

Contaminantes medidos:

- Plaguicidas organoclorados totales en agua y sedimentos.
  - Hexaclorociclohexanos HCHs
  - Clordanos
  - Drines
  - Endosulfanes
  - DDTs
  - Metoxicloro
- Plaguicidas con hidrocarburos aromáticos policíclicos PAHs en agua.
  - 2-3 anillos
  - 4-6 anillos
- Plaguicida organofosforado en agua y sedimentos.
  - Clorpirifos
- Metales en agua.
  - Cadmio
  - Plomo
  - Níquel
  - Cobre

Se realizó el análisis de contaminantes en agua ya que son la fuente receptora que mantiene contacto directo con los organismos, asimismo se evaluaron los datos de contaminantes en los sedimentos, debido a que estos pueden actuar como fuentes secundarias de contaminación (Burton, 2012), ya que los contaminantes asociados a los sedimentos pueden ser resuspendidos de forma natural, por procesos físicos y biológicos (bioturbación), o por la actividad humana, esto genera una removilización y redistribución de los contaminantes a la columna de agua desde los sedimentos (Walker et al., 2006; Hill, 2010).

Por el momento no se cuenta con una legislación con respecto a los límites permisibles de contaminantes en agua de cenotes enfocado a la protección de la vida acuática y/o para el uso y consumo humano, por esto en este trabajo se escogieron como referencia la NOM-001-SERMARNAT-1996 y la Ley Federal de Derechos Disposiciones Aplicables en Materia de Aguas Nacionales CONAGUA 2016.

- NOM-001-SERMARNAT-1996. Establece los límites máximos permisibles de contaminantes debido a las descargas de aguas residuales en cuerpos receptores, llamados así a los depósitos naturales de agua así como los terrenos en donde se infiltran o inyectan dichas aguas cuando puedan contaminar el suelo o los acuíferos. Los límites máximos permisibles en esta norma fueron establecidos mediante evaluaciones de toxicidad aguda en agua con *daphnia Magna Straus (Crustacea-Cladocera)* y *Artemia Franciscana Kellogs (Crustacea-Anostraca)*.
- Ley Federal de Derechos Disposiciones Aplicables en Materia de Aguas Nacionales CONAGUA 2016. Los límites máximos permisibles de contaminantes fueron evaluados con el uso 3 enfocado Protección a la vida acuática: Agua dulce, incluyendo humedales.

En sedimento las concentraciones de contaminantes fueron comparadas con:

**SQuiRTs Cards NOAA 2008.** NOAA ha desarrollado tablas de referencia rápida de detección, o SQuiRTs, para ayudar a evaluar los riesgos potenciales del agua contaminada, los sedimentos o el suelo.

Se utilizó como parámetros guía el valor **LEL** (Lowest Effects Level) que indica las concentraciones en las cuales un impacto puede comenzar a ocurrir, la flora y fauna de la columna del agua están en riesgo potencial vía “biomagnificación” (toxicidad de la cadena alimenticia) si las concentraciones de pesticidas organoclorados en el sedimento están sobre el LEL.

# 9. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

## 9.1 VALIDACIÓN DEL OLIGONUCLEÓTIDO CUANTITATIVO ESPECÍFICO E1FA Y DEL OLIGONUCLEÓTIDO CUANTITATIVO RPL7

### BLAST y BIOEDIT

**E1Fa.** Los resultados presentados en la figura 25 señala que la secuencia amplificada se alinea con el gen del factor de elongación de diversas especies, se cubrió la mayor parte de la secuencia (*Query Cover* = 99%), no existe la posibilidad de que el alineamiento haya sido al azar (*E-Value* = 0), y posee un 97% de similitud (*Ident*) con la de las especies *Xiphophorus maculatus* y *Poecillia latipinna*, *Poecillia formosa*, *Poecillia reticulata*; esto quiere decir que se amplificó el gen deseado y que la secuencia es altamente compatible con *Gambusia yucatanana* que también es de la familia de los Poeciliidae.

Description	Max score	Total score	Query cover	E value	Ident	Accession
<input type="checkbox"/> PREDICTED: Xiphophorus maculatus elongation factor 1-alpha (LOC102233591), mRNA	933	933	99%	0.0	97%	<a href="#">XM_005802839.2</a>
<input type="checkbox"/> PREDICTED: Poecillia latipinna elongation factor 1-alpha (LOC106951930), mRNA	931	931	99%	0.0	97%	<a href="#">XM_015039718.1</a>
<input type="checkbox"/> PREDICTED: Poecillia formosa elongation factor 1-alpha (LOC103143459), mRNA	926	926	99%	0.0	97%	<a href="#">XM_007560017.1</a>
<input type="checkbox"/> PREDICTED: Poecillia reticulata elongation factor 1-alpha-like (LOC103472995), mRNA	896	896	95%	0.0	97%	<a href="#">XM_008422892.1</a>
<input type="checkbox"/> PREDICTED: Poecillia mexicana elongation factor 1-alpha (LOC106923444), mRNA	891	891	99%	0.0	96%	<a href="#">XM_014996470.1</a>
<input type="checkbox"/> PREDICTED: Austrofundulus limnaeus elongation factor 1-alpha-like (LOC106529138), mRNA	761	761	99%	0.0	92%	<a href="#">XM_014024476.1</a>
<input type="checkbox"/> PREDICTED: Stegastes partitus elongation factor 1-alpha-like (LOC103365450), mRNA	760	760	99%	0.0	92%	<a href="#">XM_008292884.1</a>
<input type="checkbox"/> PREDICTED: Nothobranchius furzeri elongation factor 1-alpha (LOC107394932), mRNA	732	732	99%	0.0	91%	<a href="#">XM_015974152.1</a>
<input type="checkbox"/> PREDICTED: Cyprinodon variegatus elongation factor 1-alpha-like (LOC107101090), mRNA	725	725	94%	0.0	92%	<a href="#">XM_015399851.1</a>
<input type="checkbox"/> PREDICTED: Pundamilia nyererei elongation factor 1-alpha (LOC102205261), mRNA	717	717	97%	0.0	91%	<a href="#">XM_005739803.1</a>
<input type="checkbox"/> PREDICTED: Maylandia zebra elongation factor 1-alpha (LOC101482897), mRNA	715	715	97%	0.0	91%	<a href="#">XM_004572716.3</a>
<input type="checkbox"/> PREDICTED: Haplochromis burtoni elongation factor 1-alpha (LOC102296947), mRNA	712	712	97%	0.0	90%	<a href="#">XM_014339601.1</a>
<input type="checkbox"/> Girella punctata EF1alpha mRNA for elongation factor 1 alpha, partial cds	704	704	98%	0.0	90%	<a href="#">AB874605.1</a>
<input type="checkbox"/> Chelon labrosus partial mRNA for elongation factor 1-alpha (ef1a gene)	699	699	99%	0.0	90%	<a href="#">FN295560.1</a>
<input type="checkbox"/> PREDICTED: Oreochromis niloticus elongation factor 1-alpha-like (LOC106096996), mRNA	686	686	95%	0.0	90%	<a href="#">XM_013266369.1</a>
<input type="checkbox"/> Solea senegalensis SseEF1A2 mRNA for elongation factor 1 alpha isoform 2, complete cds	682	682	97%	0.0	89%	<a href="#">AB326303.1</a>
<input type="checkbox"/> Scopthalmus maximus elongation factor 1 alpha (EF1alpha) mRNA, partial cds	680	680	99%	0.0	89%	<a href="#">KU057926.1</a>
<input type="checkbox"/> PREDICTED: Larimichthys crocea elongation factor 1-alpha (LOC104924398), mRNA	680	680	98%	0.0	89%	<a href="#">XM_010737734.1</a>
<input type="checkbox"/> Scopthalmus maximus EF1alpha mRNA, partial cds	680	680	99%	0.0	89%	<a href="#">AF467776.1</a>

Figura 25. Resultados del BLAST de la secuencia que corresponde a E1Fa.

Para evaluar la calidad de las secuencias se generaron los cromatogramas forward y reverse (figuras 26 y 27, respectivamente) con el programa BIOEDIT, en ellos se observan picos definidos y poco ruido de fondo estas características están relacionadas con ausencia o concentración mínima de contaminantes y buena calidad del DNA secuenciado.

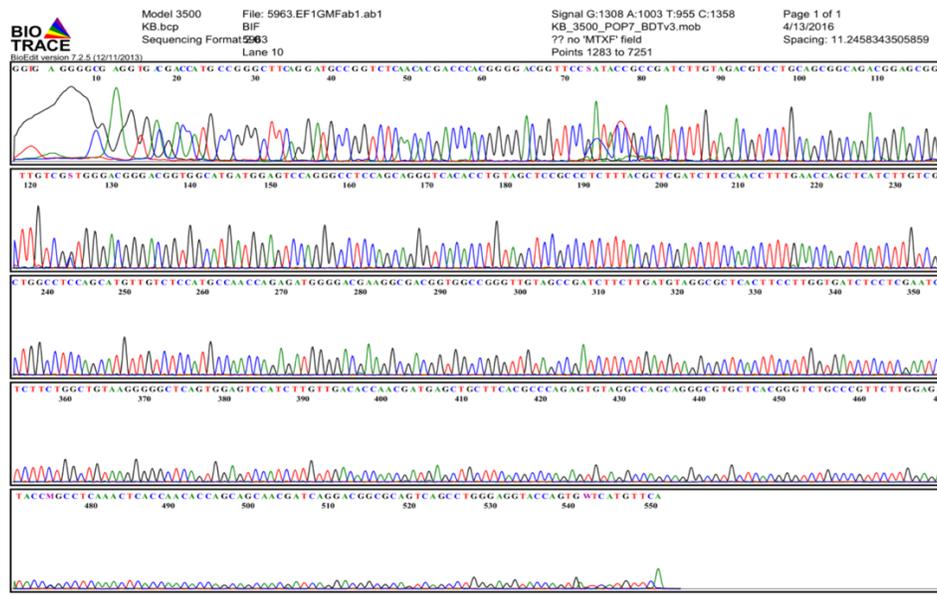


Figura 26. Cromatograma de la secuencia Forward del gen E1Fa

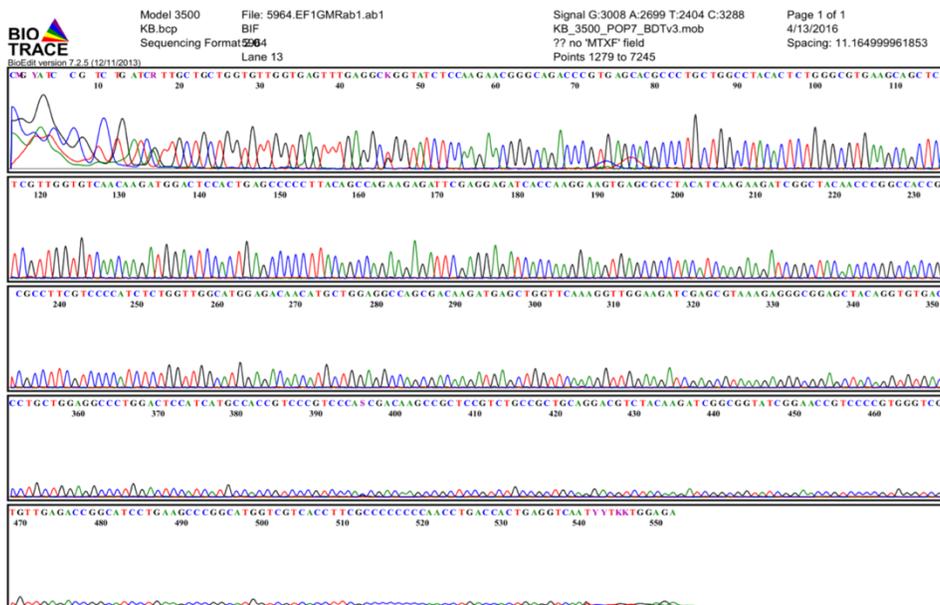


Figura 27. Cromatograma de la secuencia Reverse del gen E1Fa

En la figura 28 muestra los oligonucleótidos F y R contienen regiones altamente conservadas (La secuencia 5963 le corresponde a forward y la 5964 a la reverse) y que de cualquier secuencia es posible generar los oligonucleótidos cuantitativos específicos de E1Fa para *Gambusia yucatanana*.



Figura 28. Alineamiento de las secuencias F y R en BIOEDIT

A partir de estas secuencias se diseñaron los oligonucleótidos para qPCR de E1Fa que fueron probados nuevamente con el cDNA de *Gambusia yucatanana* y enviados a secuenciar para después validar la amplificación del producto deseado, finalmente se realizó el BLAST (figura 29) que señala que se cubrió la totalidad de la secuencia (*Query Cover* = 100%), el E-Value es igual a 1 pero esto es normal debido a que en alineaciones cortas suelen tener valores relativamente más altos debido a que el cálculo de valor de E tiene en cuenta la longitud de la secuencia de consulta por que mientras más corta más probabilidad tiene de coincidir con la secuencia de la base de datos (Calaza y Iglesias, 2016); asimismo el porcentaje de similitud (*Ident*) es del 100% para el E1Fa en diversas especies del género *Poecilia*, esto quiere decir que la secuencia generada es específica para *Gambusia yucatanana* y garantiza la amplificación del producto deseado.

Sequences producing significant alignments:  
 Select: All None Selected:0  
 Alignments Download GenBank Graphics Distance tree of results

Description	Max score	Total score	Query cover	E value	Ident	Accession
<input type="checkbox"/> <i>Astronotus ocellatus</i> elongation factor 1 alpha (ef1 alpha) mRNA, partial cds	38.2	38.2	100%	1.0	100%	KI337399.1
<input type="checkbox"/> <i>Seriola rivoliana</i> elongation factor 1 alpha (EF1alpha) mRNA, partial cds	38.2	38.2	100%	1.0	100%	KY806112.1
<input type="checkbox"/> PREDICTED: <i>Odocoileus virginianus texanus</i> elongation factor 1-alpha, oocyte form-like (LOC110127731), mRNA	38.2	38.2	100%	1.0	100%	XM_020878090.1
<input type="checkbox"/> <i>Channa maculata</i> elongation factor 1-alpha mRNA, partial cds	38.2	38.2	100%	1.0	100%	KY427701.1
<input type="checkbox"/> PREDICTED: <i>Monopterus albus</i> elongation factor 1-alpha (LOC109953430), transcript variant X2, mRNA	38.2	38.2	100%	1.0	100%	XM_020588923.1
<input type="checkbox"/> PREDICTED: <i>Monopterus albus</i> elongation factor 1-alpha (LOC109953430), transcript variant X1, mRNA	38.2	38.2	100%	1.0	100%	XM_020588922.1
<input type="checkbox"/> PREDICTED: <i>Felis catus</i> elongation factor 1-alpha, oocyte form-like (LOC101083959), mRNA	38.2	38.2	100%	1.0	100%	XM_003992621.2
<input type="checkbox"/> PREDICTED: <i>Panthera pardus</i> elongation factor 1-alpha, oocyte form-like (LOC109267052), mRNA	38.2	38.2	100%	1.0	100%	XM_019448556.1
<input type="checkbox"/> PREDICTED: <i>Oreochromis niloticus</i> elongation factor 1-alpha (LOC106096996), mRNA	38.2	38.2	100%	1.0	100%	XM_019350634.1
<input type="checkbox"/> PREDICTED: <i>Oreochromis niloticus</i> elongation factor 1-alpha-like (LOC109196356), mRNA	38.2	38.2	100%	1.0	100%	XM_019350343.1
<input type="checkbox"/> PREDICTED: <i>Kryptolebias marmoratus</i> elongation factor 1-alpha (LOC108247920), mRNA	38.2	38.2	100%	1.0	100%	XM_017436339.1
<input type="checkbox"/> PREDICTED: <i>Poecilia formosa</i> elongation factor 1-alpha (LOC103143459), mRNA	38.2	38.2	100%	1.0	100%	XM_007580017.2
<input type="checkbox"/> <i>Scophthalmus maximus</i> elongation factor 1 alpha (EF1alpha) gene, partial cds	38.2	38.2	100%	1.0	100%	KJ057927.1
<input type="checkbox"/> <i>Scophthalmus maximus</i> elongation factor 1 alpha (EF1alpha) mRNA, partial cds	38.2	38.2	100%	1.0	100%	KJ057926.1
<input type="checkbox"/> PREDICTED: <i>Poecilia latipinna</i> elongation factor 1-alpha (LOC106951930), mRNA	38.2	38.2	100%	1.0	100%	XM_015039718.1
<input type="checkbox"/> PREDICTED: <i>Poecilia mexicana</i> elongation factor 1-alpha (LOC106923444), mRNA	38.2	38.2	100%	1.0	100%	XM_014996470.1
<input type="checkbox"/> PREDICTED: <i>Equus asinus</i> elongation factor 1-alpha, oocyte form-like (LOC106827486), mRNA	38.2	38.2	100%	1.0	100%	XM_014835352.1
<input type="checkbox"/> PREDICTED: <i>Ceratotherium simum simum</i> elongation factor 1-alpha, oocyte form-like (LOC101400390), mRNA	38.2	38.2	100%	1.0	100%	XM_014784480.1
<input type="checkbox"/> <i>Acipenser gueldenstaedtii</i> elongation factor 1 alpha protein mRNA, partial cds	38.2	38.2	100%	1.0	100%	KR906074.1
<input type="checkbox"/> PREDICTED: <i>Xiphophorus maculatus</i> elongation factor 1-alpha (LOC102233591), mRNA	38.2	38.2	100%	1.0	100%	XM_005802839.2
<input type="checkbox"/> PREDICTED: <i>Maylandia zebra</i> elongation factor 1-alpha (LOC101482897), mRNA	38.2	38.2	100%	1.0	100%	XM_004572716.3
<input type="checkbox"/> PREDICTED: <i>Maylandia zebra</i> elongation factor 1-alpha (LOC101482309), mRNA	38.2	38.2	100%	1.0	100%	XM_004572715.3
<input type="checkbox"/> PREDICTED: <i>Haplochromis burtoni</i> elongation factor 1-alpha (LOC102296947), mRNA	38.2	38.2	100%	1.0	100%	XM_014339601.1

Figura 29. Resultados del BLAST de la secuencia que corresponde a E1Fa.

**RpL7.** Para validar el uso de los oligonucleótidos cuantitativos específicos para *Poecilia formosa* en *Gambusia yucatana*, se procedió a amplificar el cDNA de *Gambusia yucatana* para secuenciar el producto de PCR, una vez obtenida la secuencia realizó el alineamiento BLAST y los resultados mostraron que la secuencia tuvo un cubrimiento del 88%, un E-Value de  $8e-17$  y una similitud de 98% con otras especies del género *Poecilia*, de acuerdo a esta información es válido utilizar estos oligonucleótidos para cuantificar la expresión de RPL7 en *Gambusia yucatana* (Figura 30).

Sequences producing significant alignments:  
 Select: All None Selected:0  
 Alignments Download GenBank Graphics Distance tree of results

Description	Max score	Total score	Query cover	E value	Ident	Accession
<input type="checkbox"/> PREDICTED: <i>Poecilia formosa</i> ribosomal protein L7 (rpL7), mRNA	95.3	95.3	88%	$8e-17$	98%	XM_007554606.2
<input type="checkbox"/> PREDICTED: <i>Poecilia mexicana</i> ribosomal protein L7 (rpL7), mRNA	95.3	95.3	88%	$8e-17$	98%	XM_015010269.1
<input type="checkbox"/> PREDICTED: <i>Poecilia latipinna</i> ribosomal protein L7 (rpL7), mRNA	95.3	95.3	88%	$8e-17$	98%	XM_015045969.1
<input type="checkbox"/> <i>Poecilia reticulata</i> ribosomal protein L7 (rpL7), mRNA	95.3	95.3	88%	$8e-17$	98%	NM_001297468.1
<input type="checkbox"/> PREDICTED: <i>Xiphophorus maculatus</i> ribosomal protein L7 (rpL7), mRNA	95.3	95.3	88%	$8e-17$	98%	XM_005797870.1
<input type="checkbox"/> <i>Poecilia reticulata</i> ribosomal protein L7 mRNA, complete cds	95.3	95.3	88%	$8e-17$	98%	EF408834.1
<input type="checkbox"/> PREDICTED: <i>Oreochromis niloticus</i> ribosomal protein L7 (rpL7), mRNA	89.8	89.8	88%	$4e-15$	96%	XM_003443469.3
<input type="checkbox"/> <i>Epinephelus coioides</i> ribosomal protein L7 mRNA, partial cds	89.8	89.8	88%	$4e-15$	96%	EU714141.1
<input type="checkbox"/> PREDICTED: <i>Fundulus heteroclitus</i> ribosomal protein L7 (rpL7), transcript variant X2, mRNA	87.9	87.9	83%	$1e-14$	98%	XM_012857376.1
<input type="checkbox"/> PREDICTED: <i>Fundulus heteroclitus</i> ribosomal protein L7 (rpL7), transcript variant X1, mRNA	87.9	87.9	83%	$1e-14$	98%	XM_012857375.1
<input type="checkbox"/> PREDICTED: <i>Paralichthys olivaceus</i> ribosomal protein L7 (rpL7), mRNA	84.2	84.2	88%	$2e-13$	94%	XM_020087800.1
<input type="checkbox"/> PREDICTED: <i>Larimichthys crocea</i> ribosomal protein L7 (rpL7), mRNA	84.2	84.2	88%	$2e-13$	94%	XM_010733846.2
<input type="checkbox"/> PREDICTED: <i>Lates calcarifer</i> ribosomal protein L7 (rpL7), mRNA	84.2	84.2	88%	$2e-13$	94%	XM_018673989.1
<input type="checkbox"/> TPA: <i>Orzias latipes</i> strain Hd-rR, complete genome assembly, chromosome 20	84.2	84.2	88%	$2e-13$	94%	HF933226.1
<input type="checkbox"/> PREDICTED: <i>Neolamprolochs brichardi</i> 60S ribosomal protein L7-like (LOC102776785), mRNA	84.2	84.2	88%	$2e-13$	94%	XM_006794610.1
<input type="checkbox"/> PREDICTED: <i>Haplochromis burtoni</i> ribosomal protein L7 (rpL7), mRNA	84.2	84.2	88%	$2e-13$	94%	XM_005912152.1
<input type="checkbox"/> PREDICTED: <i>Pundamilia nyererei</i> ribosomal protein L7 (rpL7), mRNA	84.2	84.2	88%	$2e-13$	94%	XM_005722564.1

Figura 30. Resultados del BLAST de la secuencia que corresponde a RpL7.

## 9.2 ANÁLISIS DE LA CURVA DE FUSIÓN PARA DETERMINAR LA ESPECIFICIDAD DE LOS AMPLICONES.

Las temperaturas medias de disociación fueron, 83 °C para  $\beta$ -Actina, 84 y 84.50 °C para E1Fa, 80.50 para RpL7, 80.50 y 81 °C para CYP1A, 83.50 °C para MT y 82.50 °C y 83 °C para VTG. En todos los casos (con excepción de E1Fa) se observó una sola curva de disociación por amplicón, lo que indica que sólo se amplificó un producto de PCR (Figura 31). En la curva de disociación E1Fa se observa la presencia de dímeros, sin embargo, la eficiencia de reacción de E1Fa es >90% y la linealidad obtenida de las diluciones es >.99 (Figura 33) esto lo hace un oligonucleótido cuantitativo útil y confiable para el presente trabajo.

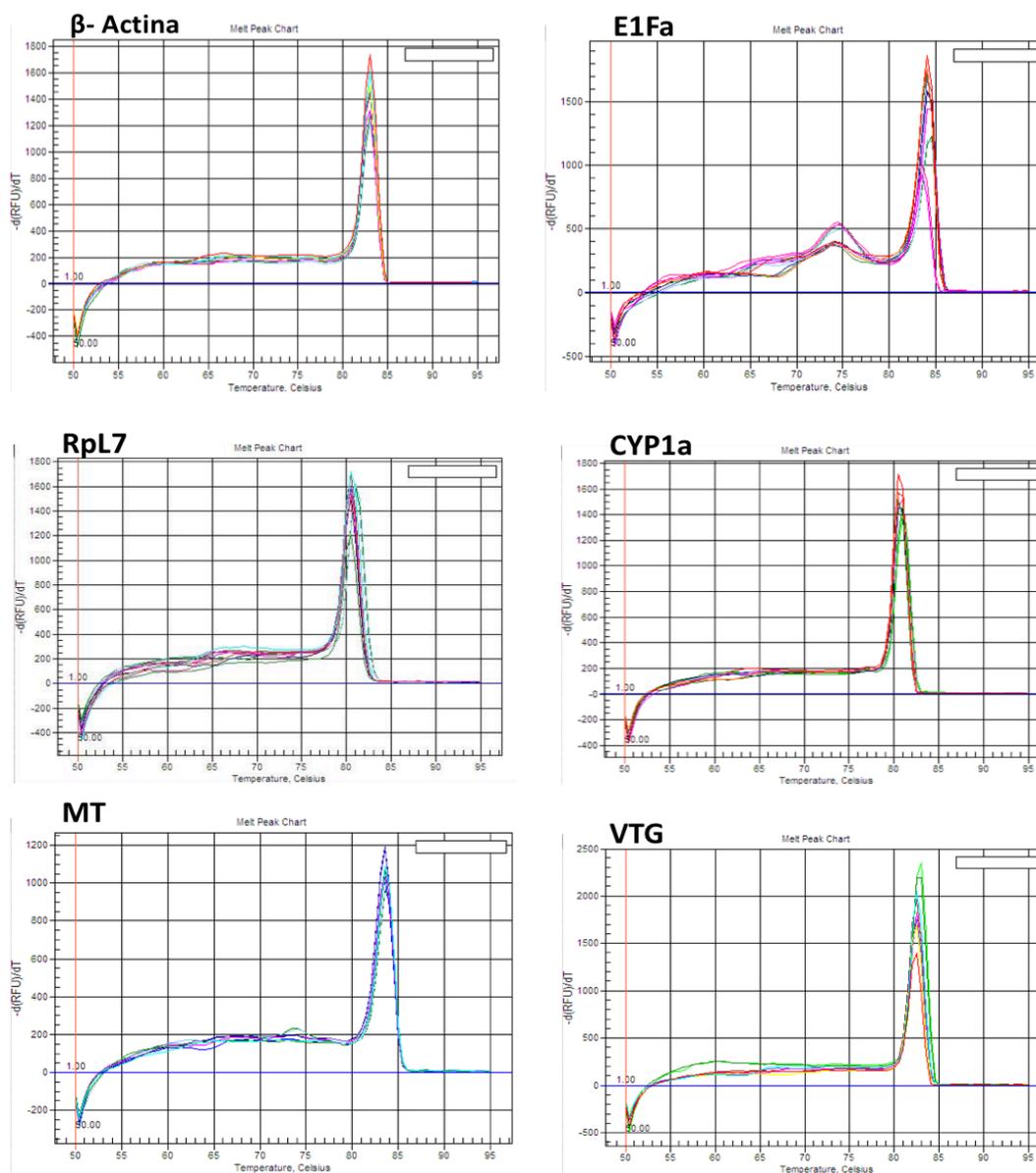


Figura 31. Curva de disociación de los oligonucleótidos.

### 9.3 PARÁMETROS DE LA RECTA ESTÁNDAR DE LAS CURVAS DE CALIBRACIÓN

Las diluciones ensayadas de cDNA (1:3, 1:9, 1:27, 1:81) mostraron una adecuada separación, reflejándose en su linealidad con valores  $>0.99$  y una eficiencia de 106.4%, 90.4, 106.8%, 91.8%, 123.2 y 100.6% para  $\beta$ -Actina, E1Fa, RpL7, CYP1A, MT y VTG respectivamente. En las siguientes figuras se muestran las curvas de amplificación y la curva estándar para cada par de oligonucleótido utilizado (Figuras 32 - 37).

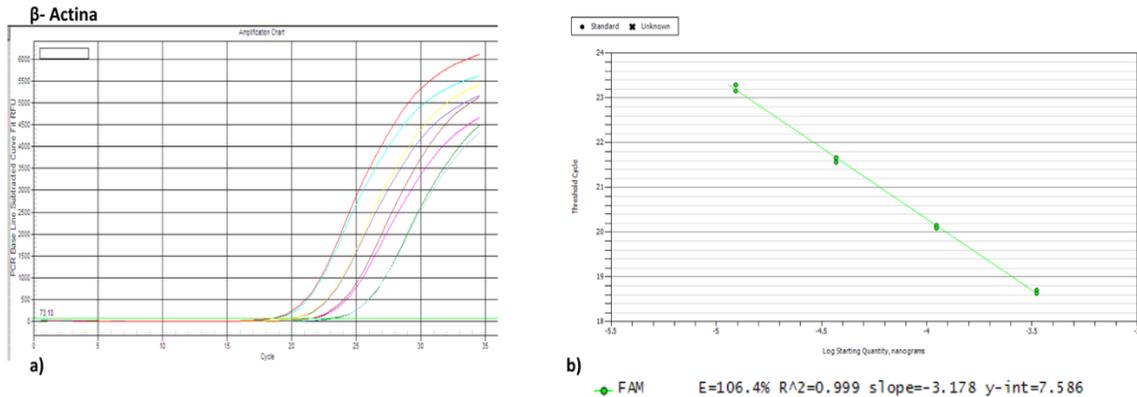


Figura 32. a) Curva de amplificación b) curva estándar de  $\beta$ - Actina. Concentraciones a 1.1458 ng/ $\mu$ l, .3819ng/ $\mu$ l, .1273 ng/ $\mu$ l y 0.0424 ng/ $\mu$ l

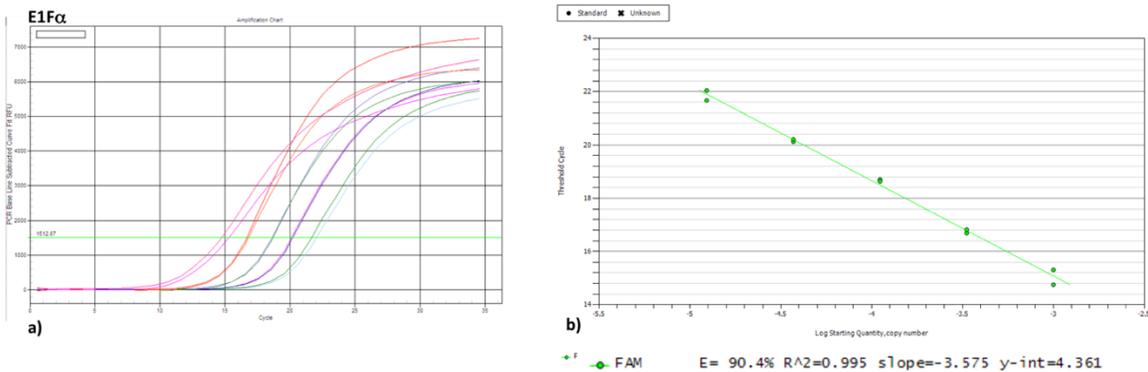


Figura 33. a) Curva de amplificación b) curva estándar de E1Fa. Concentraciones a 68.75 ng, 1.1458 ng/ $\mu$ l, .3819ng/ $\mu$ l, .1273 ng/ $\mu$ l y 0.0424 ng/ $\mu$ l

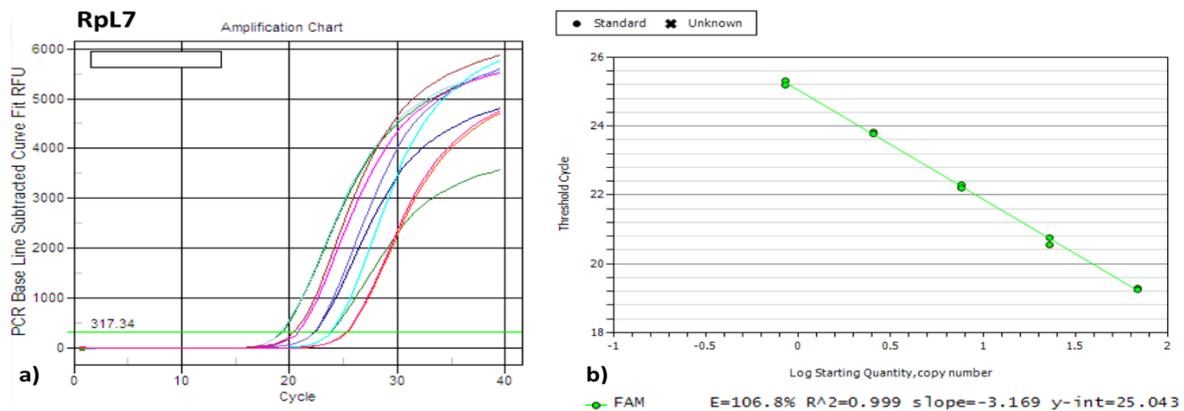


Figura 34. a) Curva de amplificación b) curva estándar de RpL7. Concentraciones a 68.75 ng, 1.1458 ng/ $\mu$ l, .3819ng/ $\mu$ l, .1273 ng/ $\mu$ l y 0.0424 ng/ $\mu$ l

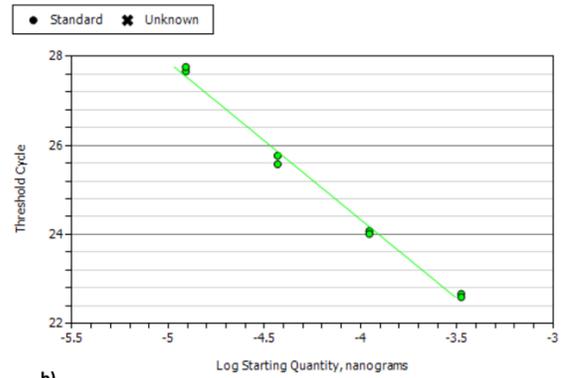
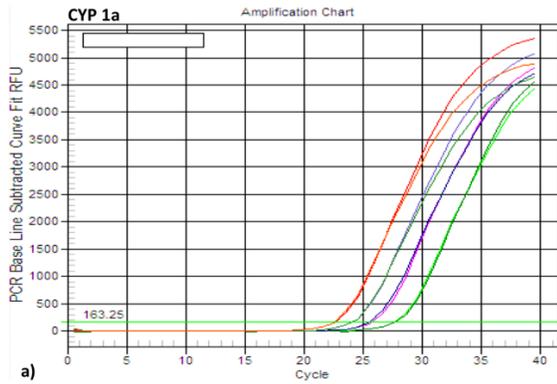


Figura 35. a) Curva de amplificación b) curva estándar de CYP  
Concentraciones a 1.1458 ng/μl, .3819ng/μl, .1273 ng/μl y 0.0424 ng/μl

E= 91.8% R<sup>2</sup>=0.992 slope=-3.534 y-int=10.195

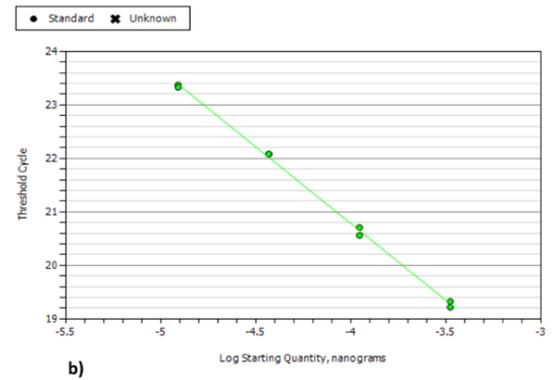
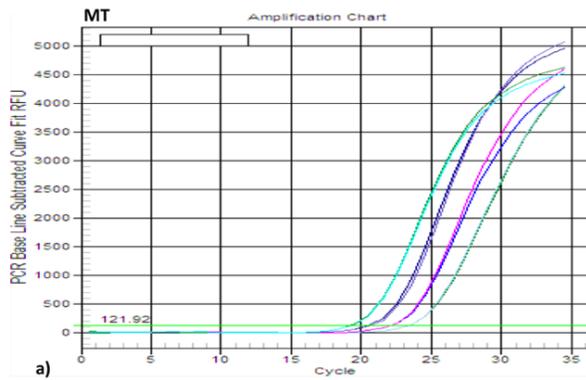


Figura 36. a) Curva de amplificación b) curva estándar de MT  
Concentraciones a 1.1458 ng/μl, .3819ng/μl, .1273 ng/μl y 0.0424 ng/μl

E=123.2% R<sup>2</sup>=0.998 slope=-2.868 y-int=9.313

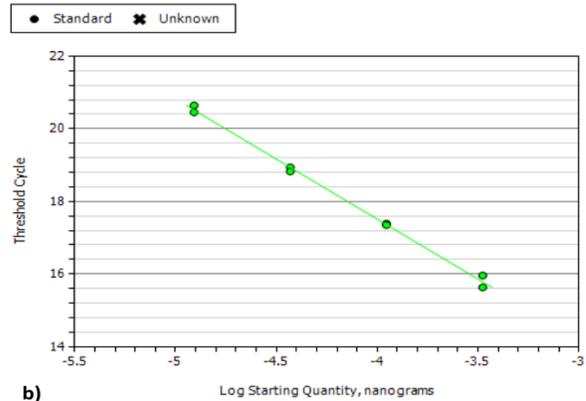
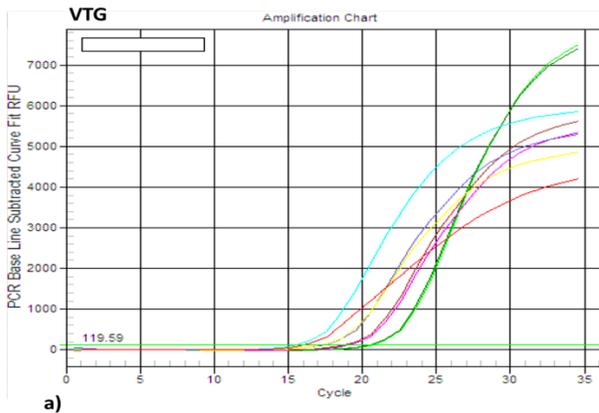


Figura 37. a) Curva de amplificación b) curva estándar de VTG  
Concentraciones a 1.1458 ng/μl, .3819ng/μl, .1273 ng/μl y 0.0424 ng/μl

E=100.6% R<sup>2</sup>=0.997 slope=-3.307 y-int=4.287

#### 9.4 DETERMINACIÓN DE LA EFICIENCIA RELATIVA $10^{- (1/Pendiente)}$

La tabla 10 muestra los valores de las pendientes obtenidas para cada uno de los genes medidos a concentraciones decrecientes 68.75ng, 1.1458ng/μl, 0.3819ng/μl, 0.1273ng/μl, 0.0424ng/μl.

Tabla 10. Eficiencia relativa de las reacciones de qPCR para cada uno de los genes analizados.

Gen	Pendiente “Slope”	$10^{- (1/Pendiente)}$
<b>β-Actina</b>	-3.178	2.06
<b>E1Fα</b>	-3.575	1.90
<b>RpL7</b>	-3.169	2.06
<b>CYP1A</b>	-3.534	1.91
<b>MT</b>	-2.868	2.23
<b>VTG</b>	-3.307	2.00

## 9.5 ANÁLISIS DE ESTABILIDAD DE LOS GENES DE REFERENCIA

Para poder comparar muestras, éstas deben estar normalizadas con genes de referencia internos que tengan una expresión constante bajo las condiciones del estudio, es decir, aquellos que sean más estables. Hay varios métodos disponibles para la normalización precisa de la expresión génica mediante RT-qPCR (Vandesompele et al., 2002; Andersen et al., 2004), pero aún no hay un consenso generalizado dentro de la comunidad científica sobre qué método se debe utilizar. Por esa razón, es mejor utilizar una comparación de diferentes procedimientos de cálculo de selección de genes de referencia, así se puede llevar a cabo una mejor identificación de los controles más fiables y se reduce el riesgo de la selección artificial de los transcriptomas co-regulados (Ayers et al., 2007). Numerosos trabajos científicos coinciden en utilizar conjuntamente las aplicaciones *BESTKEEPER*, *GENORM* y *NORMFINDER*, y comparar sus resultados para la selección de los genes de referencia (Pérez-Rico 2015; De Spiegelaere et al., 2015)

- **BESTKEEPER**

Los resultados de los genes de referencia B-Actina, E1Fa y RpL7 en peces calibradores hembra y macho evaluados se describen a continuación en las tablas 11 y 12. La primera estimación de la variabilidad de la expresión de los genes de referencia se basa en la inspección de las variaciones calculadas de los valores de SD (desviación estándar) y CV (coeficiente de variación), una variación menor representa una mayor estabilidad del gen de referencia mientras que una  $SD > 1$  puede considerarse inconsistente, sin embargo, el índice BestKeeper se calcula con la media geométrica los valores de CT o CP de sus candidatos (Pfaffl et al., 2004).

En esta primera estimación se observa que  $\beta$ -Actina es el gen más estable en hembras con una desviación estándar (SD) de 0.25 seguido del gen RpL7 con  $SD = 0.26$  y E1Fa  $SD = 1.51$ , mientras que el E1Fa es el gen más estable en machos con una SD de 0.18 seguido de B-Actina con  $SD = 0.44$  y RpL7 con  $SD = 0.63$ . En cuanto al Coeficiente de variación (CV) se reportan los valores más altos en E1Fa en hembras  $CV = 6.20$  y en RpL7 en machos  $CV = 3.21$ . El mayor valor reportado en el parámetro de la desviación estándar del coeficiente absoluto de regulación ( $SD [\pm x\text{-fold}]$ ) se encuentra E1Fa en hembras con 2.98, mientras que en resto de los genes tanto hembras como machos los valores son similares entre sí.

Tabla 11. Resultado del análisis de BestKeeper en hembras.

HEMBRAS	Genes de referencia			BestKeeper
	$\beta$ - Actina	E1Fa	RpL7	$\beta$ - Actina, E1Fa y RpL7
GM [CP]	19.91	24.29	18.06	<b>20.59</b>
SD [ $\pm$ CP]	<b>0.25</b>	<b>1.51</b>	<b>0.26</b>	<b>0.61</b>
CV [% CP]	1.25	6.20	1.46	2.97
SD [ $\pm$ x-fold]	1.20	2.98	1.21	

Tabla 12. Resultado del análisis de BestKeeper en machos.

MACHOS	Genes de referencia			BestKeeper
	$\beta$ - Actina	E1Fa	RpL7	$\beta$ - Actina, E1Fa y RpL7
GM [CP]	24.23	22.98	19.69	22.21
SD [ $\pm$ CP]	<b>0.44</b>	<b>0.18</b>	<b>0.63</b>	<b>0.17</b>
CV [% CP]	1.82	0.79	3.21	0.78
SD [ $\pm$ x-fold]	1.38	1.14	1.58	

Para estimar las relaciones entre genes BestKeeper realiza análisis de correlación entre pares donde se calcula el coeficiente de correlación de Pearson y el valor de probabilidad p véase tabla 13. Todos los genes de referencia altamente correlacionados se combinan en un índice, luego se calcula la relación entre cada gen de referencia y el índice mediante la evaluación del coeficiente de correlación de Pearson ( $r$ ) y el coeficiente de determinación ( $r^2$ ) en las tablas 14 y 15.

Tabla 13. Coeficiente de correlación de Pearson ( $r$ ) entre genes de referencia.

**Correlación de Pearson  $r$**

Genes	Hembras	Machos
$\beta$ -actina – E1Fa <i>p valor</i>	<b>0.989</b> 0.001	<b>-0.796</b> 0.107
$\beta$ -actina – RpL7 <i>p valor</i>	<b>0.979</b> 0.001	<b>-0.966</b> 0.008
E1Fa – Rpl7 <i>p valor</i>	<b>0.987</b> 0.001	<b>0.926</b> 0.024

Tabla 14. Coeficiente de correlación de Pearson (r) entre genes de referencia y el índice BestKeeper.

<b>Correlación de Pearson r</b>		
<b>Genes</b>	<b>Hembras</b>	<b>Machos</b>
<b>BestKeeper – <math>\beta</math>-actina</b> <i>p valor</i>	<b>0.991</b> 0.001	<b>-0.827</b> 0.006
<b>BestKeeper – E1Fa</b> <i>p valor</i>	<b>0.999</b> 0.001	<b>0.991</b> 0.001
<b>BestKeeper – Rpl7</b> <i>p valor</i>	<b>0.992</b> 0.001	<b>0.943</b> 0.001

Tabla 15. Análisis de regresión entre los genes de referencia frente a BestKeeper.

<b>Coefficiente de determinación r<sup>2</sup></b>		
<b>Genes</b>	<b>Hembras</b>	<b>Machos</b>
<b>BestKeeper – <math>\beta</math>-actina</b> <i>p valor</i>	<b>0.99</b> 0.001	<b>0.68</b> 0.006
<b>BestKeeper – E1Fa</b> <i>p valor</i>	<b>1.00</b> 0.001	<b>0.98</b> 0.001
<b>BestKeeper – Rpl7</b> <i>p valor</i>	<b>0.99</b> 0.001	<b>0.89</b> 0.001

En este caso, la herramienta de software fue probada con a partir de cDNA de muestras de extraídas del contenido abdominal de peces hembra y macho de *Gambusia yucatanana* depurados en laboratorio por un mes, comparando los genes  $\beta$ -actina, E1Fa y Rpl7 se observó una alta variación de CP en la expresión de E1Fa en las hembras sin embargo los 3 genes candidatos se correlacionaron muy bien entre sí y es una razón para mantener E1Fa dentro del índice. Las expresiones  $\beta$ -actina y Rpl7 en hembras mostraron variaciones de CP alrededor 0.255 (0.25 CP <SD <0.26 CP), mientras que E1Fa mostró una alta variación de CP (SD = 1.5 CP) así como una regulación up / down  $\pm$  6.20 veces; por lo tanto, el índice ponderado a partir de 3 candidatos mostró un SD=0.61. El análisis mostró una correlación fuerte (0.987 <r <1) para todos los candidatos. Las expresiones E1Fa,  $\beta$ -Actina y Rpl7 en machos mostraron variaciones de CP alrededor de 0.18 CP <SD <0.63 CP, en este caso el gen Rpl7 mostró una regulación up / down  $\pm$  3.21 veces; por lo tanto, el índice ponderado a partir de 3 candidatos mostró un SD=0.17. El análisis mostró una correlación fuerte (-0.796 > r >-0.966; 0.979 < r <0.989 machos y hembras, respectivamente) entre todos los candidatos.  $\beta$ -Actina en machos presenta una correlacion de pearson negativa con respecto a E1Fa y Rpl7.

- **geNORM**

La estabilidad de la expresión ó índice de estabilidad (M) de cada gen de referencia candidato en organismos calibradores hembras y machos se muestra en las tablas 16 y 17. De acuerdo con este programa los valores de M arriba de 1.5 indican que los genes son altamente variables en las condiciones probadas, por lo tanto, no podrían utilizarse como genes de referencia de manera individual mientras que un valor de M menor a 1.5 indica una expresión muy estable de ese gen bajo las condiciones del ensayo. En el resultado arrojado por la herramienta bioinformática geNORM integrado al software qBase+, los tres genes candidatos presentaron valores de M menores o iguales a 1.5 ;  $\beta$ -actina fué el mejor candidato tanto en hembras como en machos con valores de M=0.781 y 1.133 respectivamente, seguido del gen RpL7 con M=0.783 en hembras y en machos con el gen E1Fa M= 1.515, por último el valor de M más alto en hembras fue para el gen E1Fa con 1.493 mientras que en machos el gen RpL7 obtuvo un valor de M=1.560.

Tabla 16. Resultado de la estabilidad de expresión de los genes de referencia en hembras.

	Genes de referencia en Hembras			geNORM
	$\beta$ -actina	E1F $\alpha$	RpL7	PROMEDIO
<b>M</b>	0.781	1.493	0.783	<b>1.019</b>
<b>CV [% CP]</b>	0.341	0.628	0.361	<b>0.443</b>

Tabla 17. Resultado de la estabilidad de expresión de los genes de referencia en machos

	Genes de referencia en Machos			geNORM
	$\beta$ -actina	E1F $\alpha$	RpL7	PROMEDIO
<b>M</b>	1.133	1.515	1.560	<b>1.403</b>
<b>CV [% CP]</b>	0.246	0.651	0.505	<b>0.468</b>

En la tabla 18 se muestra el análisis de correlación generado por el programa geNorm de qBase+ arrojó una alta correlación entre genes de referencia en muestras de peces calibradores hembra, sin embargo, el resultado fue distinto para las muestras de calibradores en peces macho donde sólo los genes E1Fa y RpL7 mostraron una fuerte correlación inversa entre sí.

Tabla 18. Correlación de Pearson generado por GeNorm de qBase+.

Correlación de Pearson $r$		
Genes	Hembras	Machos
$\beta$ -actina – E1Fa <i>p valor</i>	<b>0.989</b> 1.144E-2	3.571E-2 0.927
$\beta$ -actina – RpL7 <i>p valor</i>	<b>-0.956</b> 4.401E-2	-0.181 0.641
E1Fa – RpL7 <i>p valor</i>	<b>-0.912</b> 0.088	<b>-0.989</b> 4.090E-7

- **REFFINDER: BESTKEEPER, geNORM y NORMFINDER**

Con la herramienta RefFinder se obtuvo el ranking recomendado de los genes de referencia más estables para BestKeeper, geNorm, Normfinder, tabla 19. Donde los valores cercanos a cero indican mayor estabilidad y el límite máximo establecido es 1.5.

Tabla 19. Ranking de los genes de referencia más estables obtenido mediante la herramienta RefFinder de Cotton EST Database North Carolina.

HEMBRAS	BestKeeper		geNorm		NormFinder	
Rango	Gen	SD[ $\pm$ CP]	Gen	M	Gen	V
1	$\beta$ -actina	0.25	$\beta$ -actina	0.066	$\beta$ -actina	0.033
2	RpL7	0.26	RpL7	0.066	RpL7	0.1
3	E1Fa	1.51	E1Fa	1.123	E1Fa	1.652
MACHOS	BestKeeper		geNorm		NormFinder	
Rango	Gen	SD[ $\pm$ CP]	Gen	M	Gen	V
1	E1Fa	0.18	E1Fa	0.67	E1Fa	0.335
2	$\beta$ -actina	0.442	RpL7	0.67	RpL7	1.001
3	RpL7	0.633	$\beta$ -actina	0.998	$\beta$ -actina	1.112

SD[ $\pm$ CP]: Valor de la estabilidad en BestKeeper. M: Valor de estabilidad en geNorm.  
V: Valor de estabilidad en NormFinder.

Las figuras 38 y 39 muestran los resultados del análisis de estabilidad para cada gen candidato evaluados en refFinder, la línea roja cuyo valor es 1.5 es un límite establecido por el programa GeNorm que señala aquellos genes cuya variación es suficientemente estable para ser utilizados como genes de referencia de manera individual, los genes que tengan una variación mayor a 1.5 no pueden utilizarse como genes únicos de referencia, pero sí dentro de un grupo de multiples genes control.

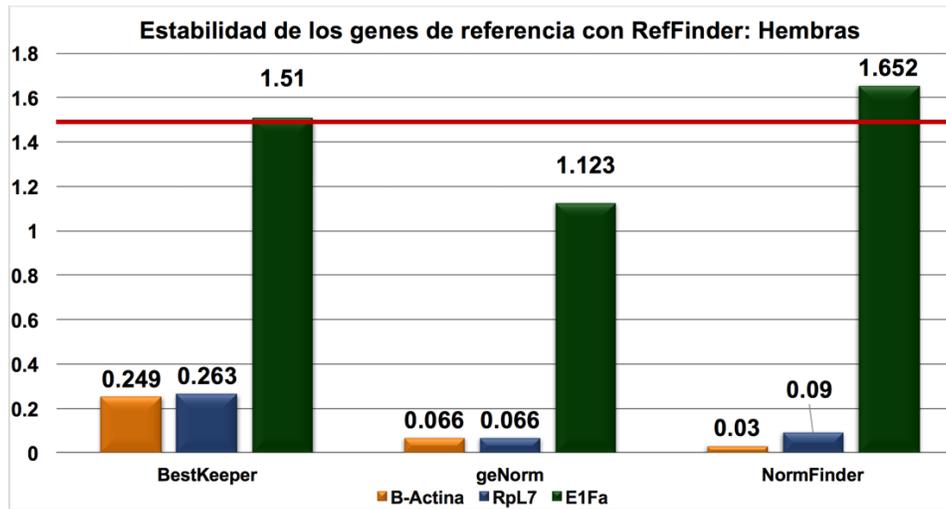


Figura 38. Gráfica de estabilidad de los genes de referencia candidatos en peces calibradores hembras en refFinder.

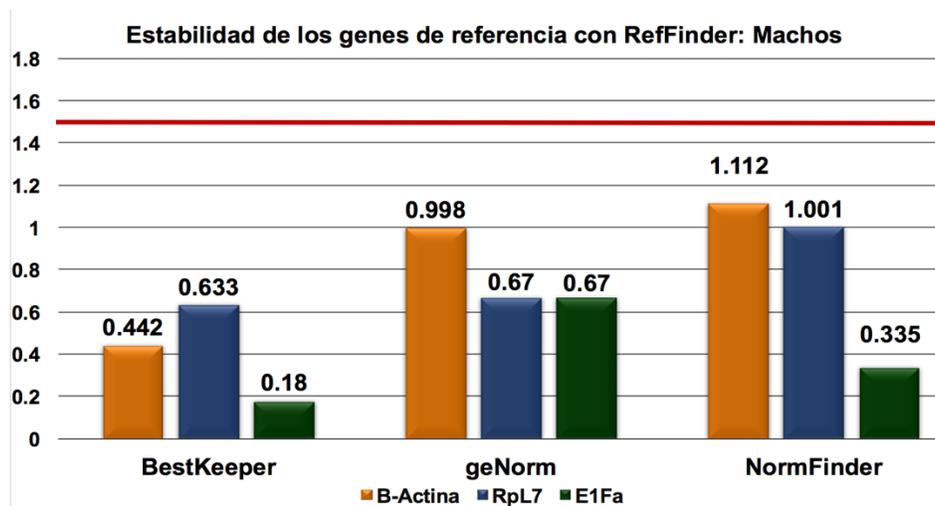


Figura 39. Gráfica de estabilidad de los genes de referencia candidatos en peces calibradores machos en refFinder.

Se encontró que el gen de E1Fa no resulta ideal como gen normalizador único de referencia en este estudio ya que la variación de la estabilidad en peces hembra, de acuerdo con la evaluación de los programas BestKeeper, GeNorm y RefFinder, es más alta que en machos, esto puede deberse a que su expresión se ve afectada por la presencia de estrógenos endógenos (Filby Amy & Tyler Charles, 2007) y probablemente a una mayor tasa de síntesis de proteínas.

- **9.5.1 VARIACIÓN DE LA EXPRESIÓN DEL CT DE LOS GENES DE REFERENCIA CON RESPECTO AL LARGO TOTAL Y EL SEXO.**

Para evaluar la variación entre el largo total de *Gambusia yucatanana* y el CT de los genes de referencia los datos se separaron por sexo y se generaron grupos por tamaño en base al largo total: grupo 1 (1.5 a 1.9 cm), grupo 2 (2 a 2.9 cm), grupo 3 (3 a 3.9 cm) y grupo 4 (4 a 7 cm). Se aplicó Kruskal Wallis para evaluar la variación entre las medianas de los grupos del mismo sexo tomando un  $\alpha \geq 0.05$ ; posteriormente la prueba Dunn's Test fue utilizada para encontrar que grupos presentaban diferencias significativas entre sí. Por último se utilizó la prueba de Mann-Whitney para evaluar la diferencia entre medianas de machos y hembras de un mismo grupo de tamaño para encontrar si la expresión en CT de los genes de referencia varía con respecto al sexo.

### **$\beta$ -Actina**

La prueba Kruskal Wallis arrojó un p-valor de 0.0335 en machos y 0.0005 en hembras. En machos la prueba Dunn's Test (Tabla 20) señala que no existe diferencias significativas entre los grupos 1, 2 y 3, pero que estos tres grupos sí presentan una diferencia significativa con respecto al grupo 4 (Figura 40), esto quiere decir que del CT en  $\beta$ -Actina en machos es estable hasta alcanzar largo total del grupo 4 (4 a 7cm). En hembras los grupos 2, 3 y 4 presentan diferencias significativas entre sí,  $\beta$ -Actina varía dependiendo del largo total. Se encontró que en peces de mayor tamaño  $\beta$ -Actina amplifica más tardíamente en la qPCR, esto concuerda con lo reportado por Moshier, et al. (1993) y Deindl, et al. (2002) que señalan que la expresión de  $\beta$ -Actina suele disminuir conforme el individuo envejece debido a que la actina es dependiente del ciclo celular, las células mitóticas expresan actina de manera diferente que las células post-mitóticas o senescentes; la edad de *Gambusia yucatanana* suele estimarse en relación con su largo total, pero se recomienda reforzar esta estimación de edad con otros métodos como por ejemplo el número de otolitos. Los resultados de la prueba Mann-Whitney señalan que la expresión en CT de  $\beta$ -Actina no presentó diferencias significativas entre hembras y machos de largos totales similares (Tabla 21).

### **E1Fa**

La prueba Kruskal Wallis arrojó p-value = 0.0281 en machos y 0.5396 en hembras. En machos la prueba Dunn's Test (Tabla 20) señala que los grupos 1, 2 y 3 no presentan diferencias significativas entre sí, pero que estos tres grupos presentan diferencias significativas con el grupo 4 (Figura 41). En hembras no se encontraron variaciones significativas entre grupos (Figura 41).

Los resultados de la prueba Mann-Whitney muestran que no hay variación en la expresión de E1Fa en hembras y machos de los grupos 2 y 4, contrario a los peces del grupo 3 que si presentó variación en la expresión de E1Fa con respecto al sexo (Tabla 21), estas variaciones pueden deberse a que la tasa de síntesis de proteínas varía dependiendo de diversos factores como son edad, condición reproductiva, sexo, alimentación, etc..

### RpL7

La prueba Kruskal Wallis arrojó p-value = 0.3878 en machos y 0.0111 en hembras. En machos la prueba de Dunn's Test (Tabla 20) señala que no hay variación entre los grupos 1, 2 y 3, pero que estos tres presentan diferencias significativas con respecto al grupo 4. En hembras el grupo 2 presentó diferencias significativas con respecto a los grupos 3 y 4, estos dos últimos grupos no presentaron diferencias entre sí (Figura 42). Los resultados de la prueba Mann-Whitney (Tabla 21) señalan que la expresión en CT de RpL7 varía con respecto al sexo sólo cuando los peces son del grupo 2, los grupos 3 y 4 presentaron variación.

Tabla 20. p-valor obtenido de la prueba Dunn Test para evaluar variación del CT de  $\beta$ -Actina en machos y hembras con respecto al largo total.

<b><math>\beta</math>-Actina</b>			
<b>Machos</b>	<b>P-Valor</b>		
<b>Largo Total</b>	<b>Grupo 1</b>	<b>Grupo 3</b>	<b>Grupo 2</b>
<b>Grupo 3</b>	0.4543		
<b>Grupo 2</b>	0.1618	0.0516	
<b>Grupo 4</b>	0.0315*	0.0152*	0.0036*
<b>Hembras</b>			
<b>Grupo 2</b>		0.0266*	
<b>Grupo 4</b>		0.0113*	0.0001*

<b>E1Fa</b>			
<b>Machos</b>	<b>Grupo 1</b>	<b>Grupo 3</b>	<b>Grupo 2</b>
<b>Grupo 3</b>	0.0295*		
<b>Grupo 2</b>	0.2659	0.0116*	
<b>Grupo 4</b>	0.2876	0.0382*	0.1564
<b>Hembras</b>			
<b>Grupo 2</b>		0.1395	
<b>Grupo 4</b>		0.2850	0.4204

<b>RpL7</b>			
<b>Machos</b>	<b>Grupo 1</b>	<b>Grupo 3</b>	<b>Grupo 2</b>
<b>Grupo 3</b>	0.0655		
<b>Grupo 2</b>	0.0562	0.4263	
<b>Grupo 4</b>	0.0020*	0.0103*	0.0126*
<b>Hembras</b>			
<b>Grupo 2</b>		0.0439*	
<b>Grupo 4</b>		0.0548	0.0021*

\* Diferencia significativa entre 2 grupos



Variación entre el CT de E1Fa y el Largo Total de *Gambusia yucatanana*

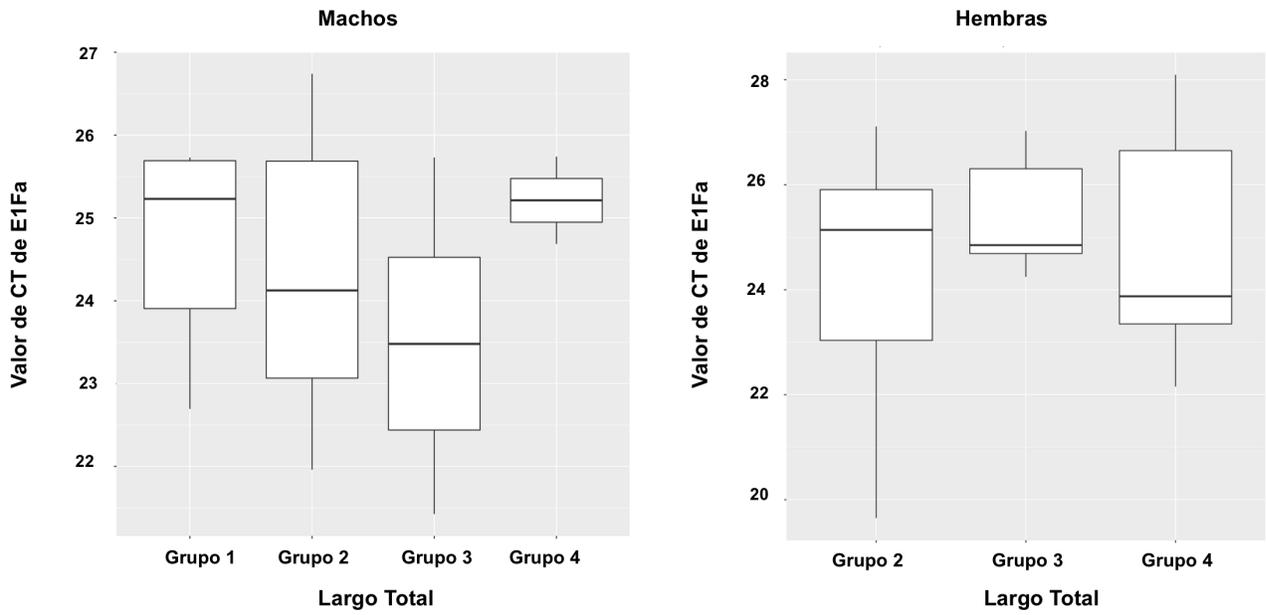


Figura 41. Expresión de E1Fa en cada grupo de tamaño de machos y hembras.

Variación entre el CT de RpL7 y el Largo Total de *Gambusia yucatanana*

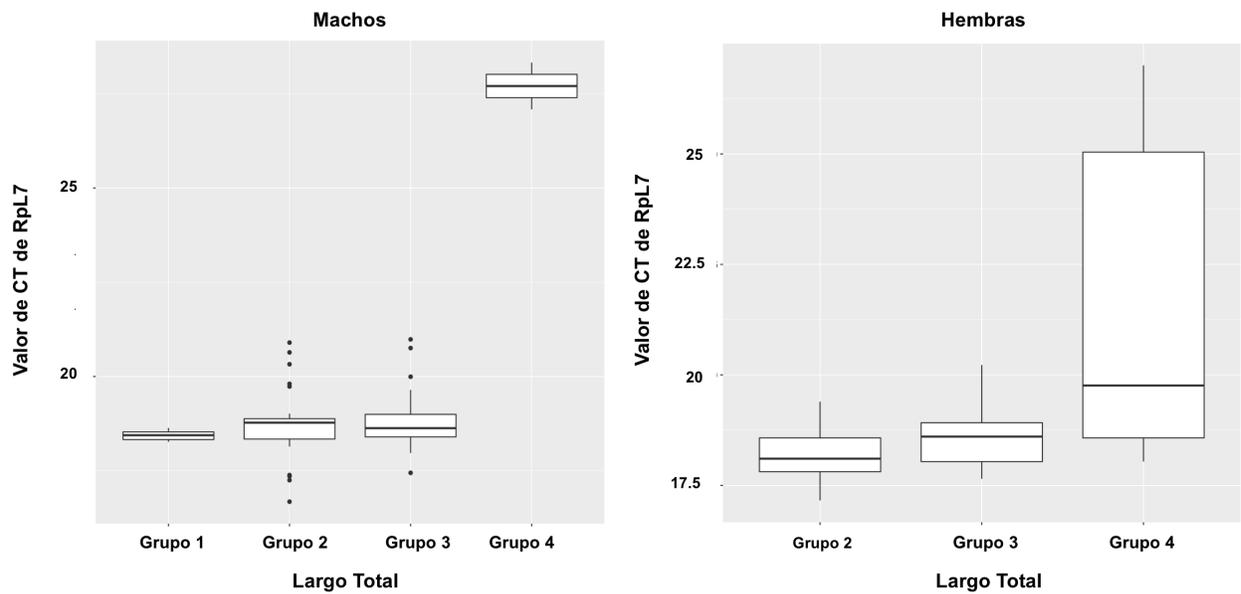


Figura 42. Expresión de RpL7 en cada grupo de tamaño de machos y hembras.

## 9.6 EXPRESIÓN RELATIVA CON RESPECTO A UN SOLO GEN DE REFERENCIA

La evaluación de la expresión relativa de los genes diana con respecto a un gen de referencia se llevó a cabo con dos métodos:

- **Método de los CT comparativo ó  $\Delta\Delta$  CT**
- **Método de la curva estándar.**

Se evaluó la expresión relativa de los genes CYP1A, MT y VTG con respecto a los genes de referencia  $\beta$ -Actina, E1Fa y RpL7 en cada sitio de muestreo en época de lluvias 2015 “Temporada 1” y en época de secas 2016 “Temporada 2” tanto en peces hembras como peces machos. Una vez obtenido el valor de la expresión relativa de cada muestra con respecto al gen de referencia seleccionado, se evaluó su distribución estadística donde se encontró que el conjunto de datos no se ajusta a criterios paramétricos, por tanto, los resultados se presentan en gráficas de cajas y bigotes. Las figuras 43 y 44 son ejemplos de la expresión relativa obtenida tanto con el método de los CT comparativos como el de la curva estándar, en ambos ejemplos se observan patrones de expresión muy similares entre ambos métodos (Figuras 43 y 44; y tablas 40,41 y 42 del ANEXO 9 para ver los valores numéricos obtenidos por cada organismo) aunque pueden encontrarse pequeñas variaciones en el número de expresión en unidades relativas en cada sitio de muestreo. Las barras de color verde representan a los datos obtenidos en la época de lluvias, las barras naranjas representan a los datos de la época de secas y los puntos rojos son los valores atípicos. El valor de control tiene el valor de una unidad de expresión relativa es calculado en ambos métodos. Si las muestras tienen una expresión de una unidad significa que se está expresando igual que el control, si la muestra tiene una expresión de 5 unidades de expresión relativa significa que se está expresando 5 veces más con respecto al control.

La expresión relativa de cada gen diana con respecto a los genes de referencia  $\beta$ -Actina, E1Fa y RpL7 fue distinta (véase la figura 45 como ejemplo) la diferencia en la expresión del gen diana entre cada gen de referencia resulta un problema cuando se necesita escoger sólo uno de ellos ya que el uso de un único solo gen de referencia es susceptible a tener errores en la interpretación de los resultados de la qPCR (Lee et al. 2002), Huggett et al. (2005) y Robinson et al.(2007) sugieren utilizar más de un gen de referencia, sobre todo cuando no se puede encontrar un único gen de referencia con características óptimas para realizar cuantificación relativa, así mismo el uso de múltiples genes de referencia aumenta sustancialmente la robustez de la normalización y genera resultados más confiables al disminuir la variabilidad en los resultados (Volland et al. 2017).

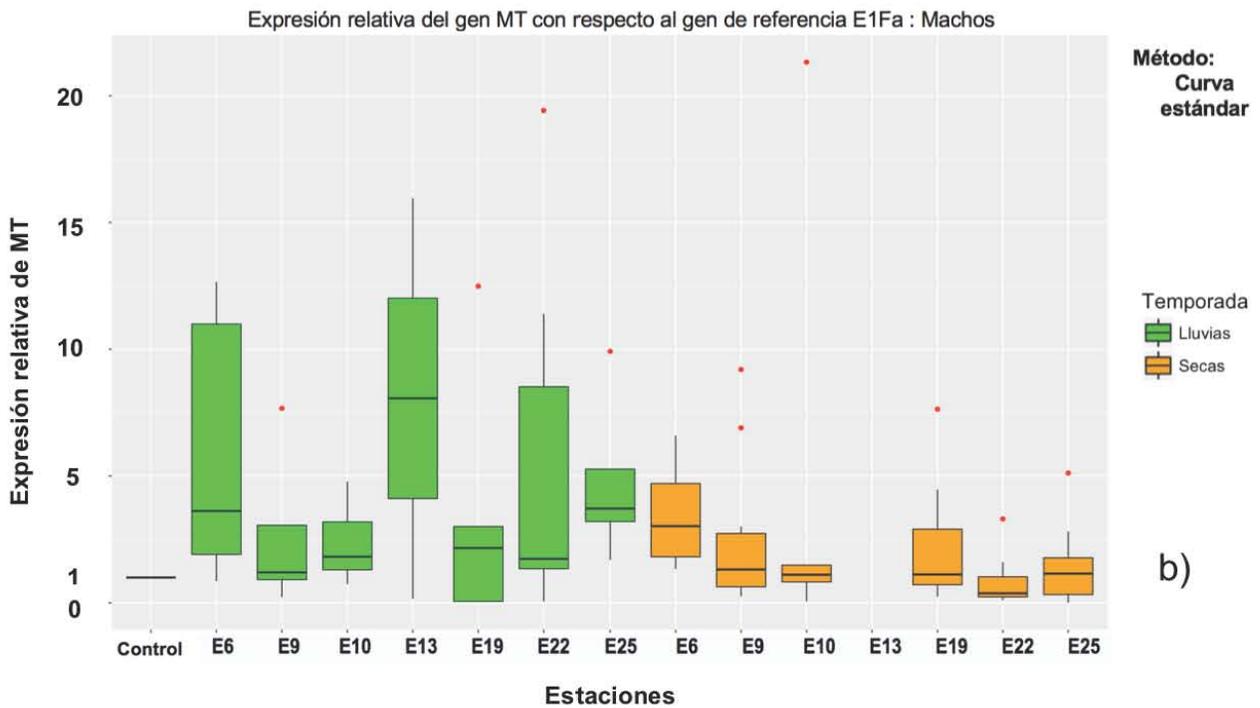
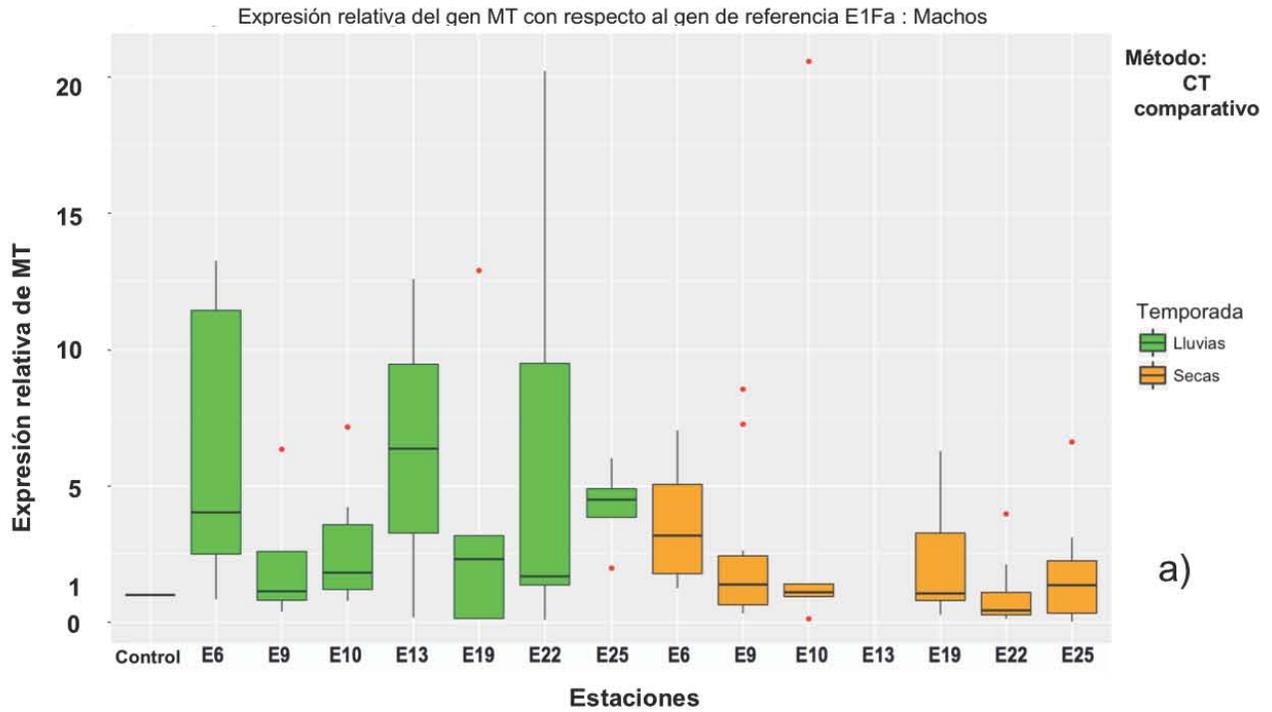


Figura 43. Evaluación de la expresión relativa de MT usando E1Fa en machos como gen de referencia. a) Método de los CT comparativos  $\Delta\Delta$  CT y b) el Método de la curva estándar. E6:Rancho Santa Julia; E9:San Antonio Mulix "X'Batún"; E10:Yaxcopoil; E13: Nah-yah; E19:Yaxbacaltún; E22: Chen Vázquez; E25:Rancho X'labón Subim.

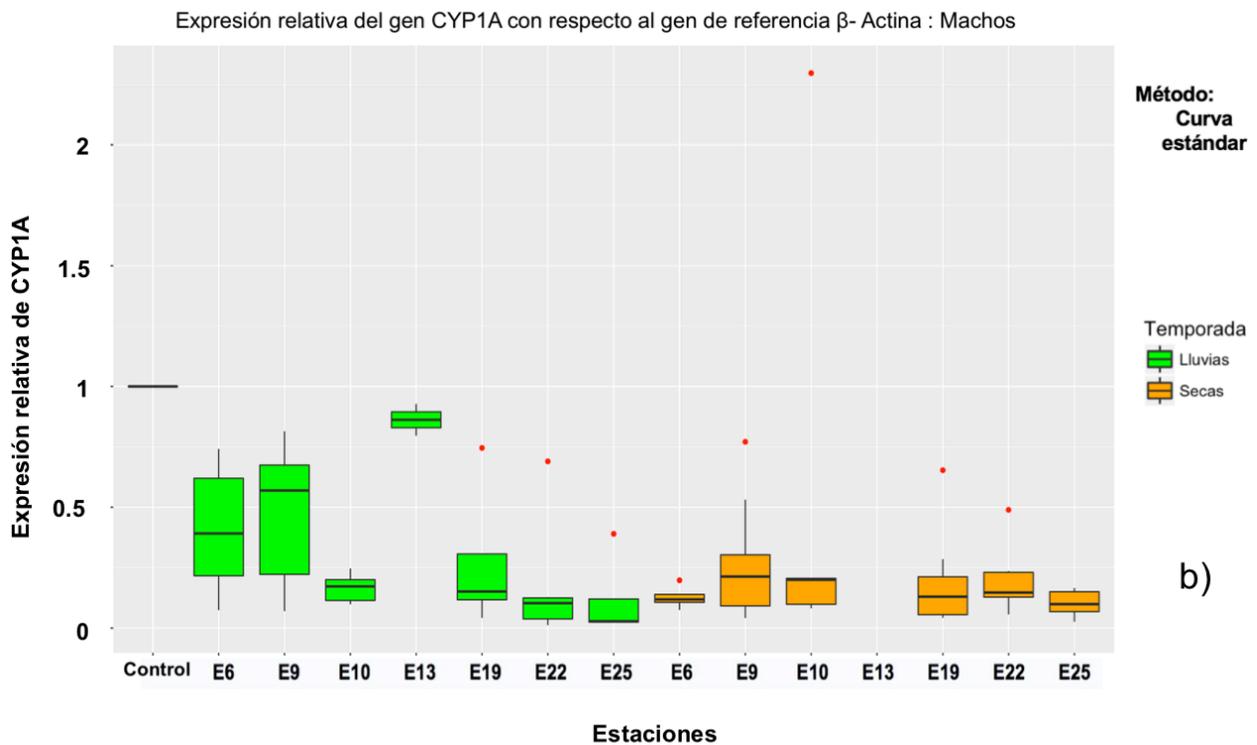
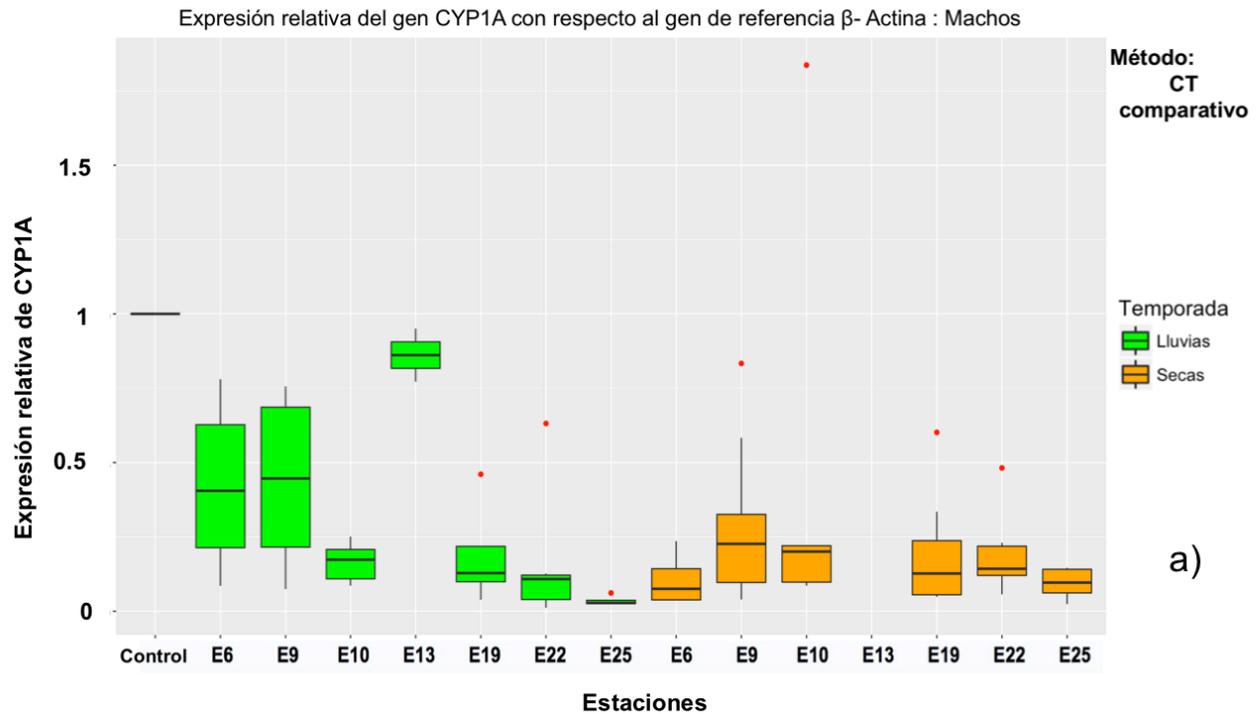


Figura 44. Evaluación de la expresión del gen CYP1A en machos utilizando  $\beta$ - Actina como gen de referencia a) Método de los CT comparativos  $\Delta\Delta$  CT y b) el Método de la curva estándar. E6:Rancho Santa Julia; E9:San Antonio Mulix "X'Batún"; E10:Yaxcopoil; E13: Nah-yah; E19:Yaxbacaltún; E22: Chen Vázquez; E25:Rancho X'labón Subim.

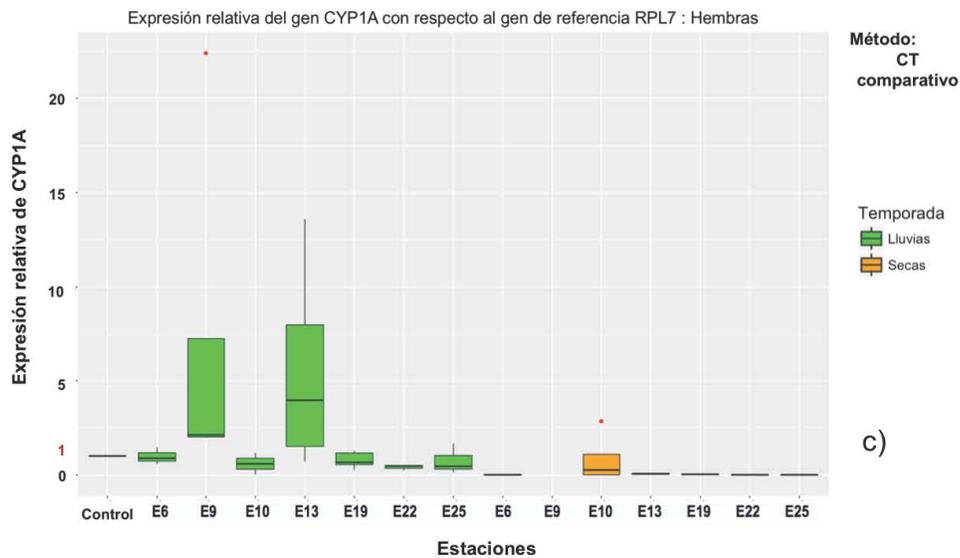
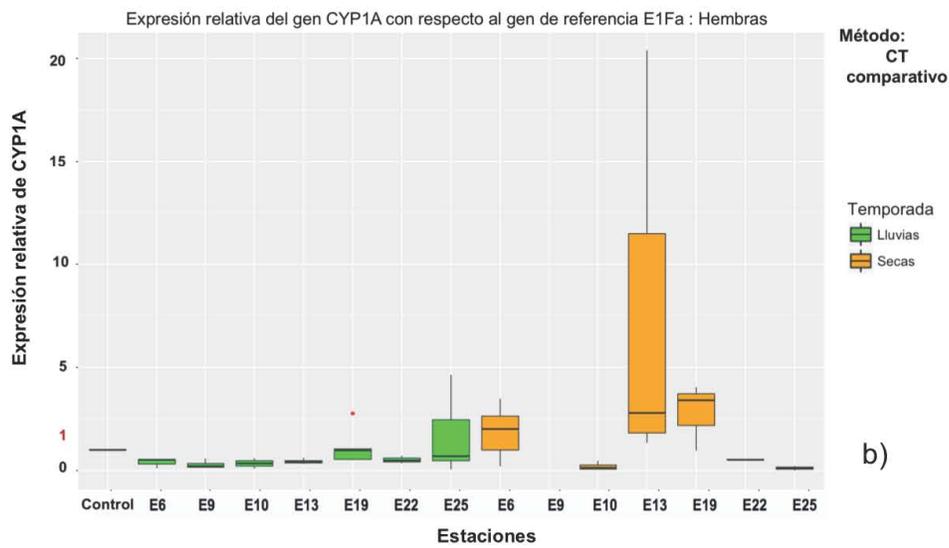
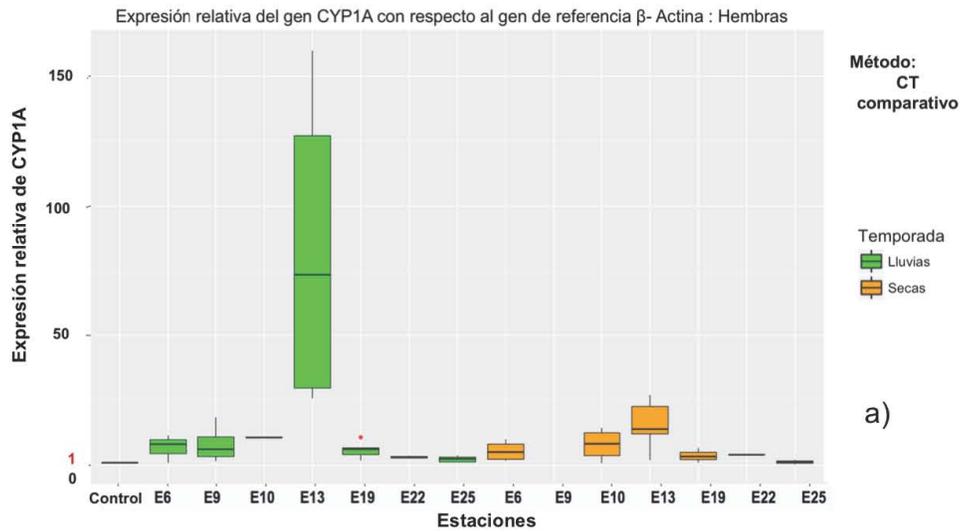


Figura 45. Expresión relativa de CYP1A utilizando el método de los CT Comparativo utilizando distintos genes de referencia: a) B-Actina b) E1Fa y c) RPL7. E6:Rancho Santa Julia; E9:San Antonio Mulix "X´Batún"; E10:Yaxcopoil; E13: Nah-yah; E19:Yaxbacaltún; E22: Chen Vázquez; E25:Rancho X´labón Subim.

## 9.7 EXPRESIÓN RELATIVA CON RESPECTO A LA MEDIA GEOMÉTRICA DE MÚLTIPLES GENES DE REFERENCIA Y SU ANÁLISIS ESTADÍSTICO

A continuación, se presenta la expresión relativa de los genes CYP1A, MT y VTG obtenida al utilizar el método de la media geométrica utilizando múltiples genes de referencia ( $\beta$ -Actina, E1Fa, Rpl7) donde el valor del control tiene el valor de 1 unidad relativa, este valor se obtiene al normalizar los valores de expresión de CT en los peces control ó calibradores con el método de la media geométrica, y los resultados de la expresión en CT de los peces muestra es comparado con el número de veces que es distinto con el valor de lo obtenido por los peces calibradores, ejemplo: si es el doble entonces tendrá un valor de 2 unidades relativas, si es el triple corresponderá a 3 unidades relativa.

Las cajas de color verde representan a la época de lluvias de octubre 2015 que corresponde a la temporada 1, y las cajas de color naranja representan la época de secas mayo 2016 que pertenece a la temporada 2. Para el análisis estadístico de la expresión de CYP1A en machos y hembras con respecto a la media geométrica de B-Actina, E1Fa y RpL7, se utilizó el programa R Studio para evaluar si existe diferencias de expresión entre estaciones y con respecto al control utilizando las pruebas no paramétricas Kruskal Wallis y Dunn Test.

**CYP1A.** La figura 46 presenta la expresión relativa de CYP1A en peces machos, en lluvias E25 presenta una expresión más alta con respecto las demás estaciones mientras que en secas E22 y nuevamente E25 muestran una expresión mayor que el resto de las estaciones, estos resultados concuerdan con los resultados de la tabla 22, donde señala que la estación 25 presenta diferencias significativas con respecto al control en ambas temporadas y que la estación 22 presentó diferencias significativas con respecto al control en secas.

En hembras (Figura 47) no se encontraron diferencias con respecto al control en lluvias y en secas sólo la estación 13 presentó diferencias significativas con respecto al control que podría indicar una subexpresión de CYP1A (Tabla 22). La expresión de CYP1A en hembras no presentó variación entre estaciones de la temporada de lluvias y en secas la estación 13 mostró diferencias significativas con las estaciones 6,10,22 y 25 (Tabla 23).

En la temporada de lluvias las estaciones 9, 19 y 25 presentaron diferencias significativas entre machos y hembras (Tabla 24) y en la época de secas esta diferencia sólo se presentó en la estación 19 (Tabla 24). Algunos autores como Williams et al., (2003) y Webb et al., (2005) señalan que existe una variación en la expresión de CYP1A entre machos y hembras, ya que encontraron que la actividad de CYP1A1 es mayor en machos que hembras, Stegeman et al.(1994), Filby y Tyler (2007) asocian el hecho de que la actividad catalítica del CYP1A disminuye con el aumento de los niveles de estrógenos celulares y medioambientales en varias especies de peces además, Flammarion et al., (2002) mencionan que el periodo de desove en las hembras afecta las actividades CYP1A, esto basados en niveles gonadosomáticos altos; sin embargo es necesario mencionar que aunque no se encontró una correlación entre CYP1A y VTG es posible que la cantidad de contaminantes no sea suficiente para obtener una respuesta marcada; por esta variabilidad se sugiere seguir evaluando en futuros estudios la expresión de CYP1A en muestras de peces machos y hembras por separado. Courtenay et al., (1999) mencionan que la expresión genética del CYP1A1 en peces sexualmente maduros no refleja adecuadamente la exposición a xenobióticos y que puede producir estimaciones erróneas.

Las estaciones de muestreo E25 y E22 pertenecen a regiones ganaderas, donde también se practica la agricultura y el cultivo de pastos, sin embargo, las expresiones más altas de CYP1A en peces macho presentada en estos puntos de muestreo no sobrepasa las dos unidades relativas, aunque la sobreexpresión encontrada no es alta, es importante evaluar si podría considerarse una señal de alerta temprana de una exposición a contaminantes medioambientales.

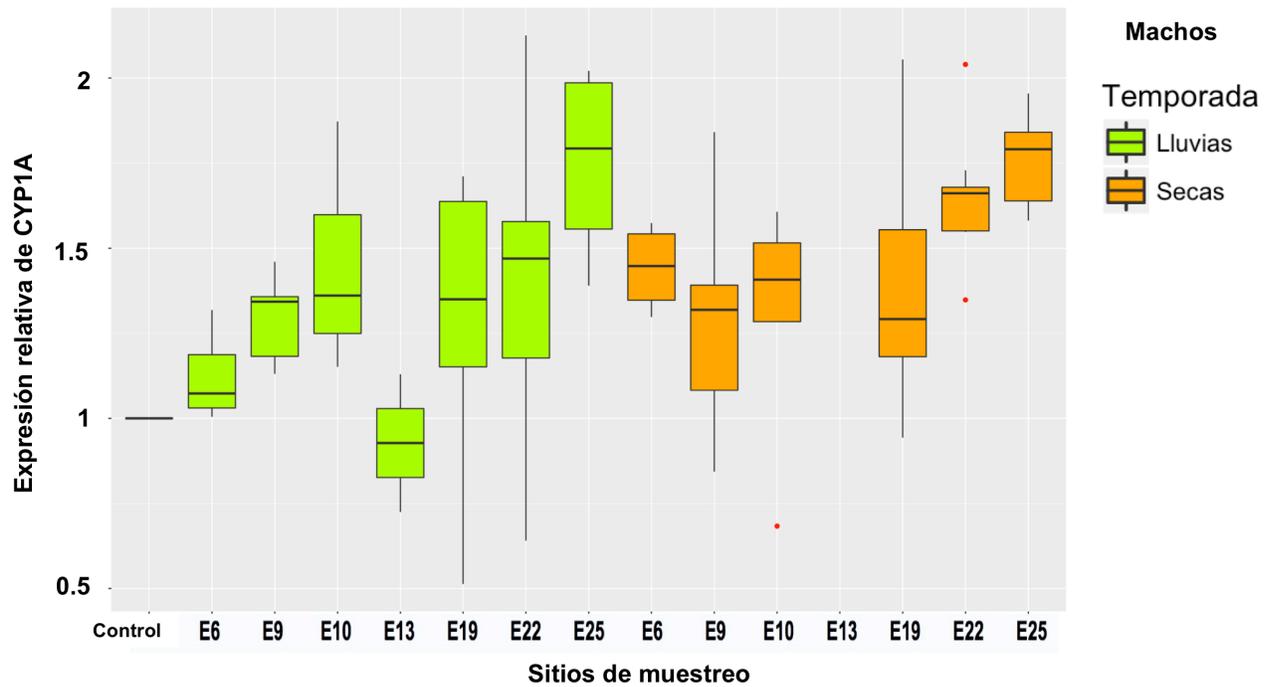


Figura 46. Gráfica de la expresión del gen biomarcador CYP1A en machos con respecto a la media geométrica de múltiples genes de referencia. E6:Rancho Santa Julia; E9:San Antonio Mulix "X'Batún"; E10:Yaxcopoil; E13: Nah-yah; E19:Yaxbacaltún; E22: Chen Vázquez; E25:Rancho X'labón Subim.

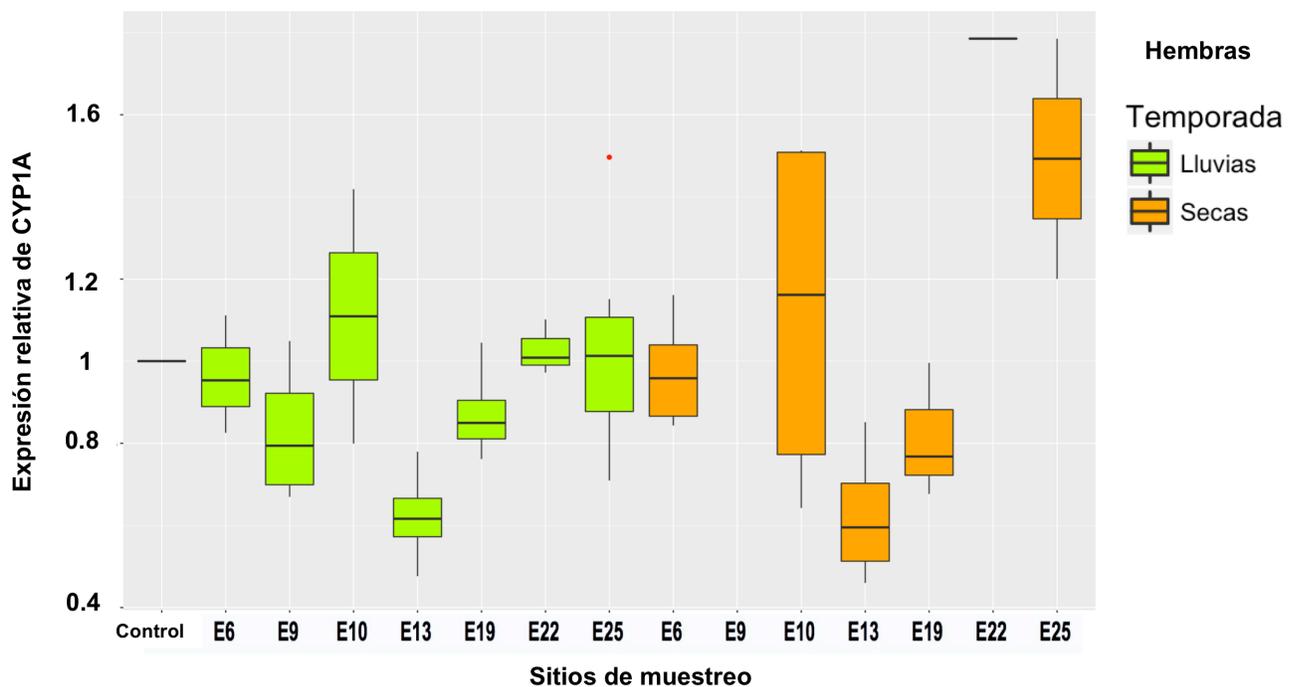


Figura 47. Gráfica de la expresión del gen biomarcador CYP1A en hembras con respecto a la media geométrica de múltiples genes de referencia. E6: Rancho Santa Julia; E9: San Antonio Mulix "X'Batún"; E10: Yaxcopoil; E13: Nah-yah; E19: Yaxbacaltún; E22: Chen Vázquez; E25: Rancho X'labón Subim.

Tabla 22. Diferencias de las estaciones con respecto al control en temporada de lluvias y secas en machos y hembras.

<b>LLUVIAS 2015 – T1</b>	
<b>Estación</b>	<b>p-valor</b>
<b>Machos</b>	
25	0.0049
<b>SECAS 2016 – T2</b>	
<b>Estación</b>	<b>Estación</b>
<b>Machos</b>	
22	0.0134
25	0.0027
<b>Hembras</b>	
13	0.0444

Tabla 23. Diferencias entre estaciones en ambas temporadas en machos y hembras.

<b>LLUVIAS 2015 – T1</b>		
<b>Estación</b>	<b>Estación</b>	<b>p-valor</b>
<b>Machos</b>		
10	6	0.0348
25	6	0.0027
25	13	0.0091
<b>SECAS 2016 – T2</b>		
<b>Estación</b>	<b>Estación</b>	<b>p-valor</b>
<b>Machos</b>		
22	9	0.0084
25	6	0.0483
25	10	0.0094
25	19	0.0101
<b>Hembras</b>		
13	6	0.0048
13	10	0.0231
13	22	0.0158
13	25	0.0027

Tabla 24. Diferencias en la expresión de CYP1A entre machos y hembras en ambas temporadas.

<b>LLUVIAS 2015 – T1</b>	
<b>Estación</b>	<b>p-valor</b>
9	1.6551 e-02
19	3.6032 e-02
25	7.0272 e-03
<b>SECAS 2016 – T2</b>	
19	5.2550e-02

**MT.** La figura 48 muestra la expresión relativa en machos donde la estación 22 de la época de secas tiene una expresión relativa de MT más alta que el resto de las estaciones, de acuerdo a los resultados de la prueba de Dunn Test (Tabla 25) en época de lluvias ninguna estación presentó diferencias entre estaciones ni con respecto al control mientras que en época de secas las estaciones 22 y 25 presentaron diferencias con respecto al control y diferencias entre la estación 22 con las estaciones 6, 9 y 19 (Tabla 26). Las estaciones 22 y 19 presentaron diferencias entre temporadas (Tabla 27).

En hembras (Figura 49) la expresión relativa de MT fue mayor que la encontrada en machos, sin embargo, sólo la estación 6 presentó diferencias con respecto al control tanto en época de lluvias como de secas (Tabla 25). Tanto en lluvias como en secas se encontraron diferencias entre estaciones (Tabla 26). La estación 13 presentó diferencias entre temporadas (Tabla 27).

Se encontraron diferencias en la expresión relativa de MT entre machos y hembras (Tabla 28), en la temporada de lluvias entre las estaciones 6, 13 y 19 y en temporada de secas solo la estación 6 presentó variación.

En algunos peces como por ejemplo, la trucha arcoíris, la expresión relativa de MT puede ser mayor en hembras debido a que durante la vitelogénesis los niveles hepáticos de zinc aumentan drásticamente, esto incrementa los sitios de unión de metales traza para que Zn pueda pegarse ocasionando una sobrerregulación de MT hasta el fin de la vitelogénesis, ya que el papel de la MT durante la vitelogénesis tardía ha sido sugerido como un preventivo de posibles efectos tóxicos causados por el zinc que se está librando al final del ciclo vitelogénico (Olsson et al. 1987), sin embargo, no se encontró en *Gambusia yucatana* correlación alguna entre la expresión MT y VTG.

E6 pertenece a un rancho que cría ganado bovino y practica la agricultura mientras que E22 y E25 están ubicados dentro de una región ganadera donde también se practica cultivo de pastos. La expresión relativa reportada es baja sin embargo es importante determinar en próximos estudios si esta respuesta es debido a contaminantes presentes en el medio y/o si es una respuesta causada por el metabolismo natural de los peces hembra por iniciar el ciclo de la vitelogénesis (Olsson et al. 1987). Es necesario tomar en cuenta que la inducción de MT por metales es dependiente de la especie, el tejido y las condiciones experimentales o ambientales (De Smet et al., 2001; Hollis et al., 2001; De Boeck et al., 2003; Chowdhury et al., 2005) donde influyen los factores endógenos y exógenos (Overnell et al., 1987; Kägi y Kojima, 1987) y al ser proteínas multifuncionales (Coyle et al. 2002) contienen elementos de respuesta a compuestos tan diversos

como glucocorticoides, indicadores del estrés oxidativo y de estrés por metales (Davis y Cousins 2000; Dalton et al. 1997; Lee et al. 1999) por lo que MT puede ser inducida por sustancias distintas a los metales (Hyllner et al., 1989; Olsson et al., 1990; George et al., 1992; Kling et al., 1996). Aunque la expresión de MT en las estaciones 6, 22 y 25 encontrada es baja, se recomienda tomar estos resultados como un antecedente y continuar su monitoreo en años próximos.

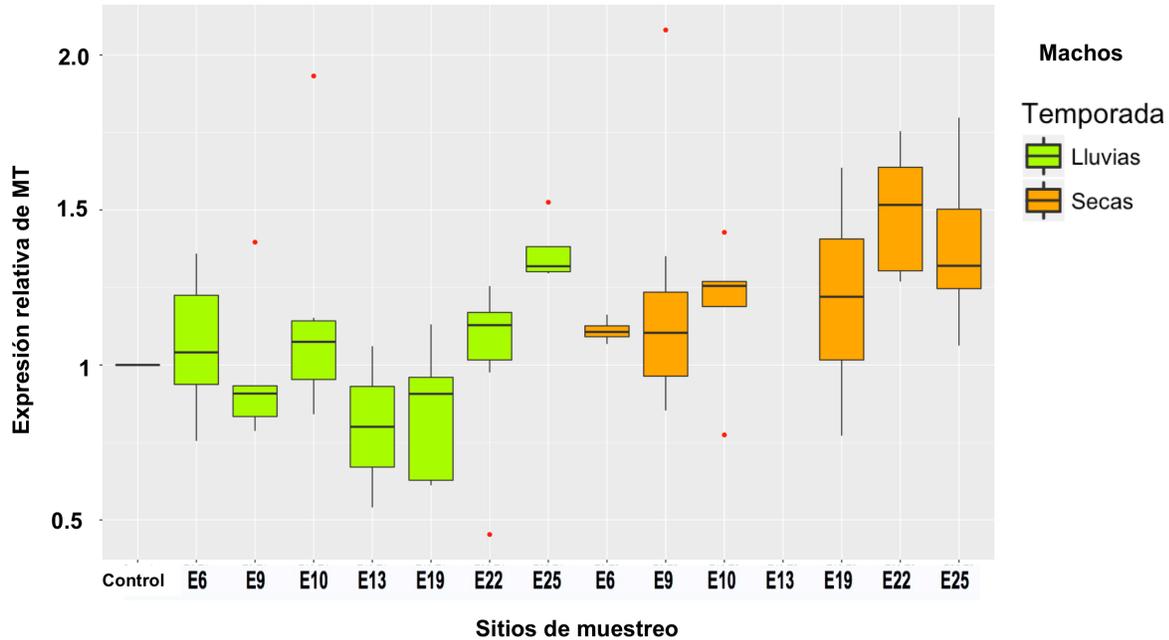


Figura 48. Gráfica de la expresión del gen biomarcador MT en machos con respecto a la media geométrica de múltiples genes de referencia. E6: Rancho Santa Julia; E9: San Antonio Mulix "X'Batún"; E10: Yaxcopoil; E13: Nah-yah; E19: Yaxbacaltún; E22: Chen Vázquez; E25: Rancho X'labón Subim.

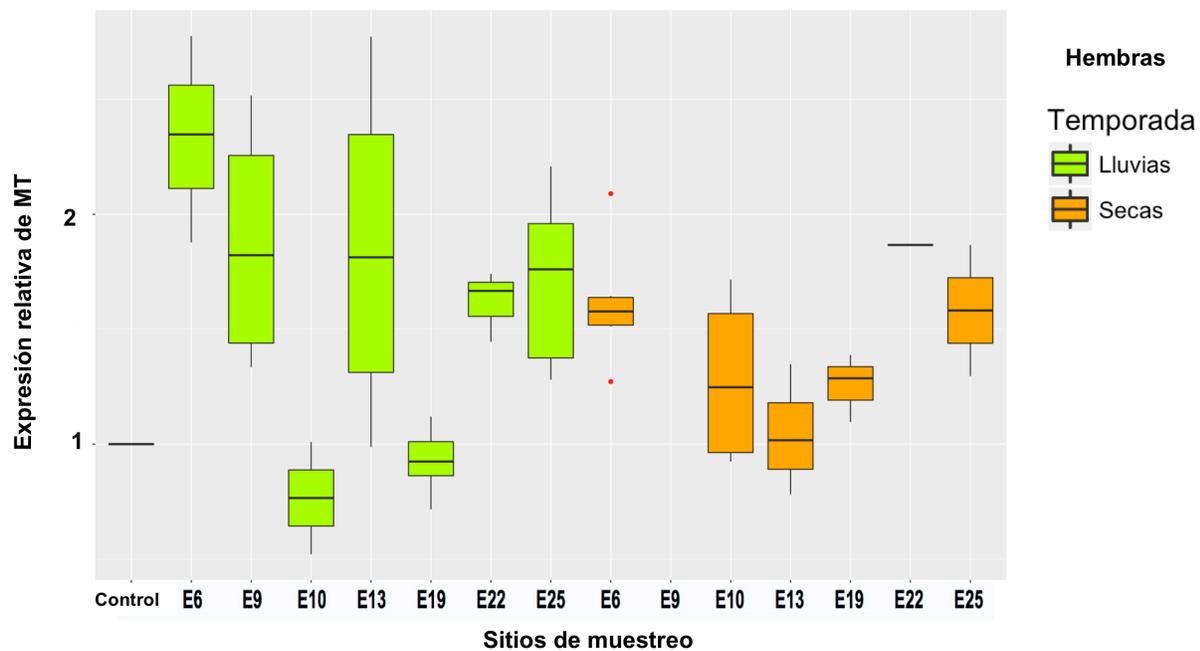


Figura 49. Gráfica de la expresión del gen biomarcador MT en hembras con respecto a la media geométrica de múltiples genes de referencia. E6: Rancho Santa Julia; E9: San Antonio Mulix “X’Batún”; E10: Yaxcopoil; E13: Nah-yah; E19: Yaxbacaltún; E22: Chen Vázquez; E25: Rancho X’labón Subim.

Tabla 25. Diferencias de las estaciones con respecto al control en temporada de lluvias y secas en machos y hembras.

LLUVIAS 2015 – T1	
Estación	p-valor
<b>Hembras</b>	
6	0.0152

SECAS 2016 – T2	
Estación	p-valor
<b>Machos</b>	
22	0.0088
25	0.0407
<b>Hembras</b>	
6	0.0470

Tabla 26. Diferencias entre estaciones en ambas temporadas en machos y hembras.

<b>LLUVIAS 2015 – T1</b>		
<b>Estación</b>	<b>Estación</b>	<b>p-valor</b>
<b>Hembras</b>		
10	6	0.0074
10	9	0.0358
10	25	0.0461
19	13	0.0321
19	6	0.0015
19	9	0.0116
19	25	0.0118
<b>SECAS 2016 – T2</b>		
<b>Estación</b>	<b>Estación</b>	<b>p-valor</b>
<b>Machos</b>		
22	6	0.0114
22	9	0.0041
22	19	0.0413
<b>Hembras</b>		
13	6	0.0018
13	25	0.0470

Tabla 27. Diferencias en las estaciones entre las temporadas 1 y 2 en peces machos y hembras.

<b>Estación</b>	<b>p-valor</b>
<b>Machos</b>	
19	3.4209 e-02
22	3.2654 e-03
<b>Hembras</b>	
13	0.0194

Tabla 28. Diferencias en la expresión de MT entre machos y hembras en ambas temporadas.

<b>LLUVIAS 2015 – T1</b>	
<b>Estación</b>	<b>p-valor</b>
6	0.01059
9	0.00412
13	0.05033
<b>SECAS 2016 – T2</b>	
<b>Estación</b>	<b>p-valor</b>
6	0.01269

**VTG.** Aunque la expresión relativa VTG fue medida en machos y hembras, sólo se graficaron los resultados generados por los peces macho, ya que el hecho que estos presenten una sobreexpresión de VTG es una evidencia clave de la presencia de contaminantes con capacidad estrogénica en el medio acuático muestreado (Heppell et al., 1995; Allner et al.,1999; Cheek et al., 2001; Brasfield et al.,2002, Hamman et al 2003; Gillesby & Zacharewski, 1998; Jones et al., 2000). La figura 50 muestra la expresión de VTG en peces machos de la temporada de secas y lluvias, de acuerdo con los resultados de la prueba Dunn Test en época de lluvias ninguna de las estaciones presentó diferencias con respecto al control ni respecto a otras estaciones, mientras que en época de secas las estaciones 9, 19 y 25 presentaron diferencias con respecto al control (Tabla 29), así como también se presentaron diferencias entre estaciones (Tabla 30).

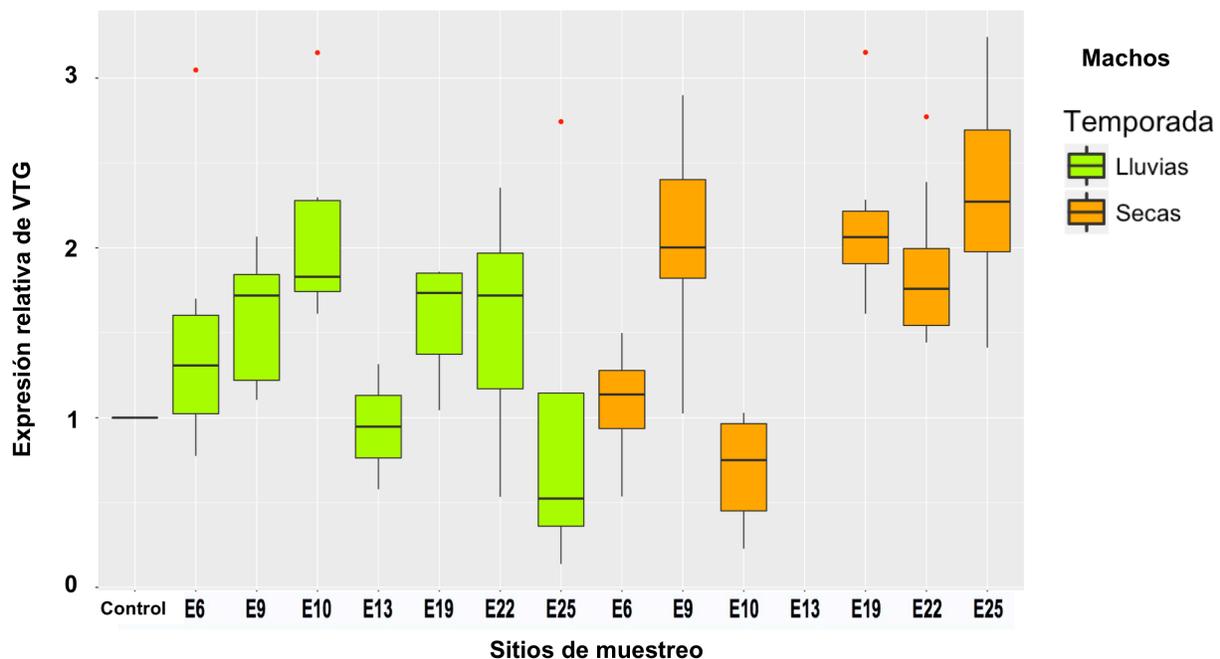


Figura 50. Gráfica de la expresión del gen biomarcador VTG en machos con respecto a la media geométrica de múltiples genes de referencia. E6: Rancho Santa Julia; E9: San Antonio Mulix "X'Batún"; E10: Yaxcopoil; E13: Nah-yah; E19: Yaxbacaltún; E22: Chen Vázquez; E25: Rancho X'labón Subim.

Las estaciones 9 y 19 corresponden a cenotes con alta actividad turística, esta sobreexpresión de VTG puede deberse al uso de bloqueadores solares por parte de los visitantes que llegan a nadar en ellos, ya que se ha visto que los compuestos utilizados en bloqueadores solares como la oxibenzona, el octil salicilato y el octinoxato son capaces de inducir VTG (Soto y Rodríguez-Fuentes, 2014) y las estación 25 pertenece a zonas ganaderas y cultivo de pastos.

Aunque la expresión de VTG encontrada en las estaciones 9, 19 y 25 es baja es un indicador directo de que hay disrupción endócrina ya que en *Gambusia yucatanana* no debería expresar diferencia con respecto al control, esta información es relevante y se recomienda priorizar los próximos monitoreos en estas estaciones.

Tabla 29. Diferencia entre estaciones con respecto al control en temporada de secas peces macho. Expresión del gen VTG.

<b>SECAS 2016 – T2</b>	
<b>Estación</b>	<b>p-valor</b>
9	0.0399
19	0.0274
25	0.0114

Tabla 30. Diferencia entre estaciones de la temporada de secas en peces macho. Expresión del gen VTG

<b>SECAS 2016 – T2</b>		
<b>Estación</b>	<b>Estación</b>	<b>p-valor</b>
9	6	0.0231
9	10	0.0012
19	6	0.0152
19	10	0.0009
22	10	0.0062
25	6	0.0042
25	10	0.0001

## 9.8 CORRELACIÓN DE LA EXPRESIÓN RELATIVA DE LOS GENES BIOMARCADORES CYP1A, MT Y VTG CON RESPECTO AL LARGO TOTAL.

Mediante R Studio se realizó el análisis de correlación de Spearman entre la expresión relativa de los genes diana CYP1A, MT y VTG con el largo total de *Gambusia yucatana* en peces machos y hembras por separado y en tres grupos:

- 1.- Lluvias 2015 y Secas 2016
- 2.- Lluvias 2015
- 3.- Secas 2016

- En la evaluación de la expresión relativa del gen CYP1A con respecto al largo total no se encontró correlación en peces macho, mientras que en los peces hembra se encontró correlación negativa en el grupo 2: lluvias 2015 ( $r = -0.4039568$ ,  $p\text{-valor} = 0.0330$ ).
- En la evaluación de la expresión relativa del gen MT con respecto al largo total se encontró correlación positiva en peces macho del grupo 3: secas 2016 ( $r = 0.32$ ,  $p\text{-valor} = 0.0388$ ) mientras que en peces hembras no se encontró correlación.
- En los peces macho no se encontró correlación entre la expresión relativa de VTG y el largo total.

## 9.9 CORRELACION ENTRE GENES BIOMARCADORES Y CONTAMINANTES

### PLAGUICIDAS ORGANOCORORADOS DETECTADOS EN AGUA Y SEDIMENTOS

**Hexaclorociclohexano HCH.** Es una sustancia química manufacturada que existe en ocho formas llamadas isómeros entre estos, el gama-HCH o  $\gamma$ -HCH comúnmente llamado lindano, este es usado como plaguicida en frutas, hortalizas y plantaciones forestales; el HCH puede acumularse en el tejido graso de peces, todos los isómeros pueden producir efectos del hígado, el riñón, en el sistema inmune y lesiones en los ovarios y los testículos (ATSDR, 2005), en *Daphnia magna* la  $EC_{10}$  (concentración décima efectiva máxima, representa la concentración de un compuesto donde se observa el 10% de su efecto máximo) de  $\gamma$ -HCH en es  $40,000 \text{ ngL}^{-1}$  de agua fresca durante 21 días (Agilent Technologies, 2012) y su concentración letal  $LC_{50}$  es de  $1,250,000 \text{ ngL}^{-1}$  de agua fresca a las 24 horas (Sanders y Cope, 1966) y de  $460,000 \text{ ngL}^{-1}$  a las 48 horas (Frear y Boyd, 1967). Los isómeros  $\alpha$ -HCH,  $\gamma$ -HCH y  $\delta$ -HCH fueron detectados en los cuerpos de agua muestreados. De acuerdo con la ley federal de derechos en materia de aguas nacionales Conagua 2016 el límite máximo permisible para los HCH en general es de  $1000 \text{ ngL}^{-1}$ , pero en el caso del  $\gamma$ -HCH puede tolerarse hasta  $2000 \text{ ngL}^{-1}$ , los valores encontrados se encuentran por debajo del límite como se puede ver en la figura 51. El total de HCH en agua no presentó correlación significativa con alguno de los genes biomarcadores (Tablas 31 y 32).

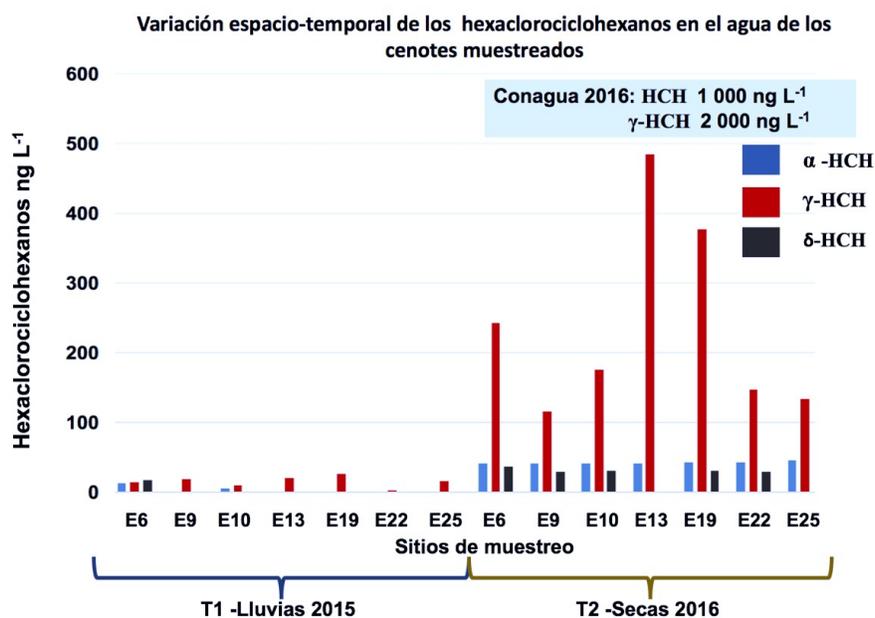


Figura 51. Gráfica de la variación espacio-temporal de HCH en agua de los cenotes muestreados en el proyecto PAPIIT IA200214. El límite de HCH en agua corresponde a lo establecido por la Ley Federal de derechos en materia de Aguas Nacionales CONAGUA 2016.

Por otro lado, aunque la concentración de los HCH totales en sedimentos (Figura 52) no sobrepasa el límite de LEL (Lowest Effect Level) en las tablas de referencia y proyección rápida SQiRTs (NOAA, 2008) con valor de 3 000 ng g<sup>-1</sup>, si se presentó correlación en peces hembras con metalotioneínas en ambas temporadas (r = 0.6747 y p-value = 8.198e-05; r = 0.6836 p-valor = 0.0001, temporada 1 y 2 respectivamente) y CYP1A en la temporada 2 (r = 0.6648 p-valor = 0.0002) (Tabla 32), esto sugiere que el HCH encontrado en el sedimento puede potencialmente causar un efecto en la producción de metalotioneínas si esa misma concentración es liberada al agua y resulta biodisponible para las hembras.

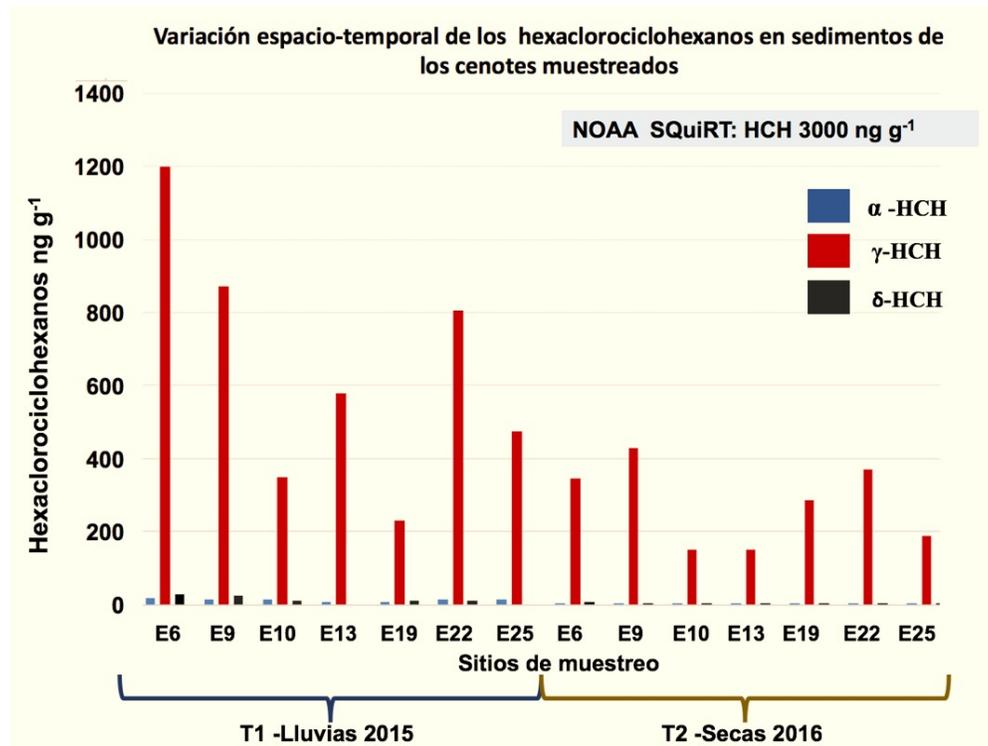


Figura 52. Gráfica de la variación espacio-temporal de HCH en sedimentos de los cenotes muestreados en el proyecto Papiit IA200214. El límite de HCH en sedimentos corresponde al valor de LEL (Lowest Effect Level) en las tablas de referencia y proyección rápida SQiRTs (NOAA, 2008).

**Clordano.** Es utilizado como pesticida, una vez que ingresa al ambiente tiene alta persistencia en el medio acuático, donde se adsorbe en el material sedimentario (Subsecretaria de recursos hídricos de la nación, República Argentina, 2003). En lo referente a la toxicidad crónica del clordano en *Daphnia magna* Cardwell et al. (1977) observaron afectación del ciclo de vida del crustáceo a  $16,000 \text{ ngL}^{-1}$ , mientras que la concentración asociada a toxicidad aguda (LC50/EC50) en *Daphnia magna* es de  $35\,000 \text{ ngL}^{-1}$  (Sanders, 1972; U.S. EPA, 1980),  $97\,000 \text{ ngL}^{-1}$  (Randall et al., 1979) y  $98\,000 \text{ ngL}^{-1}$  (Moore et al., 1998). Las concentraciones de clordanos encontrados en el agua de los sitios de muestreo (Figura 53) estuvieron por debajo del límite permitido por la ley federal de derechos en materia de aguas nacionales Conagua 2016 que es  $2\,000 \text{ ngL}^{-1}$ . En la temporada 1 los peces hembras tuvieron baja correlación en CYP1A con respecto a los clordanos ( $r=0.3831$ , p-valor = 0.0441), mientras que en la temporada 2 donde se presentó una mayor concentración de clordanos en los sitios de muestreo, no se presentó correlación (Tabla 32), esto sugiere que aunque haya existido una mayor concentración de clordano en la temporada 2 este no se encontraba biodisponible.

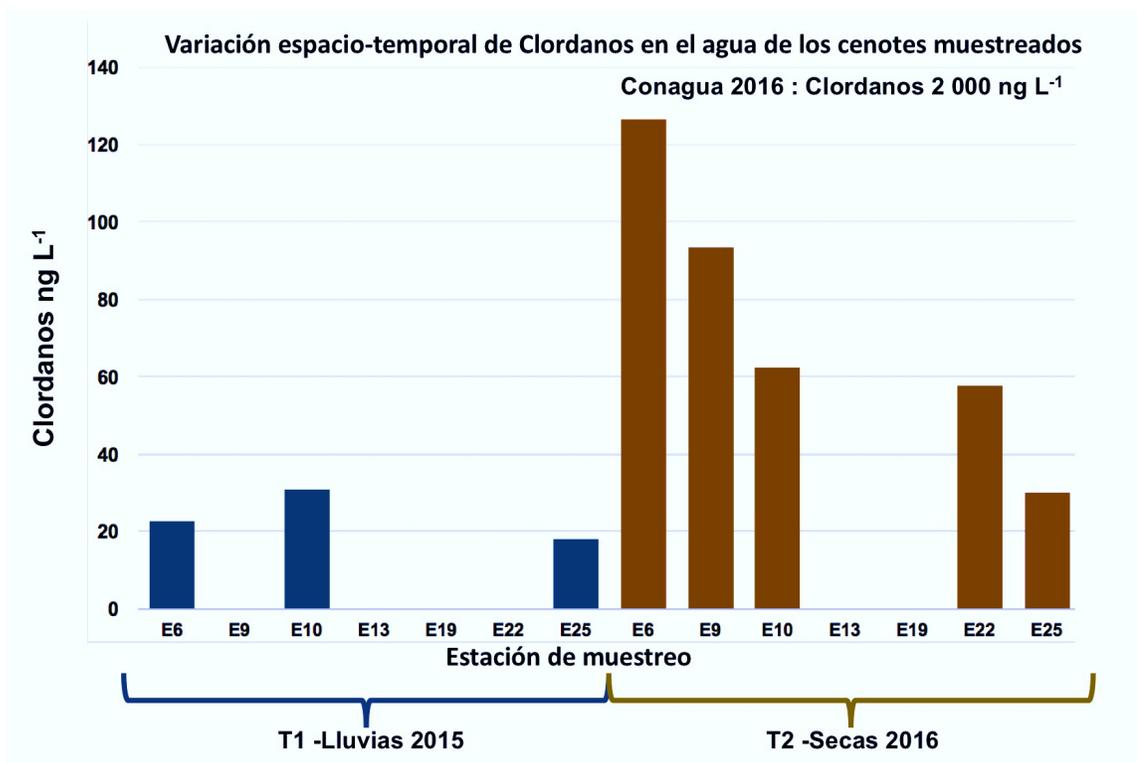


Figura 53. Gráfica de la variación espacio-temporal de clordanos en agua de los cenotes muestreados en el proyecto Papiit IA200214. El límite de clordanos en agua corresponde a la ley federal de derechos en materia de agua nacionales Conagua 2016

Las concentraciones encontradas en sedimentos (Figura 54) están muy por debajo del nivel de efecto más bajo LEL (Lowest Effect Level) de  $7000 \text{ ngL}^{-1}$ , este límite máximo permisible que se encuentra en las Tablas de Referencia y proyección rápida SQuiRT (NOAA, 2008), sin embargo, se encontró que los peces hembra de la temporada 2 tuvieron correlación con los genes CYP1A y MT ( $r = 0.5122$ ,  $p\text{-valor} = 0.0074$  y  $r = 0.4203$ ,  $p\text{-valor} = 0.032$ , respectivamente) (Tabla 32), esto sugiere que de estar biodisponible la concentración de clordano detectado sedimentos los valores de las correlaciones serian el efecto potencial con respecto a la expresión de CYP1A y MT.

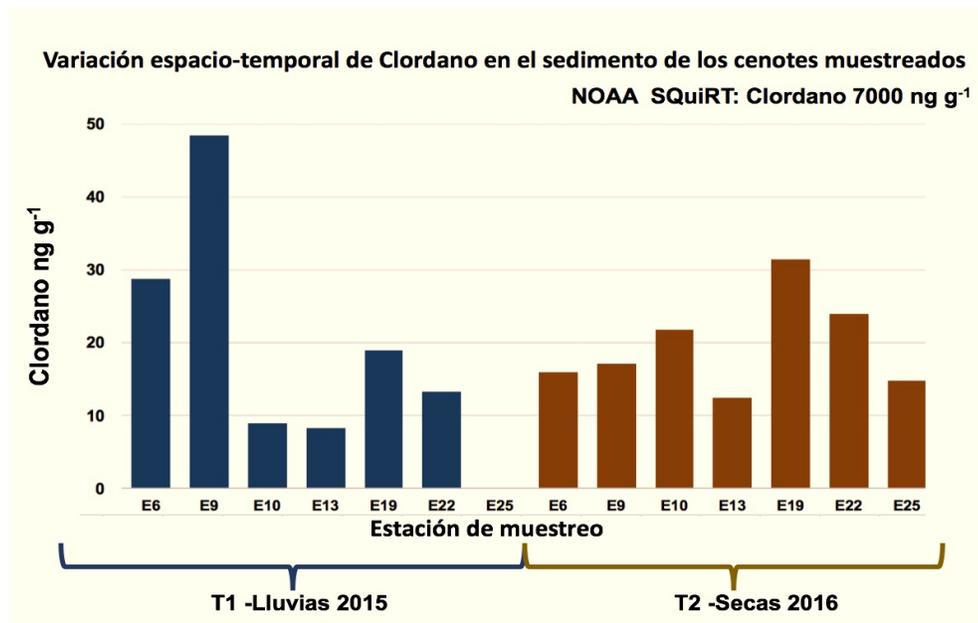


Figura 54. Gráfica de la variación espacio-temporal de clordanos en sedimentos de los cenotes muestreados en el proyecto Papiit IA200214. El límite de clordanos en sedimentos corresponde al valor de LEL (Lowest Effect Level) en las tablas de referencia y proyección rápida SQuiRTs (NOAA, 2008).

**Aldrín, dieldrín y endrín.** El aldrín y el dieldrín son insecticidas con estructura química similar, desde los 1950s hasta 1970, tanto el aldrín como el dieldrín se usaron ampliamente como pesticidas en cosechas tales como maíz y algodón, pueden absorberse a través de la piel y por ingestión, provocando alteraciones del sistema nervioso central si la exposición es de corta duración. Si el intervalo de exposición es prolongado puede provocar daños sustanciales en el cerebro, hígado y plasma sanguíneo. La luz solar y las bacterias transforman el aldrín a dieldrín de manera que encontramos principalmente dieldrín en el ambiente (PRTR; FAO, 2000) Debido a preocupaciones acerca de daño al ambiente y posiblemente sobre la salud pública, la EPA prohibió todos los usos de aldrín y de dieldrín en 1974, excepto para controlar termitas, en 1987, la EPA prohibió todos los usos (ATSDR, 2002). Cuando el dieldrín se libera en un sistema acuático, no sufre hidrólisis ni biodegradación, es susceptible de fotólisis con una semidesintegración de unos cuatro meses, o algo menos en aguas que contienen un fotosensibilizador, se considera que, en el agua, el dieldrín se adsorbe en los sedimentos y se bioacumula en los organismos acuáticos. El endrín es una sustancia sólida, blanca, casi sin olor que se usó como pesticida para controlar insectos, roedores y pájaros. Desde 1986 su venta, producción y uso general fue prohibido en Estados Unidos, parece ser resistente a la biodegradación en aguas naturales y en la mayoría de los suelos, El endrín liberado en sistemas acuáticos no se hidroliza, se convierte en cetoendrín por fotodegradación y se considera que el endrín se acumula en cantidades considerables en los organismos acuáticos (FAO, 2000).

La concentración letal media LC50 de aldrín en *Daphnia magna* es de 30 000 ngL<sup>-1</sup> en 24 horas y 28 000 ngL<sup>-1</sup> en 48 horas (Sanders y Cope, 1966; Frear y Boyd, 1967), mientras que en el guppy es de 20 000 ngL<sup>-1</sup> en 96 horas (Rehwoldt, 1977). La LC50 de dieldrín en el guppy *poecilia reticulata* puede variar de 2 600 ngL<sup>-1</sup> a 6 100 ngL<sup>-1</sup> (U.S. EPA, 1980) y en *poecilia latipinna* es de 3 000 ngL<sup>-1</sup> por 19 semanas, limitando su crecimiento y reproducción en 34 semanas a una concentración de 750 ngL<sup>-1</sup> (Lane y Livingston, 1970).

La LC50 de endrín en *Daphnia magna* es de 352 000 ngL<sup>-1</sup> mientras que en mosquitofish *Gambusia affinis* y en el guppy *Poecilia reticulata* es de 750 ngL<sup>-1</sup> y 900 ngL<sup>-1</sup> respectivamente, *Daphnia magna* está entre las especies más tolerantes al endrín (U.S. EPA, 1980)

El límite máximo de aldrín en agua permitido por la EPA corresponde a 3 000 ngL<sup>-1</sup> (U.S. EPA, 1980) y acuerdo con la Ley federal de derechos Conagua 2016 los límites máximos permitidos de dieldrín y endrín en agua corresponde a 2 000 ngL<sup>-1</sup> y 20 ngL<sup>-1</sup> respectivamente, en la figura 55 se muestra la grafica de las concentraciones de aldrín, dieldrín y endrín detectadas en los sitios de muestreo, donde señala que la concentración de endrín encontrada está por encima del límite

permitido en la estaciones 6 y 9 de la temporada 1. No se encontraron correlaciones entre las concentraciones de estos contaminantes (juntos o individuales) y los genes biomarcadores (Tablas 31 y 32).

En sedimentos (Figura 56) ninguno de los compuestos rebasó el límite LEL propuesto en las tablas de referencia y proyección rápida SQuiRTs (NOAA, 2008). No se encontraron correlaciones entre cada uno de los compuestos con los genes biomarcadores sin embargo al sumarlos y evaluarlos de manera conjunta se encontró una correlación de CYP1A en machos de ambas temporadas ( $r = 0.5035$  y  $p\text{-valor} = 0.0005$ ;  $r = 0.3387$   $p\text{-valor} = 0.0403$ , temporada 1 y 2 respectivamente) así como MT en machos de la segunda temporada ( $r = 0.3644$  y  $p\text{-valor} = 0.0176$ ) (Tabla 31).

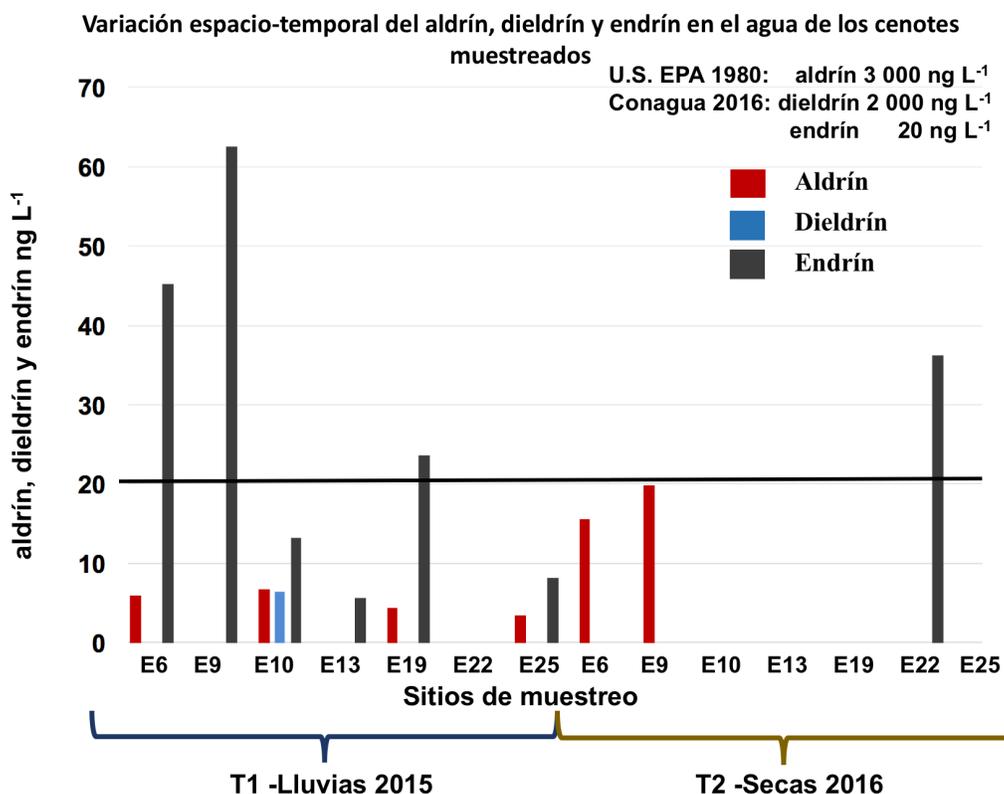


Figura 55. Gráfica de la variación espacio-temporal de aldrín, dieldrín y endrín en agua de los cenotes muestreados en el proyecto Papiit IA200214. La línea negra horizontal corresponde al valor del límite máximo permitido en Aldrín por Conagua 2016.

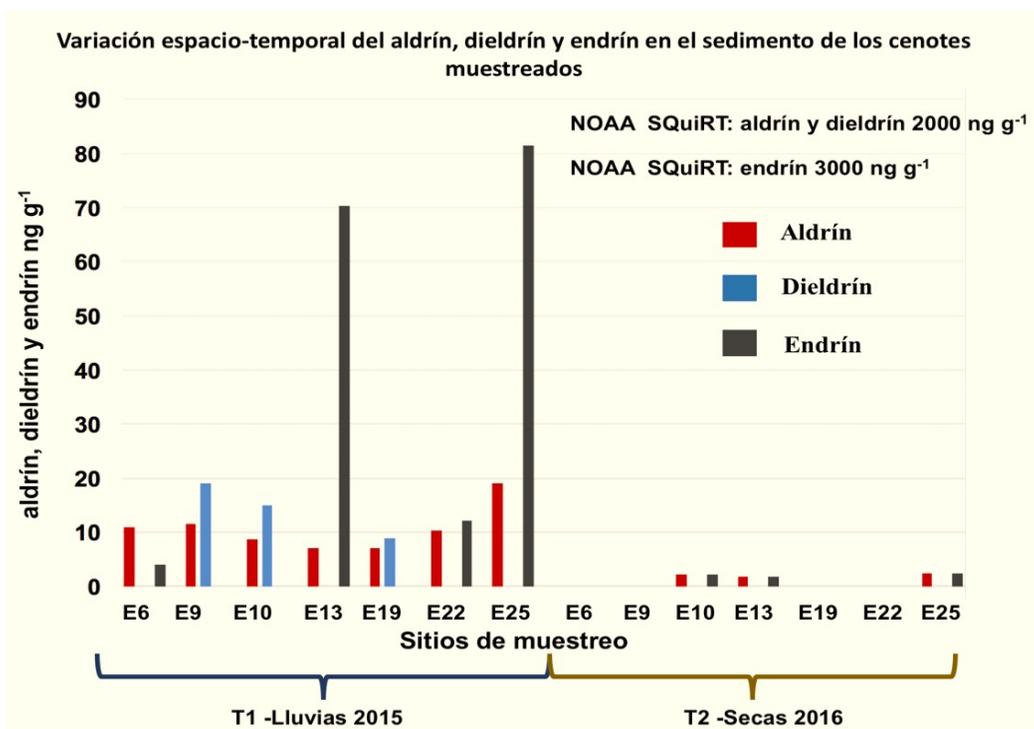


Figura 56.- Gráfica de la variación espacio-temporal de aldrín, dieldrín y endrín en sedimentos de los cenotes muestreados en el proyecto Papiit IA200214. El límite de aldrín, dieldrín y endrín en sedimentos corresponde al valor de LEL (Lowest Effect Level) en las tablas de referencia y proyección rápida SQiRT (NOAA, 2008).

**DDT.** El DDT (diclorodifeniltricloroetano) es un plaguicida usado extensamente en el pasado para controlar insectos en cosechas agrícolas e insectos portadores de enfermedades tales como la malaria y el tifus. Actualmente se usa solamente en unos pocos países para controlar la malaria. Al entrar en contacto con el agua superficial, el DDT se une a partículas y se deposita en el sedimento. En el agua, el DDT se acumula en los tejidos adiposos de peces, alcanzando concentraciones miles de veces más altos que en agua (ATSDR, 2002). Para el DDT y sus metabolitos, el criterio para proteger la vida acuática de agua dulce de acuerdo a lo establecido en la EPA en 1980 señala que la concentración del mismo no debe exceder  $1\ 100\ \text{ngL}^{-1}$  en ningún momento (U.S. EPA, 1980). La LC50 en *Daphnia magna* es de  $4\ 400\ \text{ngL}^{-1}$  en 24 horas y  $360\ \text{ngL}^{-1}$  en 48 horas (Sanders y Cope, 1966; Frear y Boyd, 1967; Agilent Technologies, 2012) mientras que el valor de LC50/EC50 en el guppy *Poecilia reticulata* es  $56\ 000\ \text{ngL}^{-1}$  (U.S. EPA, 1980). El DDT (total isómeros) en agua no presentó correlación con ningún gen biomarcador (Tabla 31 y 32), la figura 57 muestra la distribución del DDT detectado en los sitios de muestreo, las concentraciones encontradas se encuentran por debajo del límite permitido de  $1\ 000\ \text{ngL}^{-1}$  por la la Ley Federal de Derechos Conagua 2016.

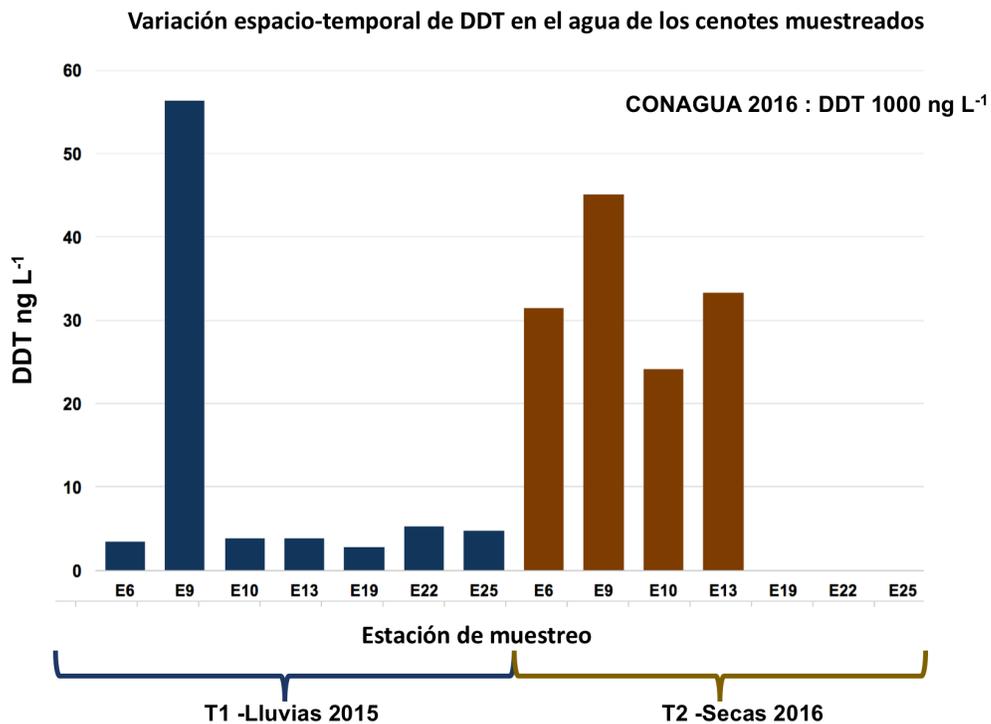


Figura 57. Gráfica de la variación espacio-temporal de DDT en agua de los cenotes muestreados en el proyecto Papiit IA200214. El límite de DDT establecido por la Ley Federal de Derechos Conagua 2016.

En sedimentos (Figura 58) el DDT mostró correlación (Tablas 31 y 32) con MT ( $r = 0.6449$  y  $p\text{-value} = 0.0002$ ) en las hembras de época de lluvias “Temporada 1” y con CYP1A ( $r = 0.4350$   $p\text{-value} = 0.0035$ ) en machos de la época de secas “temporada 2”, aunque las concentraciones encontradas en sedimentos de DDT (DDT, DDE y DDD) están muy por debajo del nivel de efecto más bajo LEL (Lowest Effect Level) de  $8000 \text{ ngL}^{-1}$  para DDT, y DDT y de  $5000 \text{ ngL}^{-1}$  para DDE según encuentra en las Tablas de Referencia y proyección rápida SQuiRT (NOAA, 2008).

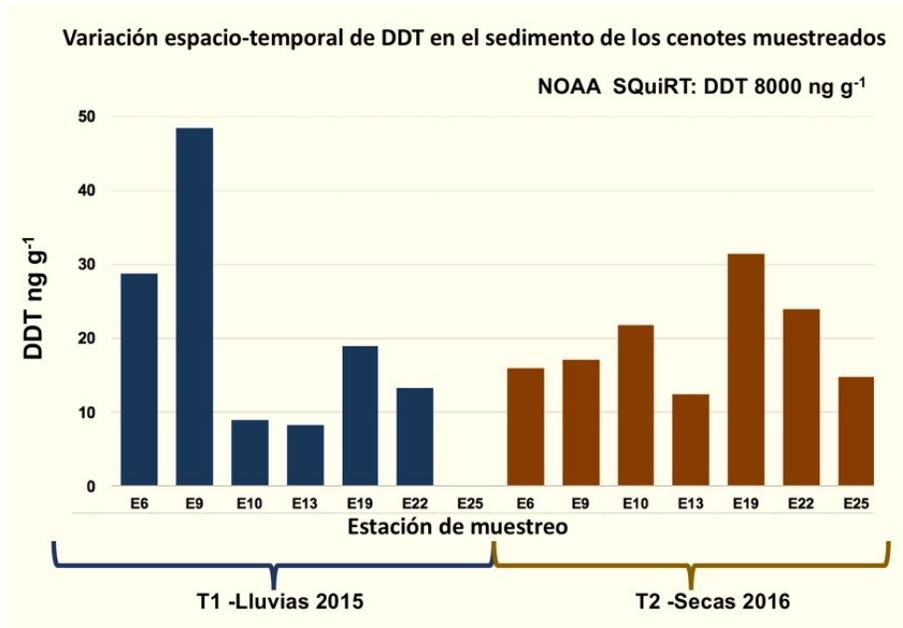


Figura 58. Gráfica de la variación espacio-temporal de DDT en sedimentos de los cenotes muestreados en el proyecto Papiit IA200214. El límite de DDT en sedimentos corresponde al valor de LEL (Lowest Effect Level) en las tablas de referencia y proyección rápida SQuiRT (NOAA, 2008).

## **Metoxicloro.**

El metoxicloro es eficaz contra una gran variedad de insectos, es usado en cosechas agrícolas y en el ganado, en alimentos para animales. Algunos plaguicidas que contienen metoxicloro se usan para controlar insectos en jardines o en animales domésticos. Cantidades más pequeñas de metoxicloro pueden depositarse directamente desde el aire en ríos, lagos u otras aguas superficiales donde la mayoría de los peces y otros animales transforman al metoxicloro a otras sustancias las cuales son rápidamente eliminadas del cuerpo. Por esta razón, el metoxicloro generalmente no se acumula en la cadena alimentaria (ATSDR).

En agua sólo en la estación E9 de la temporada de secas se detectó metoxicloro a una concentración de  $19.7 \text{ ng L}^{-1}$ , misma que rebasa el límite establecido por la Ley Federal de derechos Conagua 2016 que es  $5 \text{ ng L}^{-1}$ .

Una vez en el agua, el metoxicloro generalmente se adhiere a sedimentos o a materia orgánica y se deposita en el fondo, en sedimentos (Figura 59) se encontró que la concentración de metoxicloro es mayor en época de lluvias que en época de secas; en temporada de lluvias las hembras tuvieron una correlación entre metoxicloro en sedimentos y MT(  $r= 0.6564$  y  $p\text{-valor} = 0.0001$ ) mientras que en la temporada de secas se encontró que los machos tuvieron baja correlación con respecto a CYP1A ( $r= 0.319821$  y  $p\text{-valor} = 0.004$ ) contrariamente a lo esperado en la temporada de secas donde hay menos concentración de metoxicloro en sedimentos (figura 52) se encontró correlación para VTG tanto para machos( $r = 0.4206$  y  $p\text{-valor} = 0.0049$ ) como para hembras ( $r= 0.5096$  y  $p\text{-valor}= 0.0070$ ), pudiendo indicar que en secas hubo una mayor fracción de metoxicloro biodisponible, asimismo el metoxicloro ha sido reportado como un compuesto capaz de actuar sobre el sistema reproductivo de manera mimética o antagonista estrogénico o androgénico ya que es uno de los pesticidas que afecta el metabolismo de hormonas y disruptores hormonales, activando el PXR (receptor X pregnano) y / o CAR (receptor constitutivo del androstano) (Chichizola et al. 2009). No se encontró en la literatura límites máximos permisibles de metoxicloro en sedimentos.

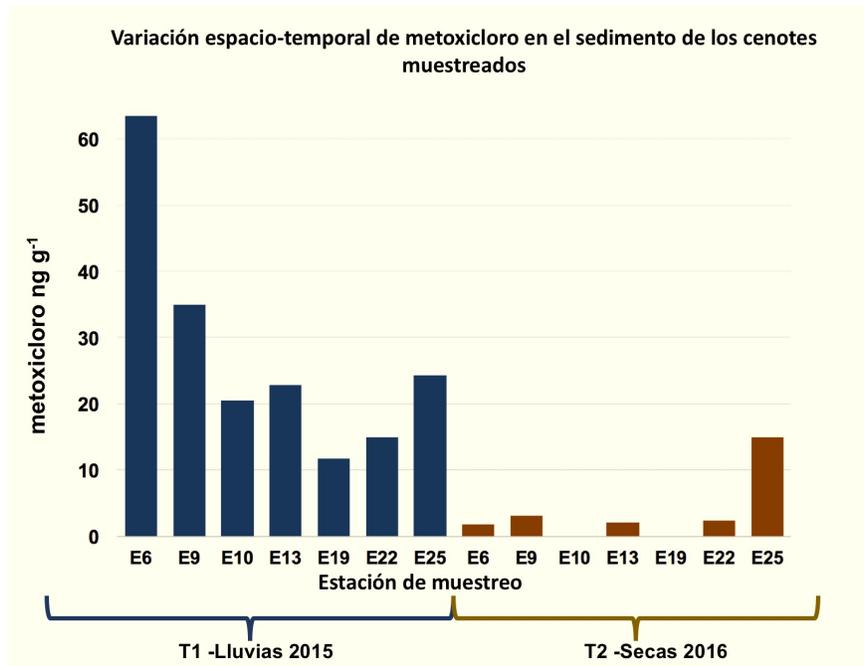


Figura 59. Gráfica de la variación espacio-temporal de metoxicloro en sedimentos de los cenotes muestreados en el proyecto Papiit IA200214. El límite de metoxicloro en sedimentos corresponde al valor LEL (Lowest Effect Level) en las tablas de referencia y proyección rápida SQuiRTs (NOAA, 2008).

## CORRELACIÓN ENTRE LOS GENES BIOMARCADORES E HIDROCARBUROS AROMÁTICOS POLICÍCLICOS DETECTADOS EN AGUA

En el caso de los hidrocarburos aromáticos policíclicos (PAHs) los datos se agruparon en dos grupos uno que comprende de compuestos de 2 y 3 anillos y otro con los PAHs de 4 y 5 anillos (Figura 60). Los PAHs compuestos de 2 y 3 anillos se encontraron en mayor cantidad en agua en época de secas 2016 “temporada 2” (Figura 61), en este grupo se encuentran: naftaleno, acenaftileno, 2-bromonaftaleno, acenafteno, floureno, fenantreno, antraceno.

En temporada de secas los peces hembras y machos presentaron correlación media con CYP1A (0.7380 y p-valor = 1.683e-05) (Tablas 31 y 32, machos y hembras respectivamente); mientras que sólo en peces hembra se encontró correlación con MT. Los PAHs pueden causar un fuerte incremento en la actividad de CYP1A en el hígado (Wittayalerpanya, 2003; Coutiño et al. 2010; Muntané J. 2009; Kosmala et al. 1998).

No se encontraron correlaciones entre los genes biomarcadores y el grupo de los PAHs de 4 y 5 anillos formado por fluoranteno, pireno, criseno, indeno (1,2,3, c-d) pireno, dibenzo (a, h) antraceno, benzo(b+k+j), flouranteno, benzo (g, h, i) perileno, benzo (a) antraceno, dibenzo (a) pireno. No se encontraron normas oficiales que señalen los límites máximos permisibles de PAHs en los cuerpos de agua nacionales.

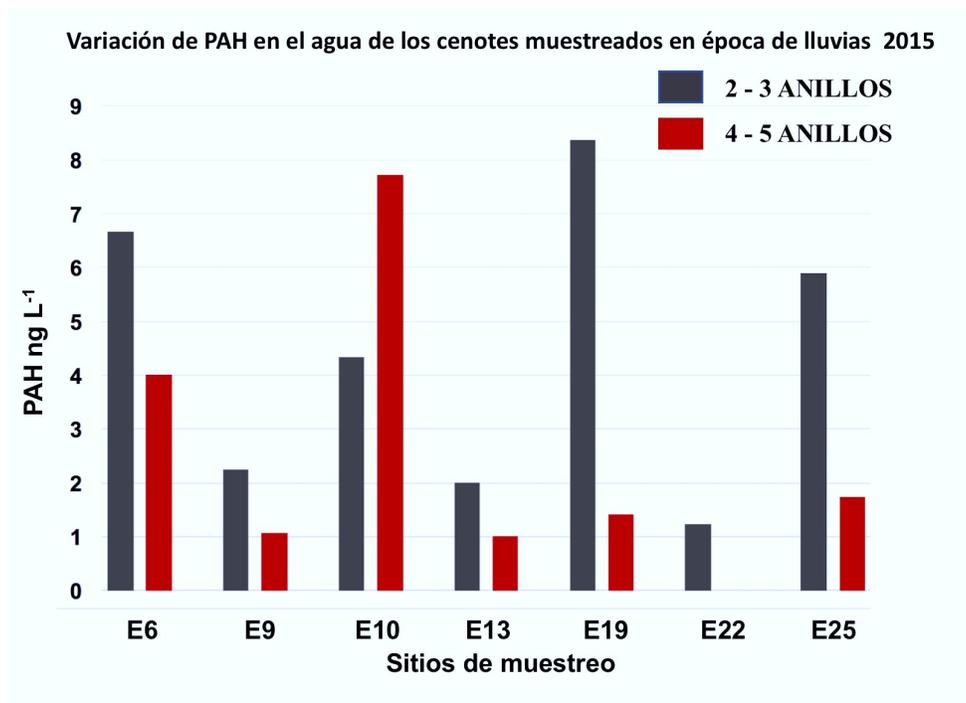


Figura 60. Gráfica de la variación espacio-temporal de PAH en la zona de estudio muestreada en octubre 2015.

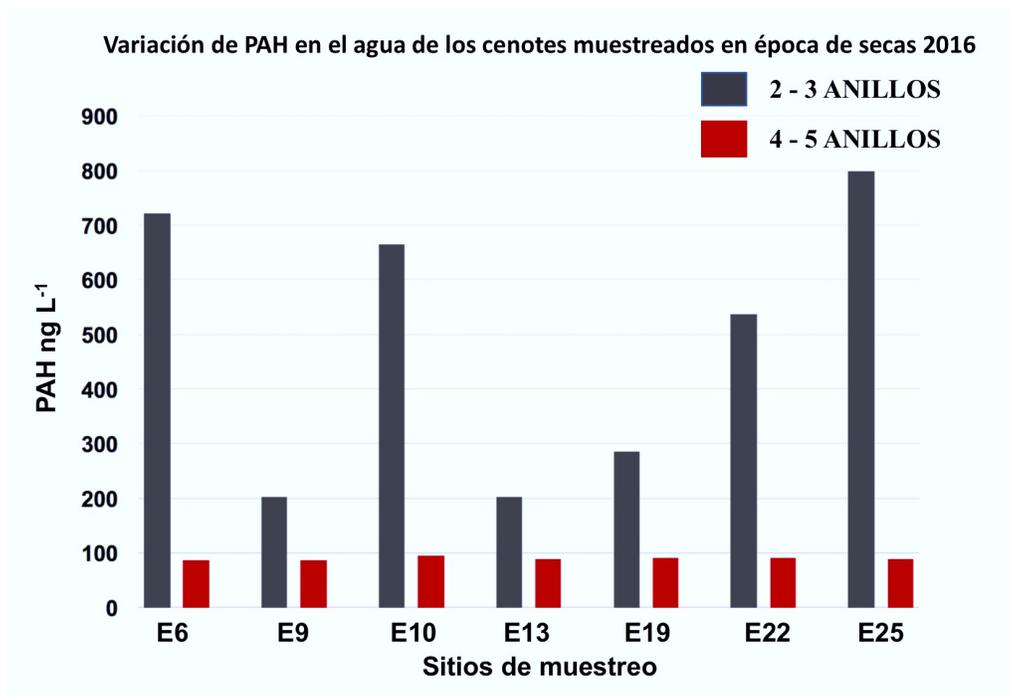


Figura 61. Gráfica de la variación espacio-temporal de PAH en la zona de estudio muestreada en mayo 2016.

## CORRELACIÓN ENTRE LOS GENES BIOMARCADORES Y METALES EN PESADOS DETECTADOS EN AGUA

**CADMIO.** Se encontró que todas las concentraciones de cadmio encontrados en los sitios de muestreo estuvieron por debajo del límite permitido por la Ley Federal de Derechos Conagua 2016 y la NOM-001-SERMARNAT-1996 que es  $100 \mu\text{g L}^{-1}$  (Figura 62).

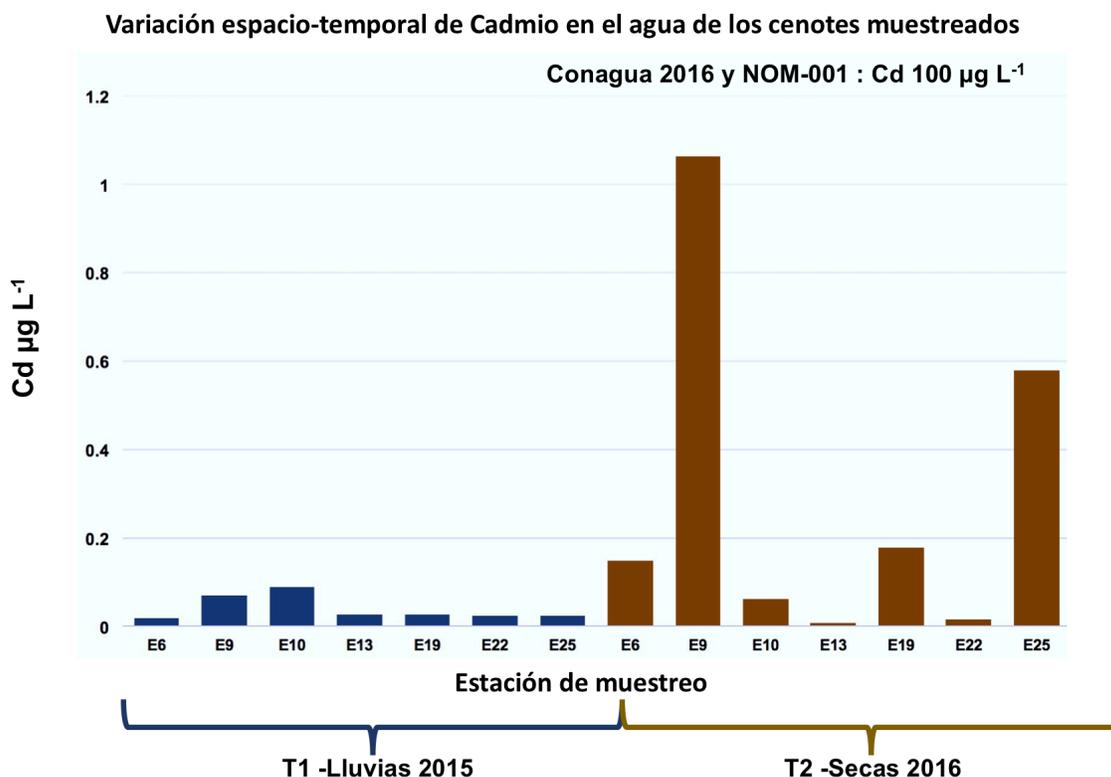


Figura 62. Gráfica de la variación espacio-temporal del cadmio en agua de los cenotes muestreados en el proyecto Papiit IA101914.

En la temporada de secas los peces hembras presentaron correlación (Tabla 32) entre el cadmio y la expresión de CYP1A, así como con MT ( $r=0.6119$  -  $p$ -valor =  $0.0008$  y  $r= 0.5319$  -  $p$ -valor =  $0.0051$ , respectivamente); en VTG de las hembras se encontró una correlación negativa ( $r= -0.4619$  y  $p$ -valor=  $0.0175$ ). Esto sugiere que el Cadmio podría tener relación con el aumento de la expresión de CYP1A, ya que el  $\text{Cd}^{+2}$  es capaz de inducir la expresión ARNm de CYP1A, y a bajas concentraciones de  $\text{Cd}^{+2}$  menor es la formación de ROS que inhiban la transcripción de CYP1A (Elbekai y El-Kadi 2005; 2007; Aposhian et al., 2004), la concentración detectada de Cd no respresenta un riesgo alguno para los sitios muestreado ya que en el estudio de Arroyo-Silva

(2017) no se encontró lipoperoxidación causado por nitrógeno reactivo de la proteína CYP1A producido indirectamente por las ROS inducidas por metal.

de esta forma esta explicación es congruente con los resultados obtenidos en la correlación entre CYP1A y Cadmio ( $r=0.6119$ ;  $p\text{-valor} = 0.0008$ ), esto concuerda con las concentraciones de cadmio reportadas en los sitios de muestro donde en ninguna estación se encontró una concentración de Cadmio  $> 1.2 \mu\text{g/L}$ , sin embargo con los estudios realizados no es posible dictaminar que la expresión de CYP1A sea únicamente debido a la presencia del cadmio, en el caso de los machos no se encontró correlación entre el cadmio y la expresión de CYP1A (Tabla 32). Se recomienda realizar bioensayos para corroborar este efecto en *Gambusia yucatanana*.

El incremento en la expresión de MT puede estar relacionado con la presencia del cadmio. La expresión de MT puede incrementar en presencia de cadmio, en diversos tipos celulares se ha demostrado que el Cd induce la expresión de la MT-I, una isoforma de MT (Urani et al., 2007; Nzengue et al., 2009; Banni et al., 2010), la cual está asociada con un mecanismo de resistencia (Honda et al., 2010). La expresión de la MT, puede estar regulada en parte por el factor de transcripción-1 que responde a metales (MTF-1). Zhang et al., (2012), determinaron que el Cd induce un incremento en los niveles de Zn en hígado y riñón que se correlaciona con la expresión del mRNA y la síntesis de la MT, dándole al Zn un papel positivo. El Zn interacciona con el factor de transcripción MTF-1 formando un complejo que se une a elementos de MRE (elementos de respuesta a metal) o ARE (elemento de respuesta a antioxidantes) en la región promotora del gen de la MT para inducir su expresión. Específicamente, el cadmio promueve la expresión de metalotioneínas, por lo cual la célula puede sufrir apoptosis o necrosis (Rana, 2008).

Por otra parte, se encontró que VTG tuvo una correlación negativa con hembras (Tabla 32) de la época de secas, esto puede ser probable debido a que en varios estudios demuestran que la exposición crónica del cadmio da como resultado una menor fecundidad y disminución del éxito reproductivo en general (Benoite. 1976; Sephar y Brewer, 1976) el Cd es conocido como disruptor endócrino que afecta la síntesis y/regulación de varias hormonas (Henson y Chedrese, 2004; Darbre, 2006)], la inhibición de la síntesis de VTG después de la exposición al cadmio parece estar a nivel de la transcripción ya que se produce muy poco a ningún mRNA de VTG (Olsson et al. 1995), además se conoce que el cadmio (y el plomo) afectan funciones endocrinas, mediante el bloqueo de acuaporina y la interferencia con las funciones esenciales de cationes tales como el magnesio y el zinc (Ciesielski et al., 2012; Flora et al., 2012; Matoviç et al., 2011; Fowler, 2009), sin embargo, en peces macho la correlación encontrada (Tabla 31) es positiva

( $r=0.3479962$  y  $p$ -valor  $0.02221$ ), asimismo no se encontraron reportes que relacione inducción de VTG en peces macho, por lo que es probable que esto sea un artefacto del método.

**Plomo.** La figura 63 muestra que las concentraciones de Pb detectadas en los sitios de muestreo están abajo del límite permitido por la Ley Federal de Derechos Conagua 2016 y la NOM-001-SERMARNAT-1996 que es  $200 \mu\text{g L}^{-1}$ . En época de lluvias se reportó una concentración más alta de Pb que en secas. La concentración de plomo detectada tuvo correlación en peces hembra de la época de secas con respecto a MT ( $r= 0.4804$  y  $p$ -valor =  $0.0129$ ) y con CYP1A ( $r= 0.4431$  y  $p$ -valor =  $0.0233$ ) (Tabla 32).

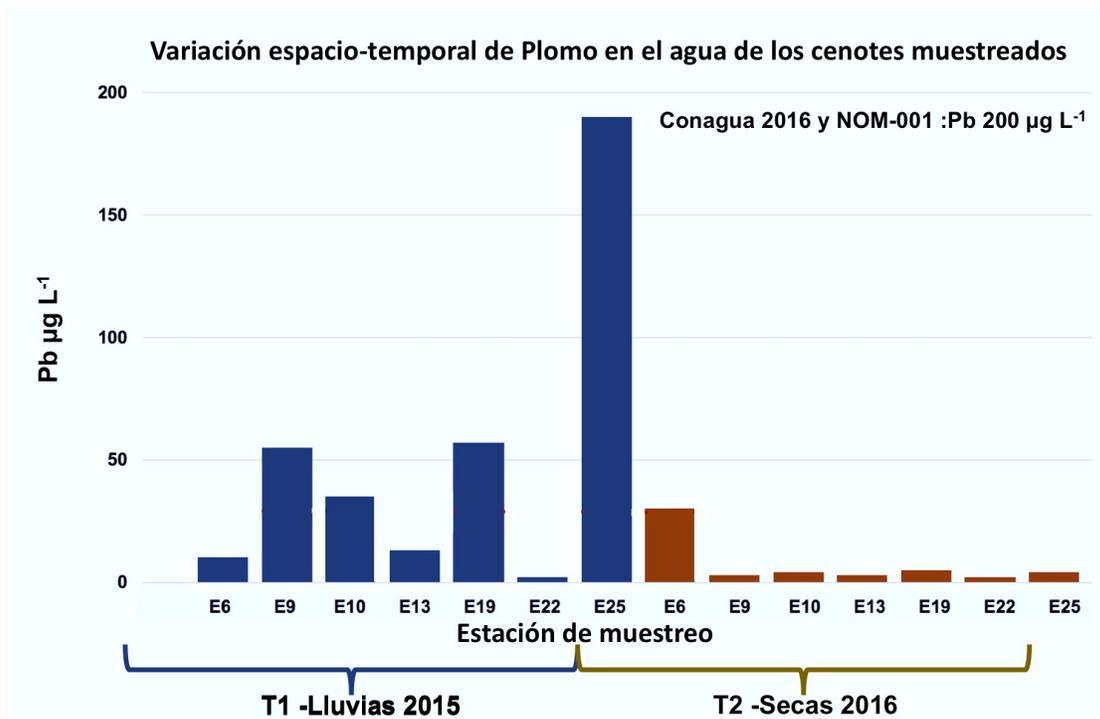


Figura 63. Gráfica de la variación espacio-temporal de plomo en agua de los cenotes muestreados en el proyecto Papiit IA101914.

A pesar de que los valores de Pb detectados fueron más altos en época de lluvias no se encontró correlación con respecto a la expresión de CYP1A, MT o VTG (Tablas 31 y 32), esto puede significar no había suficiente cantidad de Pb que cause una respuesta en estos genes o que no se encontraba en fracciones biodisponibles, ya que la toxicidad de los metales no depende sólo de su concentración, sino también de su movilidad y reactividad con otros componentes del ecosistema (Abollino et al., 2002) además un factor importante que gobierna la movilidad, toxicidad y biodisponibilidad de los metales pesados es su especiación (Buatier et al., 2001).

**Níquel.** Las concentraciones de Níquel detectadas durante la época de lluvias y secas en los sitios de muestreo (Figura 64) están por debajo del límite máximo establecido por la Ley Federal de Derechos Conagua 2016 y Norma Oficial Mexicana NOM-001-SERMARNAT-1996 que es de  $2000 \mu\text{g L}^{-1}$  como Promedio Mensual (P.M).

Se encontró correlación entre la cantidad de Ni y los genes biomarcadores MT y CYP1A en machos y hembras de la época de secas (Tablas 31 y 32) en machos ( $r= 0.3849$  y  $p\text{-valor} = 0.0118$ ;  $r= 0.5168$  y  $p\text{-valor} = 0.0003$ , MT y CYP1A respectivamente) en hembras ( $r= 0.4968$  y  $p\text{-valor} = 0.0098$ ;  $r= 0.6534$  y  $p\text{-valor} = 0.0002$ , MT y CYP1A respectivamente). Sin embargo, se observa que los valores más elevados corresponden a los sitios de muestreo de la estación 22 y 25 de la época de secas.

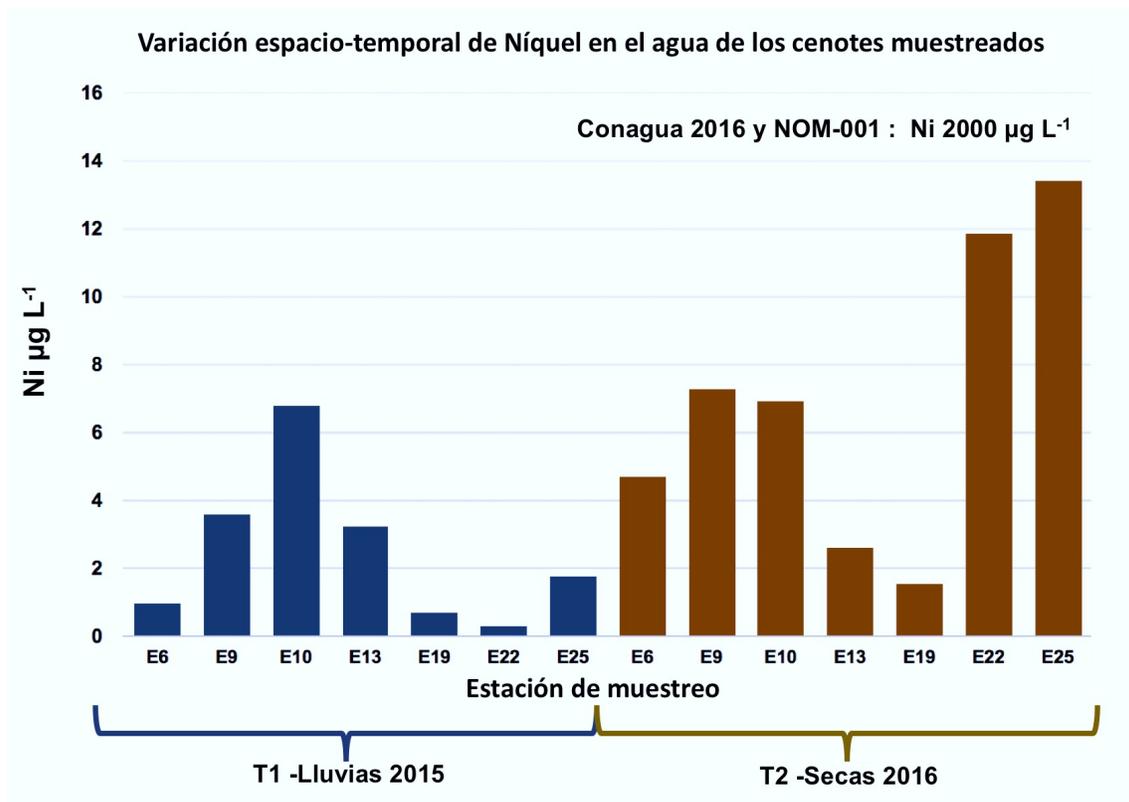


Figura 64. Gráfica de la variación espacio-temporal de níquel en agua de los cenotes muestreados en el proyecto Papiit IA101914.

En la figura 64 se observa una mayor abundancia de níquel en época de secas, la correlación positiva encontrada con MT puede indicar un aumento en el transporte de la fracción soluble del níquel al interior de las células mientras que las correlaciones positivas de CYP1A con respecto al Níquel sugiere que aún no existe un problema evidente por la presencia de este metal en los cuerpos de agua, debido a que el  $\text{Ni}^{2+}$  en exceso causa una disminución de la transcripción de

CYP1A1 (Chan et al, 1999; Park H.,1999). Las partículas de tamaño de micras en compuestos de níquel son poco solubles y se conocen pocos efectos tóxicos con excepción del níquel metálico  $\text{Ni}^{2+}$  (Pietruska et al. ,2011) que es capaz de imitar la hipoxia, lo que puede conducir a la activación de algunas vías de señalización que produce eventualmente la alteración de la expresión génica y del metabolismo celular, y como consecuencia la génesis de toxicidad reproductiva y carcinogénesis (Forgacs et al., 2012; Freitas et al. 2013; Schwerdtle y Hartwig, 2006; Seo et al., 2005; Barchowsky y O'Hara, 2003).

**Cobre.** Se encontró que todas las concentraciones de cobre encontrados en los sitios de muestreo (Figura 65) estuvieron por debajo del límite permitido por la Ley Federal de Derechos Conagua 2016 y la NOM-001-SERMARNAT-1996 que es  $4000 \mu\text{g L}^{-1}$ .

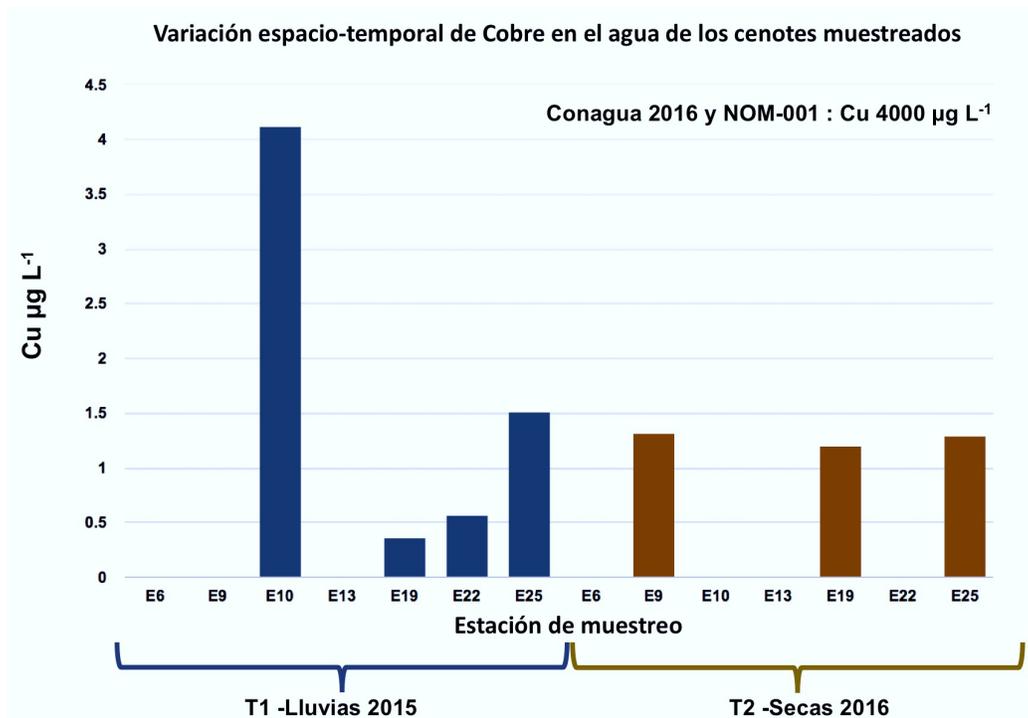


Figura 65. Gráfica de la variación espacio-temporal de Cobre en agua de los cenotes muestreados en el proyecto Papiit IA101914.

Las concentraciones de  $\text{Cu}^{2+}$  reportadas presentaron correlación con del gen CYP1A en peces hembras y macho de la época de lluvias ( $r= 0.4533$ ,  $p\text{-valor} = 0.0153$  y  $r= 0.4905$ ,  $p\text{-valor} = 0.0020$ , hembras y machos respectivamente) véase tablas 31 y 32 ; en hígado de peces como *Trematomus bernacchii* y *Morone saxatilis* se encontró que los niveles de transcripción CYP1A1 pueden no verse afectados o pueden incrementar en presencia de  $\text{Cu}^{2+}$  (Benedetti M, et al. 2007; Geist et al. 2007) ; en células HepG2,  $\text{Cu}^{2+}$  fue capaz de aumentar el mRNA de CYP1A1 de manera dependiente a la dosis y el tiempo (Song y Freedman, 2005), en las células Hepa 1c1c7, el mRNA Cyp1a1 es inducido por  $\text{Cu}^{2+}$ , pero sólo a dosis bajas (Korashy y El-Kadi, 2004); asimismo  $\text{Cu}^{2+}$  puede incrementar la producción de ROS (Anwar-Mohamed et al., 2009). Aunque la presencia de  $\text{Cu}^{2+}$  no altere el nivel de transcripción, ni la estabilidad del mRNA en CYP1A1, su actividad catalítica puede disminuir, por tanto, la inducción de CYP1A1 por medio de metales como  $\text{Cu}^{2+}$  no necesariamente significa un aumento de la función catalítica de CYP1A1.

## CORRELACIÓN ENTRE GENES BIOMARCADORES Y PLAGUICIDAS ORGANOFOSFORADOS

Se detectaron concentraciones de Clorpirifos tanto en agua como en sedimentos de las dos temporadas; en la temporada de secas fueron detectadas concentraciones bajas de otros plaguicidas OF en sedimentos como diazinon, metil paratión, malatión, paratión etión, pero no presentaron correlación con ninguno de los genes biomarcadores

**Clorpirifos.** En época de lluvias, Clorpirifos presentó correlación con VTG en peces machos ( $r=0.3942$  y  $p\text{-valor} = 0.0157$ ) y en época de secas presentó correlación en peces hembras con los genes biomarcadores CYP1A y MT ( $r= 0.5731$  y  $p\text{-valor} = 0.002$ ;  $r= 0.5671$  y  $p\text{-valor} = 0.0025$ , respectivamente) pero también se encontró que VTG tuvo una correlación negativa ( $r = -0.6197$  y  $p\text{-valor} = 0.0007$ ) (tabla 31). En la figura 66 se puede observar que en el sitio de muestreo E10 se detectaron cantidades similares de Clorpirifos, así como en la época de secas, Clorpirifos fue encontrado en más cuerpos de agua.

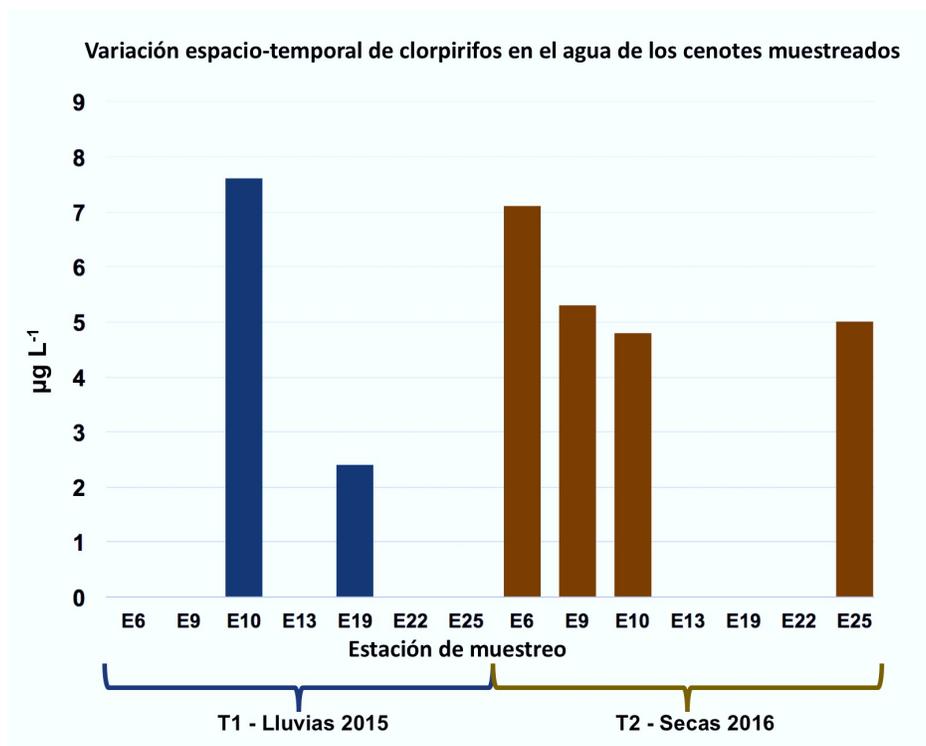


Figura 66. Gráfica de la variación espacio-temporal de Clorpirifos en sedimentos de los cenotes muestreados en el proyecto Papiit IA200214.

Algunas investigaciones previas sugieren un probable efecto disruptor endocrino (DE) del Clorpirifos en los peces (De Silva y Samayawardhena, 2005; Aranzazu et al. 2012), a pesar de que en temporada de lluvias los peces machos hayan presentado una baja correlación con VTG no se encontraron reportes que Clorpirifos induzca el gen VTG en peces macho; sin embargo en temporada de secas los peces hembra presentaron correlación negativa con VTG; Aranzazu et al. (2012) encontraron que a cantidades crecientes de Clorpirifos (4, 8 y 12  $\mu\text{g L}^{-1}$ ) puede observarse un efecto antiestrógeno que podría deberse a que las concentraciones experimentales de Clorpirifos saturaron los receptores de estrógeno (RE) inhibiendo la síntesis de VTG o a que el Clorpirifos se une a los RE produciendo una alteración conformacional que aunque permite la dimerización del receptor y la unión al contrareceptor falla en activar la transcripción o a que el Clorpirifos no activa los RE si no que cause bloqueo en la síntesis de la proteína y actúe como antagonista (Lazier et al., 1996; Park et al., 2007). Es importante tener presente que la sensibilidad de las diversas especies acuáticas al Clorpirifos es muy variable, (Giesy et al., 1999) y los escasos estudios que se han realizado a nivel mundial para determinar sus efectos en peces, se han focalizado en la intoxicación aguda en larvas de tilapia (Gul, 2005) y guppy (De Silva y Samayawardhena, 2005; Mahmut et al., 2005).

En la temporada 2 las hembras tuvieron una correlación intermedia con CYP1A y MT (Tabla 33), pocos son los estudios que expliquen como Clorpirifos esté relacionado con la inducción de CYP1A, al respecto Aragon et al., (2003) encontraron que CYP1A tuvo una inducción significativa en tilapia del Nilo después de su exposición a clorpirifos incluso diez días después del período de tratamiento, no se encontraron reportes que expliquen como clorpirifos se relaciona con la inducción de metalotioneínas.

En los sedimentos de la temporada 1 se encontró en peces macho una correlación intermedia con respecto a MT (Tabla 31).

Tabla 31. Matriz de correlación de Spearman entre genes biomarcadores en peces machos y plaguicidas organoclorados en agua y sedimentos.

Machos	Genes biomarcadores					
	CYP1A		MT		VTG	
	T1	T2	T1	T2	T1	T2
<b>Contaminantes en agua</b>						
<b>Plaguicidas organoclorados</b>						
HCHs						
Clordanos						
Aldrín, dieldrín y endrín						
Endosulfanes						
DDTs						
Metoxicloro						
<b>PAHs</b>						
2-3 anillos						
4-5 anillos						
<b>Plaguicida organofosforado</b>						
Clorpirifos						
<b>Metales</b>						
Cadmio						
Plomo						
Níquel						
Cobre						
<b>Contaminantes en sedimento</b>						
<b>Plaguicidas organoclorados</b>						
HCHs						
Clordanos						
Aldrín, dieldrín y endrín						
Endosulfanes						
DDTs						
Metoxicloro						
<b>Plaguicida organofosforado</b>						
Clorpirifos						

Valor de la correlación "r"	
Rango por color	
	1.00
	0.90
	0.80
	0.70
	0.60
	0.50
	0.40
	0.30
	0.20
	0.10
	N/C
	-0.10
	-0.20
	-0.30
	-0.40
	-0.50
	-0.60

Tabla 32. Matriz de correlación de Spearman entre genes biomarcadores en peces hembras y plaguicidas organoclorados en agua y sedimentos.

Hembras	Genes biomarcadores					
	CYP1A		MT		VTG	
	T1	T2	T1	T2	T1	T2
<b>Contaminantes en agua</b>						
<b>Plaguicidas organoclorados</b>						
HCHs						
Clordanos						
Aldrín, dieldrín y endrín						
Endosulfanes						
DDTs						
Metoxicloro						
<b>PAHs</b>						
2-3 anillos						
4-5 anillos						
<b>Plaguicida organofosforado</b>						
Clorpirifos						
<b>Metales</b>						
Cadmio						
Plomo						
Níquel						
Cobre						
<b>Contaminantes en sedimento</b>						
<b>Plaguicidas organoclorados</b>						
HCHs						
Clordanos						
Aldrín, dieldrín y endrín						
Endosulfanes						
DDTs						
Metoxicloro						
<b>Plaguicida organofosforado</b>						
Clorpirifos						

Valor de la correlación "r"	
Rango por color	
	1.00
	0.90
	0.80
	0.70
	0.60
	0.50
	0.40
	0.30
	0.20
	0.10
	N/C
	-0.10
	-0.20
	-0.30
	-0.40
	-0.50
	-0.60

## Discusión General

- Es necesario resaltar que los biomarcadores permiten evaluar únicamente una pequeña parte de la gran complejidad de todos los compuestos químicos que existen en el ambiente (Rendón-von Ostén 2005), y que por cada contaminante encontrado pueden haber dos o más que no fueron medidos, por otra parte las mezclas de plaguicidas con otros contaminantes presentes pueden modificar la respuesta medida de los biomarcadores, además los diversos factores ambientales influyen en su biodisponibilidad y transporte.
- Aunque algunos contaminantes no tengan efecto a corto plazo se ha demostrado que concentraciones bajas de plaguicidas como endosulfan, dieldrin, DDT y lindano (gamma-HCH) tienen efectos a nivel reproductivo tanto en la vida silvestre como en el ser humano (Colborn et al. 1993; Toft et al. 2004).

# 10. CONCLUSIONES

## CON RESPECTO A LA METODOLOGIA

- De acuerdo con los programas BestKeeper, GeNorm y RefFinder,  $\beta$  –Actina fue el gen de referencia con mayor estabilidad, sin embargo, su expresión relativa presentó diferencias al ser evaluada con distintos genes de referencia de manera individual, por esto es importante utilizar múltiples genes de referencia de manera simultánea para disminuir la variabilidad entre resultados, ya que evaluar con respecto a un sólo gen de referencia puede generar una interpretación errónea de los mismos.
- El método de expresión relativa elegido fue el de la media geométrica de múltiples genes de referencia. Los resultados obtenidos de la expresión relativa de los genes aparentemente son acordes con la concentración de contaminantes detectados en los cuerpos de agua.

## CON RESPECTO A LOS RESULTADOS

### Expresión Relativa de CYP1A

- En machos las estaciones que presentaron diferencias con respecto al control fueron E25 en ambas temporadas y E22 en secas. En ambas estaciones se observa una ligera sobreexpresión de CYP1A.
- En hembras sólo la estación 13 en temporada de secas presentó diferencias con respecto al control, sin embargo, su expresión esta por debajo del valor de 1, por lo que se considera una subexpresión de CYP1A.
- Se recomienda continuar el monitoreo priorizando los cenotes E22 y E25 que pertenecen a zonas ganaderas y de cultivo de pastos, así como E13 que tiene una alta actividad turística.
- En general las correlaciones encontradas entre la expresión de CYP1A y los contaminantes fueron más altas en hembras que en machos.

### Expresión Relativa de MT

- En machos las estaciones que presentaron diferencias con respecto al control fueron E22 y E25 en secas. En ambas estaciones se observa una ligera sobreexpresión de MT.

- En hembras E6 presentó diferencias con respecto al control en ambas temporadas.
- Se recomienda continuar el monitoreo priorizando los cenotes E6, E22 y E25 que pertenecen a ranchos ganaderos.
- Las correlaciones encontradas entre la expresión de MT y los contaminantes fueron más altas en hembras que en machos.

### **Expresión relativa de VTG**

- El hecho que *Gambusia yucatanana* presente VTG arriba del estado basal es una evidencia clave de compuestos con capacidad estrógena en el medio acuático.
- En machos sólo en temporada de secas se encontraron diferencias con respecto al control en las estaciones E9, E19 y E25.

### **Contaminantes detectados**

- Con base a los resultados obtenidos, la respuesta en el grado de expresión de los genes biomarcadores parece ser acorde la concentración detectada de contaminantes.
- El único contaminante en agua que rebasó los límites permitidos en los sitios de muestreo fue endrín en las estaciones 6,9 y 19 durante la época de lluvias y E22 en secas.
- En sedimentos ningún contaminante rebasó los límites de concentración permitidos.

### **Recomendación**

En futuros proyectos de investigación se sugiere realizar bioensayos con diversos contaminantes a concentraciones conocidas con organismos control para poder establecer relaciones [concentración- efecto] así como [causa -efecto] con respecto a la expresión relativa de los genes biomarcadores, utilizando también análisis multifactoriales (por ejemplo componentes principales) junto con un análisis integral de biomarcadores (IBR), debido que los resultados obtenidos responden a una combinación de factores.

Se recomienda complementar los futuros estudios con histología de las gónadas para saber con certeza el estadio reproductivo en el que se encuentran para poder determinar si las hembras presentan vitelogénesis temprana o tardía y los machos están en espermatogénesis, determinar en que épocas del año desovan y si son desovadores parciales o totales.

Realizar un seguimiento en poblaciones silvestres a través del tiempo con fines comparativos y de monitoreo.

# LITERATURA CITADA

## A

- Adam, S. A. 1999. Transport pathways of macromolecules between the nucleus and the cytoplasm. *Curr Opin Cell Biol* 11(3): 402-406.
- Abdel-Moneim A.; Mahapatra, C.T.; Hatf A.; Sepúlveda, M. S. 2015. Ovarian structure protein 1: a sensitive molecular biomarker of gonadal intersex in female Japanese medaka after androgen exposure. *Environ. Toxicol. Chem.* 2015; 34(9): 2087-2094.
- ATSDR. 2005. Agencia para Sustancias Tóxicas y el Registro de Enfermedades. *Reseña Toxicológica del Alfa-, Beta-, Gama- y Delta-Hexaclorociclohexano (versión actualizada)* (en inglés). Atlanta, GA: Departamento de Salud y Servicios Humanos de EE. UU., Servicio de Salud Pública.
- ATSDR. 2002. Agencia para Sustancias Tóxicas y el Registro de Enfermedades. *Reseña Toxicológica del Aldrín/Dieldrín (edición actualizada)* (en inglés). Atlanta, GA: Departamento de Salud y Servicios Humanos de EE. UU., Servicio de Salud Pública.
- ATSDR. 2002. Agencia para Sustancias Tóxicas y el Registro de Enfermedades. 2002. *Reseña Toxicológica de los DDT, DDE y DDD* (en inglés). Atlanta, GA: Departamento de Salud y Servicios Humanos de EE. UU., Servicio de Salud Pública.
- Agilent Technologies. 2012. FICHA DE INFORMAÇÕES DE SEGURANÇA DE PRODUTOS QUÍMICOS Organochlorine Pesticides Mixture, Part Number 8500-5926 Conforme Regulamento ABNT NBR 14725-4:2012
- Albergoni, V., Piccinni E. 1998. Copper and zinc metallothioneins. In: Rainsford KD, Milanino R, Sorenson JRJ, Velo GP (eds) *Copper and zinc in inflammation and degenerative diseases*. Kluwer Academic, London, pp 61–78
- Allen, Y., Scott A.P., Matthiessen P., Haworth S., Thain J.E. y Feist. S. 1999. Survey of estrogenic activity in United Kingdom estuarine and coastal waters and its effects on gonadal development of the flounder *Platichthys flesus*. *Environmental Toxicology and Chemistry*. 18(8):1791-1800.
- Allner, B., Wegner G., Knacher T., y Stahlsmidt-Allner P. 1999. Electrophoretic determination, of estrogen induced protein in fish exposed to synthetic and naturally occurring chemicals. *The Science of the total Environment* 233:21-31., México. *Marine Turtle Newsletter*. 92:4-7.
- Aragon, M.G.R., Ocampo P.P., Alviola P.L. III. and Lontoc, B.M. 2003. Cytochrome P450 induction, hematological changes and melanomacrophage accumulation in Nile Tilapia (*Oreochromis niloticus* Linn.) after exposure to chlorpyrifos. *Philippines Univ. Los Banos, College, Laguna (Philippines). PHILIPPINE ENTOMOLOGIST Animal Biology Div* ISSN: 0048-3753.
- Arango S.S. (2011). Biomarcadores para la evaluación de riesgo en la salud humana. *Rev. Fac. Nac. Salud Pública* 2011; 30(1): 75-82
- Arroyo-Silva, A. 2017. Biomarcadores en músculo de *Gambusia yucatanana* para la evaluación de la contaminación por hidrocarburos aromáticos policíclicos, en cuerpos de agua de Yucatán, México. Universidad Nacional Autónoma de México, Unidad de Química en Sisal. Tesis de Maestría.
- Arcand, L.D.; Benson, W. H. 2009. Fish reproduction: An ecologically relevant indicator of endocrine disruption. *Environmental Toxicology and Chemistry*. Volume 17, Issue 1. Doi.org/10.1002/etc.5620170108
- Andrews, G. K. 2000. Regulation of metallothionein gene expression by oxidative stress and metal ions. *Biochem Pharmacol*, 59:95- 04.
- Aposhian, H.V., Zakharyan, R.A., Avram, M.D., Sampayo-Reyes, A., & Wollenberg, M.L., 2004. A review of the enzymology of arsenic metabolism and a new potential role of hydrogen peroxide in the detoxication of the trivalent arsenic species. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 198, 327–335.
- Aranzazu, D.A., Rodríguez B. de J., Vieco, B., Restrepo, L.F. Efecto del Clorpirifos 0,0–dietil 0–(3, 5, 6–triclora–2–piridil fosforotioato) en machos juveniles de tilapia (*Oreochromis spp*). *Rev Colomb Cienc Pecu* 2012; 25:276–291.
- Ariyoshi, T., Hasegawa H., Nanri Y. & Arizono, K. (1990) "Profile of hemoproteins and heme-metabolizing enzymes in rats treated with surfactants". *Bulletin of Environmental Contamination & Toxicology*. 44: 369-76.
- Agarwal, S. K. 2009. *Heavy Metal Pollution*. APH Publishing. 270 p.
- Anwar-Mohamed A., Elbekai R.H. & El-Kadi, A.O. 2009. Regulation of CYP1A1 by heavy metals and consequences for drug metabolism. *Expert opinion on drug metabolism & toxicology*. 5. 501-21. 10.1517/17425250902918302.

Au, D.W.T. 2004. The application of histocytopathological biomarkers in marine pollution monitoring: a review. *Marine Pollution Bulletin*, 48:817-834.

## B

Bacchetta, C. 2013. Toxicidad y efectos fisiológicos del insecticida endosulfan en peces neotropicales. Facultad de Bioquímica y Ciencias Biológicas. Universidad Nacional del Litoral. Argentina. Tesis doctoral.

Banni, M., Messaoudi, I., Said, L., El Heni, J., Kerkeni, A., Said, K. 2010. Metallothionein gene expression in liver of rats exposed to cadmium and supplemented with zinc and selenium. *Arch Environ Contam Toxicol*. 59(3):513-519.

Barchowsky A. & O'Hara K.A. 2003. Metal-induced cell signaling and gene activation in lung diseases. *Free Rad. Biol. Med*. 2003;34:1130-1135.

Barton, B.A., Morgan, J.D., & Vijayan, M.M. 2002. Physiological and Condition-Related Indicators of Environmental Stress in Fish. En S. M. Adams, (Ed.), *Biological indicators of aquatic ecosystems stress*. (pp. 111-148). Maryland, USA: American Fisheries Society.

Bayne, B.L., Livingstone, D.R., Moore, M. N., & Widdows, J. 1976. A Cytochemical and Biochemical Index of Stress in *Mytilus edulis*. *Marine Pollution Bulletin*, 7, 221-224.

Bayne, B. L., Brown, D. A., Burns, K., Dixon, D. R., Ivanovici, A., Livingstone, D. R., Lowe, D. M., Moore, M. N., Stebbing, A. & Widdows, J. 1985. *The Effects of Stress and Pollution on Marine Animals*. Praeger, Greenwood Press. 384p.

Baynes J & Dominiczak M. 2006 *BIOQUÍMICA MÉDICA* 2ª edición. Editorial El Servier

Bedoya Soto, J.M. 2009. Propuesta Metodológica para el Manejo de Acuíferos Costeros: El Problema de la Intrusión Salina. Medellín, Colombia.

Beliaeff, B. & T. Burgeot. 2002. Integrated biomarker response: a useful tool for ecological risk assessment. *Environmental Toxicology Chemistry*, 21: 1316-1322.

Benedetti M., Martuccio G. & Fattorini D, et al. 2007. Oxidative and modulatory effects of trace metals on metabolism of polycyclic aromatic hydrocarbons in the Antarctic fish *Trematomus bernacchii*. *Aquatic Toxicol* 2007;85(3):167-75.

Benoit, D. A., Leonard, E. N., Christensen, G. M. & Fiandt, J. T. 1976. *Trans. Am. Fish. Soc.*4,550-560

Berger, B., Dallinger, R. & Thomaser, A. 1995. "Quantification of metallothionein as a biomarker for

cadmium exposure in terrestrial gastropods". *Environ Toxicol Chem*. 14: 781-91

Bergeron S.E., Zhu, M., Thiem, S.M., Friderici, K.H. & Rubenstein P.A .2010. Ion-dependent polymerization differences between mammalian beta- and gamma-nonmuscle actin isoforms. *J Biol Chem* 285:16087-16095.

Beyer, J., Sandvik, M., Skare, J.U., Egaas, E., Hylland, K., Waagbo, R. & Goksoyr, A. 1997. "Time- and dose-dependent biomarker responses in flounder (*Platichthys flesus*) exposed to benzo". *Biomarkers*. 2: 35-44.

Bogdan, C., 2001. Nitric oxide and the regulation of gene expression. *Trends Cell Biol*. 11, 66-75.

Branco, S. 1984. *Limnología sanitaria, estudio de la polución de aguas continentales*. Secretaría General de la Organización de los Estados Americanos. Programa Regional de Desarrollo Científico y Tecnológico. Washington, D.C. 115p.

Brasfield S.M., Weber L.P., Talent, L.G. & Janz, D.M., 2002. Dose-response and time course relationships for vitellogen induction in male Fence lizards (*Sceloporus occidentalis*) exposed to ethinylestradiol. *Environmental of Toxicology and Chemistry*. 21(7):1410-1416.

Brouwer, M., Whaling, P. & Engel D.W. 1986. Copper-MT in the American lobster: Potential role of Cu(I) donors to apohemocyanin. *Env.Health Persp.*, 65:93- 100

Brouwer, M. & T.H. Brouwer 1998. Biochemical defense mechanisms against copper-induced oxidative damage in the blue crab, *Callinectes sapidus*. *Arch.Biochem. Biophys.*, 351(2):257-264

Brown- Peterson, N. & Peterson, M.S. 1990. Comparative life history of female mosquitofish *Gambusia affinis*, in tidal freshwater oligohaline habitats. *Env. Biol. Fish.* 27, 33-41.

Brüschweiler, B.J., Würzler, F.E. & Fent, K. 1996. Inhibitory effects of heavy metals on cytochrome P4501A induction in permanent fish hepatoma cells. *Arch Environ Con Tox* 31:475-482.

Bunnell, T.M., Burbach, B. J., Shimizu, Y. & Ervasti, J. M. 2011. B-Actin specifically controls cell growth, migration, and the G-Actin pool. *Mol. Biol. Cell* November 1, 2011 vol. 22 no. 21 4047-4058.

## C

- Calaza-Martínez P. & Iglesias-Díaz M.I. 2016. El riesgo del arbolado urbano. Contexto, concepto y evaluación. Ediciones Paraninfo, S.A., 2016 - pp.143 y 144. ISBN: 978-84-8476-635-3.
- Cardwell, R.D. et al. 1977. Acute and chronic toxicity of chlordane to fish and invertebrates. EPA 600/3-77-019. EPA Ecology Research. Service, U.S. Environment. Protection Agency, Duluth, Minnesota. En: U.S. Environmental Protection Agency. 1985. Ambient water quality criteria for chlordane-1980. Washington DC. EPA 440/5-80-027.
- Carnevali, O. & Beldevere, P. 1991. Comparative studies of fish amphibian and reptilian vitellogenesis. *The Journal of Experimental Zoology*. 259:18-25.
- Colburn T, Clement C, eds. Chemically-induced Alterations in Sexual and Functional Development: The Wildlife/Human Connection. Princeton, NJ: Princeton Scientific Publishing, 1992.
- Carter, H. J. 1981. Aspects of the physiological ecology of species of *Gambusia* from Belize, Central America. *Copeia* 1981, 694-700.
- Carlson, M.A., Haddad, B.G., Weis, A.J., Blackwood C.S., Shelton C.D., Wuerth, M.E., Walter J.D., & Spiegel, P.C. 2017. Ribosomal protein L7/L12 is required for GTPase translation factors EF-G, RF3, and IF2 to bind in their GTP state to 70S ribosomes. *The FEBS Journal*, 284, 1631-1643.
- Carver, L. A. & Bradfield, C. A. 1997. Ligand-dependent interaction of the aryl hydrocarbon receptor with a novel immunophilin homolog in vivo. *J Biol Chem* 272(17): 11452-11456.
- Castañó, A., Carbonell, G., Carballo, M., Fernandez, C., Boleas, S. & Tarazona, J.V. 1998. "Sublethal effects of repeated intraperitoneal cadmium injections on rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*)". *Ecotoxicology & Environmental Safety*. 41: 29-35.
- Chambers, J.E., Boone, J.S., Carr, R.L., Chambers, H.W., & Strauss, D.L., 2002. Biomarkers as predictors in health and ecological risk assessment. *Human Ecological Risk Assessment* 8 (1), 165e176.
- Chan, W.K., Yao G., Gu Y.Z., & Bradfield C.A. (1999). Cross-talk between the Aryl Hydrocarbon receptor and hypoxia inducible factor signaling pathways demonstration of competition and compensation *J. Biol. Chem.*, 274(17), 12115-12123.
- Cheek, A.O., Brouwer T.H., Carrol S., Manning S., McLachlan J.A., & Brouwer M. 2001. Experimental evaluation of vitellogenin as a predictive biomarker for reproductive disruption. *Environmental Health Perspectives*. 109(7): 681-690
- Chen, H. B., Davidson, T. L., Li, Q., Ke, Q. D., & Costa, M. 2006. Molecular mechanisms of nickel toxicity and carcinogenicity. *Metal Ions in Medicine and Biology*, 9, 391-395.
- Chiaverini, N. & De, L.M. 2010 Protective effect of metallothionein on oxidative stress-induced DNA damage. *Free Radic.Res.* 44: 605-613.
- Ciesielski, T., Weuve, J. & Bellinger, D.C. 2012. Cadmium exposure and neurodevelopmental outcomes in U.S. children. *Environ Health Perspect* 120: 758-763.
- Coen, W., Robbens, J., & Janssen, C. 2006. Ecological impact assessment of metallurgic effluents using in situ biomarker assays. *Environmental Pollution*, 141, 283-294.
- Constantz, G. D. 1989. Reproductive biology of poeciliid fishes. En: Ecology and evolution of livebearing fishes. G. Meffe y F. Snelson (eds.). *Englewood Cliffs*, NY: Prentice Hall. Inc. Pp. 33-50.
- Coon, M.J., Ding, X., Pernecky, S.J., Vaz ADN. Cytochrome P450: progress and predictions. *FASEB J* 1992; 6: 669-73.
- Cosson, R.P. 1994 "Heavy metal intracellular balance and relationship with metallothionein induction in the gills of carp - after contamination by Ag, Cd, and Hg following pretreatment with Zn or not". *Biol Tr Elem Res.* 46: 229-45.
- Costa, P.M., Caeiro, S., Diniz, M.S. et al. *Ecotoxicology*.2009.18:988. <https://doi.org/10.1007/s10646-009-0373-7>.
- Costa M, Davidson TL, Chen H, Ke Q, Zhang P, Yan Y, Huang C, Kluz T.2005. Nickel carcinogenesis: epigenetics and hypoxia signaling. *Mutat. Res.* 2005;592:79-88.
- Coyle, P., Philcox, J. C., Carey, L. C. & Rofe, A. M. 2002. Metallothionein: the multipurpose protein. *Cell Mol Life Sci*, 59:627-647.
- Courtenay S.C., Grunwald C.M., Kreamer G.L., Fairchild W.L., Arsenault J.T., Ikononou M. & Wirgin I.I. 1999. A comparison of the dose and time response of CYP1A1 mRNA induction in chemically treated Atlantic tomcod from two populations. *Aquatic Toxicology*. 47: 43-69.

## D

- Dalton, T., Paria, B.C., Fernando, L.P., Huet-Hudson, Y.M., Dey, S.K. y Andrews, G.K. 1997. Activation of the chicken metallothionein promoter by metals and oxidative stress in cultured cells and transgenic mice. *Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol*, **116**:75-86.
- Davis, S.R. & Cousins, R.J. 2000. Metallothionein expression in animals: a physiological perspective on function. *J Nutr*, **130**: 085-8.
- Davidson, T., Chen, H., Garrick, M.D., D'Angelo, G., Costa, M. 2005. Soluble nickel interferes with cellular iron homeostasis. *Mol. Cell. Biochem.* 2005; **279**:157-162.
- Davidson T.L., Chen H., DiToro D.M. & D'Angelo, G., Costa M. 2006. Soluble nickel inhibits HIF-prolyl-hydroxylases creating persistent hypoxic signaling in A549 cells. *Mol. Carcinog.* 2006; **45**:479-489.
- Depiereux S, Liagre M, Danis L, De Meulder B, Depiereux E, Segner H, Kestemont P. Intersex occurrence in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) male fry chronically exposed to ethynylestradiol. *PLoS ONE*. 2014; **9**(7): e98531.
- Depledge, M. H. 1994. The rational basis for the use of biomarkers as ecotoxicological tools. En Leonzio C., (Ed.), *Nondestructive biomarkers in vertebrates*. (pp. 271-295). London (UK): CRC.
- DeRosa, C., Richter, P., Pohl, H. y Jones, D.E. 1998. Environmental exposures that affects the endocrine system: Public health implications. *Journal of Toxicology and Environmental Health, Part B*. 1:3-26.
- De Spiegelaere, W., Dern-Wieloch, J., Weigel, R., Schumacher, V., Schorle, H., Nettersheim, D., ... Fink, C. 2015. Reference Gene Validation for RT-qPCR, a Note on Different Available Software Packages. *PLoS ONE*, **10**(3), e0122515. <http://doi.org/10.1371/journal.pone.0122515>
- De Silva P.M.C.S. & Samayawardhena L.A. 2005. Effects of Chlorpirifos on reproductive performances of guppy (*Poecilia reticulata*). *Chemosphere* **58**:1293-1299.
- Coutiño EM, Purrata A. & Hernández P. 2010. Citocromo P450 biomarcador de exposición terapeútico-toxicológico-carcinogénico. *REB* **29**:39-52.
- Dhainaut, A., y Scaps, P. 2001. Immune defense and biological responses induced by toxics in annelida. *Canadian Journal of Zoology*, **79**: 233-253.
- Deindl, E., Boengler, K., Van-Royen, N. & Schaper W. 2002. Differential expression of GAPDH and beta3-actin in growing collateral arteries. *Mol Cell Biochem* 2002; **236**:139-46.
- Derrien, M., Árcega-Cabrera, F., Velázquez-Tavera N.L., Kantún-Manzano C.A. & Capella-Vizcaino S. 2014. Sources and distribución of organic matter along the Ring of Cenotes, Yucatán, México: Sterol markers and statistical approaches. *Science of the Total Environment* **511** (2015) 223-229.
- Devlin, T. 2000. *Bioquímica libro de texto con aplicaciones clínicas 3ª edición*. Editorial: Reverté S.A. pp 727.
- Díaz-Mayans, J., Torreblanca, A. & Del Ramo, J. 1993 "Presencia de metales en medio acuático". En: *Metales en sistemas biológicos*. Mas, A.; Azcue, J. (Ed). Promociones y Publicaciones Universitarias, S.A., Barcelona
- Dostal, D.E., Rothblum, K.N., Baker, K.M., 1994. An improved method for absolute quantification of mRNA using multiplex polymerase chain reaction: determination of renin and angiotensinogen mRNA levels in various tissues. *Anal. Biochem.* **223**, 239-250
- Downhower, J. F.; L. P. Brown & M. L. Matsui. 2000. Life history variations in female *Gambusia hubbsi*. *Environmental Biology of Fish* **59**, 415-428.
- Duffus, J. H. 2002. "Heavy metals" a meaningless term? (IUPAC Technical Report)" *Pure and Applied Chemistry*, Vol. **74**, pp. 793- 807.
- Duncan K.A., Jimenez P., & Carruth L.C. 2009. The selective estrogen receptor-alpha coactivator, RPL7, and sexual differentiation of the songbird brain. *Psychoneuroendocrinology* Volume **34**, Supplement 1, Pages S30-S38.

## E

EHC (Environmental Health Criteria). 1993. *Biomarkers and Risk Assessment: Concepts and Principles*. IPCS (International Programme on Chemical Safety). EHC No. 155.

Bayne, B. L., Livingstone, D. R., Moore, M. N., & Widdows, J. (1976). A Cytochemical and Biochemical Index of Stress in *Mytilus edulis*. *Marine Pollution Bulletin*, 7, 221-224.

Ebadi, M., Leuschen, P., El Refaey, H., Hamada, F.M. & Rojas P. The antioxidant properties of zinc and metallothionein. *Neurochem Int* 1996; 29:159-66.

Elbekai, R.H. & El-Kadi, A.O., 2005. The role of oxidative stress in the modulation of aryl hydrocarbon receptor-regulated genes by As<sup>3+</sup>, Cd<sup>2+</sup>, and Cr<sup>6+</sup>. *Free Radic. Biol. Med.* 39, 1355–1367.

Elbekai, R.H., El-Kadi, A.O., 2007. Transcriptional activation and posttranscriptional modification of Cyp1a1 by arsenite, cadmium, and chromium. *Toxicology Letters* 172 (2007) 106–119.

Escolero, O.A., Marín, L.E., Steinich, B. & Pacheco, J., 2000. Delimitation of a hydro- geological reserve for a city within a karstic aquifer: the Merida, Yucatan example. *Landscape Urban Planning* 51, 53e62.

EULA. 1999. Curso Teórico-Práctico de Postgrado: Evaluación y Monitoreo de la Contaminación Acuática. Centro EULA. Universidad de Concepción, Chile.

## F

FAO ORGANIZACIÓN DE LAS NACIONES UNIDAS PARA LA AGRICULTURA Y LA ALIMENTACIÓN. 2000. Evaluación de la contaminación del suelo Manual de referencia. Colección FAO: eliminación de plaguicidas Documento de campo GCP/INT/650/NET <http://www.fao.org/docrep/005/x2570s/X2570S00.htm#TOC>

FAO, 1997. Lucha Contra la Contaminación Agrícola de los Recursos Hídricos. (Estudio FAO Riego y Drenaje - 55).GEMS/Water Collaborating Centre Canada Centre for Inland Waters Burlington, Canadá.M-56 ISBN 92-5-303875-6

Filby, A.L., & Tyler, C.R. 2007. Appropriate “housekeeping” genes for use in expression profiling the effects of environmental estrogens in fish. *BMC Molecular Biology*, 8, 10. <http://doi.org/10.1186/1471-2199-8-10>.

FIR Ficha Informativa de los Humedales de Ramsar versión 2009-2012.

Flammarion P., Devaux A., Nehls S., Migeon B., Noury P. & Garric J. 2002. Multibiomarker responses in fish from the Moselle River (France). *Ecotoxicology and Environmental Safety*. 51: 145-153.

Flora, G., Gupta, D., Tiwari, A. .2012. Toxicity of lead: a review with recent updates. *Interdisc Toxicol* 5: 47-58.

Focardi, S. 1999. Contaminación antropogénica y vida marina. En Curso Teórico-Práctico de Postgrado: Evaluación y Monitoreo de la Contaminación Acuática. (pp. 1-9). Centro EULA. Universidad de Concepción, Chile.

Folmar, L.C., Denslow, N.D., Rao, V., Chow, M., Crain, D.A., Enblom, J., Marcino, J. & Guillette Jr. L.J., 1996. Vitellogenin induction and reduced testosterone concentrations in feral male carp (*Cyprinus carpio*) captured near a major metropolitan sewage treatment plant. *Environmental Health Perspectives*. 104(10):1096-1101.

Folmar, L.C., Denslow, N.D., Kroll, K., Orlando, E.F., Enblom, J., Marcino, J., Metcalfe, C. & Guillette Jr. L.J., 2000. Altered Serum sex steroids and vitellogenin induction in Walleye (*Stizostedion vitreum*) collected near a metropolitan sewage treatment plant. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*. 40:392-398.

Forgacs, Z., Massányib, P., Lukacsb, N., & Somosyc, Z. 2012. Reproductive toxicology of nickel. Review. *Journal of Environmental Science and Health, Part A*, 47, 1249–1260. doi:10.1080/10934529.2012.672114

Fowler, B.A. 2009. Monitoring of human populations for early markers of cadmium toxicity: a review. *Toxicol Appl Pharmacol* 238(3): 294-300.

Freitas, M., Barcellos-de-Souza, P., Barja-Fidalgo, C., & Fernandes, E. 2013. Nickel induces apoptosis in human neutrophils. *Biometals*, 26, 13–21. doi:10.1007/s10534-012-9590-2.

Frear, D.E.H., and J.E. Boyd. 1967. Use of *Daphnia magna* for microbioassay of pesticides. *J. Econom. Entomol.* 60, 1228, 1238. En: *Handbook of environmental data on organic Chemical*.1983. ISBN 0-442-28802-6.

Fridovich I. 1997. Superoxide anion radical (O<sub>2</sub><sup>-</sup>), superoxide dismutases, and related matters. *J Biol Chem.* 272(30):18515-7.

## G

Galdies, C. 1995). The use of specific stress indices for Cu and Zn pollution monitoring of coastal waters. Unpublished MSc thesis, University of Malta

García-Triana G. 2001, NADPH oxidasa fagocítica: características, ensamblaje y mecanismo de acción. Cap 2.2. Estrés oxidativo en Biomedicina. Libro electrónico. La Habana, Cuba: Ed. Biomed-CECAM.

Gapp, D.A., Ho, S.M. & Callard, I.P. 1979. Plasma levels of vitellogenin in *Chrysemis picta* during the annual gonadal cycle: measurement by specific radioimmunoassay. *Endocrinology.* 104(3): 784-790

Gavaud, J. 1986. Vitellogenesis in the lizard *Lacerta vivipara* Jacquin. II Vitellogenin synthesis during the reproductive cycle and control by ovarian steroids. *General and Comparative Endocrinology.* 63:1-10.

Geist, J., Werner, I., Eder, K.J. & Leutenegger, C.M. 2007. Comparisons of tissue-specific transcription of stress response genes with whole animal endpoints of adverse effect in striped bass (*Morone saxatilis*) following treatment with copper and esfenvalerate. *Aquatic Toxicol* 2007;85(1):28-39

George, S.G. & Young, P. 1986. "The time course of effects of cadmium and 3- methylcholanthrene on activities of enzymes of xenobiotic metabolism and metallothionein levels in the plaice, *Pleuronectes platessa*". *Comp. Biochem. Physiol.* **83C**: 37-44.

George, S.G. 1989. "Cadmium effects on plaice liver xenobiotic and metal detoxification systems : dose response". *Aquatic Toxicology.* **15**: 303-10.

George, S., Burgess, D. & Leaver, M. N. F. 1992 "Metallothionein induction in cultured fibroblasts and liver of a marine flatfish, the turbot, *Scophthalmus maximus*". *Fish Physiol. Biochem.* **10**: 43-54.

George, S.G. & Per-Erik Olsson (1994), Metallothioneins as indicators of trace metal pollution in Biomonitoring of Coastal Waters and Estuaries, edited by J.M. Kees. Boca Raton, FL 33431, Kramer CRC Press Inc., pp.151-171

George, S.G., Todd, K. & Wright, J. 1996. "Regulation of Metallothionein In Teleosts: Induction Of MT mRNA and Protein By Cadmium In Hepatic and Extrahepatic Tissues Of a Marine Flatfish, the Turbot (*Scophthalmus maximus*)". *Comparative Biochemistry And Physiology C Pharmacology Toxicology And Endocrinology.* Feb. **113**: 109-15.

Ghedotti, M. J. 2000. Phylogenetic analysis and taxonomy of the poecilioid fishes. *Zool. J. Linnean. Soc.* 130, 1-53.

Gillesby, B. E. & Zacharewski, T. 1998. Exoestrogens: mechanism of action and strategies for identification and assessment. *Annual Review. Environmental Toxicology and Chemistry.* 17(1): 3-14.

Giesy, J.P., Solomon, K.R., Coats, J.R., Dixon, K.R., Giddings, J.M. & Kenaga, E.E. 1999. Chlorpyrifos: Ecological Risk Assessment in North American Aquatic Environments. *Rev Environ Contam Toxicol* 160:1-129.

Goering, P.L. & Klaassen C.D. 1984, Tolerance to Cd-induced toxicity depends on pre-synthesized MT in liver. *J. Toxicol. Environ. Health.*, 14:803-812

Greenfield, D. W. 1985. Review of the *Gambusia yucatanana* complex (Pisces: Poeciliidae) of Mexico and Central America. *Copeia* 1985:368-378.

Gu, Y. Z., Hogenesch, J. B. & Bradfield, C. A. 2000. The PAS superfamily: sensors of environmental and developmental signals. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 40: 519-561.

Gul A. 2005. Investigation of acute toxicity of clorpirifos-metyl on Nile tilapia (*Oreochromis niloticus* L.) larvae. *Chemosphere* 59:163-166.

Guengerich F.P. 1995. Cytochromes P450 of human liver. Classification and activity profiles of the major enzymes. In: *Advances in drug metabolism in man.* Pacifici GM & Fracchia GN (eds) European Commission. Office for the Official Publications of the European Communities, Luxembourg 179-231.

Guengerich F.R. 2012. Cytochromes P450. In: Azenbacher P, Zanger UM editors. *Metabolism of Drugs and Other Xenobiotics.* Germany: Wiley-VCH Verlag GmbH and Co. KGaA Weinheim, p. 27-66.

Guillette Jr. L.J., Gross, T.S., Masson, G.R., Matter, J.M., Percival H.F. & Woodward, A.R. 1994. Developmental abnormalities of the gonad and abnormal sex hormone concentrations in juvenile alligators from contaminated and control lakes in Florida. *Environmental Health Perspectives* 102(8):680-688.

# H

- Hafez, A.M. 2009. Mugil cephalus Genome: A Sensitive Monitor for Genotoxicity and Cytotoxicity in Aquatic Environment. *Australian Journal of Basic and Applied Sciences, III* (3), 2176-2187.
- Hagger, J., Jones, M. B., Leonar, DR P., Owen, R. & Galloway T. S. 2006. Biomarkers and Integrated Environmental Risk Assessment: Are There More Questions Than Answers? *Integrated Environmental Assessment and Management* 2(4), 312-329.
- Hagger, J., Jones, M. B., Lowe, D. Leonard, D. R. P., Owen, R. & Galloway T. S. 2008. Application of biomarkers for improving risk assessments of chemicals under the Water Framework Directive: A case study. *Marine Pollution Bulletin* 56(6),1111-1118.
- Halliwell, B., Gutteridge, M. 1999. *Free Radicals in Biology and Medicine*, Oxford University Press, Nueva York, USA, 3rd Ed.
- Halliwell, B., Gutteridge, J.M.C., 2007. *Free Radicals in Biology and Medicine*, fourth ed. Oxford University Press, New York.
- Hamer, D.H. 1986. Metallothionein. *Annu.Rev. Biochem.*, 55:913-951
- Hamer, D.H., Thiele D.J. & Lemont J.E. 1985, Function and autoregulation of yeast copperthionein. *Science*, 228:685-690
- Hauser, R.; Altshu, I. L.; Chen, Z.; Ryan, L.; Overstreet, J. et al.2002. Environmental organo chlorines and semen quality: results of a pilot study. *Environ Health Perspect* 2002; 110:229-33.
- Heath, A. G.; B. J. Turner & W. P. Davis. 1993. Temperature preferences and tolerance of three fish species inhabiting hyperthermal ponds on mangrove island. *Hydrobiologia* 259, 47-55.
- Heidelberger, C. 1973. Current trends in chemical carcinogenesis. *Fed.Proc.*, 32:2154-2161
- Henson M.C., Chedrese, P.J. 2004. Endocrine disruption by cadmium, a common environmental toxicant with paradoxical effects on reproduction. *Exp. Biol. Med* 229:383-392.
- Heppell, S.A., Denslow, N.D., Folmar L.C. & Sullivan, C.V. .1995. Universal Assay of vitellogenin as a biomarker for environmental estrogens. *Environmental Health Perspectives*. 103(7): 9-15.
- Ho, S.M., Kleis, S., Mcpherson,R., Heisermann, G.J. & Callard, I.P. 1982. Regulation of vitellogenesis in reptiles. *Herpetologica*. 38(1): 40-5.
- Hodson, P. V. 2002. Biomarkers and Bioindicators in monitoring and assessment: The State of the Art. In S. M. Adams (ed.). *Biological indicators of aquatic ecosystems stress* (pp 591-619). American Fisheries Society, Maryland, U.S.A.
- Hogstrand, C. & Haux, C. 1991. "Binding and detoxification of heavy metals in lower vertebrates with reference to metallothionein". *Comp. Biochem. Physiol.* **100C**: 137-41.
- Holland B.T., Monteverdi G.H. & Di Giulio, R.T. Octylphenol induces vitellogenin production and cell death in hepatocytes. *Environmental Toxicology and Chemistry*. 18(4):734-739.
- Honda, A., Komuro, H., Hasegawa, T., Seko, Y., Shimada, A., Nagase, H., Hozumi, I., Inuzuka, T., Hara, H., Fujiwara, &, Satoh, M. 2010. Resistance of metallothionein-III null mice to cadmium- induced acute hepatotoxicity. *J Toxicol Sci.* 35(2):209-15.
- Huang, G., Ying, G., Liu, S. & Fang, Y. 2014. Regulation of reproduction- and biomarker-related gene expression by sex steroids in the livers and ovaries of adult female western mosquitofish (*Gambusia affinis*). *Comparative Biochemistry and Physiology - A Molecular and Integrative Physiology*, 162(1), 36-43.
- Hugget, R., J. 1992. *Biomarkers*. Boca Raton: CRC Press. Chapter 4. ISBN 9781351078726.
- Huggett, J.R., Kimerle, R.A., Mehrle, P.M. & Bergman, H.L. 1992. *Biomarkers, Biochemical, Physiological, and Histological Markers and Anthropogenic Stress*. Lewis, Boca Raton, FL, USA. Chapter 4 and p.347. ISBN 9781351078726.
- Huggett, J., Dheda, K. & Bustin, S. & Zumla. 2005. «Real-time RT-PCR normalisation; strategies and considerations». *Genes and Immunity* 6 (4) (junio): 279-284. doi: 10.1038/sj.gene.6364190.
- Hundt, N., Preller, M., Swolski, O., Ang, A. M., Mannherz, H. G., Manstein, D. J. & Müller, M. 2014, Molecular mechanisms of disease-related human  $\beta$ -actin mutations p. R183W and p. E364K. *FEBS J*, 281: 5279-5291. doi:10.1111/febs.13068
- Hyllner, S.J., Andersson, T., Haux, C. & Olsson, P.E. 1989 "Cortisol induction of metallothionein in primary culture of rainbow trout hepatocytes". *Journal of Cellular Physiology*. **139**: 24-8.

# I

Ikuta, T., Eguchi, H., Tachibana, T., Yoneda, Y. & Kawajiri, K. 1998. Nuclear localization and export signals of the human aryl hydrocarbon receptor. *J Biol Chem* 273(5): 2895-2904.

Ikuta, T., Tachibana, T., Watanabe, J., Yoshida, M., Yoneda, Y. & Kawajiri, K. 2000. Nucleocytoplasmic shuttling of the aryl hydrocarbon receptor. *J Biochem (Tokyo)* 127(3): 503-509.

# J

Jones, P.D., De Coen, W.M., Tremblay, L. & Giesy, J.P. 2000. Vitellogenin as a biomarker for environmental estrogens. *Water Science and Technology*. 42:1-14

Jobling S. & Sumpter, J.P. 1993. Detergent components in sewage effluent are weakly oestrogenic to fish: an in vitro study using rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) hepatocytes. *Aquat Toxicol* 27:361-372.

# K

Kägi, J.H.R. & Kojima, Y. .1987. "Chemistry and Biochemistry of metallothionein. Metallothionein II." Birkhäuser Verlag, Basel.

Kägi, J.H.R. & Vallee, B.L. 1960. "Metallothionein: a cadmium- and zinc-containing protein from equine renal cortex". *J. Biol. Chem.* 235: 3460-65.

Karin, M. 1985. Metallothioneins: Proteins in search of function. *Cell*, 41:9-10

Kazlauskas, A., Poellinger, L. & Pongratz, I. 1999. Evidence that the co-chaperone p23 regulates ligand responsiveness of the dioxin (Aryl hydrocarbon) receptor. *J Biol Chem* 274(19): 13519-13524.

Kiel-Martínez. 2012. Productos farmacéuticos y de cuidado personal en el acuífero y la costa de la PY. Tesis de Maestría. UNAM.

Klaassen, C.D., Liu, J. & Choudhuri, S. 1999. "Metallothionein: An intracellular protein to protect against cadmium toxicity". *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 39: 267- 94.

Klaassen C.D., Liu J. & Diwan B.A. 2009. Metallothionein protection of cadmium toxicity. *Toxicol Appl Pharmacol* 238: 215-20.

Inoue, S. & Kawanishi, S., 1989. ESR evidence for superoxide, hydroxyl radicals and singlet oxygen produced from hydrogen peroxide and nickel(II) complex of glycylglycyl-L-histidine. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 159, 445e451.

Jones D.P. 2008. Radical-free biology of oxidative stress. *Am J Physiol Cell Physiol.* 295(4):C849-68.

Jørgensen, S. E. 1998. Ecotoxicological Research Historical Development and Perspectives. In G. Schüürmann y B. Markert (eds.). *Ecotoxicology* (pp 3-15). John Wiley & Sons, New York, USA.

Juárez-Rebollar, D. & Méndez-Armenta, M. 2014 Aspectos funcionales de la Metalotioneína del sistema nervioso central. *Arch Neurocién (Mex)* Vol. 19, No. 1: 34-41; 2014 ©INNN.

Kling, P.; Erkell, L.J.; Kille, P. & Olsson, P.E. 1996 "Metallothionein induction in rainbow trout gonadal (rtg-2) cells during free radical exposure". *Marine Environmental Research.* 42: 33-36.

Klopper-Sams, P.J. & J.J. Stegeman (1989), The temporal relationships between P-450E protein content, catalytic activity and m-RNA levels in the teleost *Fundulus heteroclitus* following treatment with  $\beta$ -naphthoflavone. *Arch. Biochem. Bioph.*, 268:525-535.

Korashy H.M. & El-Kadi A.O. 2004. Differential effects of mercury, lead and copper on the constitutive and inducible expression of aryl hydrocarbon receptor (AHR)-regulated genes in cultured hepatoma Hepa 1c1c7 cells. *Toxicology* 2004;201(1-3):153-72.

Krest C.M., Onderko E.L., Yosca T.H., Calixto J.C., Karp R.F. & Livada J. 2013 Reactive intermediates in cytochrome P450 catalysis. *J Biol Chem.* 288:17074-8.

Kosmala, A., Migeon, B., Flammarion, P. & Garric, J. 1998. Impact assessment of a wastewater treatment plant effluent using the sh biomarker ethoxyresoru n-O-deethylase: field and on-site experiments. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 41(1):19-

## L

- Lane, C.E., & Livingston, R.E. 1970. Some acute and chronic effects of dieldrin on the sailfin molly, *Poecilia latipinna*. *Trans. Amer. Fish. Soc.* 99(3), 489-495, 1970. En: Handbook of environmental data on organic Chemical.1983. ISBN 0-442-28802-6.
- Lazier, C.B. & MacKay, M.E. 1991. Vitellogenin gene expression in teleost fish. In: *Biochemistry and Molecular Biology of Fishes; Molecular Biology Frontiers*. Vol 2 (Hochachka PW, Mommsen TP, eds). Amsterdam: Elsevier, 1991;391-405.
- Lazier, C.B., Langley, S., Ramsey, N.B. & Wright, J.M. 1996. Androgen Inhibition of Vitellogenin Gene Expression in Tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Gen Comp Endocrinol* 104:321– 329.
- Lee, K. F., Lau, K. M. & Ho, S. M. 1999. Effects of cadmium on metallothionein-I and metallothionein- II mRNA expression in rat ventral, lateral, and dorsal prostatic lobes: quanti cation by competitive RT-PCR. *Toxicol Appl Pharmacol*, **154**:20-27.
- Lee, Peter D, Robert Sladek, Celia M T Greenwood, y Thomas J Hudson. 2002. «Control genes and variability: absence of ubiquitous reference transcripts in diverse mammalian expression studies». *Genome Research* 12 (2) (febrero): 292-297. doi:10.1101/gr.217802.
- Lees, M. J. & Whitelaw, M. L. 1999. Multiple roles of ligand in transforming the dioxin receptor to an active basic helix-loop-helix/PAS transcription factor complex with the nuclear protein Arnt. *Mol Cell Biol* 19(8): 5811-5822.
- Lin, A., Chan, Y.L., McNally, J., Peleg, D., Meyuhas, O. & Wool, I.G. 1987. The primary structure of rat ribosomal protein L7. *J. Biol. Chem.* 262, 12665–12671.
- Lin, A. 1991 Localization of surface peptide from ribosomal protein L7 on 80S ribosome by biotinylation. *FEBS Lett.* 287, 121–124.
- Livingstone, D.R. 1993 "Biotechnology and pollution monitoring - use of molecular biomarkers in the aquatic environment". *Journal of Chemical Technology & Biotechnology*. **57**: 195-211.
- Lowe, G.M., Hulley, C.E., Rhodes, E.S., Young, A.J. & Bilton, R.F. 1998. Free radical stimulation of tyrosine kinase and phosphatase activity in human peripheral blood mononuclear cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 245, 17–22.
- Lucinda, P.H.F., 2003. Poeciliidae (Livebearers). p. 555-581. In R.E. Reis, S.O. Kullander and C.J. Ferraris, Jr. (eds.) *Checklist of the Freshwater Fishes of South and Central America*. Porto Alegre: EDIPUCRS, Brazil. (Ref. [50894](#)) Magnhagen, C. 1999. Predation risk as a cost of reproduction. *Trends in Ecology and Evolution* 6, 183-185.
- Liu S, Wang L, Qin F, Zheng Y, Li M, Zhang Y, Yuan C, Wang Z., Gonadal development and transcript profiling of steroidogenic enzymes in response to 17  $\alpha$ -methyltestosterone in the rare minnow *Gobiocypris rarus*. *J. Steroid. Biochem. Mol. Biol.* 2014; 143: 223-232.
- Luxenburg, C., Pasolli, H.A., Williams, S.E. & Fuchs, E. .2011 Developmental roles for Srf, cortical cytoskeleton and cell shape in epidermal spindle orientation. *Nat Cell Biol* **13**:203–21
- Luczak M.W., & Zhitkovich A. 2017. Nickel-induced HIF-1 $\alpha$  promotes growth arrest and senescence in normal human cells but lacks toxic effects in transformed cells. *Toxicol Appl Pharmacol.* 2017 Sep 15; 331:94-100. doi: 10.1016/j.taap.2017.05.029. Epub 2017 May 25. PMID: PMC5568485

## M

- Ma, Q. & Baldwin, K. T. 2000. 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin-induced degradation of aryl hydrocarbon receptor (AhR) by the ubiquitin-proteasome pathway. Role of the transcription activation and DNA binding of AhR. *J Biol Chem* 275(12): 8432-8438.
- Ma, Q. & Whitlock, J. P., Jr. 1997. A novel cytoplasmic protein that interacts with the Ah receptor, contains tetratricopeptide repeat motifs, and augments the transcriptional response to 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin. *J Biol Chem* 272(14): 8878-8884.
- Mahmut S. Sarikaya R, Erkoç F, Kocak O. Investigation of acute toxicity of clorpirifos-metyl on guppy *Poecilia reticulata*. *Chemosphere* 2005; 60:93–96.
- Marshall Adams S, Bevelhimer Mark S, Greeley M.S., Levine D.A., Teh, S.J., 1999. Ecological risk assessment in a large river-reservoir. 6. Bioindicators of fish population health. *Environ Toxicol Chem* 18:628–640.
- Martín-Díaz ML., Blasco J., Sales D., Del Valls TA. 2004. Biomarkers as tools to assess sediment quality. Laboratory and fields surveys. *Trends in Analytical Chemistry*. Vol. 13. No. 10-11 pp.807-817.
- Mas, A.; Arola, L. 1993. "Conceptos generales del metabolismo de metales". En: *Metales en sistemas biológicos*. Mas, A.; Azcue, J. (Ed). Promociones y Publicaciones Universitarias, S.A., Barcelona.

Matović V, Buha A, Bulat Z, Đurić-Čosić D (2011) Cadmium toxicity revisited: focus on oxidative stress induction and interactions with zinc and magnesium. *Arch Ind Hyg Toxicol* 62: 65-76.

Maxwell P, Salnikow K. 2004. HIF-1: an oxygen and metal responsive transcription factor. *Cancer Biol. Ther.* 3:29–35.

McCurley, A.T. & Callard, G.V. 2008. Characterization of housekeeping genes in zebrafish: male-female differences and effects of tissue type, developmental stage and chemical treatment. *BMC Molecular Biology* 2008, 9:102 This article is available from: <http://www.biomedcentral.com/1471-2199/9/102>

Meffe, G. & Snelson, F. 1993. Lipid dynamics during reproduction in *Gambusia holbrooki* and *Poecilia latipinna*. *Can. Fish. Aquat. Sci.* 50, 2185-2191

Meyer, B. K., Pray-Grant, M. G., Vanden Heuvel, J. P. y Perdew, G. H. 1998. Hepatitis B virus X-associated protein 2 is a subunit of the unliganded aryl hydrocarbon receptor core complex and exhibits transcriptional enhancer activity. *Mol Cell Biol* 18(2): 978-988.

Michael W. Pfaffl, Ales Tichopad, Christian Prgomet & Tanja P. Neuvians. 2004. Determination of stable housekeeping genes, differentially regulated target genes and sample integrity: BestKeeper – Excel-based tool using pair-wise correlations.

Miller, R.R., Minckley, W.L., Norris, S.M. 2005. *Freshwater fishes of Mexico*. University of Michigan, Museum of Zoology, Chicago, pp 63–404.

Mondragón & Rodas, 2001 . Hábitos alimentarios de *Gambusia yucatanana* en la División Académica de Ciencias Biológicas (UJAT). Villahermosa Tab .Kuxultab´ Revista de divulgación. División Académica de Ciencias Biológicas Universidad Juárez Autónoma de Tabasco. ISSN- 1665-0514.

## N

Narbonne, J.F., Daubeze, M., Clerandau, C. & Garrigues P. 1999. Scale of classification based on biochemical markers in mussels: Application to pollution monitoring in European coasts. *Biomarkers* 6:415– 424.

Nadeau, D., Corneau, S., Plante, I., Morrow, G., & Tanguay, R. M. 2001. Evaluation for Hsp70 as a biomarker of effect of pollutants on the earthworm *Lumbricus terrestris*. *Cell Stress & Chaperones*, 6(2), 153–163.

Newman, M. C., & Unger, M. A. 2003. *Fundamentals of ecotoxicology*. Boca Raton, FL: Lewis Publishers.

Moore, M. N. 1985. Cellular Response to Pollutants. *Marine Pollution Bulletin*. 16,134- 139.

Moore, M. N. 1988a. Cellular- and Histopathological Effects of a Pollutant Gradient - Summary. *Marine Ecology Progress Series*, 46,109-110.

Moore, M. N. 1988b. Cytochemical Responses of the Lysosomal System and NADPH- Ferrihemoprotein Reductase in Molluscan Digestive Cells to Environmental and Experimental Exposure Xenobiotics. *Marine Ecology Progress Series*, 46,81-89.

Moore, M. N. & D. M. Lowe. 1985. Cytological and Cytochemical Measurements. En D. A. Brown, K. Burns, D. R. Dixon, A. Ivanovici, D. R. Livingstone, D. M. Lowe, M. N. Moore, A. Stebbing, y J. Widdows, (Eds.). *The Effects of Stress and Pollution on Marine Animals*. (pp. 46-74). New York: Praeger, Greenwood Press. 384p.

Moore, M.T., Higgett, D.B. Gillespie, W.B. Jr., Rodgers, J.H. Jr., & Cooper, C.M.. 1998. Comparative toxicity of chlordane, chlorpyrifos and aldicarb to four aquatic testing organisms. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 34: 152-157.

Moshier, J.A., Cornell T., & Majumdar, A.P. 1993. Expression of protease genes in the gastric mucosa during aging. *Exp Gerontol* 1993;28:249–58.

Muntané J. 2009 Regulation of drug metabolism and transporters. *Curr Drug Metab* 10:932-945.

Myers, M. S., & Fournie, J. W. 2002. Histopathological Indicators of Environmental Stress and Diseases Susceptibility in Fishes. En S. M. Adams, (Ed.), *Biological indicators of aquatic ecosystems stress*. (pp. 187-220). Maryland, USA: American Fisheries Society.

Nordberg G.F. 2010. Biomarkers of exposure, effects and susceptibility in humans and their application in studies of interactions among metals in China. *Toxicology letters*, ISSN: 1879-3169, Vol: 192, Issue: 1, Page: 45-9

Nzengue, Y., Steiman, R., Garrel, C., Lefebvre, E. & Guiraud P. 2008. Oxidative stress and DNA damage induced by cadmium in the human keratinocyte HaCaT cell line: role of glutathione in the resistance to cadmium, *Toxicology*. 243:193–206.

Nzengue Y., Steiman R., Rachidi W., Favier A., Guiraud P. 2012. Oxidative Stress Induced by Cadmium in the C6 Cell Line: Role of Copper and Zinc. *Biol Trace Elem Res*.146(3):410-419.

Nikunen, E. 1985. Toxic impact of effluents from petrochemical industry. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 9:84-91

NOAA: Administración Oceanográfica y Atmosférica de los Estados Unidos de América (por sus siglas en

## O

Odintsova, T.I., Müller, E.C., Ivanov, A.V., Egorov, T.A., Bienert, R., Vladimirov S.N., Kostka S., Otto A., Wittman-Liebold B. & Karpova, G.G. 2003. Characterization and Analysis of Posttranslational Modifications of the Human Large Cytoplasmic Ribosomal Subunit Proteins by Mass Spectrometry and Edman Sequencing. *J Protein Chem* 22: 249. <https://doi.org/10.1023/A:1025068419>.

Olsen, G. H., Sva, E., Carroll, J., Camus, L., Coen, W., Smolders, R., Øveraas, H., & Hylland, K. 2007. Alterations in the energy budget of Arctic benthic species exposed to oil-related compounds. *Aquatic Toxicology*, 83, 85-92.

Olsson, P.E., Hyllner, S.J., Zafarullah, M., Andersson, T. & Gedamu, L. 1990 "Differences in metallothionein gene expression in primary cultures of rainbow trout hepatocytes and the RTH-149 cell line". *Biochimica et Biophysica Acta*. 24: 78-82.

Olsson et al. 1995. Interaction of cadmium and oestradiol-17b on metallothionein and vitelogenin synthesis in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Biochem. J.* 307, 197-203 (Printed in Great Britain).

## P

Paekall DB, Shugart RL. 1993. Research and application in the assessment of environmental health. In Paekall DB, Shugart RL, eds, *Biomarkers: Research and Application in the Assessment of Environmental Health*. NATO ASI Series—Series H: Cell Biology 68. NATO, Texel, The Netherlands, pp 13–14.

Palacio, J. A. 2007. *Ecotoxicología acuática*. Medellín: Ed. Universidad de Antioquia. 437p.

Palmer, B.D & Palmer S.K. 1995. Vitellogenin induction by xenobiotic estrogens in the redeared turtle and african clawed frog. *Environmental Health Perspectives*. 103(4): 19-25.

Palmer, B.D, Huth, S.K., Pioto D.L. & Selcer, K.W. 1998. Vitelogenin as a biomarker for xenobiotic estrogens in an amphibian model system. *Environmental Toxicology and Chemistry*. 17(1): 30-36.

Palmiter, R.D. 1994. "Regulation of Metallothionein Genes by Heavy Metals Appears to Be Mediated by a Zinc-Sensitive Inhibitor That Interacts with a

inglés, National Oceanic and Atmospheric Administration), niveles de fondo (background levels) de la tabla de referencia (Screening Quick Reference Table for Inorganics in Freshwater Sediment). <https://response.restoration.noaa.gov/sites/default/files/SQuiRTs.pdf>

Orellana, B.M. & Guajardo, T.V. 2004. Actividad del citocromo P450 y su alteración en diversas patologías. *Revista médica de Chile*, 132(1), 85-94. <https://dx.doi.org/10.4067/S0034-98872004000100014>

Oropesa A, Jiménez B, Gil M, Osswald J, Fallola C, Pula H, Cuesta J, Gómez L. 2014. Histological alterations in the structure of the testis in tench (*Tinca tinca*) after exposure to 17 alphaethynylestradiol. *Environ. Toxicol.* 2014; 29(10): 1182-1192.

Oropesa, A.L.; Moreno, J.J.; Gómez, L.J. 2017. Lesiones histopatológicas en peces originadas por la exposición a contaminantes emergentes: recopilando y analizando datos

Overnell, J., McIntosh, R., Fletcher, T.C. 1987 "The levels of liver metallothionein and zinc in plaice, *Pleuronectes platessa*, during the breeding season, and the effect of oestradiol injection". *J. Fish. Biol.* 43: 539-46.

Constitutively Active Transcription Factor, MTF-1". *Proc Natl Acad Sci USA*. 91: 1219-23.

Pavicic, J., Raspor, B. & Branica, M. 1991. Metal binding proteins of *Mytilus galloprovincialis*, similar to metallothioneins, as a potential indicator of metal pollution. *Proceedings of the FAO/UNEP/IOC Workshop on the biological effects of pollutants on marine organisms (Malta, 10-14 September 1991)*. MAP Technical Reports Series No. 69, UNEP, Athens, pp.217-234

Pawert, M., Mueller, Triebkorn. 1998. Ultraestructural changes in fish gills as biomarker to assess small stream pollution. *Tissue & Cell*, 30(6): 617-626.

Payne, J.F. 1977. Mixed function oxidase s in marine organisms in relation to petroleum hydrocarbon metabolism and detection. *Mar.Pollut. Bull.*, 8:112-116

Pelissero, C, Le Menn, F. & Kaushick, F. 1991. Estrogenic effect of dietary soya bean meal on vitellogenesis in cultured siberian sturgeon *Acipenser baeri*. *Gen Comp Endocrinol* 83:447-457.

Pelissero, C., Flouriot, G., Foucher, J.L., Bennetau, B., Dunogues, J., Legac, F., & Sumpter J.P. 1993. Vitellogenin synthesis in cultured hepatocytes: an in vitro test for the estrogenic potency of chemicals. *J Steroid Biochem Mol Biol* 44:263-272.

Pérez-León, S. & Schmitter-Soto, J.J. 2007. Distribución y taxonomía del género *Gambusia* (Teleostei: Poeciliidae) en el norte y oriente de la Península de Yucatán, México. *Trópico Húmedo* 23(2):167-171.

Pérez-Rico, A. 2015. Selección de genes de referencia y análisis de expresión diferencial en semen de equino criocervado. Tesis Doctoral. Universidad de Córdoba.

Perdew, G. H. 1988. Association of the Ah receptor with the 90-kDa heat shock protein. *J Biol Chem* 263(27): 13802- 13805.

Pietruska, J. R., Liu, X., Smith, A., McNeil, K., Weston, P., Zhitkovich, A., & Kane, A. B. (2011). Bioavailability, Intracellular Mobilization of Nickel, and HIF-1 $\alpha$  Activation in Human Lung Epithelial Cells Exposed to Metallic Nickel and Nickel Oxide Nanoparticles. *Toxicological Sciences*, 124(1), 138–148. <http://doi.org/10.1093/toxsci/kfr206>

## R

Ramírez V.A. 2006. Biomarcadores en monitoreo de exposición a metales pesados en metalurgia. Anales de la Facultad de Medicina .Universidad Nacional Mayor de San Marcos. ISSN 1025 - 5583

Rana, S.V. 2008. Metals and apoptosis: recent developments. *J Trace Elem Med Biol* 22(4): 262-284.

Randall, W.F. et al. 1979. Acute toxicity of dechlorinated DDT, chlordane, and lindane to bluegill (*Lepomis macrochirus*) and *Daphnia magna*. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 21: 849. En: U.S. Environmental Protection Agency. 1985. Ambient water quality criteria for chlordane-1980. Washington DC. EPA 440/5-80-027.

Raff, T., van der Giet, M., Endemann, D., Wiederholt, T. & Paul, M. 1997. Design and testing of -actin primers for RT-PCR that do not co-amplify processed pseudogenes. *Bio techniques* 23, 456-460. Reisner, P.D., Brandt, P.C., Vanaman, T.C., 1997.

Rebouças, E., Costa, J.J., Passos, M.J., Passos, J., Hurk R., & Silva, J.R. 2013. Real time PCR and importance of housekeeping genes for normalization and quantification of mRNA expression in different tissues. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, 56(1), 143-154. <https://dx.doi.org/10.1590/S1516-89132013000100019>

PNUMA (Programa de las Naciones Unidas para el Medio Ambiente). Conferencia de las Partes. Convenio de Estocolmo sobre contaminantes orgánicos persistentes. UNEP/POPS/COP.1/23. Informe de Primera reunión, Punta del Este, Uruguay, mayo 2005. Documento K0473589(S) 250105 270105

Polanco-Rodríguez, A.G., Navarro-Alberto J.A., Solorio-Sánchez J., Mena-Rejón G. J., Marrufo-Gómez J. & Del Valls Casillas, T.A.. 2015. Contamination by organochlorine pesticides in the aquifer of the Ring of Cenotes in Yucatán, México. *Water and Environment Journal*. Print ISSN 1747-6585

Purdum, C.E., Hardiman, P.A., Bye V.J, Eno, N.C., Tyler, C.R. & Sumpter, J.P. 1994. Estrogenic effects of effluents from sewage treatment works. *Chem Ecol* 8:275-285.

PRTR Registro Estatal de emisiones y fuentes contaminantes. España. <http://www.prtr-es.es/Aldrin,15613,11,2007.html>. Revisado en abril 2018.

Rehwoldt, R.E., et al. 1977. Investigations into acute toxicity and some chronic effects of selected herbicides and pesticides on several freshwater fish species. *Bull. Environm.Contam. Toxic.* 18, 361. En: Handbook of environmental data on organic Chemical.1983. ISBN 0-442-28802-6.

Rendón von Osten, J., 2005. Uso de biomarcadores en ecosistemas acuáticos, p. 121-140. In: A. V. Botello, J. Rendón-von Osten, G. Gold-Bouchot y C. Agraz-Hernández (Eds.). Golfo de México Contaminación e Impacto Ambiental: Diagnóstico y Tendencias, 2da Edición. Univ. Autón. de Campeche, Univ. NaI. Autón. de México, Instituto Nacional de Ecología. 696 p. ISBN: 968-5722-37-4

Reznick, D. N., Bryga, H.A. & Endler, J.A. 1990. Experimentally induced life-history evolution in a natural population. *Nature* 346, 357-359.

Rhee, J. S., Lee, Y. M., Hwang, D. S., Won, E. J., Raisuddin, S., Shin, K. H., & Lee, J. S. 2007. Molecular cloning, expression, biochemical characteristics, and biomarker potential of theta class glutathione S-transferase (GST-T) from the polychaete *Neanthes succinea*. *Aquatic Toxicology*, 83(2), 104-115.

Ricciardi, F., Matozzo, V., Binelli, A., & Marín, M. G. 2010. Biomarker responses and contamination levels in crabs (*Carcinus aestuarii*) from the Lagoon Venice: An integrated approach in biomonitoring estuarine environments. *Water Research*, 44(6), 1725-1736.

Roberts, B. J. & Whitelaw, M. L. 1999. Degradation of the basic helix-loop-helix/Per-ARNT-Sim homology domain dioxin receptor via the ubiquitin/proteasome pathway. *J Biol Chem* 274(51): 36351-36356.

Robinson, T L, Sutherland, I. A. & Sutherland, J. 2007. «Validation of candidate bovine reference genes for use with real-time PCR». *Veterinary Immunology and Immunopathology* 115 (1-2) (enero 15): 160-165. doi: 10.1016/j.vetimm. 2006.09.012.

Robles, C.A., Pérez-Vázquez, M.L., Sánchez, J.G., Aguirre. 2012 Variabilidad espacio-temporal de metales pesados en camarones, agua y sedimentos de la laguna Madre, Tamaulipas. *Rev Digital Universitaria*.

Roch, M. & McCarter, J.A. 1984. "Hepatic metallothionein production and resistance to heavy metals by rainbow trout (*Salmo gairdneri*) I. Exposed to an artificial mixture of zinc, copper and cadmium". *Comparative Biochemistry & Physiology. C, Comparative Pharmacology & Toxicology*. 77: 71-5.

Rodd, F.H; Reznick, D.N. & Sokolowski, M.B., 1997. Phenotypic plasticity in the life history traits of guppies: Responses social environment. *Ecol*. 78, 419-433.

Rodríguez-de Vera E.M.S. (2017). Respuestas Fisiológicas de peces sometidos a estrés. Trabajo de

## S

Salnikow, K., Blagosklonny, M.V., Ryan, H., Johnson, R., Costa, M. 2000. Carcinogenic nickel induces genes involved with hypoxic stress. *Cancer Res*. 2000; 60:38-41.

Salnikow, K., Davidson, T., Zhang, Q., Chen, L.C., Su, W. & Costa, M. 2003. The involvement of hypoxia-inducible transcription factor-1-dependent pathway in nickel carcinogenesis. *Cancer Res*. 63, 3524-3530.

Salnikow, K, Zhitkovich, A. 2008. Genetic and epigenetic mechanisms in metal carcinogenesis and cocarcinogenesis: nickel, arsenic, and chromium. *Chem. Res. Toxicol*. 2008; 21:28-44.

Sanders, H.O. & Cope, O.B. 1966 . Toxicities of several pesticides to two species of cladocerans. *Trans. Am. Fish Soc.* 95, 165-169. En: *Handbook of environmental data on organic Chemical*.1983. ISBN 0-442-28802-6.

fin de Grado en Biología. Universidad de la Laguna. <https://riull.ull.es/xmlui/bitstream/handle/915/5763/Respuesta%20fisiologicas%20de%20peces%20sometidos%20a%20estres.pdf?sequence=1&isAllowed=y>

Roesijadi, G. & Fowler, B.A. 1991. "Purification of invertebrate metallothioneins". *Methods in Enzymology*. 205: 263-73.

Roesijadi, G. 1992. "Metallothioneins in metal regulation and toxicity in aquatic animals". *Aquatic Toxicology*. 22: 81-114.

Roesijadi, G., Bogumil, R., Vasak, M. & Kagi J.H.1998. Modulation of DNA binding of a tramtrack zinc finger peptide by the metallothionein-thionein conjugate pair. *J.Biol. Chem.*, 273:17425-17432

Rodríguez-Fuentes, G., Luna-Ramírez, K.S., Soto, M. & Richardson, K. 2012. Gene expression in caged fish as indicators of contaminants exposure in tropical karstic water bodies. *Marine Environmental Research* 75: 62-66.

Roesijadi, G. 1992 "Metallothioneins in metal regulation and toxicity in aquatic animals". *Aquatic Toxicology*. 22: 81-114.

Rowlands, J. C. & Gustafsson, J. A. 1997. Aryl hydrocarbon receptor- mediated signal transduction. *Crit Rev Toxicol* 27(2): 109-134.

Sanders, H.O. 1972. Toxicity of some insecticides to four species of malacostracan crustaceans. U.S. dept. Inter. Fish. Wild. Tech. Pap. 66. En: U.S. Environmental Protection Agency. 1985. Ambient water quality criteria for chlordane-1980. Washington DC. EPA 440/5-80-027.

Sato M, Bremner I. 1993 Oxygen free radicals and metallothionein. *Free Rad Biol Med* 14: 325-37.

Schmidt, W.A. 1994. Hormone Copycats. Ann Arbor, MI: National Wildlife Federation.

Seo, Y. R., Kim, B., & Ryu, J. C. 2005. Molecular and genomic approaches on nickel toxicity and carcinogenicity. *Molecular Cellular Toxicology*, 1, 73-77.

Sephar D.W. & Brewer. 1976. *J.Fish.Res.BoardCan.*3,1939-1945.

Shi, H., Hudson, L.G., & Liu, K.J. 2004. Oxidative stress and apoptosis in metal ion- induced carcinogenesis. *Free Radic. Biol. Med.* 37, 582e593.

Shen, ZG, Fan QX, Yang W, Zhang YL, Wang HP. Effects of 17 $\alpha$ methyltestosterone and aromatase inhibitor letrozole on sex reversal, gonadal structure, and growth in yellow catfish *Pelteobagrus fulvidraco*. *Biol. Bull.* 2015; 228(2): 108-117.

Smith C. Marks A. & Lieberman M. 2006. *BIOQUIMICA BÁSICA de Maks, UN ENFOQUE CLÍNICO*. McGraw Hill Interamericana. pp 218.

Song M.O. & Freedman J.H. 2005. Expression of copper-responsive genes in HepG2 cells. *Mol Cell Biochem* 2005;279(1-2):141-7.

Soto, M. & Rodríguez-Fuentes, G. 2014. Evaluación del efecto estrogénico por filtros UV en el pez sargento *Abudefduf saxatilis*. *Ciencias marinas*, 40(3), 187-196. Recuperado en 13 de octubre de 2017, de [http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0185-38802014000300003&lng=es&tlng=es](http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0185-38802014000300003&lng=es&tlng=es).

Souza V., Escobar M.C., Bucio L., Hernández E., Gómez-Quiroz L.E. Gutiérrez-Ruiz. 2009. NADPH oxidase and ERK1/2 are involved in cadmium induced- Stat3 activation in HepG2 cells. *Toxicol Lett.* 187:180-186.

Southward, A. J. 1982. An Ecologist's View of the Implications of the Observed Physiological and Biochemical Effects of Petroleum Compounds on Marine Organisms and Ecosystems. *Philosophical Transaction of The Royal Society B: Biological Sciences*, 297, 241-255.

Spink, D.C., Katz, B.H., Hussain, M.M., Spink, B.C., Wu. S., Liu, N., Pause, R. & Kaminsky R.P. 2002. Induction of CYP1A1 and CYP1B1 in T-47D human breast cancer cells by benzo[a]pyrene is diminished by arsenite. *Drug Metab Dispos* 30:262–269.

Sridevi P, Chaitanya R, Prathibha Y, Balakrishna S, Dutta-Gupta A, Senthikumar B. Early exposure of 17 $\alpha$ -ethynylestradiol and diethylstilbestrol induces morphological changes and alters ovarian steroidogenic pathway enzyme gene expression in catfish, *Clarias gariepinus*. *Environ. Toxicol.* 2013; 30(4): 439- 451.

## T

Tairova, Z. M., Giessing, A. M. B., Hansen, R., & Andersen, O. 2009. 1-Hydroxypyrene as a biomarker of PAH exposure in the marine polychaete *Nereis diversicolor*. *Marine Environmental Research*, 67, 38-46.

TambuttÉ, S., E. TambuttÉ, P. Rolland & M.-C Van Klaveren, 1998. A biomonitoring program of the coastal area of the Principality of Monaco. *International Symposium on Marine Pollution*. Monaco, 5-9 October 1998. IEAE-SM-354/228 p.

Stearns, S. C. 1983. The evolution of life history traits in mosquitofish since their introduction to Hawaii in 1905: Rates of evolution heritabilities development plasticity. *Am. Zool.* 23, 65-75.

Stegeman, J.J. 1989. Cytochrome P-450 forms in fish: catalytic, immunological and sequence similarities. *Xenobiótica*, 19:1093-1110.

Stearns S. C. 1983. The evolution of life history traits in mosquitofish since their introduction to Hawaii in 1905: Rates of evolution heritabilities development plasticity. *Am. Zool.* 23, 65-75.

Sturzenbaum, S.R., Kille, P. 2001. Control genes in quantitative molecular biological techniques: the variability of invariance. *Comp Biochem Physiol Part B Biochem Mol Biol* 130:281–9.

Stagg R.M. 1998. The development of an international programme for monitoring the biological effects of contaminants in the OS- PAR convention area. *Mar Environ Res* 46:307–313.

Stegeman, J. J. & Hahn M.E. 1994. Biochemistry and molecular biology of monooxygenases: current perspectives on forms, functions and regulation of cytochrome P450 in aquatic species. In: Malins D.C., Ostrander G.K. (Eds.), *Aquatic Toxicology, Molecular, Biochemical and Cellular Perspectives*. Lewis Publishers, Boca Raton, FL, p 87–206.

Subsecretaria de Recursos Hídricos de la Nación. 2013. *Desarrollos de niveles guia nacionales de calidad de agua ambiente correspondientes a clordano*. República Argentina.

Sumpter, J. 1995. Estrogenic surfactant derived chemicals in the aquatic environment. *Environ Health Perspect* 103 (Suppl 7): 173-178.

Schwerdtle, T. & Hartwig, A. 2006. Bioavailability and genotoxicity of soluble and particulate nickel compounds in cultured human lung cells. *Materialwissenschaft Und Werkstofftechnik*, 37, 521–525. doi:10.1002/mawe.200600030

Theodorakis, C. W., & Virgin, I. I. 2002. Genetic Responses as Population-Level Biomarkers of Stress in Aquatic Ecosystems. En S. M. Adams, (Ed.), *Biological indicators of aquatic ecosystems stress*. (pp. 149-186). Maryland, USA: American Fisheries Society.

Thornalley, P.T. & M. Vasak .1985. Possible role for MT in protection against radiation-induced oxidative stress. Kinetics and mechanism of its reaction with superoxide and hydroxyl radicals. *Biochim. Biophys. Acta*, 827:36

Toro-Restrepo, B. 2011. Uso de los biomarcadores en la evaluación de la contaminación. *Revista Azul* No. 32. Pp. 2-6.

## U

Underwood, A. J. & Peterson, C. H. 1988. Towards an Ecological Framework for Investigating Pollution. *Marine Ecology Progress Series*, 46, 227-234.

UNEP/RAMOG: Manual on the Biomarkers Recommended for the MED POL Biomonitoring Programme. UNEP, Athens, 1999.

Urani, C., Melchiorretto, P., Canevali, C., Morazzoni, F. & Gribaldo, L. 2007. Metallothionein and hsp70 expression in HepG2 cells after prolonged cadmium exposure. *Toxicol In vitro*. 21(2):314-9.

U.S. EPA. 1980. Unpublished laboratory data. Env. Res. Lab., Duluth, Minnesota. En: U.S. Environmental Protection Agency. 1985. Ambient water quality criteria for chlordane-1980. Washington DC. EPA 440/5-80-027.

U.S. EPA. 1980. Ambient Water Quality Criteria for Aldrin/Dieldrin. Office of Water Regulations and Standards Criteria and Standards Division. EPA 440/5-80-019.

U.S. EPA. 1980. Ambient Water Quality Criteria for Endrin. Office of Water Regulations and Standards Criteria and Standards Division. EPA 440/5-80-047.

U.S. EPA. 1980. Ambient Water Quality Criteria for DDT. Office of Water Regulations and Standards Criteria and Standards Division. Washington DC 20460. EPA 440/5-80-038.

## V

Vainio, H. 2001. Use of biomarkers in risk assessment. *Int J Hyg Environ Health*. Nov;204(2-3):91-102.

Vakharia, D.D., Liu, N., Pause, R., Fasco, M., Bessette, E., Zhang, Q.Y. & Kamisnky, L.S. .2001. Polycyclic aromatic hydrocarbon/metal mixtures: effect on PAH induction of CYP1A1 human HEPG2 cells. *Drug Metab Dispos* 29:999–1006.

Vallee, B.L., Falchuk. K.N. 1993 The biochemical basis of zinc physiology. *Physiol Res* 73:79-118.

Van der Oost, R., Beyer, J., & Vermeulen, N. P. E. 2003. Fish bioaccumulation and biomarkers in environmental risk assessment: a review. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 13, 57-149.

Vandesompele, J., De Preter, K., Pattyn, F., Poppe, B., Van-Roy, N., De Paepe A. & Speleman, F.,. 2002. Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. *Genome Biology*, 3 (7x): research0034.1-0034.11

Vargas, P. 2000. Enzyme linked immunosorbant assay (ELISA) for the Kemp's Ridley sea turtle (*Lepidochelys kempii*: Garman 1880), vitellogenin. Tesis de Maestría en Ciencias. Texas A&M University, College Station, TX. 70.

Vazquez-Euán R., Escalante-Herrera K & Rodríguez-Fuentes G. 2016. Partial Gene Sequencing of CYP1A, Vitellogenin, and Metallothionein in Mosquitofish *Gambusia yucatana* and *Gambusia sexradiata*. *Bull Environ Contam Toxicol* DOI 10.1007/s00128-016-1994-1

Velasco-Santamaría Y, Bjerregaard P, Korsgaard B. Gonadal alterations in male eelpout (*Zoarces viviparus*) exposed to ethinylestradiol and trenbolone separately or in combination. *Marin. Environ. Res*. 2010; 69: S67-S69.

Verslycke, T., Roast, S. D, Widdows, J., Jones, M. B., & Janssen, C. R. 2004. Cellular energy allocation and scope for growth in the estuarine mysid *Neomysis integer* (Crustacea: Mysidacea) following chlorpyrifos exposure: a method comparison. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 306, 1-16.

Viarengo, A., G. Mancinelli, G. Martino, M. Pertica, L. Canesi & A. Mazzucotelli 1988a. Integrated stress indices in trace metal contamination: critical evaluation in a field study. *MEPS Special - Biological Effects of Pollutants: Results of a Practical Workshop*. *Mar.Ecol. Progr.Ser.*, 46:65-70

Virgin, I. I., & Theodorakis, C. W. 2002. Molecular Biomarkers in Aquatic Organisms: DNA Damage and RNA Expression. En S. M. Adams, (Ed.), *Biological indicators of aquatic ecosystems stress*. (pp. 43-110). Maryland, USA: American Fisheries Society.

Volland M, Blasco J, & Hampel M. 2017. Validation of reference genes for RT-qPCR in marine bivalve ecotoxicology: Systematic review and case study using copper treated primary *Ruditapes philippinarum* hemocytes. *Aquat Toxicol.* 2017 Apr;185: 86-94. doi: 10.1016/j.aquatox.2017.01.003. Epub 2017 Jan 16.

## W

Wahli W. 1988. Evolution and expression of vitellogenin genes. *Trends Genet*4:227-232.

Webb, D., Gagnon, M.M. & Rose, T.H. 2005. Interannual variability in fish biomarkers in a contaminated temperature urban estuary. *Ecotoxicology and Environmental Safety.* 62: 53-65.

Widdows, J. 1985. Physiological Responses to Pollution. *Marine Pollution Bulletin,* 16, 129- 134.

Widdows, J., & Donkin, P. 1991. Role of Physiological Energético in Ecotoxicology. Mini- Review. *Comparative Biochemistry and Physiology,* 100C, 65-79.

Wilhelmsson, A., Cuthill, S., Denis, M., Wikstrom, A. C., Gustafsson, J. A. & Poellinger, L. 1990. The specific DNA binding activity of the dioxin receptor is modulated by the 90 kd heat shock protein. *EMBO J* 9(1): 69-76.

Williams T.D., Gensberg K., Minchin S.D. & Chipman J.K. 2003. A DNA expression array to detect toxic stress response in European flounder (*Platichthys flesus*). *Aquatic Toxicology.* 65: 141-157.

Winge DR & Miklossy KA. (1982). Domain nature of metallothionein. *J Biol Chem* 257:3471–3476

Wu WC., Liu HW., Lin A. (2007). Human ribosomal protein L7 displays an ER binding property and is involved in ribosome-ER association. *FEBS Letters,* Volume 581, Issue 4, 20.

## X

Xingping Lang, Lan Wang & Zuobing Zang. 2015. Stability evaluation of reference genes for real-time PCR in zebrafish (*Danio rerio*) exposed to cadmium chloride and subsequently infected by bacteria *Aeromonas hydrophila*. *Aquatic Toxicology* [Volume 170](#), January 2016, Pages 240–250.

## Z

Zhu F, Schlupp I. & Tiedemann R. 2016. Sequence Evolution and Expression of the Androgen Receptor and Other Pathway-Related Genes in a Unisexual Fish, the Amazon Molly, *Poecilia formosa*, and Its Bisexual Ancestors. *PLoS ONE* 11(6): e0156209. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0156209>

Zhao Y, Castiglioni S, Fent K. Synthetic progestins medroxyprogesterone acetate and dydrogesterone and their binary mixtures adversely affect reproduction and lead to histological and transcriptional alterations in zebrafish (*Danio rerio*). *Environ Sci Technol.* 2015 Apr 7;49(7):4636-45. doi: 10.1021/es505575v.

## **Anexos**

## ANEXO 1

### EXTRACCIÓN DE RNA

#### Metodología:

1.- Colocar la muestra (intestinos) en un tubo de 1.5 ml  
2.- Agregar 400 µl de **solución de lisis** previamente preparada con 2-mercaptoetanol y mezclar hasta que no queden pedazos visibles en el tejido (agregar 10 µl de 2-mercaptoetanol por cada 1 ml de solución de lisis)

3.- Transferir el homogenizado a un tubo **Gen Elute Filtration** (Tubo Azul)

4.- Centrifugar a 11000 rpm por 2 minutos o hasta que pase todo el líquido.

**Tirar la columna de filtración, QUEDARSE CON EL TUBO QUE CONTIENE EL LÍQUIDO.**

5.- Agregar 400 µl de etanol (grado biología molecular) al 70% al filtrado y agitar con vortex

fuertemente. (previamente refrigerado)

6.- Transferir 800 µl de la solución (homogenizado con reactivos) a una columna **Gen Elute**

**Binding Column** (Transparente con un O-ring rojo).

7.- Centrifugar a 11000 rpm por 15 segundos. Tirar el sobrenadante del tubo colector y colocar

nuevamente la columna.

8.- Si falta más volumen por transferir, repetir el paso 6 y 7.

9.- Agregar 400 µl de **Wash Solution I**. Centrifugar a velocidad máxima por 15 segundos.

Tirar el líquido del tubo colector y colocar de nuevo la columna.

10.- Agregar 400 µl de **Wash Solution II**. (previamente preparada con etanol) y centrifugar a máxima velocidad por 15 segundos. Desechar el líquido del tubo colector y colocar de nuevo la columna en el tubo colector. Repetir este paso centrifugando por 2min.

11.- Transferir la columna a un nuevo tubo nuevo de 1.5 ml y colocarlo en el concentrador durante 4min a 30°C o dejara a temperatura ambiente por 10 min, para evaporar los residuos de etanol.

12.- Agregar 40  $\mu$ l de solución para eluir (Elute Solution), centrifugar a 11000 rpm por 2 minutos.

13.- El RNA ya está listo en el sobrenadante. Es muy importante ponerlo en hielo mientras se usa congelarlo a  $-80^{\circ}\text{C}$  para su posterior cuantificación/uso.

**Referencia: Sambrook, J y Russell, D.W.2001. Molecular Cloning: A Laboratory Manual 2nd Ed. Cold Spring Harbor Laboratories, Nueva York. USA. Págs.234**

## ANEXO 2

### INSTRUCCIONES PARA EL USO DEL NANODROP 2000 SPECTROPHOTOMETER THERMO SCIENTIFIC

Para el uso del NANODROP 2000 SPECTROPHOTOMETER THERMO SCIENTIFIC se deben seguir las siguientes instrucciones:

- 1.- Para empezar, se deben limpiar las superficies ópticas superior o inferior del sistema de retención de la muestra pipeteando 2µl de agua ultrapura sobre la superficie óptica inferior.
- 2.- Cerrar el brazo de palanca, asegurándose de que el pedestal superior entre en contacto con el agua ultrapura, levantar el brazo de palanca y limpiar ambas superficies ópticas con una toallita azul (utilizar específicamente este material) **Nota:** No tallar las superficies ópticas.
- 3.- Abrir el software de NanoDrop y seleccionar la aplicación de ácido nucleico o la prueba que se desea realizar. Utilice 2µl de volumen de agua ultrapura y/o buffer sobre la superficie óptica para llevar a cabo una medición del blanco. Bajar el brazo de la palanca y seleccionar “En blanco”.
- 4.- Después de medir el blanco, se limpian las superficies ópticas con una toallita azul.
- 5.- Una vez teniendo el blanco, se procede con la medición de las muestras para ello se utiliza 1 µl de la muestra problema.
- 6.- Seleccionar “Measure”, el software calculará automáticamente las proporciones de concentración y pureza.
- 7.- Después de la medición de la muestra, se limpian con toallitas azules las superficies ópticas y agua ultrapura
- 8.- Apagar y desconectar el equipo.

**Nota:** Es importante mencionar que se utiliza una punta por muestra y después de la medición de estas se limpian las superficies ópticas, esto con el fin de evitar lecturas erróneas y contaminación

### ANEXO 3

## SÍNTESIS DE DNA COMPLEMENTARIO

### METODOLOGÍA:

1.-El cDNA se obtuvo utilizando el kit *iScript™ Reverse Transcription Supermix for RT-qPCR* de BIORAD, para la reacción de cada muestra se necesita 16 µl a 250ng de RNA diluido en Agua libre de nucleasas, y 4 µl del reactivo iScript supermix (tabla 51).

Tabla 33. Tabla de componentes del kit iScript Reverse Transcription Supermix BIORAD

Componente	Volumen por Reacción
*5x iScript reverse transcription supermix	4 µl
RNA templado (250 ng por reacción)	Variable
Agua libre de nucleasas	Variable
<b>Volumen total</b>	<b>20 µl</b>

\*Reactivos del supermix: MMLV-RT (RNasaH<sup>+</sup>), inhibidores de RNasa, dNTPs, oligo (dT), random primers, buffer, MgCl<sub>2</sub> y estabilizadores.

Nota: Para obtener 250 ng en 20 µl, utilizamos la regla de tres en concentraciones de RNA menores, o ligeramente mayores 250 ng/ µl y utilizamos la fórmula  $V_1C_1=V_2C_2$  para concentraciones de RNA mucho mayores de 250ng/ µl (ej. 1062.1 ng/ µl de RNA), donde:

V1= Volumen que necesito =?

C1=Concentración que deseo

V2=Volumen que tengo

C2=Concentración que tengo

Una vez obtenida la concentración deseada formamos alícuotas de las muestras para poder usarlas como templado de RNA en las reacciones de retrotranscripción.

2.- El tiempo y la temperatura en cada etapa de la reacción será la siguiente:

Tabla 34. Tiempo de duración en las etapas de retrotranscripción.

<b>Priming y Activación de la Retrotranscriptasa</b>	<b>5 minutos a 25°C</b>
<b>Transcripción Reversa</b>	<b>30 minutos a 42°C</b>
<b>Inactivación de la Retrotranscriptasa</b>	<b>5 minutos a 85°C</b>

Los pasos de la RT-PCR son:

- 1.- Priming (cebado): Unión del primer a la secuencia de RNA objetivo
- 2.-Transcripción reversa: La transcriptasa reversa (DNA/RNA polimerasa dirigida, *rTth*) cataliza extensión mediante la incorporación de nucleótidos complementarios
- 3.- Fin de la transcripción reversa, se obtiene la hebra del cDNA complementario al RNA

Se incuba a 25°C por 5 minutos para activar la transcriptasa reversa (también llamada DNA/RNA polimerasa dirigida y conocida como una DNA polimerasa dependiente de RNA), donde a partir de un cebador con cola poli-T en el extremo 5' establece bases complementarias con la cola poli A en el extremo 3' del RNA transcrito de la hebra que se va a sintetizar, a 42°C una vez que el mRNA se ha unido un primer(oligonucleótido) de DNA se une la RT la cual comienza a generar una cadena complementaria de DNA a partir del modelo de mRNA donde se obtiene un "híbrido" de doble cadena formado por el mRNA molde y el cDNA donde posteriormente la RNasaH<sup>+</sup> se encarga de digerir al RNA molde dejando sDNA monocatenarios, al llegar a 85°C se desactiva la enzima transcriptasa reversa y la RNasaH<sup>+</sup>.

## ANEXO 4

### CÁLCULOS Y REACTIVOS DE LA PCR PUNTO FINAL

La tabla 53 muestra los reactivos utilizados para la PCR punto final, el volumen de cada componente a la concentración requerida fueron obtenidos mediante los cálculos presentados en las tablas 54- 57.

Tabla 35. Reactivos para la PCR punto final.

Reactivos			Blanco y duplicados
Buffer 10x		2.5 µl - 1 x	7.5
Mg – MgCl <sub>2</sub>	25mM	2.5 µl 3 µl- Sólo si mi muestra tiene muchas sustancias desconocidas a 3 mM	7.5
DNTP's	10mM	0.5 µl – 0.2mM	1.5
Primer Forward	10 mM	1 µl – a 0.4mM	3
Primer Reverse	10 mM	1 µl – a .04mM	3
Agua	*El volumen que falta para llegar a 25 µl	-	-
Taq	*Se recomienda ponerlo al final, y sumergir la punta de la micropipeta para asegurarse que se deposite	0.2 µl	0.6 µl
cDNA	*Contemplar para cada réplica menos para el blanco	1-2 µl	X
		25 µl	

Tabla 36. Cálculos para encontrar volúmenes con concentraciones definidas I.

CÁLCULOS PARA ENCONTRAR VOLÚMENES CON CONCENTRACIONES DEFINIDAS.	
Para un volumen total de 25µl de mezcla por muestra, necesito saber la cantidad en µl de Buffer10x para que esté a 1x.	
$V1C1=V2C2$	$V1=X$ del Buffer a 10x
$V1 (10x) = 25\mu l (1x)$	
$V1 = \frac{25\mu l (1x)}{10x}$	
<b><math>V1 = 2.5 \mu l</math> de Buffer 10x</b>	

Tabla 37. Cálculos para encontrar volúmenes con concentraciones definidas II.

<b>Para un volumen total de 25µl de mezcla por muestra, necesito saber la cantidad en µl de Mg-MgCl<sub>2</sub> a 25 mM para que esté a 3 Mm</b>	
$V_1C_1=V_2C_2$	$V_1=X$ de Mg-MgCl <sub>2</sub> a 25 Mm
$V_1 (25mM) = 25\mu l (3mM)$	
$V_1 = \frac{25\mu l (3mM)}{25Mm}$	
<b><math>V_1 = 3 \mu l</math> de Mg-MgCl<sub>2</sub> a 25 Mm</b>	

Tabla 38. Cálculos para encontrar volúmenes con concentraciones definidas III.

<b>Para un volumen total de 25µl de mezcla por muestra, necesito saber la cantidad en µl de DNTP's a 10mM para que esté a 0.2mM.</b>	
$V_1C_1=V_2C_2$	$V_1=X$ de DNTP's a 10Mm
$V_1 (10mM) = 25\mu l (0.2mM)$	
$V_1 = \frac{25\mu l (0.2)}{10}$	
<b><math>V_1 = 0.5 \mu l</math> de DNTP's a 10mM</b>	

Tabla 39. Cálculos para encontrar volúmenes con concentraciones definidas IV.

<b>Para un volumen total de 25µl de mezcla por muestra, necesito saber la cantidad en µl de Primer (forward o reverse) a 10mM para que esté a 0.4mM.</b>	
$V_1C_1=V_2C_2$	$V_1=X$ de Primer (F ó R) a 100Mm
$V_1 (10mM) = 25\mu l (.4mM)$	
$V_1 = \frac{25\mu l (.4)}{10}$	
<b><math>V_1 = 1 \mu l</math> de cebadores (F ó R) a 10Mm</b>	

Los elementos que interactúan en las tres etapas principales de las que se compone la PCR que son:

- ❖ **Solución tampón o Buffer:** Mantiene el pH adecuado para el funcionamiento de la ADN polimerasa.
- ❖ **Concentración de Cloruro de Magnesio:** En ausencia de concentraciones adecuadas del ión  $Mg^{2+}$  libre el DNA polimerasa es inactiva, por lo tanto, la concentración de Magnesio es un factor crucial que afecta el desarrollo de la PCR. Muchos de los componentes de la reacción unen Magnesio, incluyendo la matriz de DNA, agentes quelantes presentes en la muestra (EDTA o Citrato), dNTPs y proteínas. Como resultado, se puede ver afectada la cantidad de  $Mg^{2+}$  libre presente en la reacción. Por otro lado, el exceso de  $Mg^{2+}$  disminuye

la fidelidad de la enzima y puede incrementar el nivel de amplificación no específica. Por lo tanto, para cada protocolo de amplificación por PCR se deben optimizar las concentraciones de  $\text{Cl}_2\text{Mg}$  entre los rangos de 1 a 9 mM finales (esto se logra de manera experimental comparando el nivel de amplificación logrado con diferentes concentraciones de  $\text{Mg}^{2+}$ , proceso conocido como titulación de  $\text{Mg}^{2+}$ ).

- ❖ **Cebadores/iniciadores/primers/oligonucleótidos:** Son secuencias de oligonucleótidos que permiten que la polimerasa inicie la reacción. Delimitan la zona de DNA a amplificar, es decir, corresponden a los nucleótidos que definen los extremos de la secuencia que se desea replicar.
- **Taq:** Es una enzima polimerasa termoestable utilizada PCR con habilidad de sintetizar ADN a altas temperaturas ( alrededor de  $72^\circ\text{C}$ ) y que permite eliminar la mayoría de las estructuras secundarias presentes en la molécula blanco, una de sus desventajas es que no posee actividad correctora 3'-5' con lo que su tasa de error es de  $10^{-4}$  errores por par de bases incorporada, sin embargo es mucho menor si se compara con otras enzimas como Vent ( $10^{-5}$ ) y Pfu ( $10^{-7}$ ) y considerando que una polimerasa normal tiene un error de  $10^{-6}$  errores por par de bases incorporada.

## ETAPAS DE LA PCR

**Desnaturalización:** Un ciclo de PCR comienza con un calentamiento inicial que desnaturaliza el DNA blanco a  $94-95^\circ\text{C}$  o más. Este primer paso del ciclo dura en promedio de 20s a 3 minutos, el tiempo depende de la secuencia del templado, es decir, si la cantidad de G-C es alta, será necesario más tiempo para romper sus uniones debido a que el apareamiento de estas bases es de tres enlaces, además dependen de la velocidad del termociclador para aumentar la temperatura y esto varía dependiendo al modelo del equipo. En el proceso de desnaturalización, las dos cadenas del DNA se separan una de la otra y permiten que la matriz “templada” se encuentre como cadena simple, necesaria para la actividad llevada a cabo por la polimerasa termoestable durante los pasos de amplificación.

**Alineamiento o hibridación:** En el siguiente paso del ciclo, la temperatura se reduce a un valor que oscila en el rango de los  $40^\circ\text{C}$  a los  $60^\circ\text{C}$ . Esta temperatura se conoce como temperatura de hibridación o temperatura de melting, y es importante que sea óptima para que cada uno de los oligonucleótidos (primers) hibride con la secuencia complementaria en cada una de las cadenas

simples de DNA, que se han separado en el paso anterior, y sirviendo como cebadores para la síntesis, por la polimerasa termoestable.

**Síntesis ó extensión:** En esta etapa la Taq polimerasa actúa sobre el complejo templado-primers y agrega muy rápidamente dNTPs complementarios para crear las cadenas completas de DNA. La síntesis de DNA se inicia cuando la temperatura de la reacción llega al valor óptimo para la actividad de la polimerasa. Para la mayoría de las polimerasas esta temperatura se encuentra en, aproximadamente los 72 °C. Luego se permite la síntesis durante 30 s a 2 min. Este paso completa un ciclo y el siguiente ciclo se inicia con el retorno a los 94-95 °C para la desnaturalización. La cantidad de amplificado.

## ANEXO 5

### PURIFICACION DEL PRODUCTO DE PCR EN GEL DE AGAROSA

Para la purificación del producto de PCR se prepara un gel de agarosa (ver ANEXO 6) donde se inyecta todo el producto del PCR y se corre la electroforesis, posteriormente translada el gel a la cámara UV y con una espátula se corta la banda de interés para eliminar los dímeros y se introduce en un tubo eppendorf (previamente pesado) y se obtiene el peso del pedazo de gel. A partir de este material se puede llevar a cabo la purificación del DNA con el kit comercial Zymoclean™ Gel DNA Recovery Kit mediante el siguiente procedimiento:

- 1.- En el mismo tubo eppendorf adicionar 3 volúmenes de ADB por cada volumen de gel (ejemplo: para 100mg de rebanada de gel, adicionar 300 µl de *Agarose Dissolving Buffer*)
- 2.- Incubar de 37-55°C por 5-10 minutos. No incubar arriba de 60°C.
- 3.- Transferir la solución disuelta a una columna *Zymo-Spin Column* en un tubo de colección.
- 4.- Centrifugar a máxima velocidad ( $\geq 10,000 \times g$ ) por 30 segundos. Descartar el sobrenadante.  
(de *Agarose Dissolving Buffer*)
- 2.- Incubar de 37-55°C por 5-10 minutos. No incubar arriba de 60°C.
- 3.- Transferir la solución disuelta a una columna *Zymo-Spin Column* en un tubo de colección.
- 4.- Centrifugar a máxima velocidad ( $\geq 10,000 \times g$ ) por 30 segundos. Descartar el sobrenadante.
- 5.- Adicionar 200µl de *DNA Wash Buffer* en la columna y centrifugar por 30 segundos.
- 6.- Repetir paso 5
- 7.- Traspasar la columna *Zymo-spin* a un tubo nuevo de 1.5 ml. Adicionar  $\geq 6 \mu\text{l}$  de *DNA Elution buffer* o agua directamente en la columna matriz y darle un spin en la centrífuga para eluir el DNA. Se desecha la columna y se conserva el sobrenadante.

Una vez obtenido el producto purificado se realiza un gel de electroforesis con un poco de este producto para asegurar que los dímeros han sido removidos.

## ANEXO 6

### PREPARACIÓN DE GELES DE ELECTROFORESIS

#### Preparación de geles 1x

1.-Para la cámara pequeña necesitaremos 20 ml al 1%

Agar al 1%	0.2 gr
buffer TAE 1x	20 ml

2.-Se pone en la parrilla unos minutos hasta que quede transparente, procurar tapar la boca del matraz mientras se calienta ya que puede evaporarse el líquido.

3.-Agregar:

SYBR Safe (Rojo)	.5 $\mu$ l por cada 10ml de buffer TAE 1x
	1 $\mu$ l por 20ml de buffer TAE 1x

4.-Armar la cámara de electroforesis, calibrarla

5.- Se vierte el líquido en la cámara y se cubre mientras gelifica ya que el SYBR Safe es fotosensible, esperar 20 minutos.

6.-Separar con cuidado el peine, y colocar la base con el gel en la cámara, los pozos deben ubicarse en el extremo negativo (negro) para que las moléculas negativas como el DNA ó RNA corren hacia el polo positivo.

7.- Inyección de muestras

Ponemos **2  $\mu$ l de colorante 6x en vita film** (en bolitas, según el número de muestras)

Tomamos **2  $\mu$ l por muestra o blanco**

+Mezclamos con cuidado procurando no producir burbujas de aire

+Cambiar el volumen de la micropipeta entre 3 y 4  $\mu$ l

+Inyectar con cuidado la muestra a partir del pozo 2

**Pozo 1: va el marcador molecular 100pb DNA Ladder 0.8  $\mu$ l**

8.-Corremos el gel a 85V por 40 minutos.

Nota: En caso de que la muestra tenga un producto de 100 pb o menor, preparar el gel con agar al 2% y correr 30 minutos a 70V.

## ANEXO 7

### BLAST

BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) es un programa informático de alineamiento de secuencias de tipo local, ya sea de DNA, RNA o de proteínas. El programa es capaz de comparar una secuencia problema (también denominada en la literatura secuencia *query*) contra una gran cantidad de secuencias que se encuentren en una base de datos. El algoritmo encuentra las secuencias de la base de datos que tienen mayor parecido a la secuencia problema.

Los resultados de las secuencias fueron enviados por correo en formato *\*.abi*, *\*.ab1*, *\*.scf*, o *\*.esd*, para abrirlo se utilizó el programa Bioedit (ANEXO 8) para obtener las secuencias en formato FASTA para esto seleccionamos la herramienta **file-> export a fasta** e incorporamos directamente en la página de NCBI <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>, seleccionamos **blast -> Nucleotide blast**, se coloca la secuencia en formato FASTA, seleccionamos para la búsqueda en la base de datos “Nucleótidos de colección (nr/nt)” y para la optimización “Secuencias altamente similares” y presionamos el botón BLAST.

The image shows the NCBI BLAST Standard Nucleotide BLAST interface. The 'Enter Query Sequence' field is highlighted with a red box and contains the following FASTA sequence:

```
ACGATGAGCTGCTTACGCCAGAGTGTAGCCAGCAGGGCGTCTCAG
GGTCTGCCCGTTCTTGAGATACCMGCCTCAAACTCACCACACCCAGCAG
CAACGATCAGGACGGCCAGTCACTCCGCTGGAGGTACCAAGTGTATGTTT
A
```

A red arrow points to this field with the text "Insertar secuencia en Formato FASTA".

In the 'Choose Search Set' section, the 'Nucleotide collection (nr/nt)' option is selected. A red arrow points to this option.

At the bottom, the 'BLAST' button is highlighted with a red arrow. The text next to it reads "ion (nr/nt) using Megablast (Optimize for highly similar sequences)".

Figura 67. Insertar secuencia en Formato Fasta en Blast.

## ANEXO 8

### BIOEDIT

<http://www.mbio.ncsu.edu/bioedit/bioedit.html>

Bioedit es un programa de libre acceso que permiten editar y alinear las secuencias. Debe ser instalado.

#### Generación de cromatogramas

Para obtener el cromatograma **edit > copy trace as a metafile > copy page 1 OK >** ir a word o wordpad o a correo **CTRL+V**, aparece la imagen con extensión XPS.

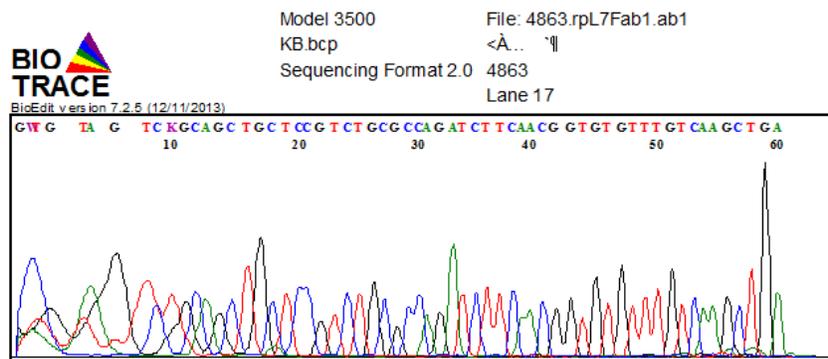


Figura 68. Ejemplo de cromatograma generado por Bioedit.

#### Alineamiento de secuencias para visualizar zonas conservadas

De manera exploratoria se alinean las secuencias F y R para comprobar su grado de conservación de entre ellas y visualizar los errores de lectura, esto nos ayudará a tomar una decisión para elegir a nuestra secuencia consenso para diseñar los oligonucleótidos del gen deseado, generalmente se suele elegir la secuencia forward ya que suele tener menos errores de lectura, sin embargo hay casos donde la mejor opción es la secuencia reverse, pero si ambas secuencias poseen buena calidad resulta más útil elegir las secciones conservadas entre ambas así que procedemos a la evaluación.

Con Bioedit en un nuevo archivo abrimos la primera secuencia F e incorporamos la secuencia R, **File > Open > Import new sequence**, seleccionamos ambas y vamos a **Accessory Application > CAP conting assembly program**, CAP conting es un ensamblador que entre sus funciones permite encontrar fragmentos donde los genes se solapan en el genoma en el caso de la transcripción sentido-antisentido y pueden ser ensamblados idealmente de forma separada.

Nota: Seleccionando los botones “Secuencia con color (flecha)” y “Vista de conservación con puntos” pueden observarse los sitios variables con respecto a la primera secuencia.

# ANEXO 9

## RESULTADOS DE LOS TRES METODOS DE EXPRESION RELATIVA EN CADA ORGANISMO

Tabla 40. Expresión relativa de CYP1A en cada organismo evaluada por los 3 métodos. DD: Delta CT comparativo, CE: Curva estándar y 3GENES: Media Geométrica con múltiples genes de referencia.

Estación	Sexo	CYP1A- TEMPORADA 1						Sexo	CYP1A- TEMPORADA 2							
		DD-B-Actin	CE-B-Actin	DD-E1FA	CE-E1FA	DD-RPL7	CE-RPL7		3GENES	DD-B-Actin	CE-B-Actin	DD-E1FA	CE-E1FA	DD-RPL7	CE-RPL7	3GENES
E6	M	0.40528256	0.39135611	3.95040345	3.58142917	0.47697978	0.46375868	1.04365147	H	9.95209323	12.865133	1.51047259	1.45119561	0.00374713	0.290162859	0.84329824
	H	11.5114686	13.1832578	0.11703043	0.13589048	0.87964908	0.88419017	0.95327079	H	6.1688433	1.24248995	2.51402675	2.35513283	0.0110869	0.825077594	0.91456161
	M	0.12345011	0.12177572	3.67310465	3.32346589	0.25738502	0.26227893	1.25039668	H	4.04180579	7.03059788	0.82074161	0.81747533	0.00127084	0.101265212	1.05209202
	H	8.11167584	8.37055275	0.55864357	0.5868204	1.45902034	1.37282137	0.82556552	M	0.03644842	0.07508283	1.2544022	1.22045561	0.0150614	0.151790918	1.53152665
	H	0.94278454	1.03745978	0.51763246	0.53707049	0.57434918	0.61009005	1.11450604	M	8.78474251	0.32970627	3.48220225	3.20067785	0.01295812	0.917505822	1.0021394
	M	0.78024548	0.74092029	1.20330303	1.19255148	0.5974956	0.55920549	1.07315446	H	1.72907446	3.23852473	0.2051854	0.22711638	0.00383914	0.297286698	1.16117603
	M	0.57315609	0.54788565	8.79692919	7.55635727	0.22251893	0.20279874	1.01741704	H	1.77153504	3.98365991	2.67585511	2.47694838	0.00652412	0.50524021	0.84906063
	M	0.6816013	0.69141982	4.89734557	4.36262949	0.32241706	0.3153875	1.00444739	M	0.11203334	0.19756997	0.96392981	0.96210056	0.02446732	0.23528571	1.36388091
	M	0.30396982	0.31084002	1.1867368	1.11275503	0.16083649	0.1594781	1.31857221	M	0.2362031	0.11889931	4.3984646	3.95247701	0.01736107	0.158876683	1.29786366
	M	0.08549596	0.07428054	8.49727349	7.3355123	0.6037403	0.57183877	1.1243982	M	0.03879461	0.11984627	0.46233164	0.48463715	0.01893239	0.182194231	1.57401438
E9	H	8.39773347	10.3279764	0.16210494	0.18225354	22.3933739	28.7349874	0.66964863	M	0.58317468	0.53130419	0.8926267	0.90964431	0.48029743	0.179194462	0.92157429
	M	0.21568534	0.22027638	0.32632226	0.35607432	0.60793964	0.65716413	1.34297091	M	0.19304378	0.17293886	1.29414565	1.27547214	0.27881615	2.739177466	1.05224107
	H	3.97236998	4.82341979	0.25971478	0.2819946	2.21913894	2.6031047	0.87934126	M	0.0273933	0.06831148	1.81126797	1.7260163	0.02781487	0.272000441	1.40968556
	H	18.4429815	22.9127521	0.58641747	0.60398806	1.97246541	2.19738004	0.70909034	M	0.26007507	0.25297794	0.95727146	0.95736096	0.02879576	0.274331339	1.31086749
	M	0.07468695	0.06978651	0.98418402	0.98011743	0.3303346	0.32961668	1.46034398	M	0.16981079	0.16219967	0.35774413	0.38342173	0.03879461	0.375235583	1.4554885
	M	0.756284	0.81413878	0.21718555	0.23972935	0.23358124	0.23797232	1.05771144	M	0.83335329	0.77041884	6.65884473	6.80247741	0.09519305	0.8632070568	0.4346792
	H	1.61888443	1.61888379	0.16493849	0.18756916	2.02090289	2.01515937	1.49004555	M	0.3303346	0.30476282	1.37745005	1.35106364	0.05336361	0.490255853	1.17383591
	M	0.44658293	0.5690285	0.42543186	0.43916392	0.86274135	1.1412816	1.13097337	M	0.03988527	0.04132804	0.19710004	0.21548178	0.01953222	0.228573162	0.84124864
	M	0.68634222	0.67411508	0.95395955	0.95652441	0.3060841	0.28882842	1.18254179	M	0.31251558	0.29834253	1.11110873	1.10075554	0.01784916	0.163929392	1.33692447
	M	0.11638685	0.12018467	0.2655398	0.28801567	0.18263055	0.19223803	1.64888583	M	0.007114963	0.064	0.95395955	0.9546634	0.09719325	0.961942587	1.3275102
E10	H	10.41073448	12.1457743	0.60499704	0.6237789	1.16073091	1.21283992	0.79939332	M	0.09786929	0.09838587	2.44867278	2.27237161	0.00717403	0.099152923	1.51564217
	M	0.25121596	0.24689195	0.980779	0.97774714	0.31360055	0.31065776	1.29505138	H	14.4200074	18.282432	0.07484242	0.08887261	0.60347778	0.502265823	0.42862722
	M	0.08579278	0.09836542	0.12175053	0.13775878	0.11679092	0.13593227	1.0275354	H	4.70762695	5.30603802	0.47139227	0.49430982	0.00699238	0.527881999	0.51308312
	M	0.17458482	0.17272001	0.91193317	0.91199161	0.28657805	0.289527	1.3608726	M	0.08579278	0.08207594	0.52195596	0.54310985	0.02001187	0.193866745	1.60718251
	M	0.17337887	0.17219322	0.29361549	0.31782275	0.22798329	0.22871232	1.54837679	M	0.22021734	0.2055906	1.02954008	1.02690882	0.04129183	0.386534818	0.47347533
	M	0.24098245	0.22756322	1.49174403	1.44813963	0.48531724	0.47213953	1.20417148	H	8.83058792	0.95536308	0.05059014	0.06167133	0.00341239	0.372866637	1.50713161
	M	0.1016724	0.10806208	18.4555158	0.11281259	0.12027383	0.15168755	M	1.83655232	2.29780548	0.50417623	0.51853033	2.66105808	3.78465114	0.68350669	
	H	10.9662624	19.6566525	0.9087328	0.10247676	0.01089644	0.01408071	1.14894922	H	11.8351001	14.4586818	0.1995746	0.22178584	2.83824671	0.481015368	
	M	0.77217513	0.79564641	1.40152745	1.36288344	0.2749004	0.2698163	1.12997129	H	8.22491061	10.2413934	1.41421356	1.36116455	0.00654677	0.531635467	0.0606420
	H	31.0172741	38.8804469	0.38555271	0.4122984	0.70956168	0.7395955	0.77963026	H	25.3690924	25.6082526	20.39297	16.7038872	0.07829153	5.485634655	0.7182756
E13	H	159.78631	279.252354	0.61557221	0.61848452	6.12623199	9.24204383	0.47646143	H	13.7847386	16.356586	3.29436407	3.00850203	0.00716409	0.543014297	0.60269598
	M	0.9506591	0.92784349	0.54790588	0.58561652	40.4200724	47.2395334	0.7250315	H	14.0256915	13.0392877	2.30537269	2.16222788	0.08266001	0.5483370536	0.47347533
	H	25.7232317	25.3686826	0.43527528	0.46929146	13.59496	12.8960368	0.60445854	H	27.0021055	26.7295938	18.9614843	15.6311104	0.06228377	0.2415350404	0.49847382
	H	116.162452	153.40522	0.32085647	0.34537684	1.77768536	1.92357658	0.62826995	H	26.627417	22.0297039	9.54668594	8.28099663	0.08508213	0.792473748	0.56567482
	H	11.5114686	11.4127157	12.1257325	10.2882198	0.04298568	0.04298568	2.977332175	H	13.7847386	13.4643913	1.3425725	1.33417799	0.05478786	3.70819496	0.58789858
	H	22.5491321	22.4635047	1.74714579	1.7074112	0.07641502	0.300086524	0.85151735	H	1.9656412	1.96201285	2.03495938	1.94067001	0.01782443	1.294303986	0.81534903
	H	10.7778686	12.3884727	0.97603176	0.97443464	0.66204446	0.66139264	0.81082156	M	0.60165151	0.65304561	0.80496614	0.805102	0.05779146	0.64080734	1.10859625
	H	1.8403753	2.19260456	1.04971668	1.03025636	0.25702846	0.27667837	1.04483744	M	0.13985464	0.13844992	1.19913991	1.17266664	0.04613483	0.471196924	1.2919710
	H	6.2117151	7.434466783	0.50873985	0.52821545	1.15668818	1.26884964	0.84959206	H	1.03168318	1.08777161	0.04180579	0.03772767	0.02376529	1.908764966	0.67607249
	M	0.4920201	0.50756834	53.7055768	78.922905	0.51312592	M	0.12692076	0.12988007	0.6959232	0.70471946	0.03484269	0.364773713	1.40316989		
E19	H	4.1410597	4.48113907	2.77021894	2.57391158	1.27898558	1.29675224	0.76173268	M	0.05317898	0.04874772	0.22021734	0.24387709	0.04086473	0.400872565	1.70605807
	M	0.46073209	0.74517575	0.05048505	0.05916291	2.9628796	5.30752373	1.1517175	M	0.3349459	0.28542928	4.32290161	3.93891782	0.17887207	1.606052266	0.94341977
	M	0.19224494	0.14215289	0.21493912	0.23332554	1.10726458	1.47180604	1.35008936	H	6.65758988	7.00730838	3.41053957	3.13645583	0.02987329	2.225625749	0.67870763
	M	0.03892929	0.04218904	0.27970928	0.29919431	0.46073209	0.56118538	1.63765401	M	0.05759151	0.06233276	0.07417105	0.07325232	0.01227613	1.34451808	2.05453525
	H	6.70389708	8.11840253	0.54525387	0.56372876	0.54525387	0.58201532	0.9045917	M	0.0484285	0.04226598	4.53782194	4.07647863	0.06302203	0.602821342	1.2543287
	M	0.13745202	0.16050031	0.38742797	0.40178217	0.05582267	0.06615594	1.71118095	H	3.38698125	3.94338131	0.95926412	0.95322458	0.04239389	3.665353777	0.99595563
	M	0.11598418	0.12167388	0.45913808	0.47749101	0.14579367	0.15428993	1.59976245	M	0.20618339	0.22022274	0.29463485	0.33369109	0.01860714	0.192805359	1.55108627
	M	0.63156363	0.6895638	0.50069363	0.51976891	0.64079577	M	0.14279328	0.14692826	0.22877479	0.25113669	0.01495737	0.150302001	1.67933225		
	M	0.10821707	0.10304728	0.51298907	0.53493298	0.38077219	0.38355897	1.46968664	M	0.4819649	0.48905312	0.24098245	0.26518155	0.0393616	0.13827443	
	M	0.12892076	0.12779976	2.59727721	2.40362462	0.14378649										

Tabla 41. Expresion relativa de MT en cada organismo evaluada por los 3 métodos. DD: Delta CT comparativo, CE: Curva estándar y 3GENES: Media Geométrica con múltiples genes de referencia.

Estación	Sexo	MT-TEMPORADA 1							Sexo	MT-TEMPORADA 2						
		DD-B-Actin	CE-B-Actin	DD-E1FA	CE-E1FA	DD-RPL7	CU-RPL7	3GENES		DD-B-Actin	CE-B-Actin	DD-E1FA	CE-E1FA	DD-RPL7	CU-RPL7	3GENES
E6	M	1.43048067	0.39552908	4.03620654	3.61961739	0.48733982	0.46870366	1.0406141	H	1.76846786	1.38320948	0.26840808	0.15824095	0.00666586	0.03209777	1.644661
	H	0.65918257	1.38470497	0.01748789	0.01427327	0.12974492	0.0942151	1.87781689	H	1.22476079	0.20310998	0.49913432	0.38499384	0.00220119	0.136827537	1.6192726
	M	0.38998756	0.25969529	3.35892597	2.52981158	0.23536962	0.19964588	1.35898234	H	0.78594486	0.72329076	0.1595964	0.08409987	0.00224112	0.010568693	2.09019444
	H	0.13761885	0.02596249	0.02473161	0.01805373	0.06375799	0.04291971	2.34799535	M	0.12789218	0.25066602	4.40151444	0.47452345	0.05284827	0.506758011	1.0670703
	H	0.03122294	0.04964578	0.04473352	0.02570054	0.04899404	0.02961335	2.77658396	H	4.10533514	0.14877428	1.62732229	1.44425081	0.0605566	0.42000518	1.2725089
	M	1.88753056	0.53330408	0.84264683	0.85838188	0.41841312	0.40250829	1.18406853	H	0.97772456	1.35378727	0.11602439	0.09494053	0.00217089	0.1260772	1.51213181
	M	2.98245423	0.91754683	13.2507306	12.6546693	0.33517815	0.33962806	0.87101239	H	0.37306528	0.55836626	0.56350488	0.34717933	0.00137391	0.071841462	1.53580235
	M	5.66273886	0.29677714	11.7778149	11.29550587	0.77539321	0.81658588	0.75501468	M	0.22814137	0.40661085	1.96291813	1.98006064	0.04982453	0.484232098	1.09882905
	M	1.46053811	0.36109037	1.65061082	1.29235427	0.22370458	0.18521795	1.26547082	M	0.3784042	0.19482128	7.05184126	6.58709303	0.02783415	0.264779653	1.11416501
	M	0.38729372	0.10815576	11.1424918	10.6808314	10.67918587	0.83262262	1.00341167	M	0.10460328	0.32992423	1.24860119	1.33415529	0.01504086	0.501561629	1.26212932
E9	H	0.08800626	0.12704902	0.004433	0.00224198	0.60447308	0.35859768	2.51745419	M	0.22037004	0.1983108	0.33868124	0.33952733	0.18149479	1.761452774	1.23812675
	M	2.54294454	0.75010972	1.1352421	1.20271594	2.07483987	2.21971016	0.93277335	M	0.0882659	0.07533365	0.59172551	0.55560659	0.12656935	1.193209164	1.35091812
	H	0.43792326	0.86838123	0.07471284	0.05076871	0.63014249	0.47543083	1.47493633	M	0.34222095	0.36400305	8.56230959	9.19721233	0.13148772	1.449375538	0.85314292
	H	1.36466679	2.80550462	0.11168443	0.07395407	0.37080947	0.27294758	1.33521998	M	0.49414283	0.49641574	1.8188165	1.87861858	0.05471196	0.538317281	1.07083737
	M	1.66612888	0.58975236	6.3554752	7.66791493	2.13317156	2.57874473	0.97278957	M	0.36805672	0.36988592	0.77539321	0.68408542	0.08408545	0.245370064	1.36513335
	M	9.72366372	3.12010091	0.80832087	0.91873743	0.86934456	0.91200379	0.90775385	M	0.627636	0.64169564	7.27526601	6.89678884	0.07169419	0.719033515	0.89016619
	H	0.07400415	0.14437847	0.0196749	0.01672816	0.23795324	0.18232092	2.16935273	M	0.27604971	0.26388387	1.15108949	1.16984054	0.0445942	0.424496047	1.2294484
	M	1.40590587	0.29677714	0.3876966	0.22132841	0.78621729	0.57517941	1.39611399	M	0.32714452	0.28061771	1.61664174	1.46311984	0.16020599	1.552010233	1.03923316
	M	6.45984702	2.16643269	2.59907812	3.05983395	0.83393104	0.92393565	0.83360456	M	0.09106244	0.06861755	0.32376075	0.25316921	0.00250098	0.03770308	2.08041846
	M	2.41412437	0.73294758	1.59438495	1.7564669	1.09657159	1.17236586	0.95907207	M	0.21884783	0.1913416	0.94147846	0.82804327	0.02109434	0.179454378	1.42785141
E10	H	2.232639	5.59382087	0.33856389	0.28727608	0.64115719	0.56664702	1.00982223	M	0.82245007	0.92352365	20.5775597	21.3301852	0.06028739	0.694912123	1.77343997
	M	1.60937441	0.45937722	1.8188165	1.82144947	0.58156002	0.57827571	1.47497999	H	1.06621619	0.70204185	0.00553385	0.00341269	0.03722718	1.951387245	1.71630847
	M	1.98137232	0.53177601	0.81394319	0.74474153	0.78078649	0.73486716	1.13226705	H	2.30138125	2.08935349	0.2304459	0.1946439	0.00341831	0.210871924	0.9756441
	M	1.93388231	0.57804207	2.9241149	3.05216237	0.91891288	0.96896003	0.94723602	M	0.23052578	0.22475372	1.4024925	1.487232	0.05377204	0.530850171	1.18860546
	M	1.59825765	0.46188568	0.78349719	0.85252281	0.60836118	0.61349439	1.15217311	M	0.23536962	0.22227394	1.10037661	1.11024078	0.04413295	0.417904482	1.25490443
	M	2.36444241	0.75136732	4.23687334	4.78146161	1.37840515	1.5589084	0.84094674	H	1.0588513	0.93690347	0.06414566	0.6048147	0.00432675	0.272442054	1.51889032
	M	0.10743232	0.0195049	7.17510528	3.33116773	0.03450621	0.02170908	1.93217893	M	0.44534645	0.29669776	0.12225793	0.0669503	0.64528125	4.814548265	1.26938055
	H	177.755452	561.945459	3.84371135	2.92961198	0.45494057	0.40836593	0.52136681	H	0.37827308	0.22332512	0.0063788	0.00342568	0.09071595	4.669990514	0.92417955
	M	23.9424685	9.31275485	12.5794767	15.9520597	2.46741434	3.15810256	0.54052597	H	7.22250852	6.81627606	1.24185781	0.90593857	0.00574889	0.358969895	0.78196071
	H	0.35234219	0.57305764	0.01145801	0.00607685	0.02081475	0.01105864	2.77448316	H	4.30943878	4.35758178	3.46414664	2.84238662	0.01329935	0.946962593	0.91918294
E13	H	13.8206159	25.20097	0.13893673	0.05548638	1.36485719	0.84611381	0.98724094	H	7.47720973	7.23705745	1.78695091	1.33112754	0.003886	0.243736722	1.1913706
	M	1.05811762	0.26160783	0.1765318	0.16511606	13.023091	13.3193064	1.06063608	H	1.36840948	1.31035265	0.22492252	0.22271463	0.00806468	0.559013454	0.88727963
	H	0.63233019	1.46792199	0.02792111	0.02715487	0.86080001	0.75701009	1.42064761	H	3.32303157	3.28536473	2.33350733	1.92123753	0.00766499	0.525611981	0.90108942
	H	1.36013514	2.36535722	0.00980341	0.00532537	0.05361387	0.03008891	2.20507376	H	3.03669076	3.05635018	1.28120382	1.14888632	0.01141837	0.815265132	0.83964687
	H	2.86294509	2.91827845	3.01571481	2.63074022	0.0106907	0.772334372	1.34795415	H	1.34490102	1.22079985	0.1309874	0.12096828	0.00534535	0.345004963	1.11476212
	H	2.7463205	2.65677179	0.21978662	0.20193652	0.00930679	0.635916417	1.2333958	H	0.83653627	0.78035605	0.86603666	0.77186731	0.00758571	0.022336935	1.14212568
	H	3.66483946	10.0947681	0.86603666	0.79401972	0.57984934	0.54673676	0.86262297	M	1.22094651	1.09015378	1.63353798	1.34398726	0.11727765	1.069390254	0.95255725
	H	0.75983075	1.75393188	1.13092245	0.82413377	0.2733365	0.22452668	1.11992796	M	0.08207007	0.0633711	0.70388411	0.53676042	0.02707303	0.216575569	1.63642074
	H	2.232639	5.65553538	0.47714511	0.40181232	1.07084524	0.97918027	0.92436304	H	0.27215492	0.20840983	1.06621619	0.6969945	0.00269221	0.370999458	1.0965805
	E19	M	11.5634501	2.4571872	0.11486411	0.06394055	12.535955	9.94225495	0.96088225	M	0.19250929	0.16523575	1.05555372	1.09655674	0.05284827	0.464071662
H		1.94362514	5.48754301	3.39285553	3.15197772	1.54622471	1.61096781	1.17681812	M	0.21508816	0.22396903	0.8906929	1.12864132	0.16528183	1.84178935	0.97797495
M		4.32140366	0.81324364	0.13707145	0.06456713	8.04448464	5.79233816	1.13080841	M	0.48733982	0.55312825	6.28973834	7.63315779	0.2602554	3.112339718	0.77190597
M		6.09024388	1.83401011	3.1777376	3.01028968	16.3701995	18.9887597	0.62821107	H	1.57188971	1.40477775	0.80524517	0.62877543	0.00705323	0.452635767	1.38779755
M		1.11457987	0.30483853	2.3181919	2.16184012	3.81848406	4.05486686	0.90670489	M	0.20632635	0.17744226	0.26572392	0.24858842	0.04398026	0.382743082	1.50543574
H		2.26380548	5.63893756	0.48046392	0.39155871	0.47425997	0.41011105	1.0107589	M	0.05248322	0.04634557	4.91775547	4.46994856	0.06829861	0.661006873	1.22014302
M		15.7961383	4.98649812	12.8883887	12.4827547	1.85703371	2.05536337	0.61173849	H	0.73841307	0.55307621	0.20913407	0.13369385	0.00924251	0.521521773	1.28671484
M		1.42553158	0.39144045	1.63353798	1.5361497	0.51870997	0.49637046	1.12832571	M	0.20776147	0.17600325	0.29688992	0.26687779	0.01874955	0.154091124	1.63775621
M		0.38729372	0.0742239	0.08887984	0.0559515	29.6097417	25.7230536	1.25473401	M	0.1681709	0.13955455	0.26943329	0.23853319	0.01761563	0.142758972	1.70824497
M		0.8019032	0.22377005	1.10037861	1.16162193	0.81676899	0.83299094	1.16498243	M	0.24707141	0.20432229	0.12353571	0.11079062	0.02016504	0.161165936	1.75419405
E22	M	1.09543205	0.30004494	6.48901724	5.64316738</											

Tabla 42. Expresion relativa de VTG en cada organismo evaluada por los 3 métodos. DD: Delta CT comparativo, CE: Curva estándar y 3GENES: Media Geométrica con múltiples genes de referencia.

Estación	Sexo	VTG- TEMPORADA 1							Sexo	VTG- TEMPORADA 2							
		DD-B-Actin	CE-B-Actin	DD-E1FA	CE-E1FA	DD-RPL7	CU-RPL7	3GENES		DD-B-Actin	CE-B-Actin	DD-E1FA	CE-E1FA	DD-RPL7	CU-RPL7	3GENES	
	M	0.66434291	0.52023847	5.25977104	4.76087432	0.63507549	0.61648484	0.95738233	H							0.03633214	
	H							0.47708448	H							0.10489007	
	M	0.77916458	0.59811736	18.8305078	16.3236369	1.31950791	1.28821721	0.77528902	H							0.04389501	
E6	H							0.27360482	M	1.1974787	2.49489276	44.1701553	40.5539575	0.53034387	5.043790552	0.5354878	
	H							0.29911413	H							0.71886036	
	M	0.20166044	0.15861523	0.25261286	0.25529983	0.12543397	0.11971396	1.70129338	H							0.38492131	
	M	0.55286533	0.43399539	6.89236928	5.98559983	0.17434296	0.1606425	1.0892442	H							0.05237328	
	M	0.35478084	0.28620488	2.07052985	1.80585779	0.13631347	0.13055085	1.30751961	M	0.16210494	0.29748796	1.49484925	1.44866819	0.03794359	0.354277855	1.20465179	
	M	0.0247745	0.02126049	0.07856334	0.07610897	0.01064756	0.0109078	3.04756824	M	0.4219079	0.22231768	8.42688829	7.51677248	0.03326157	0.302149734	1.06934297	
	M	0.03901033	0.0278888	3.14923191	2.75413501	0.22375627	0.21469818	1.50501951	M	0.04419417	0.14072989	0.5644822	0.56908681	0.02311543	0.122147673	1.49868892	
	H							0.32468081	M	0.36475509	0.37066504	0.60081802	0.6346145	0.32197041	3.292351949	1.0245729	
	M	0.38689125	0.30509888	0.48464491	0.48919149	0.88576752	0.90284271	1.22003031	M	0.09182304	0.08982466	0.65975396	0.66248179	0.14112055	1.422732129	1.27829504	
	H							0.60509005	M	0.00636775	0.00613816	0.17075503	0.15509202	0.00262221	0.024440729	2.89895426	
	H							0.42384715	M	0.05273849	0.05355662	0.20804968	0.20267784	0.00625836	0.05807724	2.08556916	
E9	M	0.04358574	0.03197594	0.4665165	0.4490864	0.15658306	0.15102922	1.84301527	M	0.03928167	0.03919039	0.08869521	0.09264166	0.00961832	0.090663738	2.22611324	
	M	0.24232245	0.19977353	0.05652371	0.05882484	0.06079093	0.05839369	2.06669564	M	0.05974658	0.06110279	0.74226179	0.65671792	0.00731463	0.068466964	1.79934713	
	H							0.59843724	M	0.05872017	0.05869938	0.26242917	0.26022399	0.01016673	0.09442659	1.91939193	
	M	0.70466038	0.61699832	0.54525387	0.47618599	1.10573065	1.23749308	1.10506875	M	0.01634508	0.0154958	0.08656934	0.0807941	0.00857885	0.085702664	2.47074859	
	M	0.24232245	0.1924104	0.27357343	0.27301751	0.08777781	0.08243931	1.71951303	M	0.09342808	0.09388192	0.35601255	0.34638388	0.00571909	0.051585023	1.88761048	
		M	0.13121459	0.10165873	0.24316374	0.24361933	0.16724094	0.16260539	1.73263666	M	1.57461595	1.62763472	7.26015324	7.04369563	0.16266773	1.526516865	0.75016016
	H								0.17156594	M	0.43678645	0.44287449	11.7126856	10.2286609	0.0343154	0.311285192	0.96463241
	M	0.15283003	0.11825733	0.48464491	0.46889516	0.15496346	0.14898118	1.6125094	H							0.14602132	
	M	0.06228377	0.04976305	0.07179365	0.06969215	0.06886907	0.06876811	2.29790502	H							0.81502197	
E10	M	0.01374452	0.01045944	0.05831456	0.05522764	0.01832555	0.01753294	3.1498162	M	0.36602142	0.36278874	2.38667149	2.4006322	0.09150536	0.85687751	1.02848782	
	M	0.06337247	0.04866872	0.08717148	0.08983	0.06768594	0.06464367	2.25935438	M	6.61160255	6.7263915	33.1284776	33.5977945	1.32868581	12.64641726	0.4510894	
	M	0.08508213	0.06462287	0.42779751	0.41123932	0.1391777	0.13407708	1.75363605	H							0.12659031	
	M	0.02966694	0.02302825	5.55967288	3.93290819	0.02673735	0.0256306	1.82998761	M	73.5166947	10.7648109	21.6305733	20.0573169	114.166851	1442.367249	0.22850306	
	H							0.24831659	H							0.37030605	
	M	0.58641747	0.47759531	0.86453723	0.81808544	0.16957554	0.16196013	1.31544859	H							0.89437716	
	H							0.42116379	H							0.22084958	
	H							0.3218077	H							1.09583233	
	M	2.42838977	1.95908691	1.13681697	1.2364948	83.8651779	99.7434943	0.57873901	H							0.39571456	
E13	H							0.26014914	H							1.00739407	
	H							0.30827279	H							0.91945032	
									H							1.17715586	
									H							1.28882626	
									H							0.83232964	
									H							0.96504629	
									H							0.77912585	
	H							1.54861025	M	0.04080812	0.04108124	0.37500975	0.34796277	0.01442785	0.139814831	1.85829859	
	H							0.74080737	H							0.88783589	
	M	1.86606598	1.81958445	0.05201242	0.04734895	5.67649343	7.36239081	1.04432314	M	0.04210105	0.04285592	0.24741416	0.23253299	0.01238725	0.12036268	1.95568477	
E19	H							0.96910855	M	0.01930342	0.01838221	0.08667393	0.09198326	0.01589812	0.151164458	2.28329977	
	M	0.43527528	0.41645916	0.03874087	0.0330646	2.27363395	2.96623565	1.37364509	M	0.0052809	0.00506378	0.07304858	0.06988012	0.00302259	0.028492883	3.15140063	
	M	0.07536299	0.06157664	0.11033787	0.10107006	0.56840849	0.63754498	1.73482006	H							0.49723358	
	M	0.03665109	0.0280319	0.21389876	0.19879537	0.35233019	0.37287159	1.85108542	M	0.05255603	0.0537477	0.07254399	0.07529806	0.01200684	0.115933838	2.14888486	
	H							0.45582515	M	0.00860863	0.00799559	0.86453723	0.77116017	0.01200684	0.114037592	2.06341208	
	M	0.15442733	0.1218802	0.35355339	0.30510402	0.05094202	0.05023728	1.85956759	H							0.13165781	
	M	0.04313492	0.03346878	0.13869618	0.13134322	0.04404127	0.04244046	2.35460093	M	0.20589775	0.21283989	0.31534435	0.32250427	0.01991501	0.186341657	1.54341567	
	M	0.56058304	0.46436712	0.3609823	0.35002359	120.258912	160.919296	0.72089969	M	0.09672281	0.09915997	0.16608573	0.16948888	0.01085874	0.101436663	1.88767576	
	M	0.08133387	0.0607852	0.31316611	0.31554458	0.23245124	0.22625256	1.71960194	M	0.3685673	0.38894506	0.19751033	0.21089949	0.0322401	0.30679323	1.44238907	
	M	3.73213197	2.91403731	62.0345483	54.8064574	3.43426175	3.31079505	0.53380606	M	0.05183247	0.05326404	0.08869521	0.08919865	0.00370837	0.033998981	2.38797256	
	M	0.02503343	0.01947421	0.21839322	0.22670802	0.09875516	0.10143311	2.19803254	M	0.07694653	0.07910138	0.23325825	0.22590243	0.00590028	0.054373615	1.99597134	
E22	H							0.07145804	M	0.00822938	0.00804844	0.2783564	0.24232258	0.00201501	0.0186144	2.77196195	
	H							0.06031402	M	0.2381595	0.24507833	0.22531262	0.240317	0.0260965	0.24247664	1.5205009	
	H							0.39178919	M	0.18750487	0.1983458	0.23004691	0.22872362	0.00822938	0.076053522	1.75905492	
	M	0.04109196	0.03013096	2.45376995	2.09291691	0.13076062	0.12529621	1.6194963	H							1.63479193	
	M	0.00372124	0.00269526	0.25971478	0.21800224	5.22343915	6.63161203	1.73955546	M	0.12370708	0.13145881	0.7737825	0.67662676	0.00647906	0.060630909	1.68196842	
	H							0.66570311	M	0.03071314	0.03185209	0.15230128	0.13914903	0.00394708	0.037612776	2.38102313	
	H							0.80420607	M	0.01845301	0.01829143	0.12200397	0.11466183	0.00251539	0.023433009	2.68750671	
	H							0.37269223	M	0.01323004	0.01366881	0.07510225	0.06776403	0.000898933	0.008178801	3.24237967	
	H							1.3263323	M	0.02194445	0.02160187	0.80385099	0.69802045	0.00687226	0.064632658	1.99596929	
E25	H							0.51581873	M	0.02987329	0.03030252	0.03955489	0.04116889	0.00386585	0.036007953	2.71400492	
	H							1.00328258	H							1.63479193	
	M	173.645354	4.13929753	8871.73157	217.026482	373.509208	4.65581945	0.13856962	H								