



**Efectos estrogénicos por bloqueadores solares en el pez
sargento *Abudefduf saxatilis***

TESIS

que para obtener el grado de

**Maestra en Ciencias del Mar y Limnología
con énfasis en
Biología marina**

presenta

Mélina Soto

Directora de Tesis: Dra Gabriela Rodríguez-Fuentes

Jurado:

**Dra Alejandra García-Gasca
Dra Cecilia Ruth Vanegas-Pérez
Dr Gerardo Gold-Bouchot
M en C Santiago Capella-Vizcaíno**



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.

Agradecimientos

Este trabajo no hubiera sido posible sin el apoyo invaluable de muchas personas, este manuscrito es de todos ustedes y se lo dedico con todo mi corazón!

Mi amor por el ambiente, en especial el mar y su biodiversidad, fue cultivado desde mi infancia por dos increíbles personas: mis padres, Margot y José Soto. Les debo, entre otros fuertes valores, el creer en mí y mis sueños; aunque éstos me lleve lejos de ellos, siempre estarán presentes acá conmigo. Je vous aime fort fort!

Quisiera agradecer a la Dra Gabriela Rodríguez Fuentes, mi directora de tesis: fue un verdadero honor ser su primera estudiante de posgrado y de allí nació una duradera relación de trabajo y de amistad. Gracias por confiar en mí, sensei!

Tuve la suerte de contar con un jurado excepcional, nuestras reuniones siempre fueron ricas en comentarios constructivos e interesantes, he disfrutado todas la oportunidades en las cuales pude conversar con cada uno de ellos. Agradezco al Dr Gerardo Gold Bouchot por haber aceptado ser mi director interino y proponerme la idea de realizar un bioensayo preliminar del cual dependió la calidad de mis resultados. A la Dra Alejandra García Gasca por compartir conmigo sus conocimientos sobre la vitelogenina, las técnicas moleculares y sus secuencias de cebadores que me ayudaron en aislar el gen de VTG, por su compromiso verdadero con este proyecto, sus comentarios e involucrarme en otras aventuras. Al MC Santiago Capella Vizcaíno por acogerme en su laboratorio para los análisis ALP y sus valiosos comentarios, siempre es bueno tener un punto de vista diferente y que mejor de parte de un gran químico. A la Dra Cecilia Vanegas Pérez por los detallados, y siempre atinados, comentarios y apuntes a mis escritos, y por haberse involucrado en este equipo de trabajo.

La carga de trabajo de laboratorio me pareció increíblemente más ligera gracias a la ayuda de la MC Karen Luna Ramírez en las corridas de PCR entre otras labores; además de ser un super binomio eres una gran amiga.

No hubiera alcanzado muestrear suficientes organismos sin la ayuda de mi equipo profesional de pescadores, gracias al MC Adrien Le Cossec y a los Lic Dania Álvarez Gómez y Jorge Pérez Rodríguez por pasar tanto tiempo en las charcas de Punta Brava a merced del sol y las mareadas!

Al gran equipo de científicos de la UASA, UNAM de Puerto Morelos por darme hospedaje para los bioensayos: gracias al Dr Roberto Iglesias Prieto por aceptar tomar esta responsabilidad, a la Dra Patricia Briones Fourzan, el Dr Enrique Lozano Álvarez y el MC Fernando Negrete Soto por prestarme sus estanques y ayudarme en acondicionarlos. De la misma manera, quisiera agradecer a la Dra Judith Sánchez Rodríguez por recibirme en su laboratorio para los últimos análisis de este trabajo. Al MC Edgar Escalante Mancera y el MC Francisco Ruiz Rentería del Servicio Académico de Meteorología y Oceanografía de la UASA, por proporcionarme los datos de radiación solar de la zona.

La secuenciación de los genes estudiados en este trabajo no hubiera sido posible sin la colaboración invaluable de los Drs Ramón Lavado y Daniel Schlenk de la Universidad de Riverside, California.

El MC Javier García Villalobos hizo que los análisis de PCR en tiempo real en la Unidad de Bioquímica y Biología de Plantas del CICY Mérida fueron de los más placenteros, gracias por tu tiempo, tu ayuda y tu sonrisa.

La MC Malena Suárez de la biblioteca de la UNAM, DF, realizó un gran trabajo de documentación y me ayudó en conseguir artículos que sin ella no hubiera podido tener acceso.

El Biol. Rodolfo Raigoza Figueras del grupo Xcaret proporcionó ejemplares de *Abudefduf saxatilis* al principio de este proyecto, los cuales fueron esenciales en la búsqueda de los genes estudiados y su secuenciación.

Un gran gracias a la Dra Gloria Villaclara Fatjó por haberme aceptado y apoyado en el posgrado de Ciencias del Mar y Limnología. De la misma manera, quisiera extender mis agradecimientos al equipo de trabajadoras del Instituto: Chantal Ruiz Guerrero por su paciencia y disponibilidad, Diana Juárez Bustos por sus consejos, Guadalupe Godoy Medina y Judith Vázquez Enríquez de Puerto Morelos por su ayuda con los trámites y su siempre buen humor!

Least but not last, tengo que agradecer a todas las increíbles personas que tengo a mi alrededor, que me apoyaron, animaron, aguantaron durante toda esta emocionante parte de mi vida y me hicieron querer tanto a México. Y aún si no les digo lo suficiente, los quiero: Edgar, Natalia, Daniella, Kor, Emiliano, Karen, Heidi, Karen Sofía, Memo, Fabien, Brenda. Gracias por estar aquí para mí en las buenas y en las malas.

Gracias a todas las personas que me apoyaron en este proyecto...y a los que no... también! Me enseñaron a no rendirme y perseverar.

Resumen

La oxibenzona, el octisalato y el octinoxato son compuestos empleados en una variedad de productos como protección contra la exposición a las radiaciones UV. En los últimos años, ha aumentado la preocupación en cuanto a su seguridad ambiental ya que estudios han demostrado que tienden a bioacumularse y actuar como compuestos xenoendocrinos en organismos acuáticos. A la fecha, no se han realizado estudios sobre su impacto en especies asociadas a arrecifes tropicales. De manera particular, ambientes arrecifales como el Sistema Arrecifal Mesoamericano son particularmente sensibles a la introducción de contaminantes. Por ello, el presente trabajo investiga los efectos estrogénicos de estos tres compuestos en el abundante pez damisela, el sargento, *Abudefduf saxatilis*. Dada la falta de información genómica disponible para *A.saxatilis*, una primera parte del estudio consistió en aislar y secuenciar los genes de la vitelogenina (VTG; proteína precursora de la yema de huevo), 18S y β -actina. Las secuencias parciales de los genes fueron reportadas en el GenBank del NCBI. En una segunda etapa, se estudiaron los efectos estrogénicos de estos tres compuestos evaluando la inducción de la expresión genética y de la síntesis de la VTG en organismos juveniles (<5cm). Los peces se expusieron a dosis de 5, 25 and 50 $\mu\text{g/g}$ PH de oxibenzona, octisalato, octinoxato y una mezcla de ellos en proporciones similares a las empleadas en las lociones comerciales. Aunque no se pudo observar una clara respuesta de la expresión genética de VTG por qRT-PCR, todos los tratamientos indujeron la síntesis de la proteína, medida como fosfatos lábiles al álcali (ALP por sus siglas en inglés). Los tratamientos presentaron niveles parecidos al control positivo de 17β -estradiol (E_2) y otros xenoestrógenos reportados en la literatura con concentraciones entre 5 and $10\mu\text{g/ml}$. Los resultados obtenidos demuestran el efecto estrogénico de la oxibenzona, el octisalato, el octinoxato y su mezcla en los juveniles del sargento y se sugiere profundizar en los estudios para evaluar las rutas transcripcionales de la síntesis de VTG en *A.saxatilis*. Cabe destacar que en un ensayo preliminar se observaron efectos neurotóxicos por la exposición a estos compuestos. Por lo tanto, de manera paralela al presente proyecto, se analizó la actividad de colinesterasas en las cabezas de los organismos, resultados que se incluyen en el Apéndice V. El enfoque sobre el potencial estrogénico de estos compuestos puede haber subestimado otros impactos ecotoxicológicos.

Abstract

Oxybenzone, Octisalate and Octynoxate are compounds used in a variety of products as a protection against UV radiation exposure. Concerns have emerged regarding their environmental safety. Previous studies have shown that they tend to bioaccumulate and act as potential xenoestrogens in aquatic organisms. To our knowledge no studies have investigated their impact on tropical reef associated species. Reef environments like the Mesoamerican Barrier Reef System are particularly sensitive to the introduction of novel contaminants. Thus the aim of the present study was to evaluate the estrogenic effect of these three compounds on the abundant reef associated damselfish sergeant major *Abudefduf saxatilis*. As no genomic information on *A. saxatilis* was available, the first part of the work was conducted to isolate and sequence vitellogenin (VTG; the egg yolk precursor protein), 18S and β -actin genes. The partial sequences of these genes were registered in the NCBI GenBank. In the second part, the potential estrogenicity of the three compounds in juvenile fish (<5cm) was studied using gene expression and protein synthesis analyses to evaluate the induction of VTG. Fish were exposed to doses of 5, 25 and 50 μ g/g WW of oxybenzone, octisalate, octynoxate and to their mixture in a similar proportion to the one used in commercial personal care products. Although no clear expression of VTG gene was observed by qRT-PCR, all treatments induced the synthesis of the protein measured as Alkali Labile Phosphate (ALP). Their levels were similar to the positive control 17 β -estradiol (E_2) and other xenoestrogens reported in several studies ranging between 5 and 10 μ g/ml. Further studies need to be conducted to evaluate the transcriptional pathway for VTG synthesis in *A. saxatilis* and its kinetic. This research demonstrated that oxybenzone, octisalate, octynoxate and their mixture have estrogenic effects on juvenile sergeant major. It is to note that in a preliminary bioassay neurotoxicity was observed in *A. saxatilis* exposed to the three compounds; thus in a parallel analyses, the head cholinesterase activity was also analyzed, results are shown in Appendix V. Focus on the estrogenic effect of these compounds may have led to underestimate other ecotoxicological impacts.

Tabla de Contenido

A. Introducción y Antecedentes	1
I. Introducción.....	1
II. Los compuestos disruptores endocrinos.....	4
III. Los bloqueadores solares o filtros UV.....	8
IV. La vitelogenina.....	12
V. <i>Abudefduf saxatilis</i> (Linnaeus 1758).....	15
B. Hipótesis y objetivos	19
I. Preguntas de Investigación.....	19
II. Hipótesis.....	19
III. Objetivo y metas.....	19
C. Materiales y Métodos	20
I. Captura y manejo de los organismos.....	20
I.1 Exposición de organismos para aislamiento de los genes.....	21
I.2 Exposición de los organismos a los bloqueadores solares, bioensayos preliminar y final.....	21
II. Aislamiento de los genes de VTG, β actina y 18S.....	22
II.1 Diseño de los cebadores.....	22
III. Extracción de Ácido ribonucleico ARN.....	28
IV. Cuantificación del ARN.....	28
V. Retrotranscripción a cADN.....	28
VI. Reacción en cadena de polimerasa o PCR.....	28
VI.1 Principios del RT-PCR.....	28
VI.2 Protocolo usado.....	30
VI.3 Geles de electroforesis.....	31
VI.4 Purificación del producto de PCR.....	31
VII. Secuenciación del producto de PCR.....	32
VIII. PCR en tiempo real.....	32
VIII.1 Principios del PCR en tiempo real.....	32
VIII.2 Tipos de cuantificaciones.....	35
VIII.3 Diseño de cebadores específicos para Q-PCR.....	36
VIII.4 Protocolo Q-PCR.....	36
IX. Técnica del fósforo proteico lábil al álcali o ALP.....	40
IX.1 Principios del método.....	40
IX.2 Protocolo adaptado para medición ALP.....	41
X. Bioensayo preliminar.....	43
X.1 Cálculo del número de organismos (n) para el bioensayo final.....	43
X.2 Cambios operados para el bioensayo final.....	44
XI. Bioensayo final.....	46
XII. Herramientas estadísticas.....	46

D. Resultados	48	
I. Secuenciación de los genes	48	
I.1 VTG	48	
I.2 β -actina	52	
I.3 18S	55	
I.4 Prueba de los cebadores de cuantificación	58	
II. PCR tiempo real	59	
II.1 Eficiencia	59	
II.2 Curva Melting	60	
III. Bioensayo Preliminar	62	
III.1 Mortalidad	62	
III.2 Q-PCR	63	
III.3 Fosfatos lábiles al álcali - ALP	64	
IV. Bioensayo Final	66	
IV.1 Q-PCR	66	
IV.2 Fosfatos lábiles al álcali-ALP	67	
E. Discusión y conclusiones	68	
I. Discusión	68	
II. Conclusiones y recomendaciones	75	
F. Referencias	76	
Anexo I	Eclosión y cultivo de <i>Artemia salina</i>	83
Anexo II	Preferencias de codificación bases/aminoácidos	84
Anexo III	Extracción de RNA con	85
Anexo IV	Retrotranscripción con Super Script III Platinum two steps kit	86
Anexo V	Análisis complementario de actividad de colinesterasas.	87

Lista de Figuras

Figura 1. Estructuras químicas de diferentes CDEs y la hormona 17 β estradiol (Lawrence and Hemnigway, 2003).	4
Figura 2. Modelo simplificado de la dinámica hormonal. Cuando una hormona se produce, proteínas intracelulares regulan su biodisponibilidad. La hormona entonces se liga con un receptor específico para empezar su acción, de allí es excretada en la orina después de conjugaciones hepáticas o biotransformada en otra hormona y volverá al ciclo disponibilidad, acción, excreción, transformación. Un CDE puede interferir en cada uno de estos pasos (adaptado de Crain <i>et al.</i> , 2000).	6
Figura 3. Interacción de un CDE con un receptor celular. Un CDE agonístico puede “imitar” la acción de una hormona natural y desencadenar el mismo tipo de respuesta. Un CDE antagonístico al contrario impedirá la acción de la hormona natural (modificado de Lawrence y Hemingway, 2003)	7
Figura 4. Rutas principales de los filtros UV en el ambiente. Las partes onduladas indican las potenciales entradas al ambiente (adaptado de Giokas <i>et al.</i> , 2007).	8
Figura 5. Compuestos filtros de UV usados en las playas de Cancún. Resultado de las encuestas realizadas durante el verano 2008 (Rodríguez Fuentes <i>et al.</i> , 2010).	10
Figura 6. Estructuras de la oxibenzona, del octisalato y del octinoxato con las longitudes de onda a las cuales presentan su efectividad	10
Figura 7. Diagrama explicativo de la síntesis de VTG en peces. El hipotálamo sensible a estímulos como la luz y la temperatura induce la síntesis de las gonadotropinas (GtHs) en la pituitaria. Las GtHs estimulan la síntesis del estradiol (E2) por las células foliculares de los ovarios. En el hígado el E2 a su vez induce la síntesis de VTG, la cual es transportada a los oocitos (adaptado de Lawrence y Hemingway, 2003).	12
Figura 8. Activación del gen codificante de VTG por el estradiol. Se forman dímeros con los receptores del estradiol. Crean complejos de iniciación al juntarse con los elementos de respuesta estrogénica (EREs) del ADN, lo cual va a desencadenar la transcripción del gen (o de los genes) codificando para VTG y la síntesis de la proteína (esquemático a partir de Rotchell y Ostrand, 2003).	13
Figura 9. Timbre postal de Cuba retratando al <i>Abudefduf saxatilis</i>	15
Figura 10. Mapa de distribución del <i>Abudefduf saxatilis</i>	16
Figura 11. Tipo de anuncios para actividades acuáticas en Cancún y la Riviera Maya; esnorklear en medio de una escuela de sargentos. Se puede notar la cercanía que logran tener los turistas con estos peces poco tímidos (foto: http://www.rivieramaya.info).	17
Figura 12. Dibujo de Cummings de las diferencias morfológicas de la papilla entre el macho y la hembra sargento durante el periodo de reproducción (Cummings, 1968).	18
Figura 13. Esquema representativo de las instalaciones de los estanques. 8 estanques de 60 litros con flujos individuales de agua de mar filtrada y sus refugios. Máximo 10 peces por estanque, comida <i>ad libitum</i>	20
Figura 14. Las inyecciones se realizaron intraperitonealmente debajo de la zona de unión de las aletas pectorales.	22
Figura 15. Búsqueda de una secuencia de VTG para <i>Abudefduf saxatilis</i> en NCBI. Impresión de pantalla.	23
Figura 16. Búsqueda de secuencias de VTG en otras especies de peces en NCBI. Impresión de pantalla.	23
Figura 17. El programa de alineación de secuencias en línea MultAlin. Impresión de pantalla.	24
Figura 18. Alineaciones de secuencias y consenso entre ellas analizado por MultAlin, las zonas rojas indican las zonas de más alto consenso o zonas conservadas.	25
Figura 19. Tabla representando las diferentes posibilidades de combinación de bases para la codificación de los aminoácidos(http://aprend3r.com/wp-content/uploads/2008/06/tabla1.jpg)	25
Figura 20. Herramienta de diseño de cebadores en línea de Invitrogen, el OligoPerfect™ Designer. Impresión de pantalla.	26
Figura 21. Etapas de un ciclo de PCR.	29

Figura 22.	Funcionamiento del fluoróforo SYBR Green en ciclos de PCR de tiempo real. Una vez asociado con ADN de doble hebra, el SYBR Green emite a 520nm. Los productos generados por cada ciclo de PCR producen una respuesta exponencial.	34
Figura 23.	Curvas de amplificación obtenidas para los tres genes de interés en Q-PCR. La línea azul representa un umbral hipotético de fluorescencia. Las líneas punteadas naranja el número de ciclos necesario para que la amplificación sobrepase este umbral o C_t . Captura de pantalla.	34
Figura 24.	Programación del ciclo de PCR en StepOne™.	38
Figura 25.	Programación del Melting Curve en StepOne™.	39
Figura 26.	Curva de dilución de los estándares de PO_4^{3-} para ALP.	42
Figura 27.	Diagrama explicativo del bioensayo preliminar. Página opuesta.	44
Figura 28.	Diagrama explicativo del Bioensayo final. Página opuesta.	46
Figura 29.	Foto en colores invertidos y escala de blanco y negro de un gel de agarosa de productos de PCR para VTG (220610). A la derecha se puede observar dos bandas definidas asegurando la integridad del ARN usado en la retrotranscripción del análisis PCR.	48
Figura 30.	Cromatograma de la secuencia de VTG, cada color de pico representa la señal de una base. Captura de pantalla de ChromasPro.	49
Figura 31.	Captura de pantalla del resultado del análisis BLAST en NCBI para VTG, calificación de alineación en escala de colores.	50
Figura 32.	Captura de pantalla de las secuencias de VTG de otras especies de peces con alto consenso de alineación obtenidas por el análisis BLAST.	50
Figura 33.	Foto de un gel de agarosa en colores invertidos y escala de blanco y negro de un producto de PCR para β actina obtenido con cADN de <i>A.saxatilis</i>	52
Figura 34.	Captura de pantalla de ChromasPro. Cromatograma de la secuencia de β -actina, picos muy bien definidos y intercalados, muy buena señal de análisis.	52
Figura 35.	Captura de pantalla del resultado del análisis BLAST, se obtuvieron puntuaciones de alineación máximas.	53
Figura 36.	Captura de pantalla de las secuencias con alto consenso de alineación para el gen de β -actina obtenidas por el análisis BLAST.	53
Figura 37.	Foto en colores invertidos y escala de blanco y negro de un gel de agarosa de producto de PCR para 18S, la banda correspondiente se nota facilmente y se ubica entre los 500 y 250bp. ...	55
Figura 38.	Cromatograma de unas secuencias obtenidas para 18S, los productos son cortos pero la señal esta muy clara. Captura de pantalla de ChromasPro.	55
Figura 39.	Captura de pantalla del resultado del análisis BLAST en NCBI para 18S, el máximo de puntuación de alineación fue obtenido.	56
Figura 40.	Captura de pantalla de las secuencias de otros peces con alto consenso de alineación para el gen 18S obtenidas por el análisis BLAST.	56
Figura 41.	Foto en colores invertidos y escala de blanco y negro del gel de agarosa para los productos de PCR de prueba de los cebadores de cuantificación.	58
Figura 42.	Curva de Eficiencia: se calculó a partir de la pendiente obtenida por una serie de dilución de cADN.	59
Figura 43.	Ejemplo de una curva melting obtenida de una muestra para el gen de VTG.	60
Figura 44.	Curva melting para β -actina.	60
Figura 45.	Curva melting obtenida en una muestra para 18S.	61
Figura 46.	Curva de mortalidad obtenida en el bioensayos preliminar por efecto de las inyecciones con oxibenzona. Oxi 10 μ g/g PH y Oxi 100 μ g/g PH se acabaron al quinto día, los demás tratamiento se siguieron como previsto. Neg: Control Negativo, E ₂ : Control positivo de E ₂ a 5 μ g/g PH, Oxi 10: Oxibenzona 10 μ g/g PH, Oxi 30: Oxibenzona 30 μ g/g PH, Oxi 100: Oxibenzona 100 μ g/g PH.	62
Figura 47.	Expresiones relativas de VTG usando el gen de referencia β -actina obtenidas en el bioensayo preliminar; solamente el control positivo mostró diferencia significativa en relación al control negativo. Medianas y rangos intercuartiles, * diferencia significativa (P<0,05).	63
Figura 48.	Expresiones relativas de VTG usando el gen de referencia 18S: solamente el control positivo fue significativamente diferente del control negativo.	64
Figura 49.	Fosfatos lábiles al álcali de la parte proteica para los diferentes tratamientos: Oxi 10 y Oxi 30 se mostraron significativamente diferentes del control positivo.	65

Figura 50. Expresiones relativas de VTG con referencia a β -actina de los tratamientos del bioensayo final. Diferencias significativas del control positivo E2 y del tratamiento Oxi5 respecto al control negativo.....	66
Figura 51. Síntesis de VTG medida como ALP de los tratamientos del bioensayo final. Los tratamientos son estadísticamente diferentes del control negativo. Medianas y rangos intercuartiles, * diferencia significativa ($P < 0,05$).	67

Lista de Tablas

Tabla 1. Hormonas involucradas en los mayores procesos fisiológicos y sus efectos (traducido de Van der Kraak, 1998).	5
Tabla 2. Propiedades fisicoquímicas de los tres compuestos filtros de UV seleccionados. (Modificado de Giokas <i>et al</i> , 2007 y Rodil <i>et al</i> , 2009)	11
Tabla 3. Reactivos y volúmenes empleados en PCR.....	30
Tabla 4. Programa de ciclos de PCR	30
Tabla 5. Lista de los cebadores específicos utilizados en el presente estudio con sus características y secuencias.	36
Tabla 6. Reactivos y volúmenes empleados en los análisis de Q-PCR con el kit platinum SYBR® Green de Invitrogen™.	37
Tabla 7. Ilustración de la distribución de las muestras en las placas de Q-PCR en el presente estudio. ..	37
Tabla 8. Programa de tiempos y temperaturas en Q-PCR utilizados en el presente estudio.	38
Tabla 9. Cebadores de cuantificación de VTG, características y secuencias.	51
Tabla 10. Cebadores de cuantificación para β -actina, características y secuencias.	54
Tabla 11. Cebadores de cuantificación para 18S, características y secuencias.....	57

A. Introducción y Antecedentes

I. Introducción

La preocupación por conocer y entender los impactos de los contaminantes antropogénicos sobre la salud humana y el ambiente es primordial (OMS, 2002). Como lo expusieron Rachel Carson (*Silent Spring*, 1962) y más recientemente Theo Colborn (*Our Stolen Future*, 1996) en sus fascinantes libros, los humanos tenemos impactos devastadores en la salud de la vida silvestre liberando compuestos capaces de alterar la sobrevivencia, la biodiversidad y la reproducción de muchas especies; del cocodrilo al águila, de la abeja al salmón, de la ballena hasta el mismísimo humano. La gravedad de las consecuencias de estos contaminantes es muy difícil de prever y estimar. En efecto, los síntomas pueden ir de tumores, cánceres a disfunciones reproductivas, impactos en el desarrollo del embrión y dificultades de aprendizaje (Colborn, 1996). Poco a poco, se está tomando conciencia de que los compuestos químicos, al entrar al ambiente, tienen profundos efectos en las poblaciones de la vida salvaje y que la salud humana está estrechamente vinculada con la salud del ambiente.

El medio acuático es el destino final de la mayoría de los compuestos químicos, naturales o manufacturados (Sumpter, 1998). Los organismos acuáticos y los organismos que de ellos dependen a través de la cadena alimenticia reciben entonces una mayor exposición y se ven más afectados por esta contaminación.

No se necesitan obligatoriamente exposiciones a concentraciones muy importantes de contaminantes para tener un impacto sobre la fecundidad de las poblaciones acuáticas (Van der Oost *et al.*, 2003), los efectos pueden llegar a ser tardíos y hasta volverse transgeneracionales (Tillit *et al.*, 1998).

Cancún y la Riviera Maya representan dos de los principales destinos turísticos a nivel nacional e internacional, alcanzando fama mundial por su turismo de tipo “sol y mar”. Millones de personas los visitan al año, disfrutando de sus bellezas naturales, realizando actividades principalmente acuáticas; buceando en los arrecifes coralinos, esnorkeleando en los cenotes o simplemente relajándose en las aguas someras de sus lagunas costeras y playas.

La costa de Quintana Roo alberga una parte importante del Sistema Arrecifal Mesoamericano (SAM), la barrera más larga del hemisferio oeste y de importancia económica y ecológica global. El SAM se extiende desde Cabo Catoche en México hasta las Bay Islands de Honduras siendo la barrera coralina más extensa después de la famosa Gran Barrera Arrecifal australiana. Es hogar de un gran número de especies de interés ecológico y comercial: peces, langostas, caracoles, corales etc (Almada-Villela *et al.*, 2008).

El desarrollo de las actividades turísticas en esta región ha atraído desde hace poco más de 30 años una población siempre creciente. Según el consejo estatal de población de Quintana Roo, el crecimiento del municipio de Benito Juárez, donde se ubica Cancún y el 50% de la población de todo el estado, tiene una tasa anual de 4,97%, cuando Solidaridad, donde se encuentra Playa del Carmen tiene una tasa alrededor de los 6.80% (la tasa de Playa del Carmen por si sola siendo de alrededor del 20% desde más de dos décadas); la población de esta ciudad aumentó de 10 531 habitantes en 1990 a 169 541 en 2008 (INEGI, 2008). Este crecimiento desenfrenado genera una presión

antropogénica importante sobre los recursos acuáticos y la salud del ambiente. En la gran mayoría de los casos, los asentamientos no cuentan con un sistema adecuado de alcantarillado y tratamiento de las aguas domésticas. Una gran diversidad de contaminantes entran así al medio acuático sin mayor obstáculo.

Dentro de los compuestos químicos que llegan al medio acuático se encuentra un grupo de compuestos que tienen la capacidad de interferir con la regulación hormonal de los vertebrados e invertebrados; son conocidos como compuestos disruptores endocrinos (CDEs) o xenoendocrinos. Estos compuestos pueden tener diferentes impactos en el sistema reproductivo, desde lesiones, hemorragias, malformaciones en las gónadas, pituitaria, hígado, cerebro, y provocar baja sobrevivencia de los gametos, huevos, larvas y juveniles (Van der Oost *et al.*, 2003). Todas estas alteraciones pueden tener repercusiones mayores sobre la dinámica de las poblaciones y por ende de los ecosistemas. Existe una variedad de compuestos considerados disruptores endocrinos, incluyendo hormonas naturales y sintéticas, ciertos productos vegetales, plaguicidas, compuestos usados en plásticos etc (OMS, 2002). Ciertos de ellos son rápidamente degradados en el ambiente, pero otros pueden ser persistentes y dispersarse ampliamente.

Los compuestos como la oxibenzona (o 3-benzofenona, 2-hidroxi-4-metoxifenilbenzofenona), el octisalato (2-etilhexil salicilato) y el octinoxato (2-etilhexil trans 4-metoxicinamato) son usados en diferentes productos para la protección contra la radiación solar UV, en particular en las lociones cosméticas bloqueadoras solares (Giokas *et al.*, 2007). Tienen estructuras aromáticas que absorben la energía de los rayos UV y la dispersan tras relajación vibracional de sus estructuras. Una serie de encuestas realizadas en la zona hotelera de Cancún por el Centro de Investigación Científica de Yucatán AC durante la temporada alta del verano 2008 muestra que estos tres compuestos forman parte de los cinco productos más usados por los turistas y habitantes de la zona, nacionales o extranjeros (Rodríguez Fuentes *et al.*, 2010). Varios estudios les atribuyen un impacto negativo sobre los ecosistemas. Podrían contribuir al blanqueamiento coralino induciendo mecanismos infecciosos (Danovaro *et al.*, 2008), pero sobre todo parecen actuar como disruptores endocrinos potenciales en organismos acuáticos. Por sus tendencias lipofílicas los compuestos filtros de UV tienden en bioacumularse en los organismos acuáticos (Coronado *et al.*, 2008; Kunz *et al.*, 2006; Schlumpf *et al.*, 2004) lo que aumenta su impacto en la biología del organismo.

Los efectos de los compuestos disruptores endocrinos están siendo ampliamente estudiados por los científicos en numerosas especies de vertebrados e invertebrados. La vitelogenina se volvió en poco tiempo un biomarcador molecular comúnmente usado para detectar rápidamente los efectos estrogénicos de numerosos compuestos químicos y de muestras ambientales (Rotchell y Ostrander, 2003, Kime *et al.*, 1999).

La vitelogenina (VTG) es la fosfolipoproteína precursora de la yema de huevo expresada bajo condiciones normales en las hembras maduras de peces, reptiles, anfibios y aves. Bajo contaminación con compuestos disruptores endocrinos la expresión de la vitelogenina se puede inducir tanto en machos como en organismos juveniles (Scholz *et al.*, 2004; Kime *et al.*, 1999). Se suele usar la expresión del gen de VTG así como el nivel de proteína inducida para monitorear la disrupción endocrina (Van der Oost *et al.*, 2003). Una manera de medir la expresión del gen es a través de técnicas de biología molecular con PCR cuantitativo o en tiempo real. El nivel de proteína inducida se puede evaluar sencillamente usando el método Alkali Labile Phosphate que consiste

en determinar los fosfatos lábiles de la VTG después de una hidrólisis alcalina de la proteína (Gagné y Blaise, 2000 y Hallgren *et al.*, 2009). La variación genética de la vitelogenina hace que los genes que la codifican sean diferentes entre especies (Rotchell y Ostrander, 2003). Identificar y secuenciar uno o varios genes que codifican para la VTG en una especie dada aporta información valiosa para el entendimiento de su funcionamiento y la descripción de zonas conservadas.

Algunos peces como el medaka (*Oryzias latipes*), el pez cebra (*Danio rerio*), el "fathead minnow" (*Pimephales promelas*) y la trucha (*Oncorhynchus mykiss*) (Coronado *et al.*, 2008; Kunz, 2006; Scholz *et al.*, 2004) se han vuelto modelos apreciados para los estudios de disrupción endocrina. Desafortunadamente, a la fecha, no se han estudiado estos efectos en peces arrecifales caribeños, los cuales podrían ser más susceptibles de encontrarse expuestos a compuestos bloqueadores solares por la intensa actividad turística.

El *Abudefduf saxatilis*, o pez sargento, es un pez abundante, ampliamente distribuido, territorialista, de fácil identificación, omnívoro y vive en las zonas someras de los arrecifes y lagunas costeras. Lo cual lo expone a la contaminación costera, de las descargas de agua subterránea y directamente de las actividades acuáticas (Prappas *et al.*, 1991; Kerr *et al.*, 2004). Los juveniles del pez sargento (<5cm) se encuentran en zonas someras de las lagunas arrecifales y las charcas de marea, lo cual facilita su muestreo. Bajo condiciones normales, no presentan expresión de la vitelogenina hasta su madurez sexual (aproximadamente un año, >10cm) (Robertson, 1988). Todas estas características vuelven al sargento un organismo de particular interés en el monitoreo de la contaminación en zonas arrecifales.

En este trabajo se propone estudiar el efecto de tres bloqueadores solares y una mezcla de ellos sobre la síntesis de la vitelogenina en los juveniles de *Abudefduf saxatilis* con la posibilidad de sentar bases en su uso posterior como especie centinela en estudios de ecotoxicología en zona arrecifal caribeña.

Al determinar las dosis a las cuales la oxibenzona, el octisalato (etilhexil salicilato), y el octinoxato (2-etihexil trans-4-metoxicinamato) tienen un efecto sobre la expresión genética y/o inducción de la VTG en juveniles de pez sargento, se proveerá información para la toma de decisiones en cuanto a la regulación del uso de los bloqueadores en ecosistemas tropicales sensibles.

II. Los compuestos disruptores endocrinos

En las últimas décadas se han ido acumulando evidencias sobre la existencia de un grupo de compuestos capaces de interferir con la reproducción, el crecimiento y la sobrevivencia de las especies a través de su sistema endocrino. Los compuestos disruptores endocrinos (CDEs) son un grupo heterogéneo de compuestos exógenos que interfieren con la síntesis, la secreción, el transporte, el acción y la eliminación de las hormonas responsables del mantenimiento de la homeostasis y la regulación del desarrollo del organismo (OMS, 2002). Una diversidad de productos son considerados como CDEs; compuestos naturales como los fitoestrógenos (soya, alfalfa, clavo) así como plaguicidas (ej. DDT), fungicidas (ej. vinclozolin), plásticos (ej. bisfenol A), químicos industriales (ej. PCBs) y metales (ej. Cd, Pb, Hg, As) (Gore,2007). La figura 1 muestra una selección de estos compuestos con sus estructuras químicas (nótese la estructura química de la hormona 17 β -estradiol). Se puede observar en sus estructuras que tienen como constante la presencia de bencenos y cadenas insaturadas.

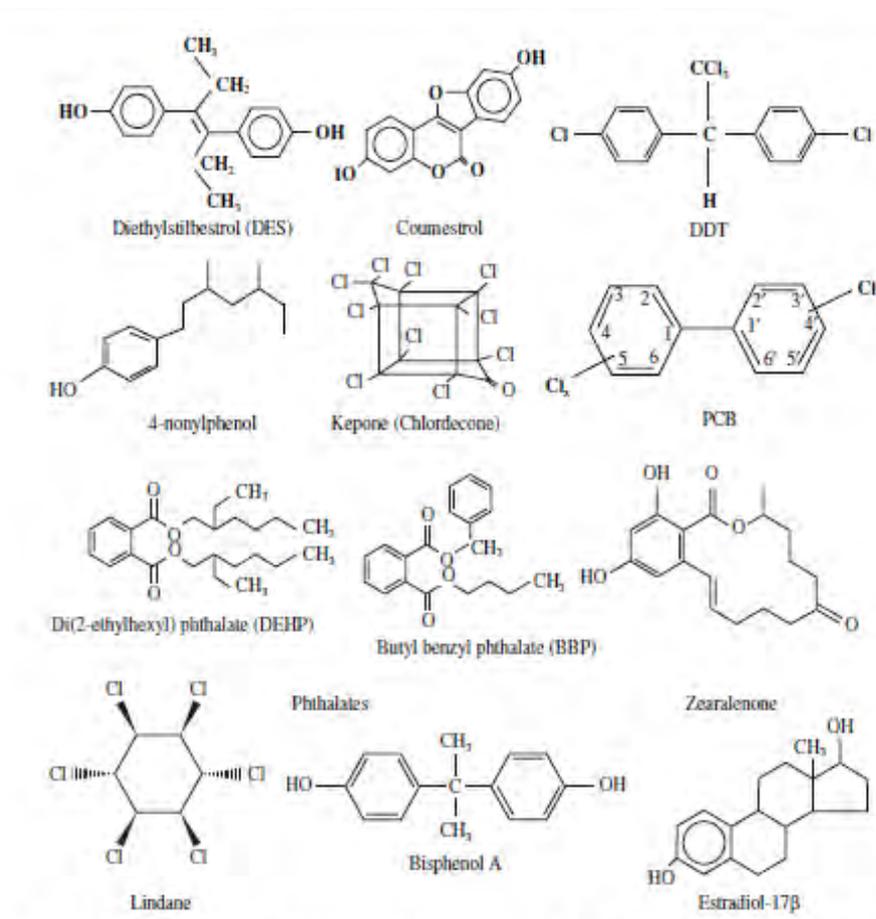


Figura 1. Estructuras químicas de diferentes CDEs y la hormona 17 β estradiol (Lawrence and Hemnigway, 2003).

Los CDEs son ambientalmente preocupantes ya que pueden impactar los procesos fisiológicos básicos de los organismos; como la reproducción, el crecimiento, el desarrollo así como afectar las respuestas al estrés y la regulación de la energía (Scholz, 2008).

Una recopilación de las hormonas involucradas en los diferentes procesos biológicos se presenta en la tabla 1:

Tabla 1. Hormonas involucradas en los mayores procesos fisiológicos y sus efectos (traducido de Van der Kraak, 1998).

Proceso	Hormona involucrada	Tejido/Respuesta
Reproducción	Andrógenos, estrógenos gonadotropinas (LH, FSH)	Crecimiento y reproducción Producción de gametos, embarazo, lactancia
Crecimiento y Desarrollo	Hormonas de crecimiento, de tiroides, insulina, andrógenos, estrógenos	Acción generalizada
Mantenimiento	Aldosterona, prostaglandina	Control del volumen de fluidos, presión sanguínea, balance de electrolitos, control de huesos, músculos y grasa
Regulación de energía	Insulina, glucógeno, tiroidales, catecolaminas	Regulación anabolismo/catabolismo

Por la complejidad del sistema endocrino las rutas exactas de acción de estos CDEs no están completamente entendidas, pero tienen diferentes posibilidades de interferir con las funciones hormonales a lo largo del eje hipotálamo-pituitaria-gónadas (Lawrence y Hemingway, 2003):

- “imitando” las hormonas naturales y ligándose a sus receptores afectando su disponibilidad y su acción
 - alterando o previniendo que las hormonas endógenas se ligan a sus receptores afectando su acción
 - alterando la producción y la eliminación de las hormonas endógenas
 - modificando la producción y la función de los receptores hormonales

En la figura 2 se representa de manera simplificada las diferentes etapas clave del sistema endocrino donde pueden actuar los CDEs:

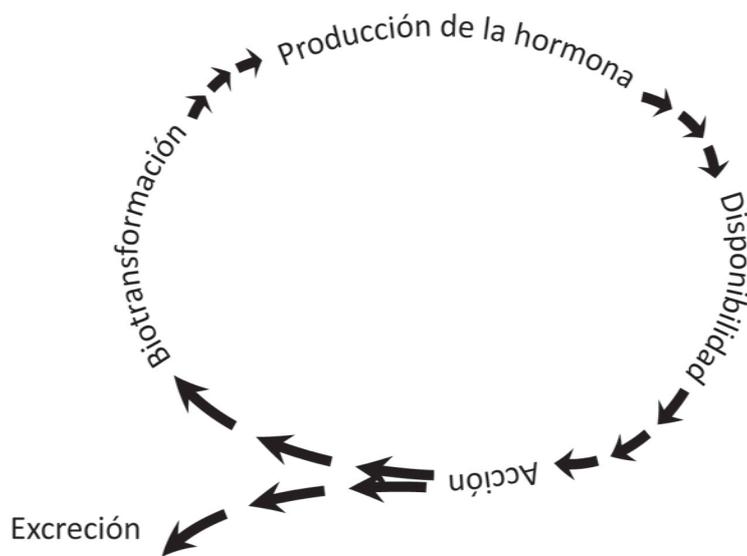


Figura 2. Modelo simplificado de la dinámica hormonal. Cuando una hormona se produce, proteínas intracelulares regulan su biodisponibilidad. La hormona entonces se liga con un receptor específico para empezar su acción, de allí es excretada en la orina después de conjugaciones hepáticas o biotransformada en otra hormona y volverá al ciclo disponibilidad, acción, excreción, transformación. Un CDE puede interferir en cada uno de estos pasos (adaptado de Crain *et al.*, 2000).

En los peces, los procesos de reproducción dependen de la coordinación de una variedad de hormonas de las cuales los esteroides sexuales estradiol y testosterona son de las más importantes (Rotchell y Ostrander, 2003). En las hembras, las hormonas gonadotropinas (GtHs) son sintetizadas en la pituitaria por inducción de hormonas provenientes del hipotálamo, esta glándula es sensible al fotoperiodo y la temperatura permitiendo sincronizar el ciclo reproductivo con la temporada adecuada (Lawrence and Hemingway, 2003). Las GtHs provenientes de la pituitaria a su vez inducen la síntesis del estradiol (E_2) en los ovarios. El estradiol así producido es acarreado en el plasma hacia diferentes tejidos donde gracias a receptores de estrógenos (REs) se inicia la activación de genes que codifican proteínas.

Un CDE tiene un efecto estrogénico (xenoestrógeno) agonístico cuando sus mecanismos de acción implican la "imitación" del estradiol vía sus receptores de estrógenos y la activación de los genes correspondientes (Scholz y Mayer, 2008). Un CDE es capaz de interactuar con los receptores de estrógenos (figura 3) en los diferentes tejidos como el hígado, las gónadas y el cerebro, formando dímeros con los REs los cuales se unen a elementos de respuesta estrogénica (EREs) del ADN para formar complejos de iniciación.

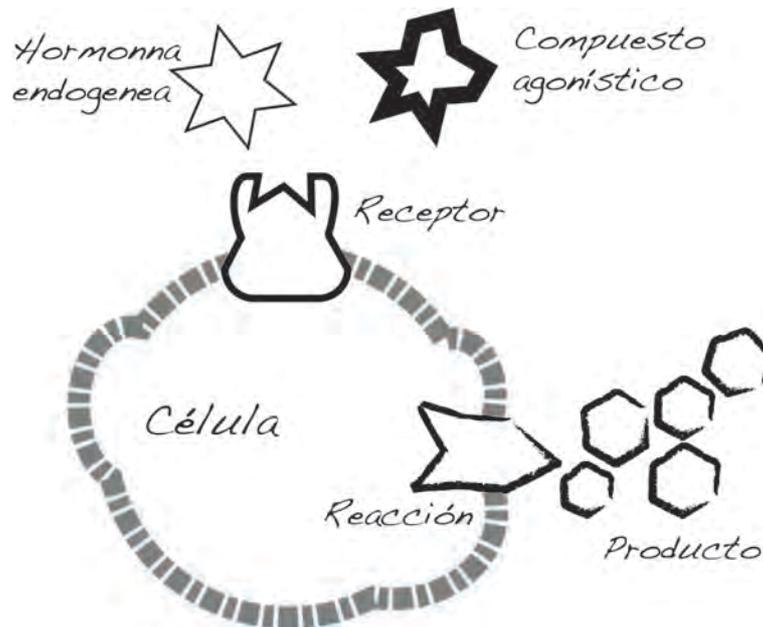


Figura 3. Interacción de un CDE con un receptor celular. Un CDE agonístico puede “imitar” la acción de una hormona natural y desencadenar el mismo tipo de respuesta. Un CDE antagonístico al contrario impedirá la acción de la hormona natural (modificado de Lawrence y Hemingway, 2003).

Estos complejos promueven la transcripción de genes que codifican proteínas de potencial importancia (Rotchell y Ostrander, 2003), como es el caso de la vitelogenina. La relativa baja especificidad de ciertos receptores de estrógenos facilita la actividad estrogénica de una diversidad de xenoestrógenos; éstos son por lo general lipofílicos y persistentes por lo cual tienden a bioacumularse y biomagnificarse (Matozzo *et al.*, 2008). Los CDEs con efecto estrogénico pueden tener consecuencias dramáticas para la estabilidad de una población ya que impactan el sistema reproductor de los organismos y el desarrollo de los juveniles (Gore, 2007). Bajo contaminación con productos xenoestrógenos se han observado alteraciones en el desarrollo y en la reproducción de varios organismos acuáticos incluyendo decaimientos en la calidad del esperma y hasta inversión sexual (Scholz *et al.*, 2004). En los ríos de Alemania, se ha detectado un incremento de la preponderancia de los peces hembras llegando al 70% de la población (Hansen *et al.*, 1998). Los efluentes de maquiladoras de papel en Canadá se reportan como responsables de alterar los niveles de esteroides en el plasma de peces (Van der Kraak, 1998). Otros animales como los cocodrilos de Florida presentan alteraciones en la proporción de sexos en sus poblaciones. Los machos tienen concentraciones de testosterona parecidas a las de las hembras y la síntesis de los esteroides de sus juveniles está alterada, lo cual ha llevado a una disminución dramática de su población (Guillette y Gunderson, 2001). Sumpter describió en 1998 la feminización de los peces de Inglaterra en los ríos expuestos a las descargas de las plantas de tratamiento de residuos industriales. Los casos de disrupción endocrina por compuestos de origen antropogénico en la vida silvestre se siguen reportando en el mundo entero y se vuelve una preocupación cada vez mayor para los especialistas de la salud tanto ambiental como humana.

III. Los bloqueadores solares o filtros UV

Los problemas dermatológicos debidos a la radiación ultravioleta (UV) han impulsado el desarrollo de compuestos orgánicos capaces de absorber los UV y atenuar los impactos negativos de la exposición al sol. Su espectro de uso se ha diversificado y se pueden encontrar ahora también como aditivos en productos plásticos, alfombras, muebles, neumáticos, ropas, detergentes, tintes, shampoo etc (Schlumpf *et al.*, 2004). Por legislación, los compuestos filtros de UV tienen que aparecer en la etiqueta de los productos cosméticos pero no es el caso en otros tipos de productos, lo que vuelve difícil su rastreo.

Los compuestos bloqueadores de UV tienen estructuras aromáticas simples o múltiples con doble enlaces carbono-carbono presentando diferentes grados de saturación que les permiten absorber los fotones y disipar la energía tras relajación vibracional (Giokas *et al.*, 2007) protegiendo así la piel o el producto en el cual están incluidos. Las fórmulas comercialmente usadas generalmente contienen los isómeros geométricos tipo E pero ciertos presentan las dos formas E y Z (Díaz Cruz y Barceló, 2009). Por lo general se utiliza una mezcla de diferentes compuestos permitiendo proteger de los dos tipos de rayos UV que llegan a la superficie terrestre, los UVA en 320-400nm de longitud de onda y los UVB en 280-320nm (Díaz Cruz y Barceló, 2009).

Los filtros UV pueden llegar al medio acuático por una variedad de rutas (figura 4), sean directas por las actividades recreacionales en los cuerpos de agua o bien indirectas por las descargas de las aguas residuales de las plantas de tratamiento: aunque una parte importante se adsorbe en los lodos activados de plantas de tratamiento, una fracción queda disponible en el agua (Balmer *et al.*, 2005; Sumpter y Johnson, 2005).

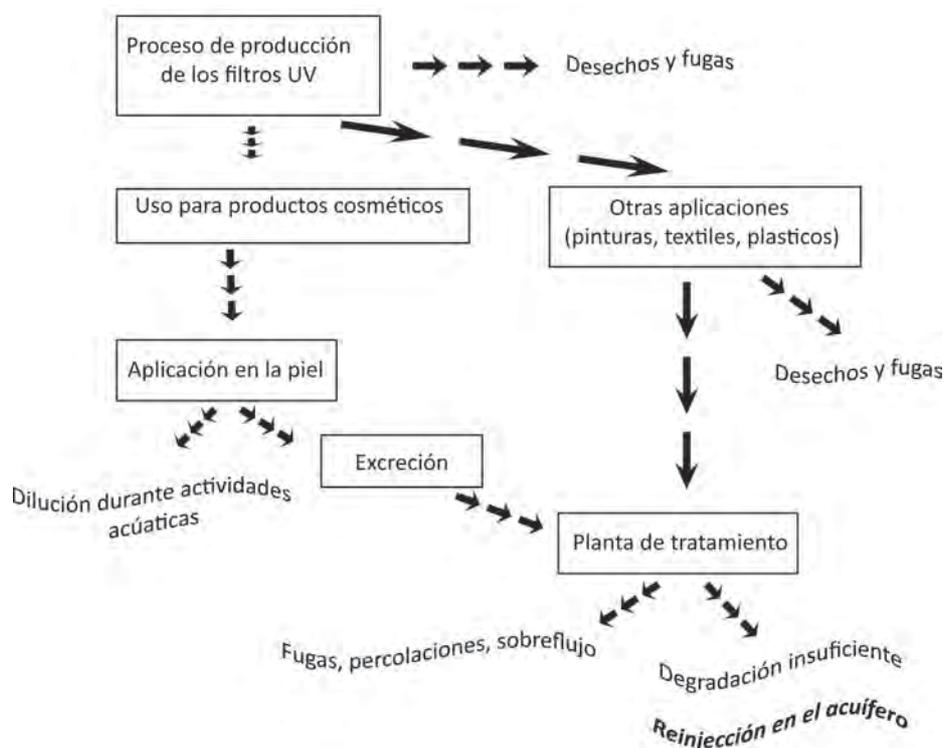


Figura 4. Rutas principales de los filtros UV en el ambiente. Las partes onduladas indican las potenciales entradas al ambiente (adaptado de Giokas *et al.*, 2007).

Por su elevada lipofilidad, la mayoría de los compuestos tienen un log K_{ow} entre 4 y 8, y por su relativa resistencia a la degradación biológica, los filtros UV tienden a bioacumularse y bioamplificarse a través de la cadena alimenticia (Díaz Cruz y Barceló, 2009). En el pez *Pimephales promelas* se ha calculado la bioconcentración del filtro UV 3-bencildieno canfor en un factor de hasta 313 (Kunz y Fent, 2006).

Las sospechas sobre un posible impacto endocrino de los compuestos bloqueadores solares usados en cosmetología han sido levantadas desde hace un poco más de una década; el equipo de la suiza Margret Schlumpf evidenció que la exposición a estos compuestos altera el desarrollo de embriones de ratas (Schlumpf *et al.*, 2001). Desde entonces se han multiplicado los estudios sobre la actividad estrogénica y antitiroidea de ciertos bloqueadores solares (Díaz Cruz *et al.*, 2009, Giokas *et al.*, 2007, Schlumpf *et al.*, 2004 para una revisión de los diferentes estudios realizados).

Coronado y sus colaboradores reportaron una clara respuesta estrogénica debida a la exposición a la oxibenzona en truchas y medakas, aunque la respuesta se observó a concentraciones mayores que las reportadas en el ambiente, no se debe descartar ya que estos compuestos son propensos a bioacumularse (Coronado *et al.*, 2008).

De hecho, Petra Kunz y Karl Fent (2006) estudiaron el efecto de una mezcla de filtros UV usando concentraciones inferiores a las cuales, individualmente, no se había reportado efecto en los organismos. Los autores observaron el efecto sinérgico de las mezclas indicando que aún a concentraciones parecidas a las reportadas en el ambiente, los filtros UV podían tener un efecto estrogénico o aumentar el impacto de otros xenoestrógenos presentes.

Por otro lado, los investigadores italianos del equipo de Roberto Danovaro observaron otro tipo de impacto de los filtros UV en los corales y sus algas simbióticas; los compuestos podrían promover la infección viral de corales ya debilitados por los fenómenos de anomalías de temperatura y desencadenar eventos de blanqueamiento (Danovaro *et al.*, 2008).

La costa de Quintana Roo es un ambiente particularmente sensible, caracterizado por su sistema subterráneo complejo cárstico, sus cenotes, sus pastizales marinos y la barrera arrecifal mesoamericana. El turismo es la mayor actividad realizada en esta región tropical que recibe una incidencia lumínica de 8358 W/m^2 (equivalente a $15170 \text{ micromol/m}^2 \text{ s}^2$) en promedio (Servicio de Hidrología de la UASA, ICMYL-UNAM). Por consecuencia de esta importante radiación, tanto los visitantes como los habitantes tienden a protegerse de los rayos dañinos UV con cremas bloqueadoras solares. Durante la temporada alta del verano 2008 en la zona hotelera de Cancún se realizó una encuesta a un total de 411 usuarios de la playa (turistas, prestadores de servicio) sobre sus patrones de uso de las cremas bloqueadoras solares así como los compuestos presentes en sus cremas en el caso de que las usaran. Los compuestos como la oxibenzona (o 3-benzofenona, 2-hidroxi-4-metoxifenil-benzofenona), el octisalato (2-etilhexil salicilato) y el octinoxato (2-etilhexil trans 4-metoxicinamato) resultaron formar parte de los cinco productos más usados por los entrevistados (Rodríguez Fuentes *et al.*, 2010) (figura 5).

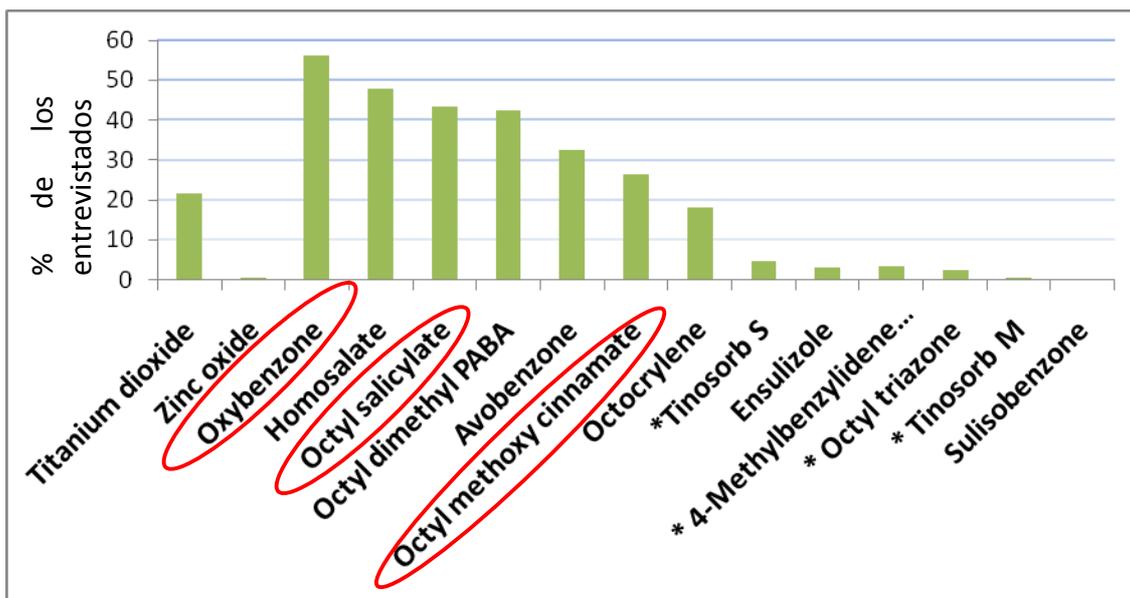


Figura 5. Compuestos filtros de UV usados en las playas de Cancún. Resultado de las encuestas realizadas durante el verano 2008 (Rodríguez Fuentes *et al.*, 2010).

En el presente estudio se seleccionaron estos tres compuestos con base en sus estructuras químicas (figura 6) con benenos y cadenas insaturadas que recuerdan las estructuras de CDEs previamente estudiados por sus efectos estrogénicos, así como por su frecuencia de utilización como filtros de UV.

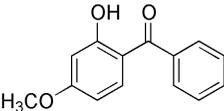
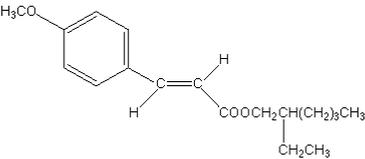
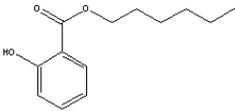
Estos tres compuestos cubren longitudes de onda diferentes yendo de los UVA a los UVB por lo que se encuentran en muchas ocasiones asociados entre ellos en las formulaciones de las cremas bloqueadores solares.



Figura 6. Estructuras de la oxibenzona, del octisalato y del octinoxato con las longitudes de onda a las cuales presentan su efectividad (http://www.scienceofspectroscopy.info/edit/index.php?title=Sunscreen_Chemistry).

Las principales características de la oxibenzona, del octinoxato y del octisalato se presentan en la tabla 2. Los compuestos exhiben unos $\log K_{ow}$ un poco diferentes entre ellos si bien los tres se consideran lipofílicos lo que les vuelve susceptibles de bioacumularse en los tejidos adiposos de los organismos. Los valores de $\log K_{oc}$ permiten evaluar el coeficiente de producto absorbido por los sedimentos en donde se pueden ir acumulando los compuestos e impactar los organismos bénticos (Giokas *et al.*, 2007).

Tabla 2. Propiedades fisicoquímicas de los tres compuestos filtros de UV seleccionados. (Modificado de Giokas *et al*, 2007 y Rodil *et al*, 2009)

Compuesto	Abreviatura empleada	Fórmula	Peso molecular	Estructura química	Log K _{ow}	pKa	Log factor bioconcentración	Log K _{oc}
Oxibenzona	Oxi	C ₁₄ H ₁₂ O ₃	228,25		3,52	7,56	1,38	3,10
Octinoxato (Octil metoxicinamato)	ONX	C ₁₈ H ₂₆ O ₃	290,41		5,80	nd	5,80	4,10
Octisalato (Octil salicilato)	OS	C ₁₅ H ₂₂ O ₃	250,33		5,97	8,13	nd	nd

IV. La vitelogenina

La vitelogenina (VTG) es la fosfoglicolipoproteína precursora de la yema de huevo (vitelina) expresada en las hembras de especies ovíparas como peces, reptiles, anfibios, aves e invertebrados (Barucca, 2006). Es una proteína relativamente larga, de peso molecular importante (300-600 kDa según las especies), rica en glucosa, lípidos y fosfatos y contiene moléculas de Ca y Zn en sus enlaces (Gagnaire *et al.*, 2009). Se sintetiza normalmente en el hígado de las hembras maduras en respuesta a la liberación de estrógenos por las gónadas (figuras 7 y 8) y se libera en el flujo sanguíneo para ser almacenada en los oocitos a través de la endocitosis de los receptores específicos (Matozzo *et al.*, 2008).

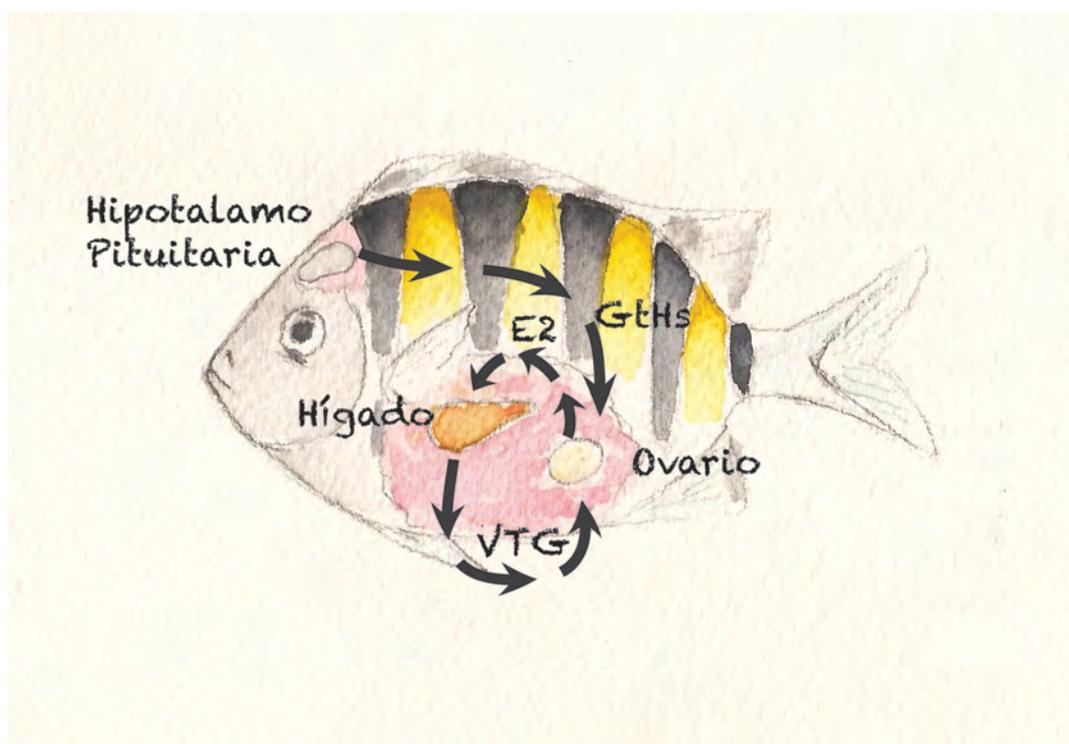


Figura 7. Diagrama explicativo de la síntesis de VTG en peces. El hipotálamo sensible a estímulos como la luz y la temperatura induce la síntesis de las gonadotropinas (GtHs) en la pituitaria. Las GtHs estimulan la síntesis del estradiol (E2) por las células foliculares de los ovarios. En el hígado el E2 a su vez induce la síntesis de VTG, la cual es transportada a los oocitos (adaptado de Lawrence y Hemingway, 2003).

En los oocitos, la VTG es "cortada" en proteínas más pequeñas: fosvitina, lipovitelina y compuestos beta (Cheek *et al.*, 2001) que servirán como fuente de energía al embrión en desarrollo. La porción de VTG no almacenada en los oocitos se acumula en el plasma hasta su destrucción por proteasas. En ambientes contaminados con compuestos disruptores endocrinos, la expresión de la vitelogenina se induce tanto en machos como en organismos juveniles (Scholz *et al.*, 2004; Kime *et al.*, 1999).

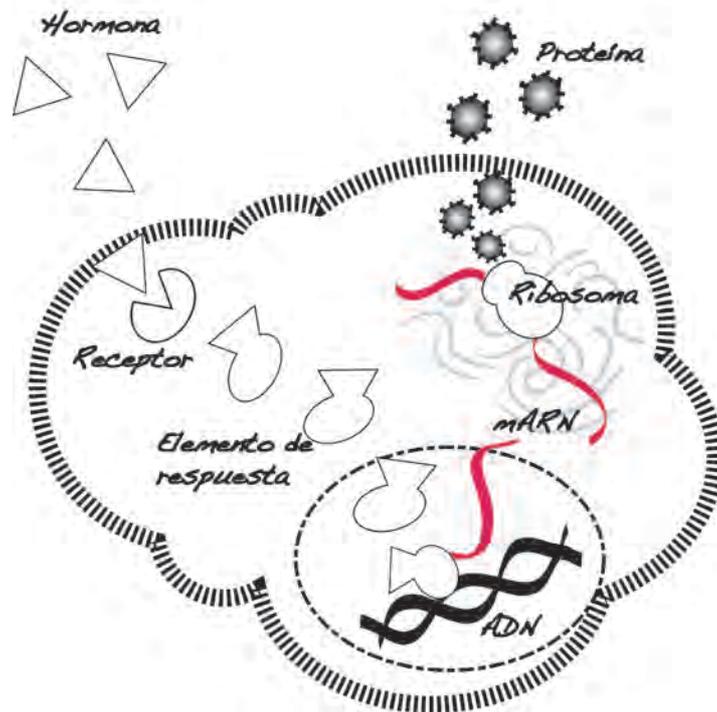


Figura 8. Activación del gen codificante de VTG por el estradiol. Se forman dímeros con los receptores del estradiol. Crean complejos de iniciación al juntarse con los elementos de respuesta estrogénica (EREs) del ADN, lo cual va a desencadenar la transcripción del gen (o de los genes) codificando para VTG y la síntesis de la proteína (esquemático a partir de Rotchell y Ostrander, 2003).

Los organismos inmaduros y los machos adultos disponen de receptores de estrógenos y de elementos de respuesta estrogénica pero, en situaciones normales, no están estimulados por la casi ausencia de estradiol endógeno. Los compuestos estrogénicos regulan el nivel de expresión del gen codificando para VTG, los compuestos como los bloqueadores solares o xenoestrógenos se pueden fijar en los receptores de estrógeno e inducir la síntesis de la proteína de VTG (Green y Chambon, 1996) lo cual se ve facilitado por la relativa baja especificidad de los receptores de estrógeno (Matozzo *et al.*, 2008).

Por la relación específica entre la estimulación por estrógenos y la síntesis de VTG, la escasa producción de la proteína en organismos machos o juveniles en condiciones normales, la VTG se ha vuelto un biomarcador molecular ampliamente utilizado para estudiar los efectos estrogénicos en peces (Cheek *et al.*, 2001). Los primeros reportes de niveles altos de VTG en peces machos fueron reportados en ríos y estuarios, ecosistemas impactados por los efluentes y descargas de aguas residuales (Sumpter, 2005). Hansen *et al.* reportaron el uso de la VTG en 1998 en su estudio del aumento en la feminización de los peces en varios ambientes acuáticos de Alemania e Inglaterra. Los niveles de VTG en peces de varios ríos de Inglaterra reportados por Allen *et al.* (en Kime *et al.*, 1999) en 1999 fueron de 100mg/ml, unas diez millones de veces más elevados que los organismos control. En 2001, los niveles altos de VTG en los machos del pez espada *Xiphias gladius* L. del Mediterráneo demostraron que los CDEs no estaban confinados a los ríos y estuarios ya que las zonas costeras y marítimas también se ven impactadas por estos compuestos (Fossi *et al.*, 2004). En México, Zapata *et al.* (2007) estudiaron los efectos de contaminantes orgánicos persistentes en el

golfo de México y la costa oeste de la península de Yucatán usando la expresión del gen de VTG en el bagre (*Ariopsis felis*) y pudieron observar claras alteraciones endócrinas. Scholz y Mayer (2008) estudiaron el efecto de diferentes hormonas sobre peces pequeños (el medaka (*Oryzias latipes*), el pez cebra (*Danio rerio*), el "fathead minnow" (*Pimephales promelas*) y el "stickleback" (*Gasterosteus aculeatus*); demostraron el potencial de los biomarcadores moleculares como la VTG como técnica sencilla de estudio de los impactos de los diferentes compuestos "disruptores" endocrinos. Vega López *et al.* (2006) usaron la inducción de VTG para demostrar el efecto estrogénico de los PCBs en una especie endémica en peligro de extinción en México, el *Girardinichthys viviparus*. En lenguados del Sur de California se ha detectado desde ya varios años la presencia de VTG en el plasma de los machos que habitan los afluentes de aguas residuales (Coronado *et al.*, 2008). Ferreira y sus colaboradores (2009) han propuesto el uso de la expresión de la VTG en el *Lipophrys polus* como centinela para el monitoreo de la contaminación por compuestos estrógenos en las costas atlánticas de Europa.

Como se puede apreciar, la VTG se volvió en poco tiempo un biomarcador popular para detectar los efectos estrogénicos de numerosos compuestos químicos y de muestras ambientales (Rotchell y Ostrander, 2003, Kime *et al.*, 1999).

En la mayoría de los estudios, se suele usar la expresión del gen de VTG así como el nivel de proteína inducida para monitorear la disrupción endocrina (Van der Oost *et al.*, 2003, Scholz *et al.*, 2004).

La secuencia del gen y la proteína son específicas a cada especie, por lo cual es necesario efectuar estudios especie-específicos de las rutas de la inducción de la VTG para poder usarla como biomarcador (Hansen *et al.*, 1998).

La expresión genética generalmente se mide por RT PCR cuantitativa o de tiempo real, usando cebadores específicos previamente diseñados gracias a la alineación de secuencias de especies cercanas conocidas (Rotchell y Ostrander, 2003).

Para medir los niveles de proteína inducida tradicionalmente se usan los métodos de inmunoensayos tipo ELISA basados en la utilización de anticuerpos específicos a la VTG. Los anticuerpos no están disponibles para todas las especies de peces y su diseño puede ser un proceso complicado y costoso. Afortunadamente y como alternativas se han desarrollado ensayos indirectos basados en la cuantificación de los fosfatos lábiles de la VTG tras hidrólisis alcalina. El método ALP (Alkali Labile Phosphate en inglés) ha mostrado muy buenas correlaciones con los métodos directos de cuantificación en peces y moluscos (Gagné y Blaise, 2000, Hallgren *et al.*, 2009, Gagnaire *et al.*, 2009).

V. *Abudefduf saxatilis* (Linnaeus 1758)

Hoy en día los peces más empleados como modelos en el monitoreo de los compuestos endocrinos son el medaka (*Oryzias latipes*), el pez cebra (*Danio rerio*), el "fathead minnow" (*Pimephales promelas*) y la trucha (*Oncorhynchus myhiss*) (Coronado *et al.*, 2008; Kunz, 2006; Scholz *et al.*, 2004). Ferreira *et al.* (2009) proponen *Lipophrys polis* para monitorear las costas atlánticas europeas pero no se ha reportado todavía un modelo para especies marinas tropicales.

El *Abudefduf saxatilis* o pez sargento, es un habitante emblemático de los arrecifes del mar Caribe y fue descrito por primera vez por Linnaeus en 1758. Toma su nombre del árabe "Abudefduf" significando padre, "saxa": viviendo entre las rocas y "tilis" por sus rayas, lo que podría interpretarse por "padre de las rocas" por su carácter territorial y agresivo. Se le conoce como sargento por las 5 rayas que presenta y hace pensar en la decoración militar de un sargento mayor (Cummings, 1968).



Figura 9. Timbre postal de Cuba retratando al *Abudefduf saxatilis*.

Es una damisela y pertenece a la familia de los Pomacentridos, un grupo de peces marinos tropicales que incluye más de 180 especies (Cummings, 1968).

Clasificación:

Reino: Animalia

Phylum: Chordata

Clase: Actinopterygii

Orden: Perciformes

Familia: Pomacentridae

Sinónimos: *Chaetodon marginatus* (Bloch, 1787), *Chaetodon sargoides* (Lacepede, 1802), *Apogon quinquevattatus* (Blyth, 1858), *Abudefduf ascensionis* (Fowler, 1919).

El sargento está representado en la mayoría de los mares tropicales del globo por especies muy cercanas como el *Abudefduf vaigiensis*, el *Abudefduf taurus*, el *Abudefduf abdominalis* o el *Abudefduf troschelii*. Esta distribución amplia toma un carácter particularmente interesante para la comparación de resultados provenientes de diversas regiones del mundo. El *A. saxatilis* es exclusivamente del Atlántico (figura 10) mientras que las especies anteriormente nombradas poblan los océanos Índico y Pacífico.



Figura 10. Mapa de distribución del *Abudefduf saxatilis* (<http://www.aquamaps.org/receive.php>).

El sargento es muy abundante; cuando no está en temporada de reproducción, se encuentra en agregaciones de varias decenas de individuos. Estas agregaciones se asocian al ambiente somero arrecifal (1-15 m de profundidad). Su carácter curioso y poco tímido le ha dado un papel como protagonista en una cantidad de carteles publicitarios de la región y se considera un emblema de la profusión de vida y colores en el arrecife caribeño (figura 11).

La especie es fácilmente identificable por su cuerpo pequeño ovoide comprimido (los adultos alcanzan un máximo de 15 cm de largo), su aleta dorsal única, sus cinco rayas negras verticales de la cola a la cabeza que se adelgazan hacia el abdomen y su color amarillo vivo (al menos que el individuo este cuidando su nido en temporada de reproducción por lo cual se verá azul profundo). Es altamente territorialista, individuos desalojados a varios kilómetros de sus nidos son capaces de volver a encontrar su área muy rápidamente presentando así una alta fidelidad a su sitio (Cummings, 1968).



Figura 11. Tipo de anuncios para actividades acuáticas en Cancún y la Riviera Maya; esnorklear en medio de una escuela de sargentos. Se puede notar la cercanía que logran tener los turistas con estos peces poco tímidos (foto:<http://www.rivieramaya.info>).

Tiene su fase juvenil en ambientes muy específicos, protegidos de la depredación, como las charcas de marea donde puede llegar a ser la especie dominante, o en zonas costeras someras y rocosas lo que lo vuelve susceptible a la contaminación del litoral (Prappas *et al.*, 1991; Kerr *et al.*, 2004).

No se ha reportado hermafroditismo para esta especie de damisela, y la proporción sexual ambiental reportada por Cummings (1968) entre hembras y machos es aproximadamente de 1,5:1 en las Islas Bahamas, siendo los machos en general 5 mm más largos que las hembras. No se presenta dimorfismo sexual; durante el desove la forma de la papila se diferencia ligeramente y con práctica se puede lograr sexar el individuo (figura 12), pero de forma general individuos que no están en temporada de reproducción son imposibles de diferenciar sexualmente (Cummings, 1968).

En el presente estudio, se decidió trabajar con juveniles por su facilidad de captura en las charcas de marea. Los juveniles (< 5 cm) bajo condiciones normales, no presentan expresión de la vitelogenina hasta su madurez sexual (aproximadamente un año; > 10 cm para los machos, > 8 cm para las hembras) (Robertson, 1988).

No prevalece una temporada definida para su reproducción ya que se han observado nidos durante todo el año. El ritual de apareamiento empieza por el cortejo; el macho persigue a la hembra por las mañanas y durante el día, los machos arreglan lo que será su nido removiendo las algas, para acoger y proteger a los huevos en las grietas y cuevas formadas por el arrecife. Aproximadamente 200 000 huevos son liberados durante el desove. Una vez fertilizados, los huevos de color rosa a morado se adhieren al sustrato y son ferozmente protegidos hasta la eclosión por el macho, unas 150 horas más tarde (Robertson, 1988).

Como la mayoría de los Pomacéntridos, la especie es omnívora lo que aumenta su espectro de exposición a contaminantes. El estudio de contenidos estomacales reveló una variedad de fuentes dietarias: algas bénticas, pelágicas, copépodos, larvas de camarón, peces, hidrozoarios, gasterópodos, anélidos y tunicatos (Cummings, 1968).

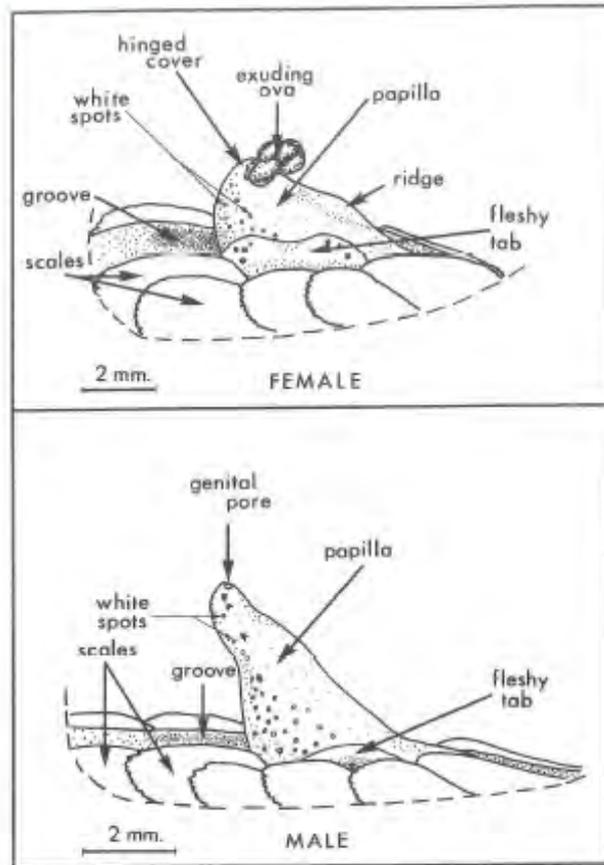


Figura 12. Dibujo de Cummings de las diferencias morfológicas de la papilla entre el macho y la hembra sargento durante el periodo de reproducción (Cummings, 1968).

A la fecha la especie no es considerada como "vulnerable" por la Unión Internacional para la Conservación de la Naturaleza (IUCN por sus siglas en inglés), lo que facilita la obtención de permiso para pesca de fomento.

B. Hipótesis y objetivos

I. Preguntas de Investigación

¿Cuál es la secuencia de VTG en *Abudefduf saxatilis*?

¿Cuáles de los compuestos bloqueadores solares seleccionados, y a qué dosis, tienen efecto estrogénico en los juveniles de *Abudefduf saxatilis*?

¿Cómo se relaciona la expresión genética de VTG con la concentración de la proteína en peces sargento tratados con compuestos bloqueadores solares?

II. Hipótesis

La oxibenzona, el octisalato y el octinoxato, solos o en mezcla, tienen efectos estrogénicos en los juveniles de *Abudefduf saxatilis*, induciendo la expresión genética y la síntesis proteica de la vitelogenina.

III. Objetivo y metas

Evaluar el impacto de los bloqueadores solares como disruptores endocrinos, sobre una especie de pez marino tropical, el sargento *Abudefduf saxatilis*, a través del análisis de la expresión genética e inducción de la VTG en los juveniles.

- Secuenciar el gen de VTG y los genes control 18S y β -actina del *Abudefduf saxatilis* para diseñar cebadores específicos de cuantificación en vista al análisis de PCR en tiempo real.
- Cuantificar la inducción de la proteína VTG a través del método de fosfatos lábiles al álcali o Alkali Labile Phosphate (ALP).
- Evaluar el probable efecto como disruptor endocrino de la oxibenzona, del octinoxato, del octisalato y una mezcla en juveniles de *A. saxatilis* analizando la expresión genética por PCR en tiempo real y la concentración proteica por ALP.

C. Materiales y Métodos

I. Captura y manejo de los organismos

La captura de los organismos se llevó a cabo bajo permiso de pesca de fomento N°DGOPA.09749.140909.-3161 por parte de la Secretaria de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación, Comisión de Acuicultura y Pesca y con revisión del Instituto Nacional de Pesca y la Secretaria de Medio Ambiente y Recursos Naturales. De la misma manera, el estudio fue aprobado por el Comité de Ética del Centro de Investigación Científica de Yucatán A.C.

Los juveniles de *Abudefduf saxatilis* fueron capturados usando redes de acuario en las charcas intermareales de Punta Brava, Puerto Morelos y Bahía de la Media Luna, Akumal y posteriormente se trasladaron rápidamente a sus estanques de aclimatación.

Algunos organismos fueron donados por el acuario del parque ecológico Xcaret, Playa del Carmen y se usaron en los estudios previos de aislamiento de los genes de vitelogenina VTG, β -actina y 18S.

Para los bioensayos de exposición a los bloqueadores solares, se capturaron solamente individuos provenientes de Punta Brava de longitud total inferior a los 5 cm y mayor a los 2 cm para asegurar su estadio juvenil.

Todos los organismos usados en este estudio se aclimataron en 8 estanques de fibra de vidrio de aproximadamente 60 L, con flujo continuo independiente de agua de mar filtrada, protegidos de los rayos solares con "malla sombra" y techos de acrílico. Se dispusieron adoquines perforados para proveer lugares de refugio (fig 13) y una densidad máxima de 10 organismos por estanque para prevenir agresividades. Los estanques se ubicaron en las instalaciones de la estación de Puerto Morelos del Instituto de Ciencias del Mar y Limnología de la Universidad Nacional Autónoma de México.

A las pocas horas de haber ingresado a los estanques los peces salían de los refugios y aceptaban comida.

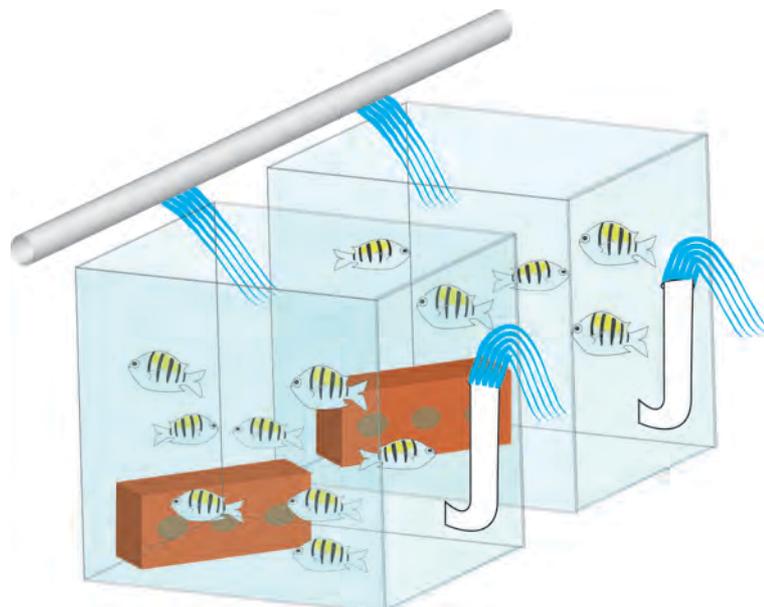


Figura 13. Esquema representativo de las instalaciones de los estanques. 8 estanques de 60 litros con flujos individuales de agua de mar filtrada y sus refugios. Máximo 10 peces por estanque, comida *ad libitum*.

Los organismos se aclimataron por lo menos 2 semanas en estas condiciones previamente a los bioensayos.

Durante todo el tiempo de aclimatación se les alimentó *ad libitum* 2 veces al día con alimento comercial para peces tropicales y nauplios de artemia (*Artemia salina*) vivos previamente eclosionados (Anexo I).

Los estanques se sifonearon diariamente y se limpiaron semanalmente. Entre cada bioensayo se realizó un recambio total de agua, una limpieza profunda y se dejaron los estanques vacíos con flujo máximo continuo durante por los menos 48h para asegurar la remoción de cualquier contaminación residual.

En todos los casos, al final de las exposiciones, se sacrificaron por rápido choque hipotérmico y se disectaron inmediatamente con materiales estériles.

I.1 Exposición de organismos para aislamiento de los genes

Dado que la expresión del gen de VTG es regulada hormonalmente y que no se pueden distinguir las hembras de los machos en la especie de interés, para asegurar respuesta y una mejor amplificación posterior por PCR se decidió exponer unos organismos de *Abudefduf saxatilis* con 17β -estradiol (E_2). Se expusieron 5 individuos en estanques de 20 L separados a una concentración de 100 ng/L de E_2 durante 3 días con cambios parciales de agua diariamente. Estos organismos fueron proporcionados por el acuario de Xcaret, midieron entre 5 y 10 cm de longitud. No se les alimentó durante los 3 días de la exposición. Los parámetros de temperatura, salinidad, oxígeno disuelto y pH se midieron mediante una sonda multiparámetro HACH Senslon 5 y permanecieron estables: T°: $27,2 \pm 0,3^\circ\text{C}$; S: $28,2 \pm 0,1$; DO: $7,7 \pm 0,3$ mg/L, pH: $7.85 \pm 0,2$.

Se disectaron inmediatamente después del sacrificio para remoción de sus hígados, los cuales se guardaron en RNALater® a -80°C .

I.2 Exposición de los organismos a los bloqueadores solares, bioensayos preliminar y final

Los compuestos bloqueadores solares fueron diluidos en 2,5 ml de etanol grado biología molecular aforando a 10ml con 7,5 ml de aceite de maíz (Leaños Castañeda *et al.*, 2002). Su concentración se calculó de manera que el volumen final de inyección sea de 10 $\mu\text{l/g}$ PH, independientemente de la dosis para evitar confusiones. Se prepararon las soluciones el día anterior a las exposiciones y se guardaron en viales de vidrio ámbar de 10 ml a 4°C .

Los organismos se pesaron en una balanza granataria al 0,1 g. Fueron inyectados con los compuestos intraperitonealmente usando jeringas estériles para insulina de 0,3 ml con aguja corta y delgada BD Ultra fine®. La inyección se realizó en la zona debajo de la unión de las aletas pectorales limpiando el área con etanol de farmacia (figura 14). Se manipularon los organismos con sumo cuidado con un trapo húmedo. Se actuó lo más rápidamente posible y se regresaron a sus estanques inmediatamente. Se monitorearon los parámetros ambientales como la conductividad, la salinidad, la temperatura, el pH y el oxígeno disuelto gracias a una sonda multiparámetros HACH Senslon 5. Los parámetros permanecieron estables durante todos los bioensayos: T°: $26,3 \pm 0,6^\circ\text{C}$; S: $29,3 \pm 0,1$; DO: $8,5 \pm 0,5$ mg/L; pH: $8,1 \pm 0,2$.

La exposición para el bioensayo preliminar fue de una semana, contando con 10 organismos por cada tratamiento. El tiempo de exposición se ajustó a 96 h en el bioensayo final, donde se trataron 7 organismos por condición experimental.



Figura 14. Las inyecciones se realizaron intraperitonealmente debajo de la zona de unión de las aletas pectorales.

Inmediatamente después del sacrificio, aproximadamente dos tercios del hígado se guardaron en glicerol al 20 % para un posterior análisis de la VTG por ALP y el tercio sobrante se guardó en RNALater® para la extracción del ARN, su retrotranscripción a cADN y finalmente análisis de expresión genética por Q-PCR. Ambos se guardaron a -80°C hasta sus respectivos tratamientos.

II. Aislamiento de los genes de VTG, β actina y 18S

Debido a la falta de información disponible sobre el genoma de *Abudefduf saxatilis*, el primer paso para poder estudiar la expresión de algunos de sus genes fue obtener sus secuencias o por lo menos una fracción de ellas. El diseño de cebadores específicos (o oligo-nucleótidos o primers en inglés) es primordial para el aislamiento y la secuenciación de los genes estudiados. Son pequeñas secuencias de ácido nucleico complementarias a la hebra molde de interés sirviendo de punto de inicio de su copia empleando la técnica conocida como PCR (Polymerase Chain Reaction por sus siglas en inglés, Reacción en cadena de polimerasa).

II.1 Diseño de los cebadores

Dada la ausencia de secuencias de *Abudefduf saxatilis*, las secuencias de los genes de interés de varias especies de peces fueron buscadas y alineadas con el fin de encontrar zonas conservadas o de alta similitud entre ellas para diseñar los cebadores de la especie en estudio.

II.1.a Búsqueda de secuencias

El sitio Internet del National Center for Biotechnology Information (NCBI) de la biblioteca nacional de Estados Unidos contiene un registro de un número importante de secuencias dadas de alta por científicos del mundo entero: el GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>).

Usando el buscador proporcionado por el sitio, se buscaron secuencias de mRNA de los genes estudiados. Los ejemplos que se señalan subsecuentemente corresponden al gen de VTG.



Figura 15. Búsqueda de una secuencia de VTG para *Abudedefduf saxatilis* en NCBI. Impresión de pantalla.

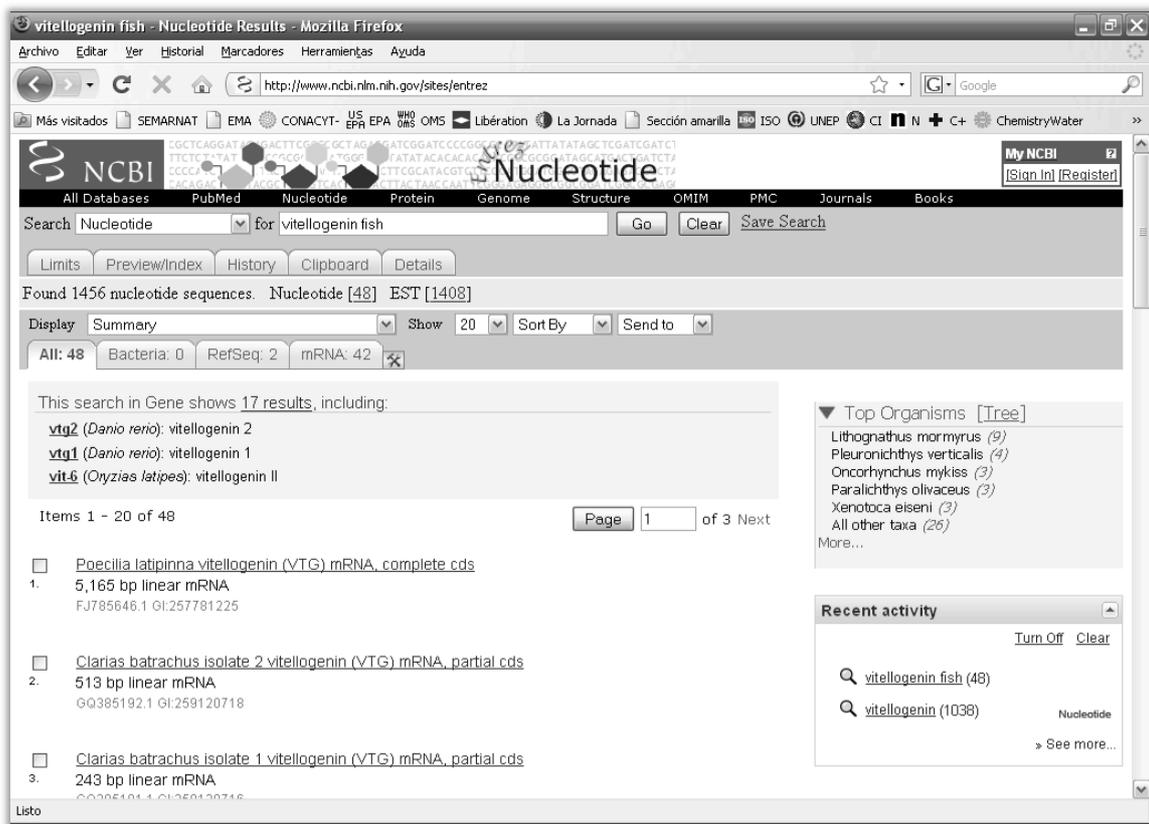


Figura 16. Búsqueda de secuencias de VTG en otras especies de peces en NCBI. Impresión de pantalla.

Las secuencias se guardaron en un archivo de texto sencillo, .doc en este caso, siguiendo el formato siguiente:

>nombre del pez y código de referencia
copia de la secuencia en formato FASTA

>nombre del segundo pez y código de referencia
copia de la secuencia en formato FASTA
etc.

Se recomienda trabajar por lo menos con tres secuencias las más completas posible para tener mayor seguridad en los resultados del análisis de alineación.

II.1.b Análisis de consenso entre las secuencias

Una vez encontradas las secuencias las más convenientes y guardadas en un mismo archivo se procedió a encontrar las zonas de más alto consenso entre ellas, o zonas conservadas ya que con una alta probabilidad estas zonas se encuentran también en el genoma de *Abudefduf saxatilis*. Para ello se consultaron varios programas de acceso en línea:

- ClustalW (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/clustalw2/index.html>),
- MUSCLE (<http://www.drive5.com/muscle/>),
- Toffee (http://www.tcoffee.org/Projects_home_page/t_coffee_home_page.html)
- MultAlin (<http://multalin.toulouse.inra.fr/multalin/>)



Figura 17. El programa de alineación de secuencias en línea MultAlin. Impresión de pantalla.

En este ejemplo se usó el último programa, MultAlin, para alinear las diferentes secuencias seleccionadas anteriormente.

El programa es amigable y guía el usuario paso a paso en la definición de las características del análisis. Se seleccionó un nivel de consenso del 90%. El programa genera una imagen indicando las zonas de consenso con escala de colores, el rojo siendo el más alto.

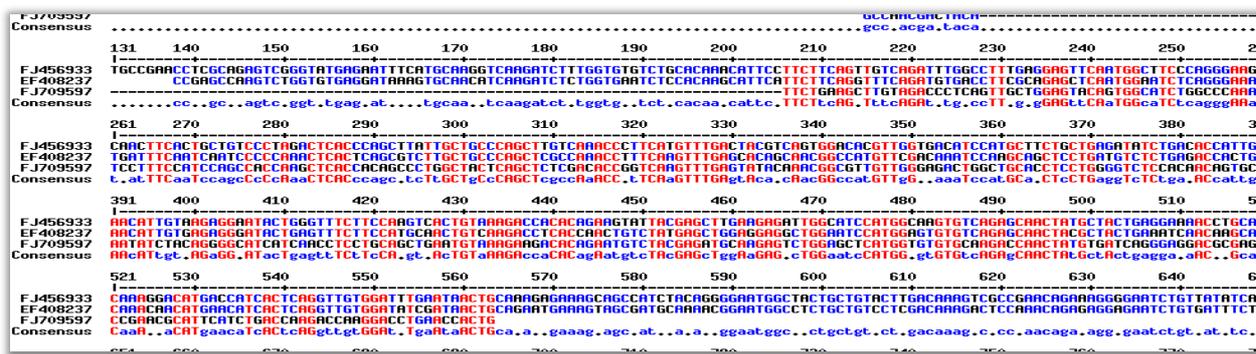


Figura 18. Alineaciones de secuencias y consenso entre ellas analizado por MultAlin, las zonas rojas indican las zonas de más alto consenso o zonas conservadas.

II.1.c Alineación de proteínas; búsqueda de los codones favoritos

Una manera complementaria de diseñar cebadores es usando alineaciones de las secuencias de aminoácidos del gen de estudio.

La combinación de 3 de las bases de nucleótidos forma lo que se le llama un codón y codifica por un aminoácido, el cual representa es el elemento base de las proteínas.

La codificación de los aminoácidos por codones tiene varias posibilidades de arreglo de nucleótidos:

		Segunda letra					
		U	C	A	G		
Primera letra	U	UUU } Phe UUC } UUA } Leu UUG }	UCU } UCC } Ser UCA } UCG }	UAU } Tyr UAC } UAA Stop UAG Stop	UGU } Cys UGC } UGA Stop UGG Trp	U C A G	
	C	CUU } CUC } Leu CUA } CUG }	CCU } CCC } Pro CCA } CCG }	CAU } His CAC } CAA } Gin CAG }	CGU } CGC } Arg CGA } CGG }	U C A G	
	A	AUU } AUC } Ile AUA } AUG } Met	ACU } ACC } Thr ACA } ACG }	AAU } Asn AAC } AAA } Lys AAG }	AGU } Ser AGC } AGA } Arg AGG }	U C A G	
	G	GUU } GUC } Val GUA } GUG }	GCU } GCC } Ala GCA } GCG }	GAU } Asp GAC } GAA } Glu GAG }	GGU } GGC } Gly GGA } GGG }	U C A G	
		Tercera letra					

Figura 19. Tabla representando las diferentes posibilidades de combinación de bases para la codificación de los aminoácidos (<http://aprend3r.com/wp-content/uploads/2008/06/tabla1.jpg>)

Se ha observado que las diferentes especies demuestran combinaciones “favoritas” de codones para la codificación de sus aminoácidos. Conociendo las combinaciones favoritas de la especie de interés, es entonces posible, a partir de una secuencia o una alineación de secuencias de aminoácidos de una proteína dada de otras especies, traducir y obtener una secuencia de nucleótidos “personalizada”.

A partir de la secuencia de aminoácidos del mRNA de Cyp 51 reportada para *Abudefduf saxatilis* (AY496940) se analizó la recurrencia de las diferentes combinaciones de nucleótidos (Anexo II) y se obtuvieron los codones más frecuentes para *A. saxatilis*. Posteriormente, se realizó una alineación de las secuencias de aminoácidos de VTG de diferentes especies de peces como se describió previamente, por NCBI y MultAlin. Las zonas conservadas de aminoácidos fueron entonces traducidas a secuencias de nucleótidos donde se diseñaron cebadores de la manera descrita a continuación.

II.1.d Diseño de los cebadores

De la misma manera que para las alineaciones, se consultaron diferentes programas de libre acceso en línea entre ellos el Biotools de la Universidad de Massachusetts (<http://biotools.umassmed.edu/cgi-bin/primer3plus/primer3plus.cgi>) y el OligoPerfect™ Designer de Invitrogen (<http://tools.invitrogen.com/content.cfm?pageid=9716>).

Un cebador ideal debe de tener una proporción de 50% de bases G y C, una longitud de alrededor de 20 bases y una temperatura de fusión cercana a los 60°C, para amplificar un producto de entre 200 y 400 bases de longitud. Siempre se diseñan los cebadores por pares, uno iniciador (o forward en inglés) y otro de regreso (o reverse en inglés), teniendo sus características similares ya que la amplificación por PCR sigue la dirección 5'-3' de las dos hebras de ácido desoxiribonucleico ADN complementarias. Se suben las secuencias en formato FASTA y el programa genera varios pares de cebadores posibles indicando sus características y su ubicación en la secuencia.

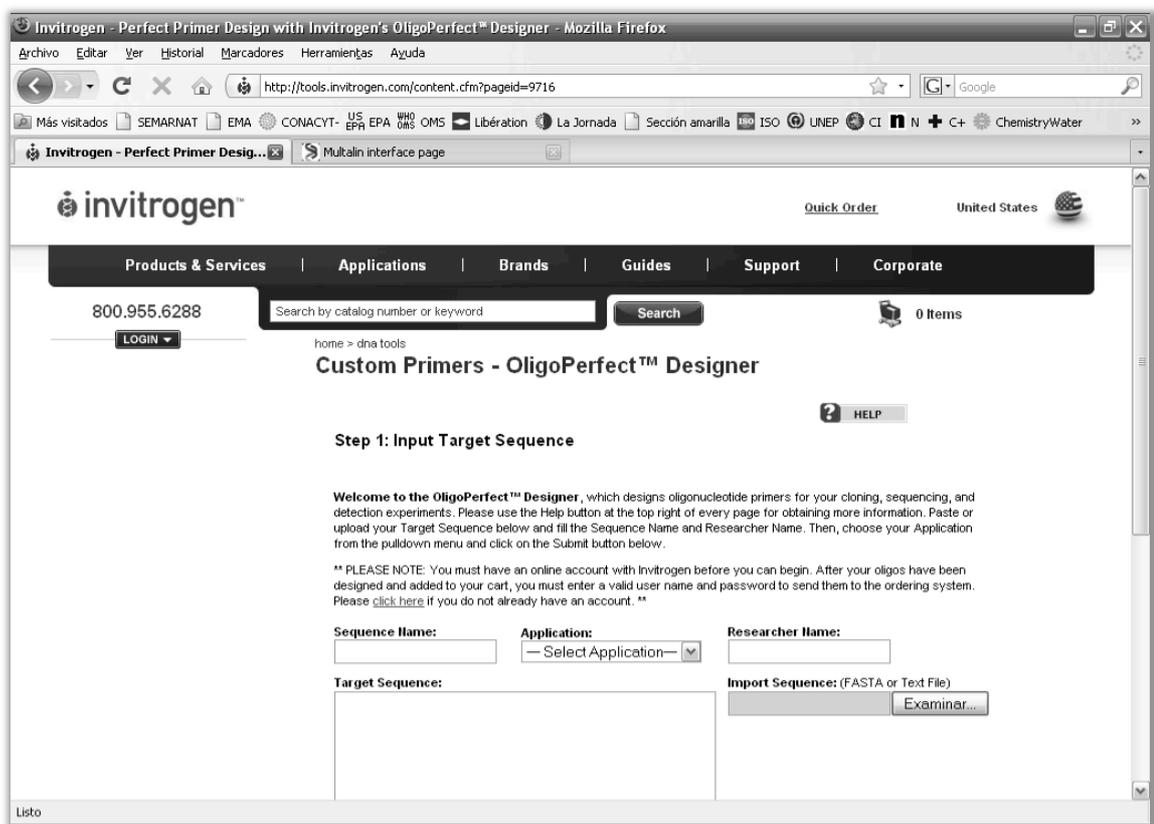


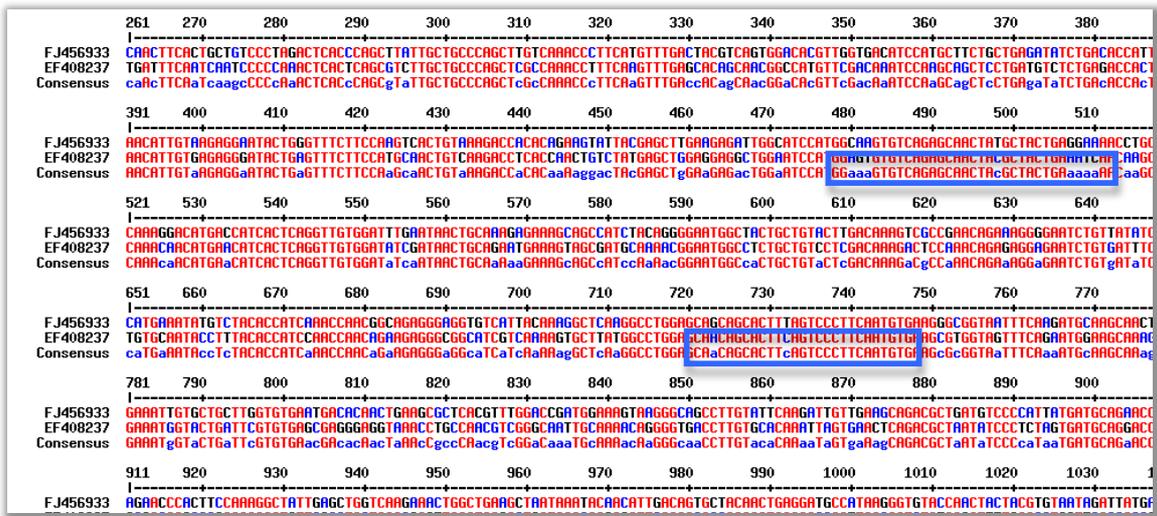
Figura 20. Herramienta de diseño de cebadores en línea de Invitrogen, el OligoPerfect™ Designer. Impresión de pantalla.

Por otra parte, es posible diseñar “manualmente” sus cebadores. A partir del consenso obtenido por la alineación previa o de una secuencia, se pueden sacar secuencias cortas complementarias como descrito a continuación.

Se recuerda que las bases complementarias son Adenina A-Timina T y Guanina G-Citosina C, y que la lectura de una secuencia se hace en la orientación 5'-3' de la hebra de ADN.

- El primer paso es ubicar dos zonas muy bien conservadas, de consenso alto, de alrededor de 20 bases, a una distancia una de la otra de la longitud del producto deseado, unas 200 bases para el ejemplo:

5'



3'

- El segundo paso consiste en traducir las secuencias a su equivalente complementario:

Ejemplo:

Cebador de inicio o F:

Secuencia consenso: gtg tca gag caa cta cgc ta

Cebador de regreso o R:

Secuencia consenso: cac ttc agt ccc ttc aat gt

Secuencia complementaria 3'-5': gtg aag tca ggg aag tta ca

Secuencia cebador regreso 5'-3': aca ttg aag gga ctg aag tg

- Una vez los cebadores traducidos es conveniente comprobar que sus características son las deseadas.

Una variedad de programas se pueden encontrar para calcular las proporciones de GC y la temperatura de fusión de los cebadores así diseñados y validarlos.

En este estudio se usó el programa de BioPHP:

(http://www.biophp.org/minitools/melting_temperature/demo.php).

III. Extracción de Ácido ribonucleico ARN

En todo el estudio se utilizó el kit de Sigma GenElute™ Total RNA Miniprep. Consiste en una lisis del tejido con mercaptoetanol, el homogeneizado se filtra. Se transfiere el filtrado a una columna donde se adhiere el RNA en una membrana y se lava con etanol a diferentes concentraciones. El ARN purificado es entonces eluido en 20µl de agua en un tubo estéril y se guarda a -80°C. (GenElute™ User Guide, Sigma-Aldrich). El protocolo detallado se señala en el Anexo III.

IV. Cuantificación del ARN

La cuantificación del ARN obtenido se realizó mediante la técnica descrita por Gallagher y Desjardins (2006) leyendo la absorción a 260 nm en el espectrofotómetro NanoDrop® ND 1000. Este método tiene la gran ventaja de solo requerir un microlitro de muestra para las lecturas gracias a su sistema de fibra óptica.

V. Retrotranscripción a cADN

La retrotranscripción del ARN a cADN se realizó usando el kit de Invitrogen Superscript III First Strand Synthesis Super Mix #18080-400.

El protocolo detallado se señala en el Anexo IV.

VI. Reacción en cadena de polimerasa o PCR

VI.1 Principios del RT-PCR

La retrotranscripción seguida de una PCR (RT-PCR) es una técnica desarrollada en los años ochenta por el equipo de colaboradores de Kary Mullis (Saiki, *et al.*, 1985). Se volvió rápidamente la herramienta más poderosa para amplificar y detectar niveles traza de mRNA, por la cual Kary Mullis recibió el premio Nobel de Química en 1993.

Los principios de la técnica de PCR se basan en la acción de una enzima polimerasa que cataliza la síntesis de cadenas de polinucleótidos a partir de una región de ADN (identificada gracias a cebadores) con la presencia en el medio de los nucleótidos A,T,G,C o dNTPs y iones Mg^{2+} . Originalmente se utilizaba una polimerasa aislada de *Escherichia coli*, pero con el tiempo, se descubrieron otras polimerasas, la más popular siendo la polimerasa que se logró aislar en la bacteria termofila *Thermus aquaticus*, abreviada *Taq*. Originaria de las fuentes hidrotermales del parque natural Yellow Stone resiste temperaturas altas, por lo cual no se inactiva como la polimerasa de *E.coli* a temperaturas de desnaturalización del ADN, lo cual ahorró un paso en el método de PCR y se eliminó una fuente de contaminación.

El proceso se puede dividir en tres pasos de tres temperaturas diferentes (Fig. 21):

- La desnaturalización del ADN: a una temperatura cercana a los 95°C, la doble hélice del ADN se desnaturaliza, los puentes de hidrógeno se rompen y las 2 hebras se separan.
- La alineación: a una temperatura de unos grados inferiores a su temperatura de fusión, los cebadores se alinean en la región complementaria correspondiente en las hebras separadas
- La amplificación: a una temperatura por lo general de 72°C la enzima polimerasa empieza a amplificar las regiones de ADN a partir de los cebadores incorporando los dNTPs.

Los tres pasos descritos forman lo que se identifica como un ciclo de PCR y por lo general son necesarios de 35 a 40 ciclos para obtener un producto de PCR satisfactorio para un posterior análisis.

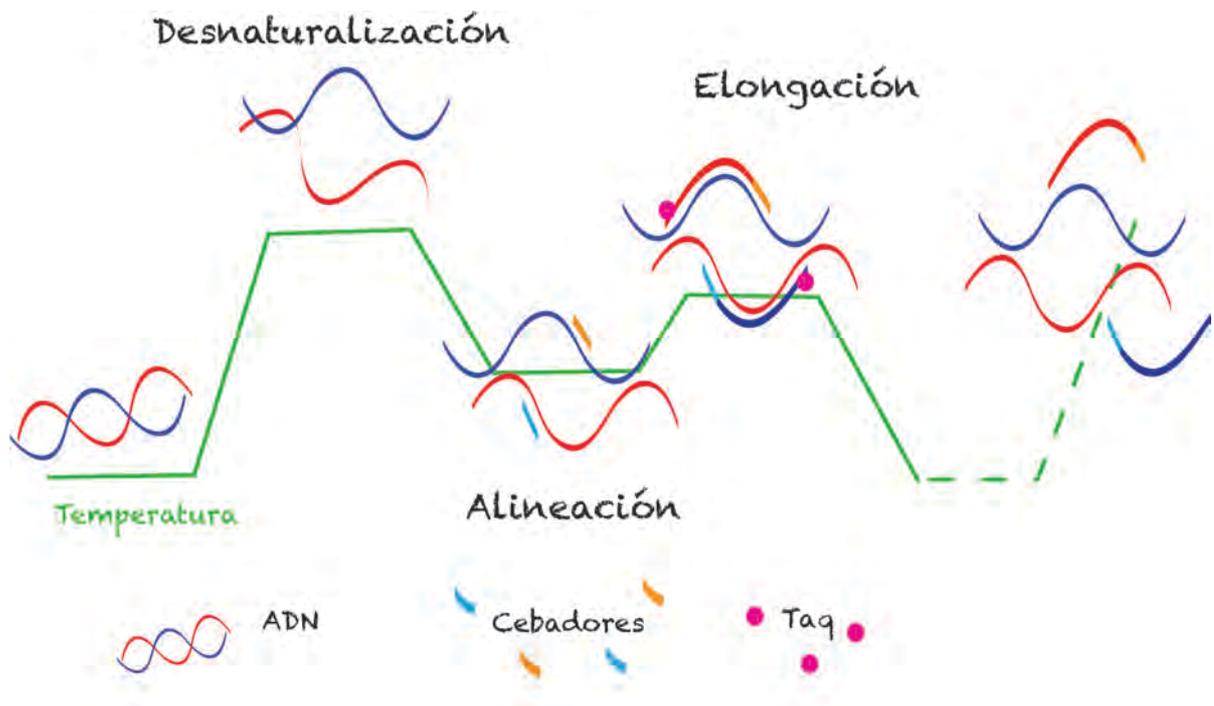


Figura 21. Etapas de un ciclo de PCR.

VI.2 Protocolo usado

Se usó el kit de PCR *Taq* Polymerase de los laboratorios BioLabs®.

Después de varias pruebas modificando los volúmenes de reactivos, tiempos y temperaturas de corridas se desarrolló el siguiente método:

Tabla 3. Reactivos y volúmenes empleados en PCR

Reactivos	Volumen en μ l
dNTPs	1
Cebador F	1
Cebador R	1
Buffer 10X	3
cADN	2
<i>Taq</i> Polimerasa	0,5
Agua	11,5
Total	20

Se realizó un ensayo para probar la concentración más eficiente de $MgCl_2$ y se observó que las mejores respuestas se obtuvieron entre una concentración de 1,5mM (misma que el Buffer 10X) y una concentración de 2,5mM. En el caso de aumentar la concentración de $MgCl_2$, se ajusta el volumen de agua para alcanzar un volumen total de 20 μ l.

El programa de ciclos de PCR se estableció de la siguiente manera:

Tabla 4. Programa de ciclos de PCR

Ciclo	Temperatura	Tiempo
Desnaturalización inicial	95°C	5 min.
Desnaturalización	95°C	30 seg.
Alineación	60°C o algunos grados por debajo de la T_f	30 seg.
Elongación	72°C	30 seg.
Elongación final	72°C	5 min
Número de ciclos: 35		

VI.3 Geles de electroforesis

Los productos de PCR obtenidos después de la amplificación se visualizaron gracias a la técnica de electroforesis en gel de agarosa.

Una corriente eléctrica se aplica a través de la agarosa, los productos amplificados son acareados de manera proporcional a su peso o número de bases, los productos más ligeros o más cortos viajan entonces más rápido que los largos.

Una tinción del gel con bromuro de etidio, BrEt, permitió visualizar en un transluminador de luz UV los productos que recorrieron el gel en forma de bandas. Un marcador de tamaño o ladder permite estimar el peso o números de bases de los productos de PCR.

Se usaron geles al 0,8% de agarosa en una cámara de electroforesis horizontal (Fisher FB SB 1316) con buffer TAE 1X. Una corriente de 120V se aplicó durante media hora o hasta que los productos hayan recorrido la mitad de la superficie.

Se cargaron los 20 μ l de producto de PCR con 4 μ l de colorante 6X de azul de bromofenol y naranja de xileno.

El gel fue retratado con una cámara numérica (Canon PowerShot A630) equipada de un filtro UV y se trabajó la imagen con un programa de tratamiento de imágenes, en este caso Adobe Photoshop CS4, para invertir colores y ajustar el contraste y brillo de la imagen.

VI.4 Purificación del producto de PCR

Si el producto amplificado resulta satisfactorio, se procede a su purificación, lo cual consiste en remover los reactivos en exceso presentes como restos de dNTPs y cebadores que podrían interferir con la secuenciación.

Se recorta la banda del gel con sumo cuidado con un escalpel estéril.

En un tubo tipo Eppendorf de 1,5 ml se dispone otro tubo de 0,5 ml al cual se le habrá hecho una perforación en su base con una aguja de jeringa e insertado un tapón de fibra de vidrio estéril. Se coloca la banda en el tubo de 0,5 ml y se centrifuga a 16 000 g por 2 min:



Se remueve el tubo de 0,5 ml y se añade un volumen de 1:1 de Polietilen Glicol PEG al 20%.

Se incuba a 37°C durante 15 min y se vuelve a centrifugar a 16 000 g por 15 min.

Se remueve el sobrenadante y se resuspende el pellet en 125 μ l de etanol al 80%.

Se centrifuga a 16 000g durante 2 min y con sumo cuidado se remueve el sobrenadante.

Se seca el tubo y se añade 10 μ l de agua tipo MilliQ estéril y se cuantifica en el Nanodrop® ND 1000 usando el programa de ácidos nucleicos (Gallagher y Desjardins, 2006).

VII. Secuenciación del producto de PCR

Un mínimo de 10 ng de ADN purificado es requerido por el Genomic Center UCR para una secuenciación satisfactoria en un volumen total recomendado de 12 μ l.

Los tubos se prepararon de la siguiente manera:

ADN	cebador	H ₂ O
x μ l para incluir más de 10 ng	1 μ l	x μ l para aforar a 12 μ l

Cabe resaltar que en cada tubo se incorpora un solo cebador que sea el F o el R; así por cada banda originalmente purificada se cuenta con dos tubos.

La secuenciación se realizó en el Genomic Center de la Universidad de California, Campus de Riverside (<http://www.genomics.ucr.edu>) gracias a la cooperación de los doctores Daniel Schlenk y Ramón Lavado, en un secuenciador Applied Biosystems 3730xl.

Los archivos recibidos correspondientes a las secuencias de los productos purificados se visualizaron gracias al programa ChromasPro (<http://www.flu.org.cn/en/download-49.html>) de Applied Biosystems.

Se realizó un análisis BLAST de las secuencias en el sitio del NCBI para compararlas con las secuencias disponibles en la base de datos y validarlas.

VIII. PCR en tiempo real

VIII.1 Principios del PCR en tiempo real

Como se señaló anteriormente, la técnica de RT-PCR abrió amplias oportunidades en el área de la biología molecular, sobre todo en el trabajo con los ácidos nucleicos, la manipulación del ADN para clonación, la ingeniería genética y las secuenciaciones genéticas entre otros (Pfaffl, 2006). No obstante, las limitaciones de este método radican principalmente en las dificultades de cuantificación ya que se genera una cantidad de producto independiente del ADN presente inicialmente (Kubista *et al.*, 2006). Por otra parte, la sensibilidad de los tratamientos post amplificación de estimación de los niveles de ADN son poco sensibles, sin tomar en cuenta los riesgos de contaminaciones debido a la manipulación de los productos. Estas limitaciones fueron resueltas satisfactoriamente, y desde su primera descripción por Higuchi *et al.* en 1993, la técnica de PCR en tiempo real se ha convertido en el método de predilección para cuantificar estas trazas de genes expresados en cualquier tipo de matriz biológica. Se basa en la detección y cuantificación de la fluorescencia emitida por un fluoróforo añadido a la reacción, de manera directamente proporcional a la formación de producto de PCR a cada ciclo. Asumiendo una amplificación eficiente, a cada ciclo se aumenta de 2ⁿ el número de moléculas anterior, así es posible deducir la cantidad de ADN inicialmente presente (Kubista *et al.*, 2006). Además de su alta sensibilidad, su especificidad y su buena repetibilidad (Bustin, 2005), este método tiene la gran ventaja de no requerir manipulación después de la amplificación que pudiera ser fuente de contaminación. Su mayor desventaja son los costos relativamente altos de los equipos y reactivos. Aplicaciones típicas del PCR en tiempo real incluyen la detección de patógenos, el

estudio de la expresión genética, el estudio de aberraciones cromosómicas, el estudio de “micro hileras” y la detección de proteínas (Ginzinger, 2002, Kubista *et al.*, 2006).

Para evitar confusiones con el RT-PCR, en el presente estudio se considerará a Q-PCR para referir al PCR en tiempo real por su capacidad de cuantificación (Quantification en inglés) a partir de muestras de cADN, también referida en otros lados como qRT-PCR (Pfaffl, 2006).

Varios tipos de fluoróforos son disponibles para la detección de la amplificación del producto estudiado: fluoróforos no específicos (SYBR®Green), cebadores combinados con fluoróforos (LUX™) o sondas específicas de la secuencia (TaqMan, Scorpions™). Todas estas opciones tienen niveles de sensibilidad altos pero sus principios de detección y optimización, así como sus costos, varían.

En el presente estudio se describe la técnica de Q-PCR usando el fluoróforo no específico SYBR®Green. Las revisiones de Bustin (2005) y Wong y Medrano (2005) exponen ampliamente las otras técnicas de detección.

SYBR®Green es un fluoróforo que se asocia únicamente con ADN de doble hebra por lo que la fluorescencia emitida es directamente proporcional a la cantidad de ADN de doble hebra amplificado: el producto de PCR estudiado (Ponchel, 2006). SYBR®Green se excita a los 497 nm y emite a los 520 nm de longitud de onda. Las mayores ventajas de su uso radican en la sencillez del diseño y operación del análisis, su flexibilidad de uso, ya que se puede usar en diferentes pruebas y sus relativamente bajos costos de operaciones. Por otro lado, su mayor desventaja se debe a su no especificidad, un solo gen por reacción se puede estudiar y existe una posibilidad de falso positivo, pruebas de curva de fusión o geles de electroforesis se tienen que correr para ayudar a detectar la formación de productos no deseados.

En los primeros ciclos, la señal de fluorescencia es débil y no se distingue del ruido de fondo ya que todavía no se forma una cantidad suficiente de producto de doble hebra (figura 22). Con la acumulación del producto la señal empieza a aumentar exponencialmente y finalmente se satura y llega a una etapa de saturación cuando uno o varios de los componentes de la reacción empiezan a faltar. En una corrida típica, este nivel de saturación es el mismo para todas las muestras, así que esta medición no aporta información sobre la cantidad original. No obstante, las curvas se distinguen en su fase de respuesta exponencial la cual refleja directamente la cantidad inicial de la molécula a amplificar.

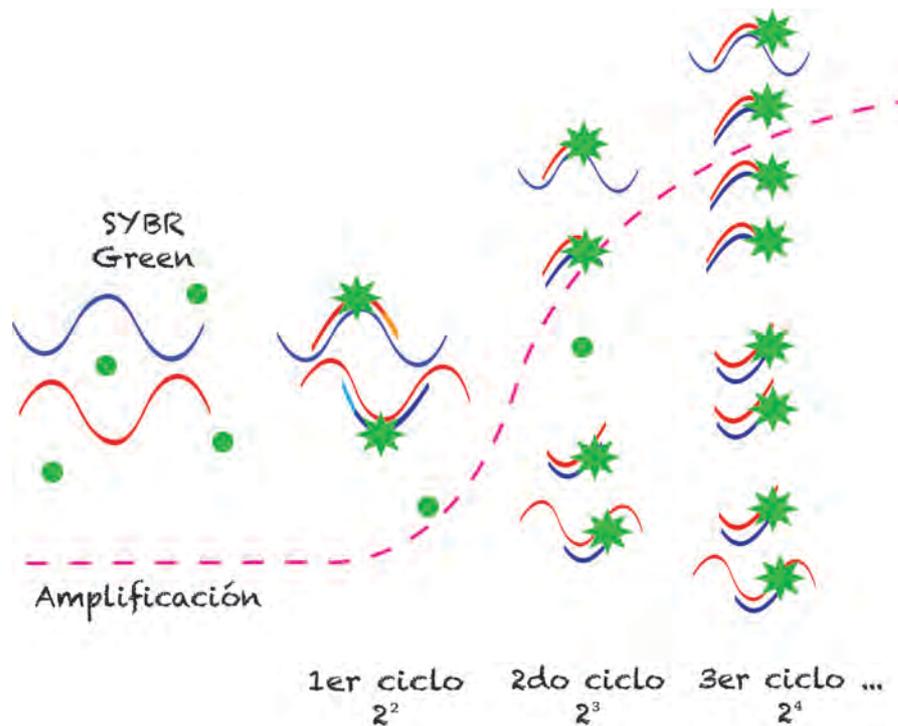


Figura 22. Funcionamiento del fluoróforo SYBR Green en ciclos de PCR de tiempo real. Una vez asociado con ADN de doble hebra, el SYBR Green emite a 520nm. Los productos generados por cada ciclo de PCR producen una respuesta exponencial.

Para los análisis de los resultados de Q-PCR se toma en cuenta el número de ciclos de amplificación necesarios para que la respuesta sobrepase un umbral de fluorescencia o “threshold” particular (figura 23), este número se identifica como el C_t (Bustin, 2005) o CP (Wong y Medrano, 2005). En este trabajo se usará la denominación C_t de acuerdo a la literatura de Applied Biosystems, fabricante del equipo usado en el presente estudio.

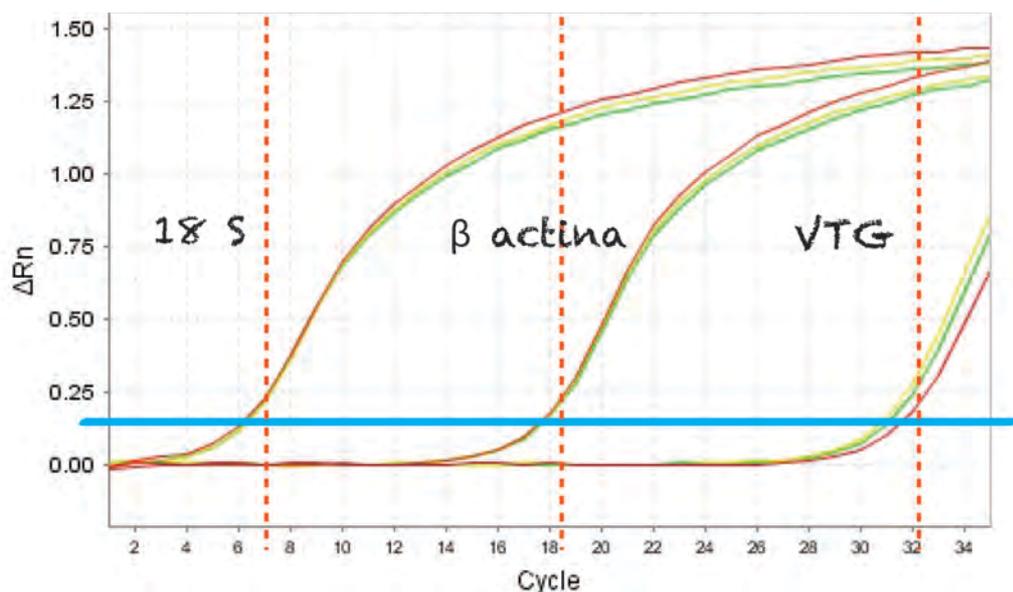


Figura 23. Curvas de amplificación obtenidas para los tres genes de interés en Q-PCR. La línea azul representa un umbral hipotético de fluorescencia. Las líneas punteadas naranja el número de ciclos necesario para que la amplificación sobrepase este umbral o C_t . Captura de pantalla.

VIII.2 Tipos de cuantificaciones

Existen varias maneras de cuantificar el producto de PCR que básicamente se dividen en dos tendencias: la cuantificación absoluta y la cuantificación relativa.

VIII.2.a Cuantificación absoluta

El principio de la cuantificación absoluta radica en el uso de una curva de calibración elaborada a partir de una serie de dilución de un producto estándar de concentración conocida. Este estándar puede ser un producto de PCR, ADN o ARN recombinante, secuencia clonada en plásmidos o muestras de tejido enriquecidas (Pffafli, 2006; Wong y Medrano, 2005). Una regresión lineal entre los C_t y las concentraciones de la curva de dilución estándar permite extrapolar y determinar la concentración de la muestra en función de su valor de C_t . El método asume que los estándares y las muestras tienen las mismas eficiencias de amplificación. Aunque las curvas de calibración sean altamente reproducibles, la determinación de la concentración de la muestras depende enteramente de la precisión del estándar. La cuantificación “absoluta” es relativa al uso de curvas de calibración y tiene que ser correlacionada con parámetros biológicos, como el peso del tejido, el número de copias de un gen de referencia etc (Pffafli, 2006).

VIII.2.b Cuantificación relativa

En la cuantificación relativa o comparativa, se miden los cambios de expresión de un gen en base a una referencia. No se necesitan curva de calibración ni estándares, donde la referencia puede ser cualquier gen de secuencia conocida. Comúnmente, se escogen genes constantemente expresados como referencia o “housekeeping”, como ARN mensajero de β -actina o GAPDH o ARN ribosomal de 18S o 28S (Wong y Medrano, 2005). Se recomienda usar más de un gen de referencia para una mejor normalización.

Los niveles de expresión se determinan midiendo las diferencias en los C_t , o ΔC_t , entre el gen estudiado y el gen de referencia.

$$\Delta C_t = C_t \text{ gen estudiado} - C_t \text{ referencia}$$

Otro nivel de complejidad se puede añadir, tomando en cuenta como parámetro de relatividad el ΔC_t de un grupo control, por lo general organismos sin tratamiento, organismos a tiempo=0 u organismos sanos. La expresión del gen en un tratamiento dado se expresa entonces en función de un gen de referencia pero también en función de muestras sin tratamiento o control, o $\Delta \Delta C_t$.

$$\Delta \Delta C_t = \Delta C_t \text{ tratamiento} - \Delta C_t \text{ control}$$

El valor del número de copias del gen siendo de poco interés, los resultados se representan de preferencia como un cambio relativo de expresión: la expresión relativa. El modelo matemático más usado para la representación de la expresión relativa fue descrito en 2001 por Pfaffli y se calcula de la siguiente manera:

$$\text{Expresión relativa} = 2^{-\Delta \Delta C_t}$$

En el presente estudio se usó la cuantificación relativa como método para determinar la expresión de VTG en función a β -actina y 18S en las muestras resultantes de las exposiciones a los compuestos bloqueadores solares.

VIII.3 Diseño de cebadores específicos para Q-PCR

A partir de las secuencias de los genes de interés obtenidas anteriormente se diseñan cebadores específicos usando las herramientas previamente descritas.

Los productos de Q-PCR suelen ser más cortos que un PCR normal para no saturar la señal, unas 100 bp.

Los cebadores fueron sintetizados por la compañía Sigma-Aldrich®.

Tabla 5. Lista de los cebadores específicos utilizados en el presente estudio con sus características y secuencias.

Nombre	Tº fusión	%GC	Secuencia
β actina F	64.3	52.63	ATTCCGCAGGGACTCCATA
β actina R	64	55	TCCCTGGAGAAGAGCTACGA
18 S F	63.8	50	CCGCAGCTAGGAATAATGGA
18 S R	63.3	50	TCACCTCTAGCGGCACAATA
VTG a F	64.2	55	GCTGCCAGATGGAGTCTAA
VTG a R	64.4	55	CTCGCTGCCAAACTCGTACT
VTG b F	64.2	55	GCCCAGATGGAGTCTAAGCA
VTG b R	64.6	55	ACTCGTACTGCAGGGTTCCA

Se probó la eficacia de los cebadores con cDNA de *Abudefduf saxatilis* expuesto cada dos días durante una semana a una concentración de E₂ de 5 μ g/g PH. Se usaron dos volúmenes diferentes de cADN (2 μ l y 4 μ l) para asegurar la respuesta y la visualización del producto. Se realizó un PCR y se corrió un gel de electroforesis de la manera antes descrita.

VIII.4 Protocolo Q-PCR

VIII.4.a Equipo y reactivos

Los análisis de Q-PCR se realizaron en un equipo Applied Biosystems Step One de 48 pozos en la Unidad de Bioquímica y Biología Molecular de Plantas del CICY AC.

Se usaron los reactivos provistos por el kit platinum SYBR® Green de Invitrogen™ y se siguieron las recomendaciones del proveedor:

Tabla 6. Reactivos y volúmenes empleados en los análisis de Q-PCR con el kit platinum SYBR® Green de Invitrogen™.

Reactivo	Volumen en µl
Mix platinum SYBR Green	10
Colorante ROX	0,4
Cebador F	0,5
Cebador R	0,5
cADN	2
H ₂ O	6,6

Para minimizar variaciones y evitar contaminaciones se realizó un “MasterMix” de los reactivos usados en todas las reacciones como el Mix platinum SYBR® Green, el ROX y el agua estéril por cada uno de los cebadores, añadiendo posteriormente individualmente las muestras de cADN de los tratamientos. Como controles negativos, se remplazaron los volúmenes de cADN por agua destilada estéril.

Las placas se cargaron de la siguiente manera:

Tabla 7. Ilustración de la distribución de las muestras en las placas de Q-PCR en el presente estudio.

VTG	18S	βactin	VTG	18S	βactin	VTG	18S
VTG	18S	βactin	VTG	18S	βactin	VTG	18S
VTG	18S	βactin	VTG	18S	βactin	VTG	18S
VTG	18S	βactin	VTG	18S	βactin	βactin	Negativo VTG
VTG	18S	βactin	VTG	18S	βactin	βactin	Negativo 18S
VTG	18S	βactin	VTG	18S	βactin	βactin	Negativo βactina

IX.4.b Curva de eficiencia

La eficiencia del método se verificó realizando una serie de dilución de cADN para cada una de las parejas de cebadores. Se calculó gracias a la tasa de amplificación, en base a su regresión lineal, la cual varía generalmente entre 1,6 hasta arriba de 2 (Pffafli, 2006).

$$\text{Ecuación de la eficiencia: } E = 10^{(-1/\text{pendiente})}$$

Se realizó una serie de dilución usando cADN del control positivo E₂ con un factor de 0,2X entre cada punto.

VIII.4.c Melting curve

Debido a la falta de especificidad del fluoróforo SYBR®Green es necesario confirmar la amplificación de un sólo producto y de que no haya ocurrido interferencia por dímeros o productos no específicos durante la reacción.

Para distinguir la formación de producto específico y no específico, un análisis “melting curve” es realizado; al final de la reacción de PCR el producto es disociado por aumento gradual de la temperatura. El producto de PCR se “funde” y libera el SYBR®Green, la intensidad de la fluorescencia disminuye entonces y se registra. Si un dímero se amplificó se nota un pico adicional al del producto de interés.

VIII.4.d Programa Q-PCR

Tabla 8. Programa de tiempos y temperaturas en Q-PCR utilizados en el presente estudio.

	Temperatura	Tiempo
Desnaturalización inicial	95°C	5min
Desnaturalización	95°C	30 seg
Alineación	60°C	30 seg
Elongación	72°C	30 seg
Melting curve	95°C	15seg
	60°C	1 min
	$\Delta+0,3^{\circ}\text{C}$ hasta 95°C	15 seg
Número de ciclos: 35		

Las figuras 24 y 25 ilustran la programación usando el programa del PCr en tiempo real StepOne™ 2.0.

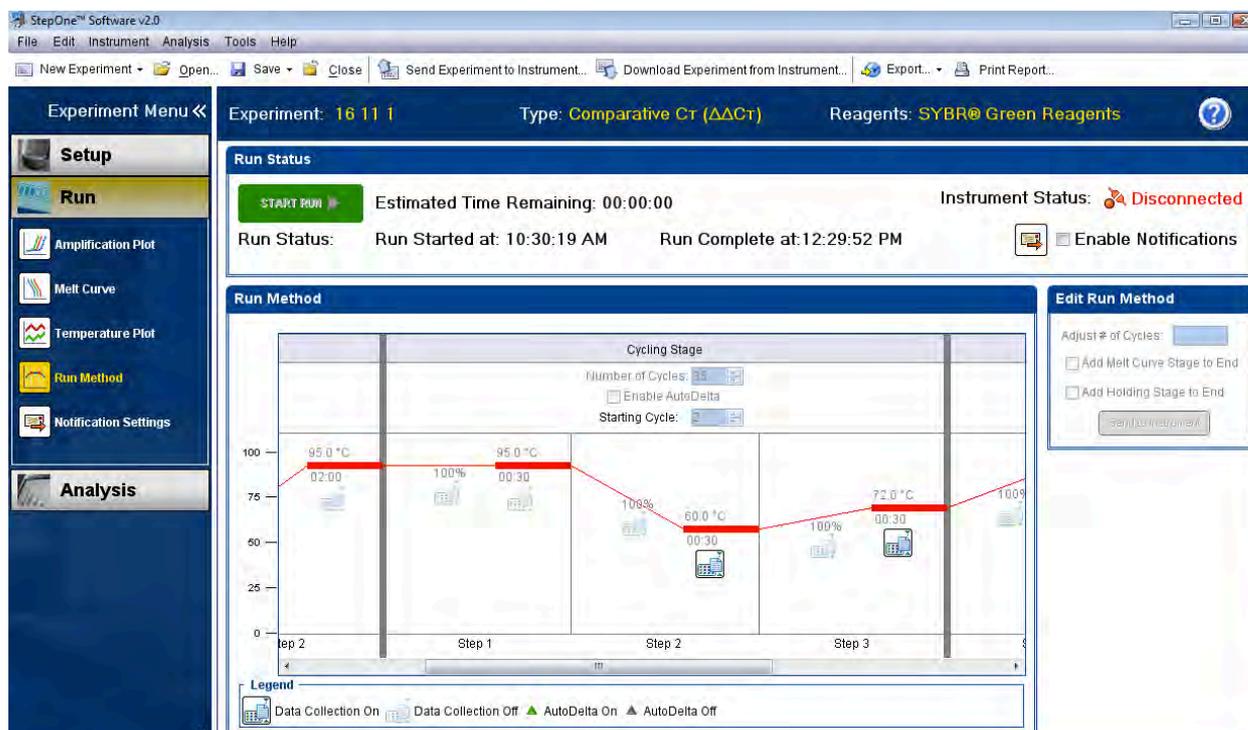


Figura 24. Programación del ciclo de PCR en StepOne™.

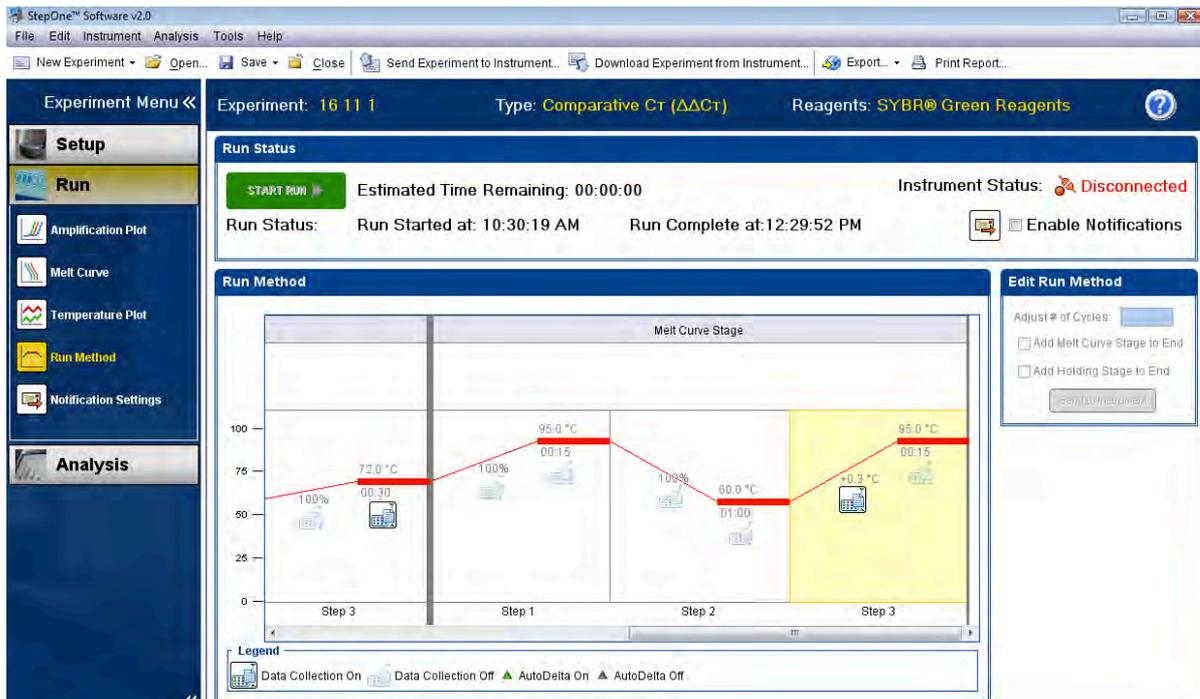


Figura 25. Programación del Melting Curve en StepOne™.

VIII.4.e Cuantificación relativa $2^{-\Delta\Delta C_t}$

La cuantificación se realizó de la manera antes descrita usando el método $\Delta\Delta C_t$. El programa del equipo Step One arroja los valores de C_t medidos para cada muestra y sus replicas. Los cálculos de ΔC_t y $\Delta\Delta C_t$ se realizaron en el programa de cálculos Excel tomando como:

$$\Delta C_t = C_t \text{ VTG} - C_t \text{ } \beta\text{actin o 18S}$$

$$\Delta\Delta C_t = \Delta C_t \text{ tratamiento} - \Delta C_t \text{ control negativo}$$

Se reportaron los resultados como expresión relativa ($2^{-\Delta\Delta C_t}$) por cada gen de referencia.

IX. Técnica del fósforo proteico lábil al álcali o ALP

IX.1 Principios del método

Existen métodos directos de medición de la vitelogenina basados en inmunoensayos tipo ELISA; desafortunadamente a la fecha, no existen anticuerpos específicos de vitelogenina para *Abudefduf saxatilis*. Obtener anticuerpos es un proceso complicado y costoso, lo cual impulsó a varios investigadores a diseñar protocolos para su medición de manera indirecta a través de la medición de sus fosfatos.

En efecto, la vitelogenina de los vertebrados es una macromolécula inusualmente rica en serina lo cual la convierte en la secuencia de aminoácidos más fosforilada de la naturaleza (Hallgren *et al.*, 2009).

La proteína es precipitada con una serie de extracciones por solventes, los fosfatos proteicos son entonces liberados tras una hidrólisis al álcali con NaOH. Los niveles de fosfatos son medidos por colorimetría gracias al complejo azul de fosfomolibdato formado por la reducción con ácido molibdato y ácido ascórbico (Gagné y Blaise, 2000).

Desde que M.G. Stanton describió en 1968 la primera técnica de medición colorimétrica de fosfatos en muestras orgánicas, el protocolo ha experimentado modificaciones a lo largo de los años. En los noventa, el equipo del canadiense F.Gagné impulsó el uso de esta metodología como herramienta de monitoreo. La adaptación propuesta por Hallgren y sus colaboradores en 2009 tiene la gran ventaja de usar reactivos menos dañinos, más disponibles y relativamente más económicos que los protocolos antes propuestos en la literatura.

El método de Hallgren toma en cuenta solamente muestras de plasma, por lo cual se necesitó adaptar el protocolo original para ajustarse a las condiciones del presente estudio y del laboratorio. La sangre es el vehículo por donde la vitelogenina viaja del hígado a las gónadas, por lo cual los estudios de ALP se suelen realizar en plasma.

En el presente estudio, el tamaño de los organismos limitó tomar volúmenes adecuados de sangre así que se decidió trabajar con muestras de hígado. Existen estudios donde se han realizado las mediciones ALP en hígado, gónadas y hasta en todo el contenido peritoneal (Cheek *et al.*, 2001; Shilling y Williams, 2000; Ortiz Zarragoitia y Cajaraville, 2005).

Al contrario del plasma, donde se cree que la vitelogenina es la única proteína fosforilada, otras moléculas fosforiladas se encuentran en el hígado, como los fosfolípidos por ejemplo, pero representan una pequeña fracción en comparación con la vitelogenina y la mayoría de ellas no son lábiles al álcali (Hallgren *et al.*, 2009).

Gagné propone un método para extraer la proteína de muestras de tejido como hígado o gónada así que se usó su protocolo para la primera parte de extracción seguido de las etapas de tratamiento descritas por Hallgren.

IX.2 Protocolo adaptado para medición ALP

IX.2.a Homogeneización del tejido (adaptado de Gagné y Blaise, 2000)

Es de primordial importancia que los pasos siguientes se realicen en hielo para prevenir la degradación de la proteína.

Se homogeneiza el tejido de hígado en tubos eppendorf fríos con una solución amortiguadora de pH 8 de Tris HCl con EDTA y ditiotreitól. Se agrega 1 ml de la solución amortiguadora Tris para cada 200 mg de tejido y 1 µg de aprotinina por cada ml.

El homogeneizado se centrifuga a 10 000 g por 20 min a 4°C y se dispone el sobrenadante en un nuevo tubo frío.

Una fracción de aproximadamente 5 µl del sobrenadante se guarda para medir su concentración total de proteína en el programa A280 del Nanodrop.

IX.2.b Extracción y tratamiento alcalino

Extracción de la proteína (adaptado de Hallgren *et al*, 2009)

Una vez obtenido el sobrenadante del homogeneizado, varios pasos de extracción y purificación se llevan a cabo.

Se añaden 54 µl de acetona fría por cada 100 µl de homogeneizado y se mezclan en vortex. Se centrifuga esta mezcla a 5 000g por 5 min.

Se descarta el sobrenadante y se resuspende el pellet en 300 µl de la solución amortiguadora mediante una agitación suave en el "Beadbeater". Se añaden 162 µl de acetona y se vuelve a centrifugar 5 000 g por 5 min.

De nuevo, se descarta el sobrenadante y se resuspende el pellet en 300 µl de la solución amortiguadora y se le añade 162 µl de etanol. La mezcla se centrifuga a 10 000g por 10 min y se descarta el sobrenadante.

Tratamiento alcalino

Para obtener la fracción proteica lábil al álcali se resuspende el pellet en 100 µl de NaOH a 1M y se mezclan con sumo cuidado con vortex.

Se procede a una incubación a 70°C por 90 min durante la cual se vuelve a mezclar con vortex a los 30 y 60 min.

Después de la incubación, y a temperatura ambiente, se añaden 40 µl de 100% TCA. Se centrifuga a 16 000 g por 15 min.

105 µl del sobrenadante son transferidos a un nuevo tubo y se diluyen con 435 µl de agua destilada.

Se añaden 435 µl de butanol grado molecular y se mezclan hasta obtener una sola fase homogénea.

Se vuelve a centrifugar a 16 000 g por 15 min. (13000 rpm)

2 volúmenes de 145 µl de la fase acuosa inferior son cuidadosamente removidos y dispuestos en 2 nuevos tubos. Uno de los tubos servirá para leer la absorbancia de fondo de la muestra, el otro el desarrollo del color.

IX.2.c Lectura y resultados

Curva de Calibración

A partir de una solución madre de 127 ppm de PO_4^{3-} en 1M de NaOH, se prepara una curva de calibración de la siguiente manera:

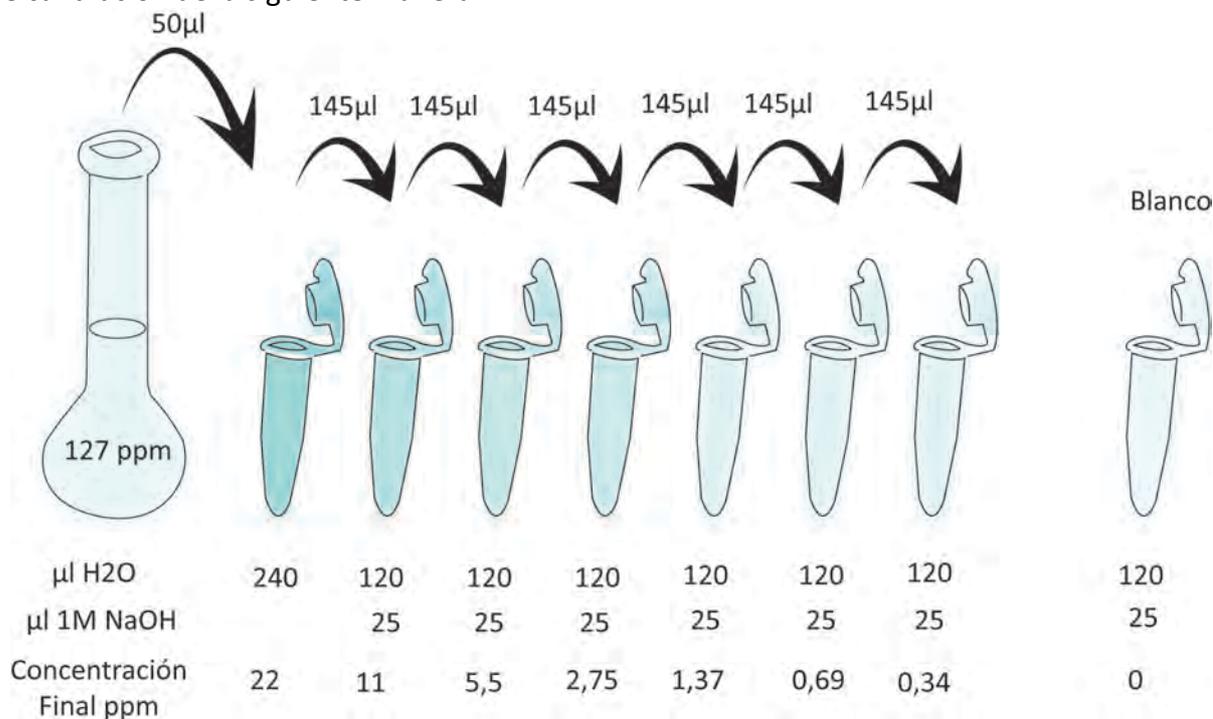


Figura 26. Curva de dilución de los estándares de PO_4^{3-} para ALP.

Desarrollo del color

La reacción colorimétrica se realiza añadiendo 50 μl de ácido molibdato al 1% en 2 M H_2SO_4 en todos los tubos.

Se añaden luego 50 μl de ácido ascórbico al 5%. Para leer la absorbancia de fondo, se añaden solamente 50 μl de agua destilada.

Los tubos se agitan vigorosamente durante 60 seg y se incuban 60 min a 40°C.

Las absorbancias se leen a 630 nm.

Resultados

La concentración de fosfatos de la muestra es calculada gracias a la curva de calibración.

$$(x = y - b / a)$$

Se le aplican los siguientes factores de dilución:

- 1) Fase inicial: Volumen de muestra inicial/Volumen de NaOH. Si se siguen los mismos volúmenes que descritos aquí : $100 \mu\text{l}/100 \mu\text{l} = 1$
- 2) Tratamiento alcalino: Volumen NaOH+TCA/Volumen extraído : $140 \mu\text{l}/105 \mu\text{l} = 1,3$
- 3) Desarrollo del color: Volumen total/Volumen muestra usado: $245 \mu\text{l}/145 \mu\text{l} = 1,7$

Si se usaron los volúmenes indicados en este protocolo se necesita entonces multiplicar el resultado obtenido gracias a la curva de calibración por 4 para tener la concentración en μg de PO_4^{3-} de ALP por ml de homogeneizado.

Para presentar los resultados en μg de ALP por mg de proteína total (μgmg^{-1}), se divide la concentración de PO_4^{3-} en μgml^{-1} por la concentración total de proteína medida a 280nm por Nanodrop en mgml^{-1} .

X. Bioensayo preliminar

Con el objetivo de garantizar un número de organismos representativo para asegurar pruebas estadísticas satisfactorias se realizó un bioensayo preliminar.

Se inyectaron diez peces por cada tratamiento, los cuales consistieron en una dosis baja ($10 \mu\text{g/g}$ PH) y una dosis alta de oxibenzona ($100 \mu\text{g/g}$ PH), un control negativo de solventes y un control positivo de E_2 ($5 \mu\text{g/g}$ PH) (Leaños Castañeda *et al.*, 2002). Tratándose de organismos juveniles quienes por ende deberían de carecer de expresión de VTG, se acordó limitarse al uso de un control negativo de solventes y no usar grupo control sin exposición. Se trataron cada dos días durante una semana para un total de tres inyecciones.

Se incorporó un tratamiento de dosis mediana de oxibenzona ($30 \mu\text{g/g}$ PH) contemplando una sola inyección para comprobar si una sola inyección bastaría en disparar la respuesta de VTG y así disminuir a lo máximo el estrés sufrido por los organismos al momento de las manipulaciones.

Se sacrificaron los organismos por rápida hipotermia y se les removió inmediatamente el hígado. Los análisis de ALP se realizaron en las instalaciones de la UCIA-CICY Quintana Roo y los análisis de Q-PCR en la Unidad de Bioquímica y Biología Molecular de Plantas del CICY, AC.

X.1 Cálculo del número de organismos (n) para el bioensayo final

Gracias a las desviaciones estándares obtenidas en los análisis del bioensayo preliminar y el programa StatMate del paquete Prism GraphPad, se calculó el número de muestras necesario para obtener resultados estadísticamente satisfactorios. Como las desviaciones estándares no eran iguales en todos los tratamientos se escogió trabajar con un promedio de ellas lo que da una desviación aproximada de 0,5.

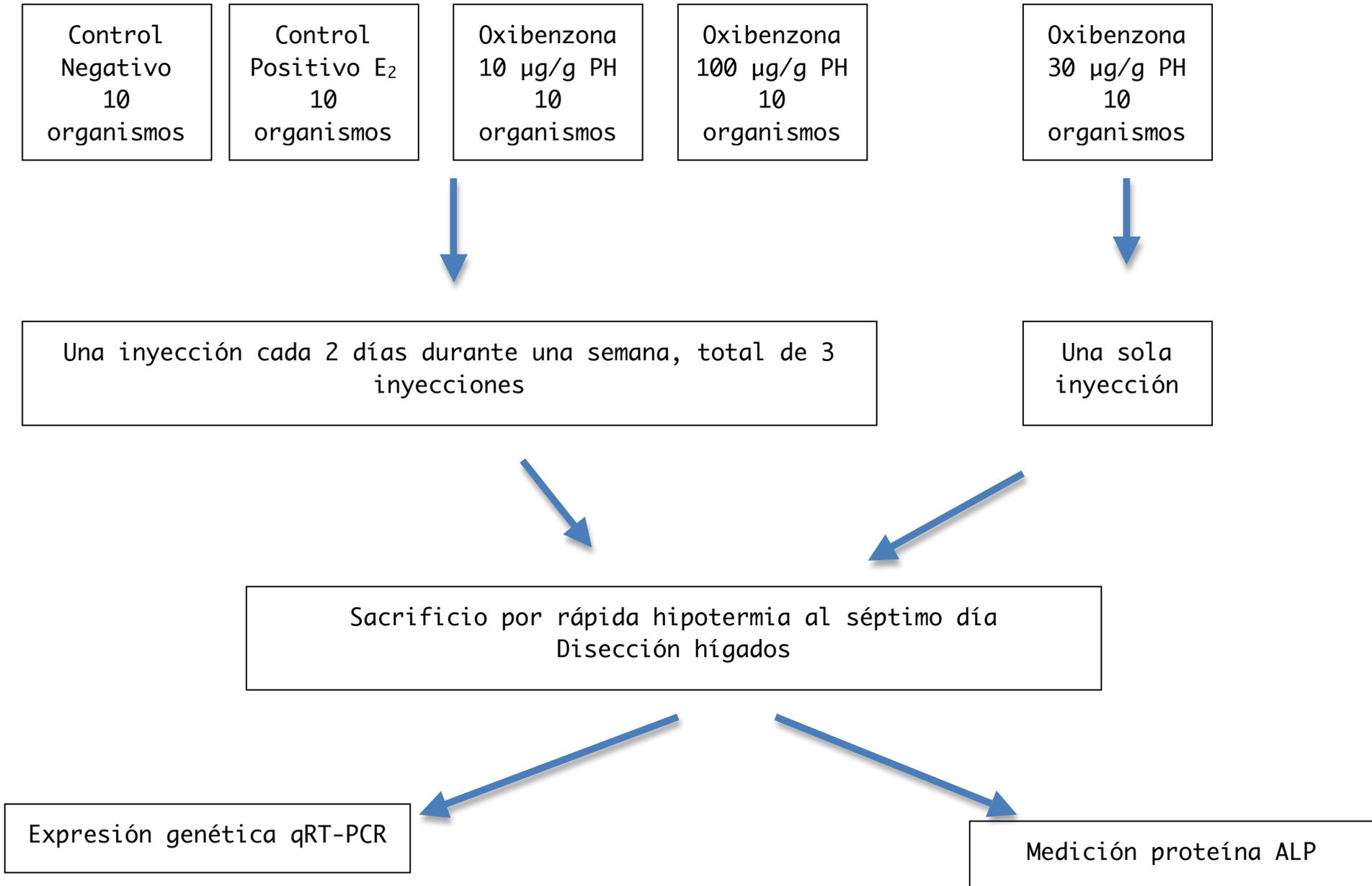
Se determinó que una n de 5 daría diferencias de 1,54 a 99% de poder o 1,30 a 95%, lo cual se juzgó aceptable.

X.2 Cambios operados para el bioensayo final

En vista de los resultados obtenidos en el estudio preliminar se efectuaron algunos cambios para el bioensayo final:

- Se bajó la dosis máxima de exposición debido a la mortalidad reportada, se escogieron dosis de 5, 25 y 50 $\mu\text{g/g}$ PH.
- Se inyectaron siete peces para asegurar una n final de por lo menos cinco organismos.
- Se inyectaron una sola vez para reducir el estrés ocasionado por la manipulación así como los riesgos de infección y mortalidad, y se dejaron en exposición 96h, el tiempo reportado por Shilling y Williams (2000) para una mayor expresión y síntesis de la VTG.
- Se añadió un tratamiento compuesto por una mezcla (Mix) de los tres compuestos en proporciones similares a las usadas en las cremas comerciales: Oxibenzona 5%, Octisalato 6% y Octinoxato 7,5%, calculadas en relación a una dosis final de 5 $\mu\text{g/g}$ PH de Oxibenzona.
- Para los análisis de expresión genética se usó como gen de referencia a β -actina. Los resultados obtenidos con 18S fueron muy similares, pero sus C_t eran inferiores a los 10 ciclos. Debido a la gran cantidad de 18S, su amplificación se dió a un C_t muy por debajo de los otros genes que anduvieron alrededor de los 30 ciclos. La expresión de β -actina no varió con los tratamientos y tuvo menor desviación estándar que 18S; asimismo, β -actina apareció como la mejor opción de referencia en este estudio.

Figura 27. Diagrama explicativo del bioensayo preliminar. Página opuesta.



XI. Bioensayo final

Se inyectaron siete peces por cada tratamiento para asegurar una n de cinco al final del experimento.

- E₂: Control positivo de 17β-etilenestradiol a una dosis de 5 µg/g PH de pez
- Neg: Control negativo de solventes, 25% etanol grado biología molecular 75% aceite de maíz
- OS: Octisalato con dosis de 5 µg/g PH, 25 µg/g PH, 50 µg/g PH
- Oxi: Oxibenzona con dosis de 5 µg/g PH, 25 µg/g PH, 50 µg/g PH
- ONX: Octinoxato con dosis de 5 µg/g PH, 25 µg/g PH, 50 µg/g PH
- Mix: Mezcla de Oxibenzona 5%, Octisalato 6% y Octinoxato 7,5%, para una dosis de Oxibenzona de 5 µg/g PH

96 h después de la inyección (Shilling y Williams, 2000), se sacrificaron los organismos por rápida hipotermia y se les removió el hígado.

Las muestras para ALP fueron tratadas en el laboratorio de la UCIA-CICY Quintana Roo y precipitadas a fosfatos. Para las muestras de expresión genética, el ARN fue extraído y retrotranscrito a cADN. Las muestras tanto para ALP como para Q-PCR fueron transportadas a Mérida en un contenedor BioFreeze asegurando una temperatura de congelación hasta llegar a las instalaciones del CICY AC. donde se guardaron a 4°C las muestras de ALP y -20°C las de cADN. Se realizaron los análisis ALP usando en el lector multiplacas de la Unidad de Química de la UNAM en Sisal y los análisis Q-PCR en la Unidad de Bioquímica y Biología Molecular de Plantas del CICY, AC.

XII. Herramientas estadísticas

Los análisis estadísticos de los resultados y sus gráficas se realizaron gracias al programa Graph Pad Prism (Graph Pad Software Inc., San Diego, USA).

Los resultados fueron sometidos a un análisis de varianza ANOVA de una vía no paramétrico de Kruskal Wallis seguido de un análisis *post hoc* de Dunns.

Figura 28. Diagrama explicativo del Bioensayo final. Página opuesta.

		Control Positivo E ₂ 5 organismos	Octisalato 5 µg/g PH 5 organismos	Octisalato 25 µg/g PH 5 organismos	Octisalato 50 µg/g PH 5 organismos		
Control Negativo 5 organismos	Oxibenzona 5 µg/g PH 5 organismos	Oxibenzona 25 µg/g PH 5 organismos	Oxibenzona 50 µg/g PH 5 organismos	Octinoxato 5 µg/g PH 5 organismos	Octinoxato 25 µg/g PH 5 organismos	Octinoxato 50 µg/g PH 5 organismos	Mezcla 5 µg/gPH oxi 5 organismos



Inyección única



Sacrificio por rápida hipotermia 96h después de la inyección



Expresión genética por Q-PCR



Medición proteína por ALP

D. Resultados

I. Secuenciación de los genes

I.1 VTG

I.1.a Secuencia

El diseño de varios cebadores, pruebas de diferentes tiempos, temperaturas, cambios en las concentraciones de $MgCl_2$ y asociaciones de cebadores fueron necesarios para finalmente poder obtener productos de PCR satisfactorios para VTG. En la figura 29, se puede observar un ejemplo de un gel de agarosa obtenido con productos de PCR para VTG y 18S, en el extremo derecho se corrió una muestra de ARN para comprobar la integridad del mismo.

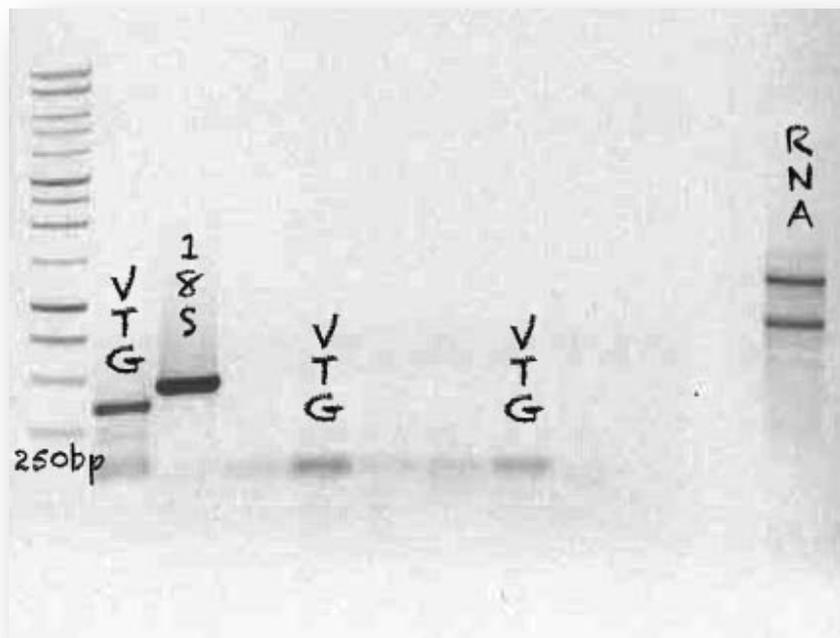


Figura 29. Foto en colores invertidos y escala de blanco y negro de un gel de agarosa de productos de PCR para VTG (220610). A la derecha se puede observar dos bandas definidas asegurando la integridad del ARN usado en la retrotranscripción del análisis PCR.

Se secuenciaron los productos de PCR purificados de interés en el Genomic Center de la Universidad de Riverside, California. Los archivos que entregó el Genomic Center consistieron en una secuencia de bases con un cromatograma correspondiente a la importancia de la señal para cada base. Cada color representa una de las cuatro bases A, T, G, C, cuando la señal no es definida se representa por una "N".

De los 16 productos de PCR obtenidos y mandados a secuenciar, el producto "sarg 6" (figura 28) resultó el más apropiado. El cromatógrama de su secuencia enseñó picos intercalados con pocos solapamientos de colores y ausencia de "N" :

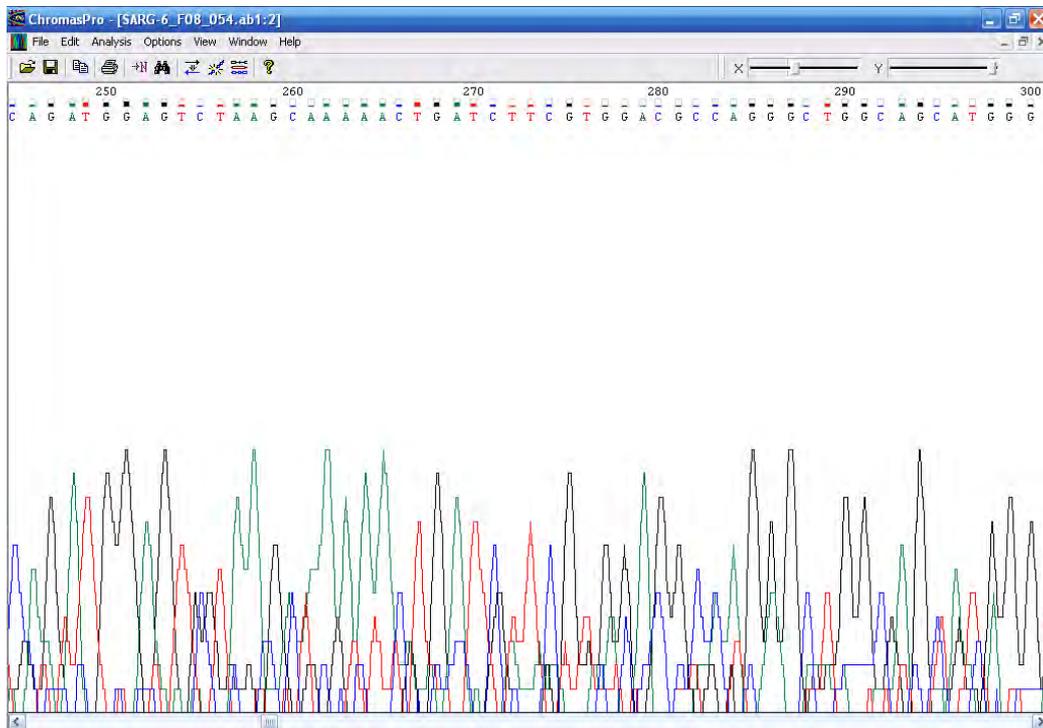


Figura 30. Cromatograma de la secuencia de VTG, cada color de pico representa la señal de una base. Captura de pantalla de ChromasPro.

Se usó la herramienta Basic Local Alignment Search Tool (BLAST). BLAST es un programa informático que alinea la secuencia sometida contra la base de secuencias registradas por el National Center for Biotechnology Information (NCBI) y calcula sus similitudes. Se obtuvieron buenas calificaciones de alineación, entre 70 y 80% de similitudes y valores de E de e^{-10} hasta e^{-20} , con secuencias de VTG en otras especies de peces marinos (figuras 31 y 32). Estos resultados permitieron confirmar de que se trate del gen de interés: VTG. Las especies alcanzando mejores puntuaciones de similitudes, son especies marinas y el análisis pareció indicar que el gen aislado fue de VTG B o Ab.

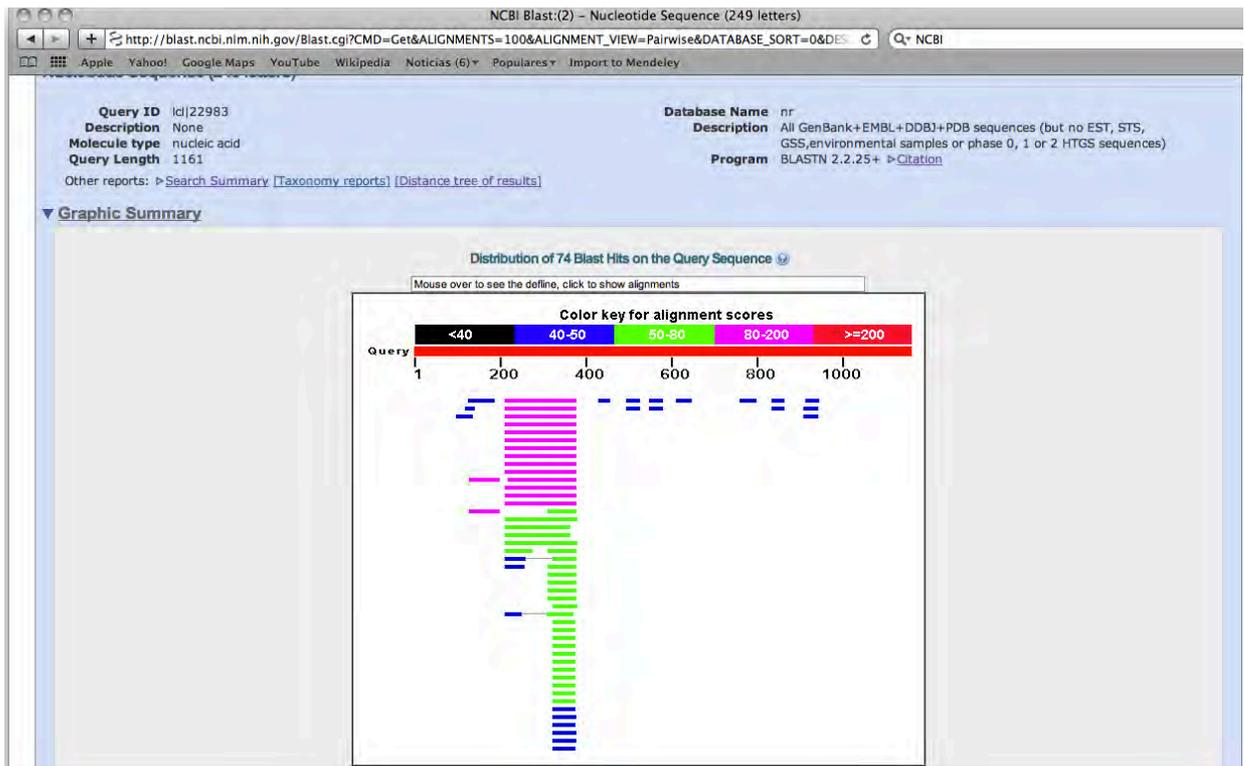


Figura 31. Captura de pantalla del resultado del análisis BLAST en NCBI para VTG, calificación de alineación en escala de colores.

Accession	Description	Max score	Total score	Query coverage	E value	Max ident	Links
AB181839.1	Pagrus major VgB mRNA for vitellogenin, complete cds	123	123	14%	2e-24	76%	
AB288933.1	Mugil cephalus VgB mRNA for vitellogenin B, complete cds	118	118	14%	9e-23	76%	
DQ020121.1	Morone americana vitellogenin B mRNA, complete cds	118	118	14%	9e-23	76%	
GU217572.1	Thunnus thynnus vitellogenin B mRNA, complete cds	116	116	14%	3e-22	76%	
HQ846510.1	Morone saxatilis vitellogenin Ab mRNA, complete cds	114	114	14%	1e-21	76%	
AJ416327.1	Platyichthys flesus partial mRNA for vitellogenin	109	109	14%	4e-20	75%	
EF582607.1	Hippoglossus hippoglossus vitellogenin (vtgAb) mRNA, complete cds	104	104	14%	2e-18	74%	
AB181834.1	Verasper moseri VgB mRNA for vitellogenin, complete cds	104	104	14%	2e-18	74%	
AJ416328.1	Pleuronectes platessa partial mRNA for vitellogenin	104	104	14%	2e-18	74%	
DQ849747.1	Lithognathus mormyrus clone lithmor117 mRNA sequence	100	100	14%	2e-17	75%	
AJ416326.1	Zoarces viviparus partial mRNA for vitellogenin	93.3	93.3	13%	3e-15	73%	
AY909437.1	Siniperca chuatsi clone C109 nephrosin mRNA, partial cds	89.7	89.7	6%	4e-14	86%	
F456935.1	Labrus mixtus vitellogenin Ab2 mRNA, partial cds	86.0	86.0	14%	5e-13	72%	
F456932.1	Centrolabrus exoletus vitellogenin Ab2 mRNA, partial cds	86.0	86.0	14%	5e-13	72%	
NM_001104840.1	Oryzias latipes vitellogenin II (vit-6), mRNA > dbj AB074891.1	86.0	86.0	14%	5e-13	72%	UG
AY909438.1	Siniperca chuatsi clone C109_2 nephrosin mRNA, partial cds	84.2	84.2	6%	2e-12	85%	
FJ456931.1	Centrolabrus exoletus vitellogenin Ab1 mRNA, partial cds	71.6	71.6	14%	1e-08	70%	
FJ756399.1	Oreochromis mossambicus clone OMV6/9 2.1 vitellogenin mRNA	69.8	69.8	13%	4e-08	70%	
AF017250.1	Oreochromis aureus vitellogenin precursor (Vtg1) mRNA, complete cds	69.8	69.8	13%	4e-08	70%	
AB181836.1	Gambusia affinis VgB mRNA for vitellogenin, complete cds	68.0	68.0	14%	1e-07	69%	
EU399547.1	Gasterosteus aculeatus vitellogenin mRNA, partial cds	64.4	64.4	5%	2e-06	81%	
AF284034.1	Melanogrammus aeglefinus vitellogenin B (VtgB) mRNA, complete cds	59.0	101	8%	7e-05	83%	
AJ011691.1	Oncorhynchus mykiss Vtg gene, exons 1 to 7, partial	57.2	57.2	5%	2e-04	78%	
AJ011690.1	Oncorhynchus mykiss Vtg gene, exons 1 to 7, partial	57.2	57.2	5%	2e-04	78%	
AJ011689.1	Oncorhynchus mykiss Vtg gene, exons 1 to 7, partial	57.2	57.2	5%	2e-04	78%	
X92804.1	O.mykiss vtg1 gene	57.2	57.2	5%	2e-04	78%	E
AJ011694.1	Oncorhynchus mykiss Vtg gene, exons 1 to 7, partial	57.2	57.2	5%	2e-04	78%	
AJ011692.1	Oncorhynchus mykiss Vtg gene, exons 1 to 7, partial	57.2	57.2	5%	2e-04	78%	
AJ011693.1	Oncorhynchus mykiss Vtg gene, exons 1 to 7, partial	57.2	57.2	5%	2e-04	78%	
F456930.1	Centrolabrus exoletus vitellogenin Aa mRNA, partial cds	53.6	53.6	5%	0.003	79%	
AY376668.1	Oryzias latipes vitellogenin precursor, gene, partial cds	53.6	96.3	8%	0.003	84%	
NM_001045294.2	Danio rerio zgc:136383 (zgc:136383), mRNA	51.8	51.8	4%	0.010	81%	UG M

Figura 32. Captura de pantalla de las secuencias de VTG de otras especies de peces con alto consenso de alineación obtenidas por el análisis BLAST.

Una vez eliminadas las zonas con "ruido de fondo" y de poca señal de la secuencia recibida, se usó para el diseño de cebadores de cuantificación de VTG para *Abudefduf saxatilis* la secuencia parcial de 249 bp siguiente:

```
>GTGCTACTCCTACATTGGCCGTATTGATTATGGGCAGGATCTGTCTCTGCAGGGTTCAGACTT
TTCGTCTTCATCCCCATTCAACATCATGGGAGGCGCTGCCAGATGGAGTCTAAGCAAAAAC
GATCTTCGTGGACGCCAGGGCTGGCAGCATGGGGCCCCACCGAACTGACTATTCTGAGCGTG
GAACCCTGCAGTACGAGTTTGGCAGCGAGCTTCTCCAGATGCCCGTTCAGCCTTTTCGTCT
```

1.1.b Cebadores de cuantificación

Usando la secuencia parcial obtenida para VTG y de la misma manera anteriormente descrita para el diseño de cebadores, se obtuvieron cebadores para la cuantificación. Estos cebadores de cuantificación generan un producto de alrededor de 100bp, lo recomendado en el uso para PCR en tiempo real. Se diseñaron dos juegos de cebadores, a la luz de la prueba realizada (ver adelante) se decidió trabajar con el juego VTG *b*.

Tabla 9. Cebadores de cuantificación de VTG, características y secuencias.

Nombre	Tf	%GC	Secuencia
VTG <i>b</i> F	64,2	55	GCCCAGATGGAGTCTAAGCA
VTG <i>b</i> R	64,6	55	ACTCGTACTGCAGGGTTCCA

1.2 β -actina

1.2.a Secuencia

La primera secuencia parcial que se obtuvo en el desarrollo de esta tesis fue la de β actina. Se logró obtener bandas de producto de PCR para β actina en los geles de agarosa (figura 33), lo cual permitió secuenciar parcialmente este gen de referencia para *Abudefduf saxatilis*.

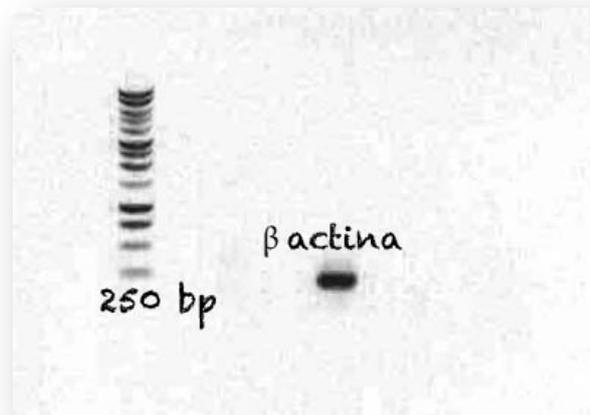


Figura 33. Foto de un gel de agarosa en colores invertidos y escala de blanco y negro de un producto de PCR para β actina obtenido con cADN de *A.saxatilis*.

El producto de PCR "Mex 13" purificado mandado a secuenciar en el Genomic Center dio resultados muy satisfactorios, su cromatógrama se observa muy limpio, con ausencia de "N". El análisis tipo BLAST contra la base NCBI resultó en alineaciones muy significativas (93% de similitud y valores de E de e^{-64}) con genes de β -actina de otras especies de peces marinos lo cual permite confirmar el aislamiento del gen de β -actina de *Abudefduf saxatilis* (figuras 34, 35 y 36).

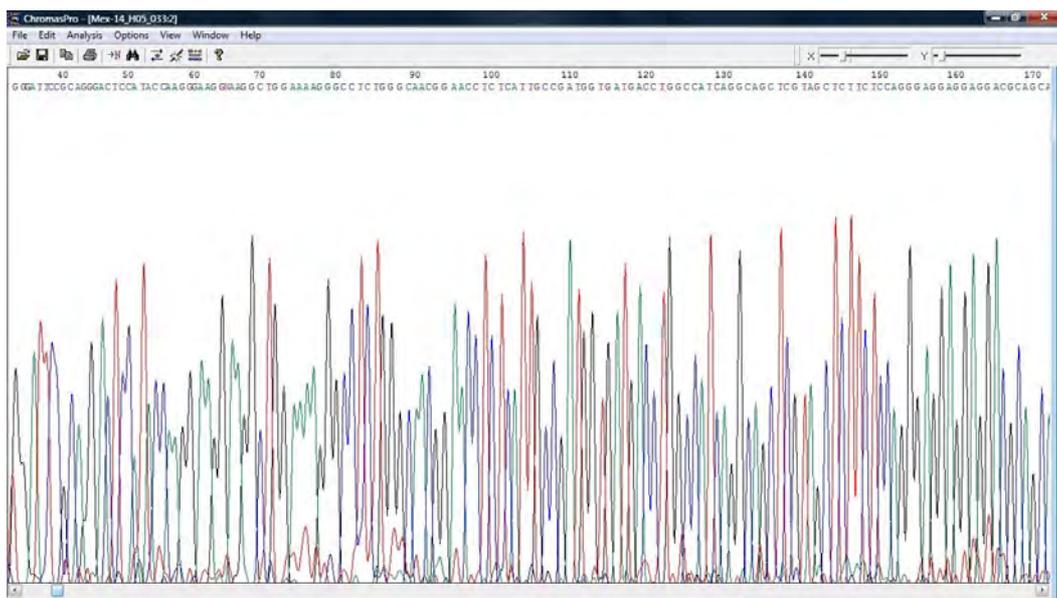


Figura 34. Captura de pantalla de ChromasPro. Cromatógrama de la secuencia de β -actina, picos muy bien definidos e intercalados, muy buena señal de análisis.

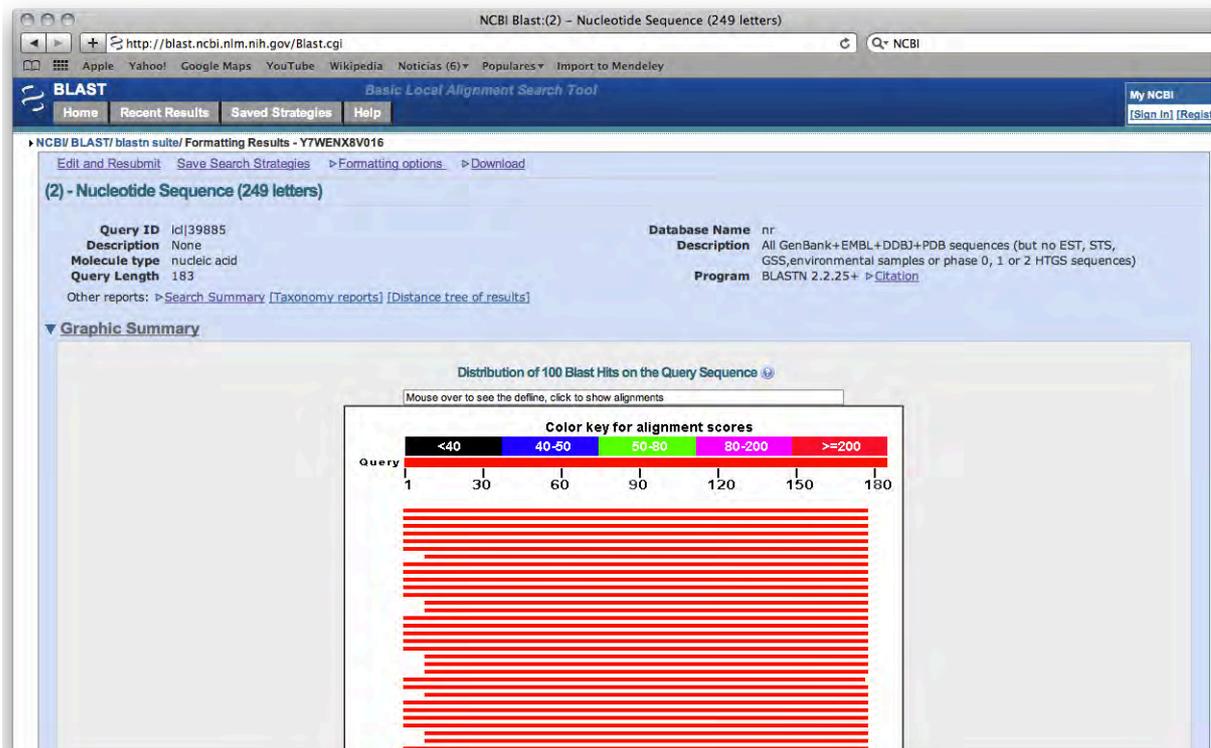


Figura 35. Captura de pantalla del resultado del análisis BLAST, se obtuvieron puntuaciones de alineación máximas.

NCBI BLAST/ blastn suite/ Formatting Results - Y7WENX8V016

Descriptions

Legend for links to other resources: UniGene GEO Gene Structure Map Viewer PubChem BioAssay

Accession	Description	Max score	Total score	Query coverage	E value	Max ident	Links
EU555181.1	Epinephelus merra beta-actin mRNA, partial cds	253	253	96%	2e-64	93%	
EU570219.1	Channa striata beta-actin mRNA, partial cds	253	253	96%	2e-64	93%	
AY510710.2	Epinephelus coioides beta actin mRNA, complete cds	253	253	96%	2e-64	93%	
HM047109.1	Stegastes partitus beta-actin mRNA, partial cds	250	250	96%	3e-63	93%	
AY148350.1	Dicentrarchus labrax actin mRNA, complete cds	250	250	96%	3e-63	93%	
L36342.1	Morone saxatilis (striped bass) beta-actin mRNA, partial cds	250	250	96%	3e-63	93%	
AY885682.1	Channa maculata beta-actin mRNA, partial cds	248	248	91%	9e-63	94%	
EU714183.1	Epinephelus coioides beta actin-like mRNA, complete sequence	246	246	96%	3e-62	93%	
AJ537421.1	Dicentrarchus labrax mRNA for beta actin (act gene)	246	246	96%	3e-62	92%	
DQ073096.1	Parajulus poecilepterus beta-actin mRNA, complete cds	244	244	96%	1e-61	92%	
AB288085.1	Sillago japonica mRNA for actin, complete cds	244	244	96%	1e-61	92%	
DQ018720.1	Punglitius pungitius beta-actin mRNA, partial cds	244	244	96%	1e-61	92%	
HM347345.1	Oryzias dancena cytoskeletal beta-actin mRNA, complete cds	242	242	91%	4e-61	93%	
AY647143.1	Monopterus albus beta-actin mRNA, complete cds	242	242	91%	4e-61	92%	
GU188683.1	Lates calcarifer beta-actin mRNA, partial cds	241	241	96%	1e-60	92%	
GU046791.1	Thunnus thynnus beta-actin mRNA, partial cds	241	241	96%	1e-60	92%	
FJ975145.1	Oplegnathus fasciatus beta-actin mRNA, complete cds	241	241	96%	1e-60	92%	
EU107278.1	Siganus canaliculatus beta-actin mRNA, partial cds	241	241	96%	1e-60	92%	
AB179839.1	Seriola quinqueradiata ACTB mRNA for beta-actin, partial cds	241	241	96%	1e-60	92%	
AY332493.2	Perca flavescens beta-actin mRNA, complete cds	239	239	91%	5e-60	92%	
DQ231555.1	Stizostedion vitreum vitreum beta-actin mRNA, partial cds	239	239	91%	5e-60	92%	
AY491380.1	Acanthopagrus schlegelii beta actin mRNA, complete cds	239	239	91%	5e-60	92%	
DQ243822.1	Pomacentrus moluccensis beta-actin mRNA, partial cds	239	239	95%	5e-60	92%	
HQ386788.1	Paralichthys olivaceus beta-actin mRNA, complete cds	235	235	96%	6e-59	91%	
EF555077.1	Atherina boyeri beta actin mRNA, partial cds	235	235	91%	6e-59	92%	
EF571597.1	Latris lineata beta-actin mRNA, partial cds	235	235	96%	6e-59	91%	
EF452499.1	Thunnus maccoyii beta-actin mRNA, partial cds	235	235	96%	6e-59	91%	
BT027669.1	Gasterosteus aculeatus clone CGX79-E10 mRNA sequence	235	235	96%	6e-59	91%	U
AY885683.1	Siniperca chuatsi beta-actin mRNA, partial cds	235	235	96%	6e-59	91%	
GU319958.1	Melanotaenia fluviatilis beta-actin mRNA, partial cds	233	233	91%	2e-58	92%	
EU664997.1	Perca fluviatilis beta-actin mRNA, complete cds	233	233	91%	2e-58	92%	
GU584189.1	Larimichthys crocea beta-actin mRNA, complete cds	232	232	96%	7e-58	90%	
FJ936563.1	Larimichthys crocea beta-actin mRNA, complete cds	232	232	96%	7e-58	90%	

Figura 36. Captura de pantalla de las secuencias con alto consenso de alineación para el gen de β -actina obtenidas por el análisis BLAST.

La secuencia así obtenida se recortó en las zonas de mejor respuesta y se pudo reportar la secuencia parcial de 183 bp para β -actina para *A.saxatilis* como:

```
>GTCTCGCGGGATTCCGCAGGGACTCCATACCAAGGGAAGGNAAGGCTGGAAAAGGGCCTC  
TGGGCAACGGAACCTCTCATTGCCGATGGTGTATGACCTGGCCATCAGGCAGCTCGTAGCTCTT  
CTCCAGGGAGGAGGAGGACGCAGCAGTGCCCATCTCCTGCTCAAAGTCAAGGGAATTTCT
```

1.2.b Cebadores de cuantificación

A partir de la secuencia parcial obtenida y reportada previamente, se diseñaron cebadores para cuantificación por PCR en tiempo real:

Tabla 10. Cebadores de cuantificación para β -actina, características y secuencias.

Nombre	Tf	%GC	Secuencia
β actina F	64,3	52,63	ATTCCGCAGGGACTCCATA
β actina R	64	55	TCCCTGGAGAAGAGCTACGA

I.3 18S

1.3.a Secuencia

Contando con cebadores universales para el gen de 18 S, fue muy rápido el aislamiento de este gen de referencia, las bandas obtenidas con productos de PCR en geles de agarosa fueron en todos los casos claras y bien definidas (figura 37).

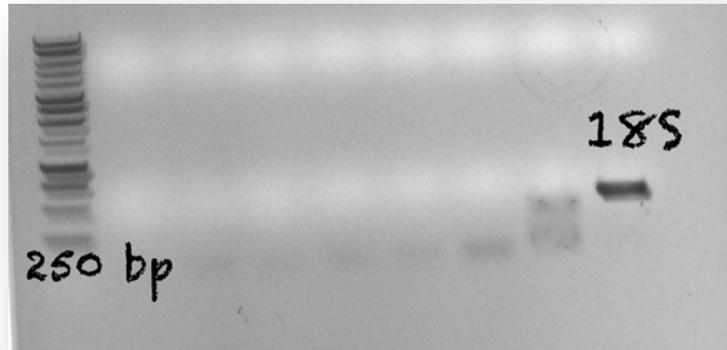


Figura 37. Foto en colores invertidos y escala de blanco y negro de un gel de agarosa de producto de PCR para 18S, la banda correspondiente se nota facilmente y se ubica entre los 500 y 250bp.

De los cuatro productos mandados a secuenciar, todos resultaron tener muy alta correlación con el gen 18S de otras especies de peces. Se escogió para el resto del estudio a la secuencia "Sarg 13", la cual tuvo mayor definición de picos en el cromatógrama (figura 38) y alineaciones en el análisis BLAST de las más significativas posibles (figuras 39 y 40).

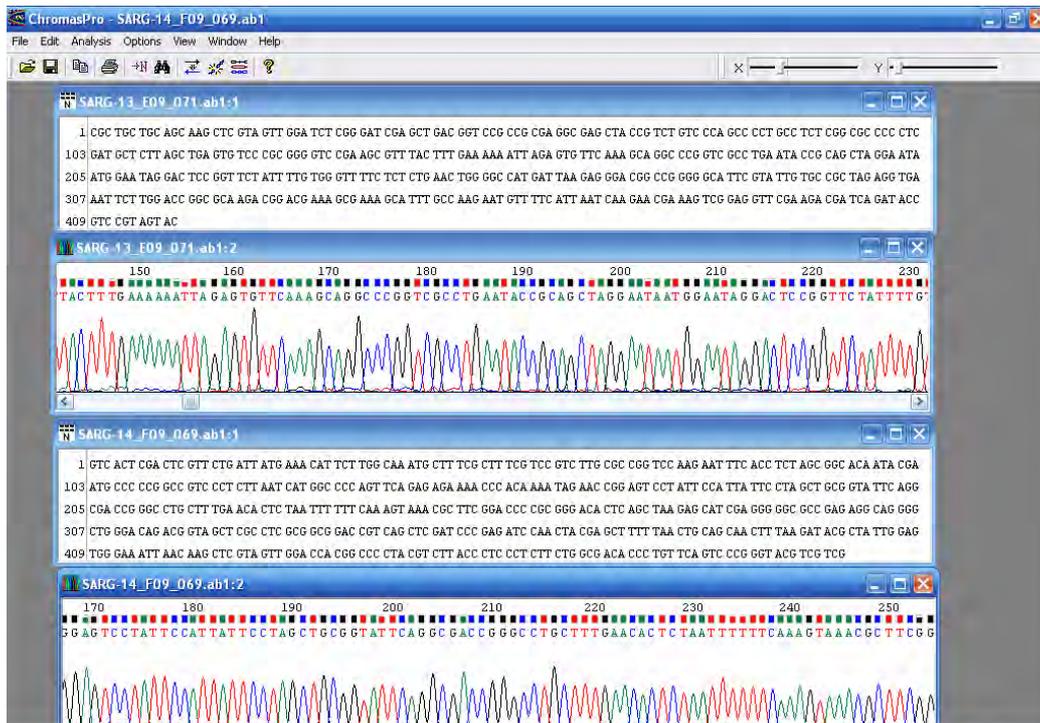


Figura 38. Cromatógrama de unas secuencias obtenidas para 18S, los productos son cortos pero la señal esta muy clara. Captura de pantalla de ChromasPro.

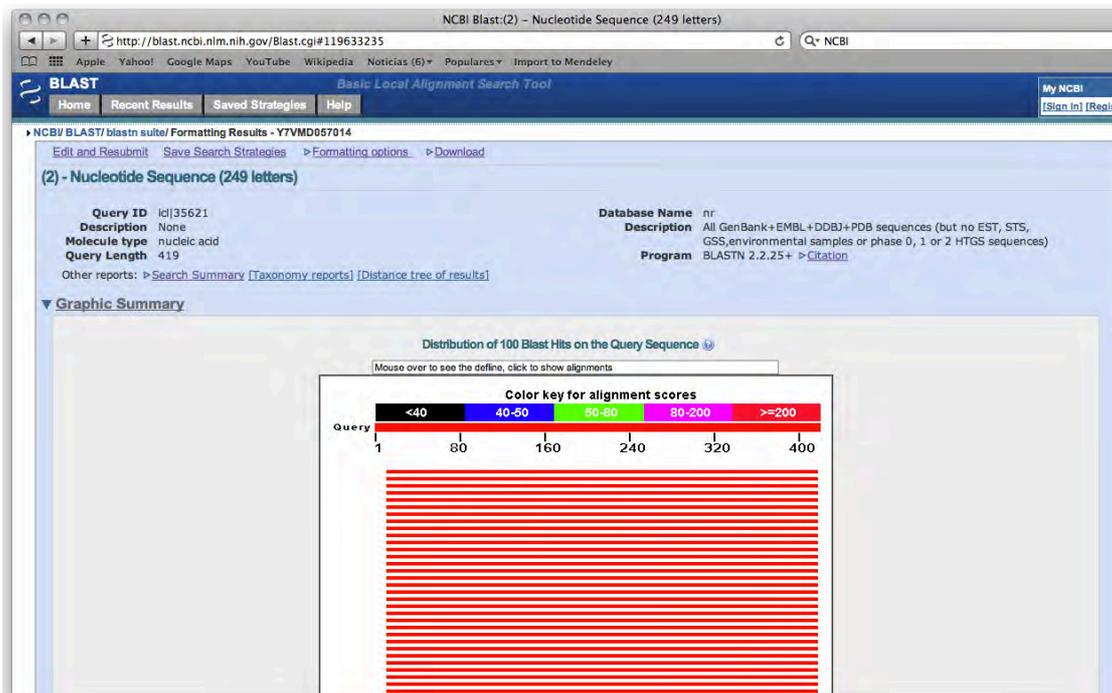


Figura 39. Captura de pantalla del resultado del análisis BLAST en NCBI para 18S, el máximo de puntuación de alineación fue obtenido.

Accession	Description	Max score	Total score	Query coverage	E value	Max ident	Links
EU120033.1	Monopterus albus 18S ribosomal RNA gene, partial sequence	722	722	96%	0.0	99%	
EU120032.1	Misgurnus anguillicaudatus 18S ribosomal RNA gene, partial sequence	722	722	96%	0.0	99%	
FJ126794.1	Epinephelus moara 18S ribosomal RNA gene, partial sequence	722	722	96%	0.0	99%	
FJ126793.1	Epinephelus bruneus 18S ribosomal RNA gene, partial sequence	722	722	96%	0.0	99%	
AB300393.1	Pseudolabrus sieboldi gene for 18S ribosomal RNA, partial sequence	722	722	96%	0.0	99%	
AF492908.1	Oreochromis mossambicus 18S ribosomal RNA gene, partial sequence	722	722	96%	0.0	99%	
GU017319.1	Acanthopagrus schlegelii voucher Asc2008MNB1 18S ribosomal RNA gene	719	719	96%	0.0	99%	
AB089345.2	Acanthopagrus latus gene for 18S rRNA, partial sequence	719	719	96%	0.0	99%	
AJ564775.1	Pampus argenteus partial 18S rRNA gene	719	719	96%	0.0	99%	
AB028214.1	Chrysophrys major 18S rRNA, partial sequence	719	719	96%	0.0	99%	
GU289229.1	Oreochromis aureus isolate Oau1-4 18S ribosomal RNA gene, partial sequence	713	713	96%	0.0	99%	
AY850371.1	Sebastes marmoratus 18S ribosomal RNA gene, partial sequence	713	713	96%	0.0	99%	
AY850370.1	Seriola quinqueradiata 18S ribosomal RNA gene, partial sequence	713	713	96%	0.0	99%	
AF518199.1	Sebastes marinus 18S ribosomal RNA gene, partial sequence	713	713	96%	0.0	99%	
AF518198.1	Sebastes brevispinis 18S ribosomal RNA gene, partial sequence	713	713	96%	0.0	99%	
AY452490.1	Siniperca chuatsi 18S ribosomal RNA gene, partial sequence	713	713	96%	0.0	99%	
M91182.1	Sebastes altivelis 18S ribosomal RNA gene	713	713	96%	0.0	99%	
FN252250.1	Awaous banana partial 18S rRNA gene	711	711	96%	0.0	99%	
FN252249.1	Gobius niger partial 18S rRNA gene	711	711	96%	0.0	99%	
FN252247.1	Pomatoschistus microps partial 18S rRNA gene	711	711	96%	0.0	99%	
EU780557.1	Nothobranchius furzeri 5' external transcribed spacer, partial sequence	711	711	96%	0.0	99%	
AB451875.1	Acanthogobius flavimanus gene for 18S rRNA, partial sequence	711	711	96%	0.0	99%	
EU637075.1	Kareius bicoloratus isolate LZ1q 18S ribosomal RNA gene, complete	711	711	96%	0.0	99%	
EU637072.1	Kareius bicoloratus isolate LZ1n 18S ribosomal RNA gene, complete	711	711	96%	0.0	99%	
EU637071.1	Kareius bicoloratus isolate LZ1m 18S ribosomal RNA gene, complete	711	711	96%	0.0	99%	
EU637070.1	Kareius bicoloratus isolate LZ1l 18S ribosomal RNA gene, complete	711	711	96%	0.0	99%	
EU637069.1	Kareius bicoloratus isolate LZ1k 18S ribosomal RNA gene, complete	711	711	96%	0.0	99%	
EU637068.1	Kareius bicoloratus isolate WH1q 18S ribosomal RNA gene, complete	711	711	96%	0.0	99%	
EU637067.1	Kareius bicoloratus isolate WH1p 18S ribosomal RNA gene, complete	711	711	96%	0.0	99%	
EU637066.1	Kareius bicoloratus isolate WH1o 18S ribosomal RNA gene, complete	711	711	96%	0.0	99%	
EU637065.1	Kareius bicoloratus isolate WH1n 18S ribosomal RNA gene, complete	711	711	96%	0.0	99%	
EU637064.1	Kareius bicoloratus isolate WH1m 18S ribosomal RNA gene, complete	711	711	96%	0.0	99%	

Figura 40. Captura de pantalla de las secuencias de otros peces con alto consenso de alineación para el gen 18S obtenidas por el análisis BLAST.

De manera lógica para un gen tan conservado como el 18S, las puntuaciones de similitudes fueron muy altas, de 99% con valores de E de 0. Las especies que dieron mayores puntuaciones son peces marinos, algunos de ellos arrecifales como el *Epinephelus* y el *Acanthopagrus*. También se encontró una fuerte relación con cíclidos como el *Oreochromis*.

Para este estudio se reportó la siguiente secuencia parcial de 300bp de 18S para *Abudefduf saxatilis* :

```
>CGGCGCCCCCTCGATGCTCTTAGCTGAGTGTCCCGCGGGGTCCGAAGCGTTTACTTTGAAAA
AATTAGAGTGTTCAAAGCAGGCCCGGTGCGCTGAATACCGCAGCTAGGAATAATGGAATAGG
ACTCCGGTTCTATTTTGTGGGTTTTCTCTCTGAACTGGGGCCATGATTAAGAGGGACGGCCGG
GGGCATTCGTATTGTGCCGCTAGAGGTGAAATTCTTGGACCGGCGCAAGACGGACGAAAGCG
AAAGCATTTGCCAAGAATGTTTTCATTAAATCAAGAACGAAAGTCGGAGGTT
```

1.3.b Cebadores de cuantificación

De la misma forma que para los genes de VTG y β actina, a partir de la secuencia parcial obtenida, se diseñaron los siguientes cebadores de cuantificación:

Tabla 11. Cebadores de cuantificación para 18S, características y secuencias.

Nombre	Tf	%GC	Secuencia
18 S F	63,8	50	CCGCAGCTAGGAATAATGGA
18 S R	63,3	50	TCACCTCTAGCGGCACAATA

I.4 Prueba de los cebadores de cuantificación

Los cebadores de cuantificación se sintetizaron por el proveedor Sigma Aldrich®, se probaron su especificidad con cADN de *A. saxatilis* expuesto a 5 µg/g PH de 17β estradiol (E₂). Para probar su sensibilidad, se usaron 2 volúmenes de cADN. En la figura 41, para cada gen, la banda izquierda corresponde a 2 µl de cADN por reacción y la banda derecha a 4 µl de cADN.

La prueba resultó satisfactoria; las bandas aparecieron nítidas y definidas:

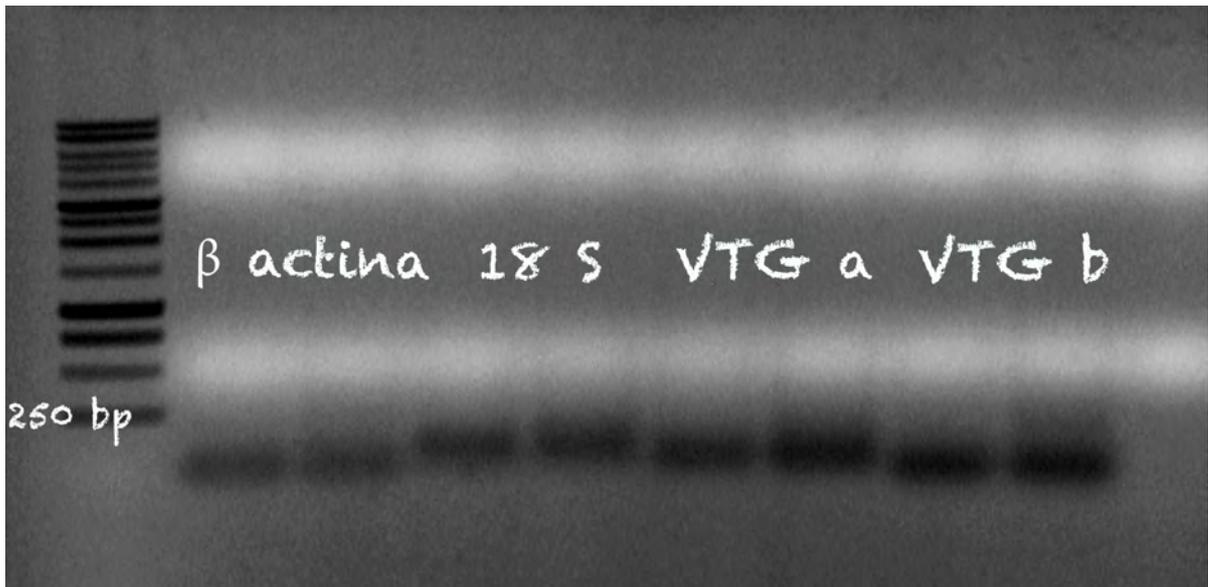


Figura 41. Foto en colores invertidos y escala de blanco y negro del gel de agarosa para los productos de PCR de prueba de los cebadores de cuantificación.

A la vista de la calidad visual de las bandas obtenidas para el gen de VTG, se optó por usar el juego de cebadores "VTG b" para los análisis de PCR tiempo real, ya que su producto fue sensiblemente más ligero y su claridad de señal más nítida.

II. PCR tiempo real

II.1 Eficiencia

Se utilizó el ARN de un organismo tratado con E₂, parte del tratamiento control positivo del bioensayo. Se seleccionó la muestra "E2-9" por su alta concentración en ARN (296 ng/μl), el cual se retrotranscribió a cADN para una concentración final de 14 ng/μl. Se realizó una serie de diluciones 0,2X y se usaron 2 μl de cADN así obtenido con los reactivos y programa antes descritos.

Se midieron las amplificaciones por triplicado.

A partir de la pendiente de la regresión lineal obtenida con los Ct a las diferentes concentraciones de cADN (figura 42) se calculó la eficiencia: $E = 10^{(-1/\text{pendiente})}$.

Los valores de eficiencia suelen variar en un rango de entre 1,6 hasta por arriba de 2 (Pffaf, 2006), este estudio cumplió con la regla reportando eficiencia de entre 1,9 para 18S, 2,3 para β-actina y hasta 2,9 para VTG lo cual se considera razonable.

Curva de Eficiencia de PCR en tiempo real

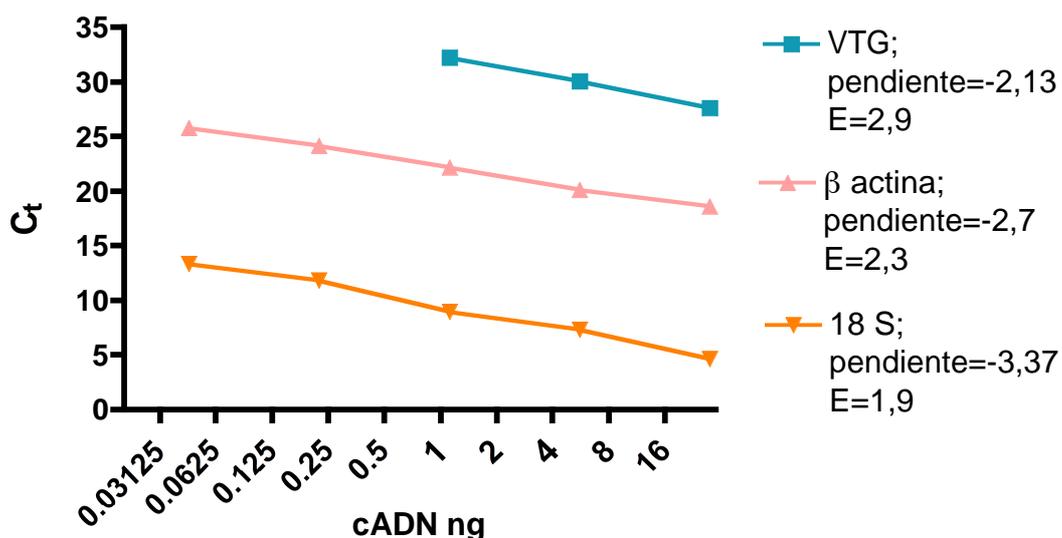


Figura 42. Curva de Eficiencia: se calculó a partir de la pendiente obtenida por una serie de dilución de cADN.

II.2 Curva Melting

Las curvas "Melting" de las muestras para los 3 genes fueron muy satisfactorias, no se observaron picos adicionales o "hombros" al pico principal. Aseguraron entonces de que el producto analizado se trató en efecto del gen estudiado y no de un dímero que se pudiera haber formado. A continuación se presentan ejemplos de curvas melting obtenidas para los 3 genes estudiados (figuras 43, 44 y 45).

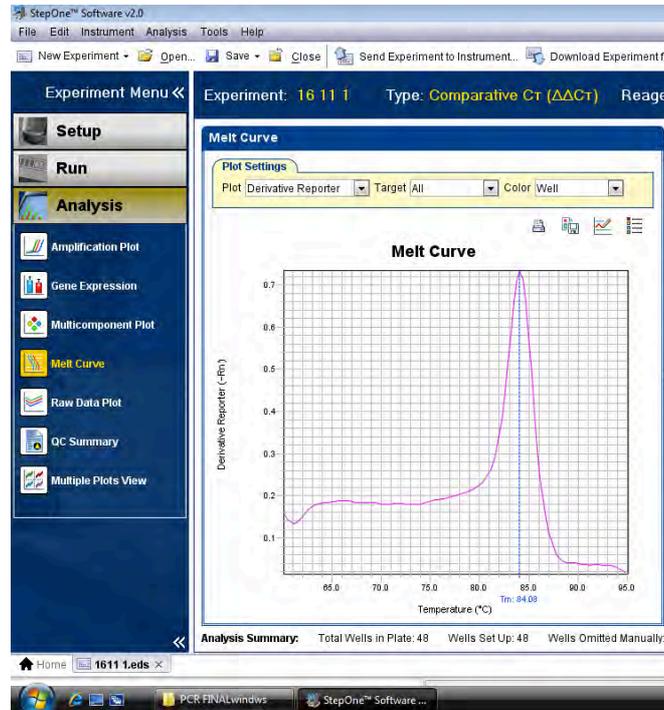


Figura 43. Ejemplo de una curva melting obtenida de una muestra para el gen de VTG.

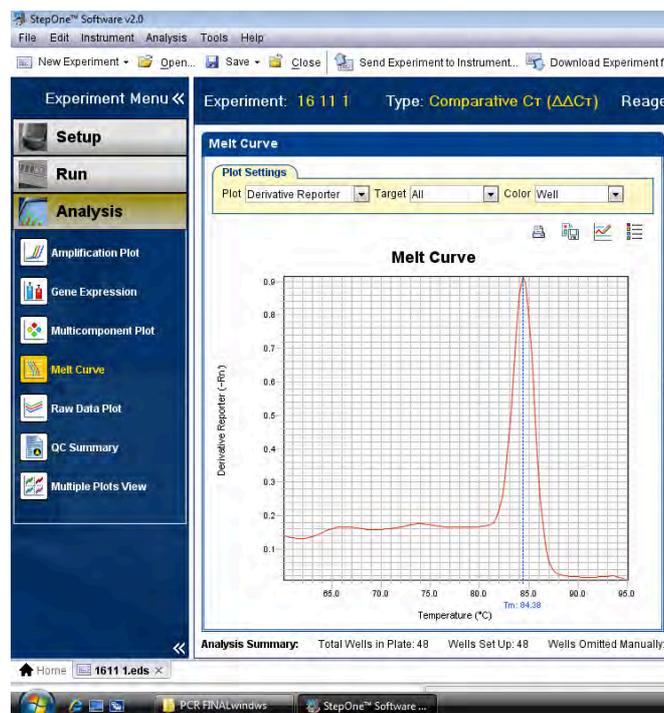


Figura 44. Curva melting para β -actina.

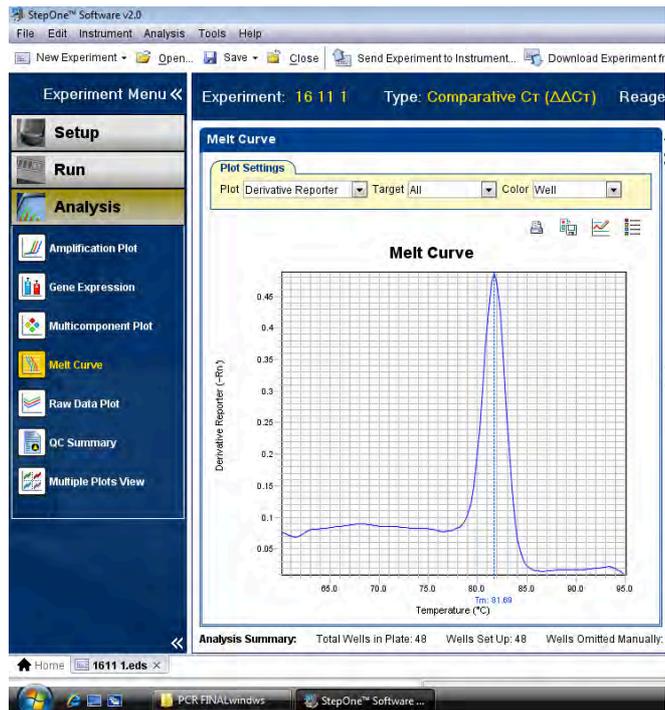


Figura 45. Curva melting obtenida en una muestra para 18S.

III. Bioensayo Preliminar

III.1 Mortalidad

El bioensayo preliminar dio la oportunidad de comprobar procedimiento de dosificación a usar. Uno de los resultados de los menos esperados y de gran importancia para el seguimiento del trabajo fue la mortalidad importante observada en los organismos expuestos a oxibenzona. Se previa exponer los organismos tres veces en un lapso de una semana, fuera de la dosis mediana que solo se iba a inyectar una vez.

Al inyectar los peces en los tratamientos de Oxibenzona, se observaron unas reacciones instantáneas, los organismos nadaban de manera errática, con problemas de desorientación y cambios de pigmentaciones. No obstante, regresaron a una conducta normal de nado en menos de dos minutos. Ninguna de estas reacciones se pudo observar en los controles, sea el positivo de E₂ o el negativo.

Desafortunadamente, los peces empezaron a morir a un ritmo alarmante (figura 46), el 60% de sobrevivencia se alcanzó al cuarto día del bioensayo para las dosis de Oxibenzona 10 µg/g PH y 100 µg/g PH, poniendo en peligro la relevancia del bioensayo y la calidad de los análisis estadísticos de los resultados. En el tratamiento de Oxibenzona 30 µg/g PH solamente dos organismos fallecieron, uno en el control negativo y ninguno en el control positivo de E₂.

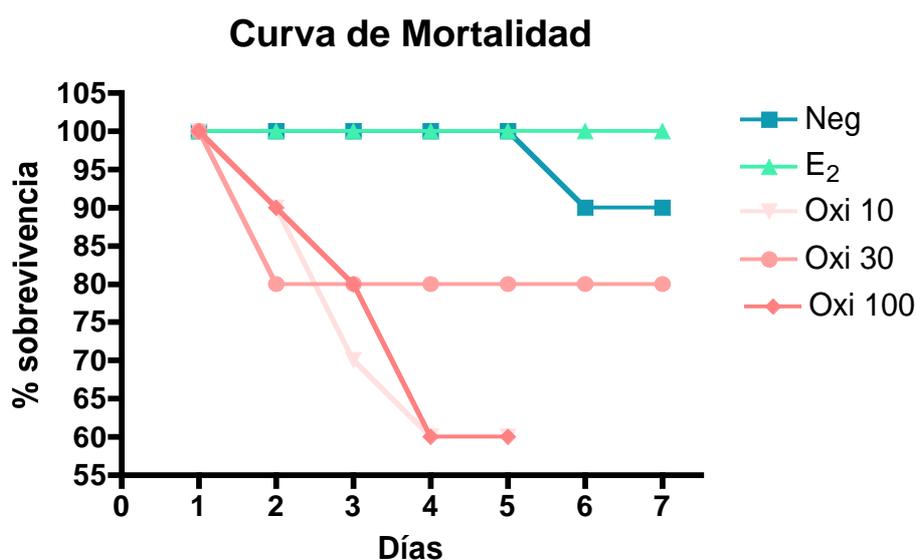


Figura 46. Curva de mortalidad obtenida en el bioensayos preliminar por efecto de las inyecciones con oxibenzona. Oxi 10 µg/g PH y Oxi 100 µg/g PH se acabaron al quinto día, los demás tratamiento se siguieron como previsto. Neg: Control Negativo, E₂: Control positivo de E₂ a 5 µg/g PH, Oxi 10: Oxibenzona 10 µg/g PH, Oxi 30: Oxibenzona 30 µg/g PH, Oxi 100: Oxibenzona 100 µg/g PH.

Se decidió parar el bioensayo para los tratamientos de Oxibenzona 10 µg/g PH y 100 µg/g PH y sacrificar los organismos restantes ya que se había alcanzado el 60% de mortalidad y ponía en riesgo el número de muestras analizadas para el análisis estadístico. Estos dos tratamientos finalmente consistieron en dos inyecciones y duraron cinco días.

Durante la disección de los organismos se pudo observar que las entrañas de los peces tratados presentaban gases, hemorragias, necrosis y sus hígados tenían una coloración

pálida. En comparación, los peces de los controles se veían sanos, sus entrañas normales y sus hígados firmes y coloridos.

Todos los organismos eran inmaduros sexualmente; no se pudieron observar gónadas, lo cual asegura una ausencia de interferencia hormonal endógena en los análisis posteriores de vitelogenina.

III.2 Q-PCR

Los análisis de expresión genética se realizaron en la Unidad de Bioquímica y Biología Molecular de Plantas del CICY, AC usando un PCR tiempo real AB Step One de 48 pozos. Se retrotranscribieron las muestras de ARN a cADN previamente al análisis y se usaron los cebadores de cuantificación diseñados anteriormente.

Se calcularon los $\Delta\Delta C_t$ y sus expresiones relativas, el $2^{-\Delta\Delta C_t}$ (Pfaffl, 2001), tomando como genes de referencia al gen de β -actina y 18S. Se les realizó entonces una prueba de varianza de una vía ANOVA no paramétrica de Kruskal Wallis con Prism GraphPad.

Independientemente del gen de referencia tomado en cuenta, los resultados mostraron diferencias significativas, la prueba *post hoc* de Dunns reveló que los valores obtenidos del control positivo fueron estadísticamente diferentes en relación al control negativo cuando ninguno de los tratamientos mostraron diferencia estadística con el control negativo (figuras 47 y 48).

No se pudo observar expresión genética relativa de la VTG en los tratamientos de oxibenzona.

Expresión relativa usando β -actina como gen de referencia

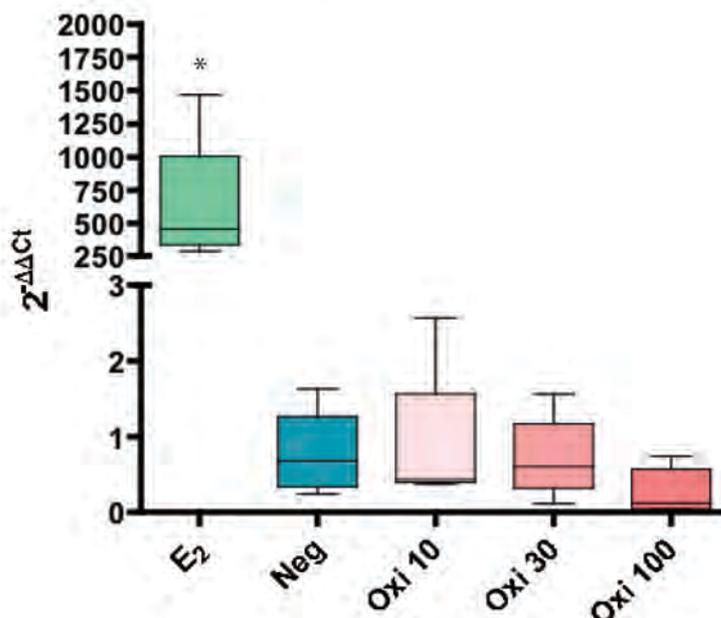


Figura 47. Expresiones relativas de VTG usando el gen de referencia β -actina obtenidas en el bioensayo preliminar; solamente el control positivo mostró diferencia significativa en relación al control negativo. Medianas y rangos intercuartiles, * diferencia significativa ($P < 0,05$).

Expresión relativa usando 18S como gen de referencia

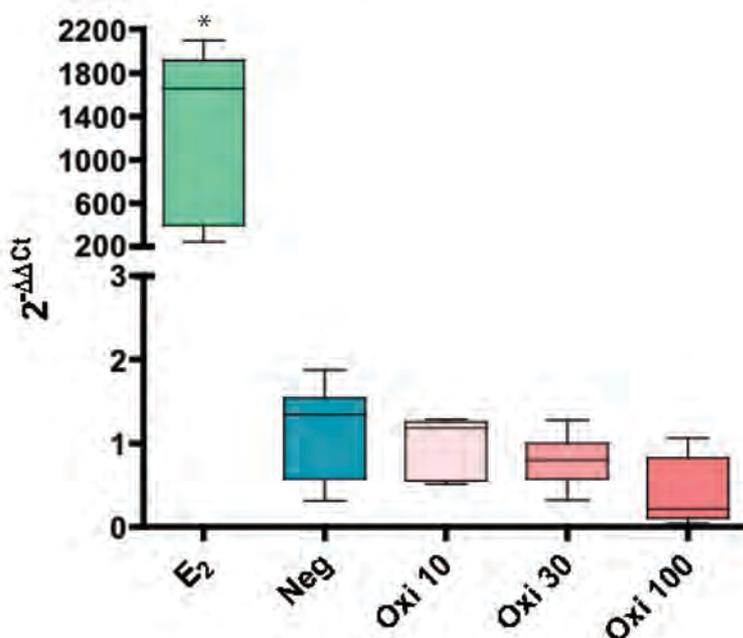


Figura 48. Expresiones relativas de VTG usando el gen de referencia 18S: solamente el control positivo fue significativamente diferente del control negativo. Medianas y rangos intercuartiles, * diferencia significativa ($P < 0,05$).

III.3 Fosfatos lábiles al álcali - ALP

Los análisis de cuantificación de la proteína VTG se realizaron siguiendo el protocolo descrito anteriormente, modificado de Gagné y Blaise (2000) y Hallgren *et al.* (2009). El método consiste en una precipitación de los fosfatos lábiles al álcali (ALP por sus siglas en inglés) de origen proteico y su cuantificación por colorimetría en un espectrofotómetro a 630nm.

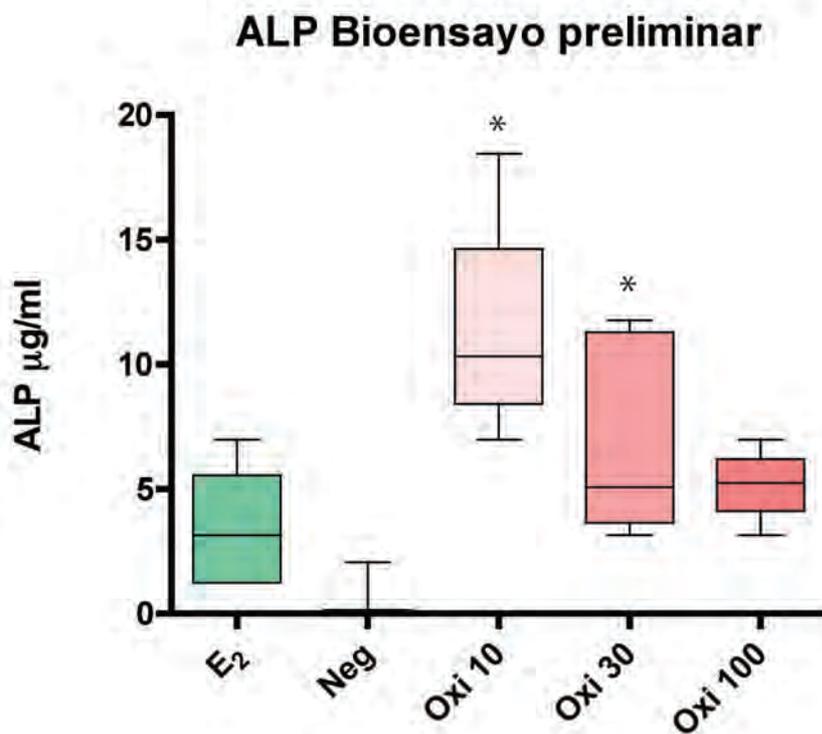


Figura 49. Fosfatos lábiles al álcali de la parte proteica para los diferentes tratamientos: Oxi 10 y Oxi 30 se mostraron significativamente diferentes del control positivo. Medianas y rangos intercuartiles, * diferencia significativa ($P < 0,01$).

Como se puede apreciar, los tratamientos dieron diferencia de respuesta en relación al control negativo pero las diferencias entre ellos no fueron significativas. Oxi 10 y Oxi 30 dieron una mayor respuesta que el control positivo y el Oxi 100.

El control negativo dio resultados muy bajos, estadísticamente diferentes de los tratamientos, lo cual hace pensar que se pudo analizar la síntesis de la VTG y no de otra fosfoproteína presente en el hígado.

Se realizó el análisis en la Unidad de Ciencias del Agua del CICY, AC y las lecturas colorimétricas se hicieron en un espectrofotómetro de una celda.

Debido a la dilución de las muestras, las absorbancias se encontraron muy cercanas del límite de detección del espectrofotómetro usado y a su rango de lectura. El tiempo requerido para procesar las muestras, sus repeticiones y las curvas de calibración fue importante.

Para resolver estos inconvenientes, se decidió usar un espectrofotómetro de placa para las lecturas del bioensayo final obteniendo así mayor definición en las lecturas y ahorrando tiempo de análisis ya que el bioensayo final contó con más muestras.

IV. Bioensayo Final

Nuevamente, se observaron síntomas neurotóxicos en los organismos inyectados con los filtros UV: nado errático, desorientación y cambio de pigmentación, señal de estrés.

Se sacrificaron a las 96h después de la inyección, se disecaron en el instante y se preservaron las muestras de hígado para posterior análisis genético y proteico.

Se extrajo el ARN de las muestras y se retrotranscribió a cADN para los análisis de Q-PCR. Se guardaron las muestras de cADN a -20°C hasta el análisis.

Se extrajeron los fosfatos lábiles al álcali de las muestras de hígados homogeneizados según el protocolo descrito anteriormente y se guardaron a 4°C.

IV.1 Q-PCR

Los análisis de PCR en tiempo real se realizaron en los laboratorios de la Unidad de Bioquímica y Biología Molecular de Plantas del CICY AC, en un equipo Applied Biosystems Step One de 48 pozos.

Los cálculos de la expresión relativa de VTG se obtuvieron contra el gen de referencia β -actina.

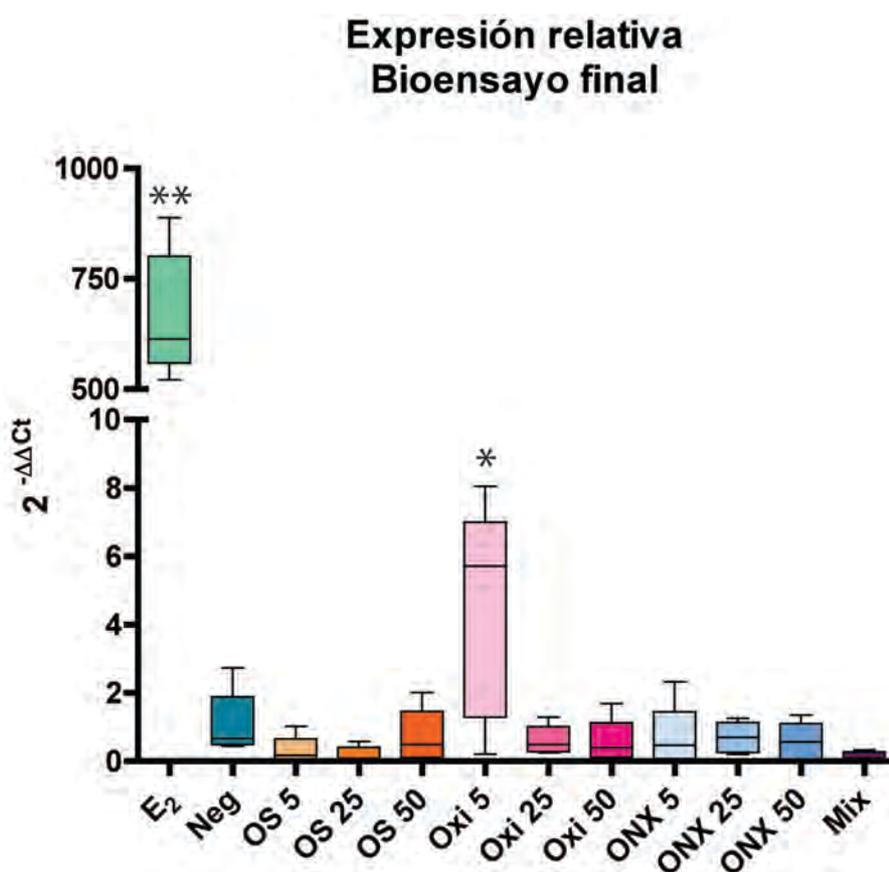


Figura 50. Expresiones relativas de VTG con referencia a β -actina de los tratamientos del bioensayo final. Diferencias significativas del control positivo E2 y del tratamiento Oxi5 respecto al control negativo.

Medianas y rangos intercuartiles, diferencia significativa ** a $P < 0,01$, * a $P < 0,05$.

Solamente el control positivo E₂ y el tratamiento Oxi 5 dieron diferencias significativas con el control negativo (figura 50), no obstante, la expresión de Oxi 5 sigue siendo relativamente baja comparando con los valores alcanzados por el control positivo con unas medianas de 5,7 y 612,7 respectivamente. Los demás tratamientos no revelaron expresión genética de VTG con valores no estadísticamente diferentes del control negativo ni entre ellos; sus medianas no rebasan 0,6. Aunque los compuestos en mezcla tuvieron la misma dosis final de Oxibenzona que el tratamiento Oxi 5, no se apreció expresión del gen de VTG.

IV.2 Fosfatos lábiles al álcali-ALP

El desarrollo del color y las lecturas espectrofotométricas de los fosfatos lábiles al álcali o ALP se realizaron en las instalaciones de la Facultad de Química en el campus de Sisal usando un espectrofotómetro multiplaca BenchMark Plus®.

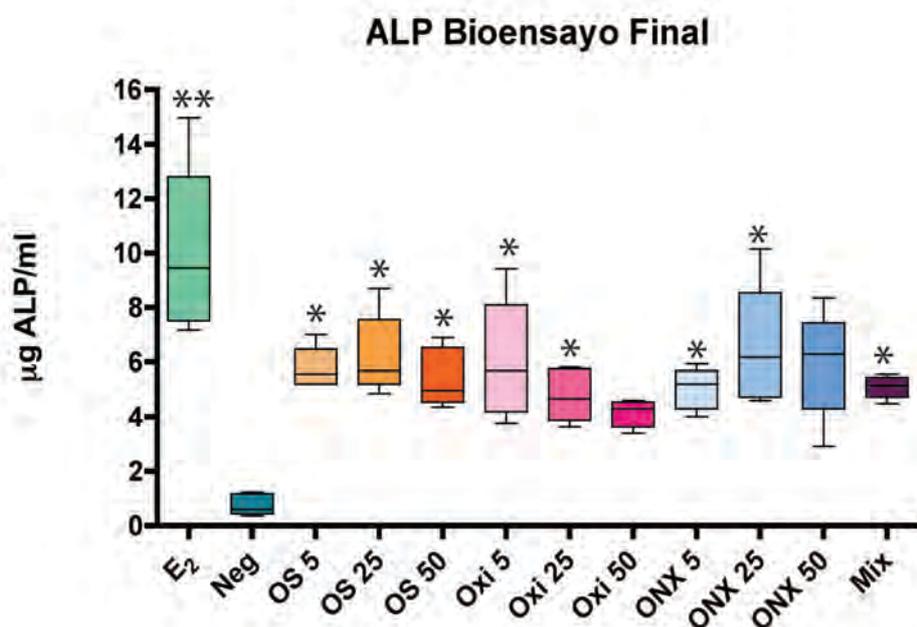


Figura 51. Síntesis de VTG medida como ALP de los tratamientos del bioensayo final. Los tratamientos son estadísticamente diferentes del control negativo. Medianas y rangos intercuartiles, * diferencia significativa ($P < 0,05$).

Todos los tratamientos dieron diferencias significativas ($P < 0,05$) en relación al control negativo, a excepción de Oxi 50 y ONX 50, probablemente debido a su alta varianza (figura 51). Aunque se puede observar que los tratamientos OS 25, Oxi 5 y ONX 25 tendieron a tener máximos más altos que los demás tratamientos (8,7; 9,4 y 10,1 $\mu\text{g/ml}$ respectivamente), sus medianas no fueron estadísticamente diferentes de las demás. La mezcla de compuestos presentó muy poca variación con una desviación estándar de 0,37 $\mu\text{g/ml}$ cuando el rango cubierto por E₂ fue relativamente amplio, teniendo una desviación estándar de 3,1 $\mu\text{g/ml}$. De manera general, las variaciones fueron menores en comparación a los valores obtenidos en el bioensayo preliminar lo cual se puede deber al uso de un equipo espectrofotométrico de mayor definición. Las medianas de los tratamientos oscilaron alrededor de los 5 $\mu\text{g/ml}$, la mediana del control positivo es de 9,45 $\mu\text{g/ml}$ y del control negativo de 0,6 $\mu\text{g/ml}$.

E. Discusión y conclusiones

I. Discusión

Los objetivos de este trabajo fueron la evaluación de la inducción de la expresión del gen de vitelogenina (VTG) y de la síntesis de su proteína por compuestos bloqueadores solares: la oxibenzona, el octinoxato y el octisalato en juveniles de *Abudefduf saxatilis*. Dada la falta de información genómica sobre *A.saxatilis*, el aislamiento de las secuencias parciales de los genes de VTG, β -actina y 18S (los genes de referencia) fue un paso primordial para el desarrollo del estudio.

Después de varias pruebas, incluyendo diferentes métodos de diseño de cebadores, se obtuvieron secuencias parciales de los tres genes de interés. Los análisis BLAST de las secuencias obtenidas dieron mejores respuestas para los genes de β -actina (93%) y 18S (99%), lo cual se debe a la relativa conservación de sus secuencias a lo largo de la evolución (Finn *et al.*, 2009). Varias de las especies con mayor similitudes para β -actina fueron especies marinas tropicales como los meros (*Epinephelus* sp), el lábrido (*Dicentrarchus labrax*) e interesantemente una especie de damisela (Pomacentrido) *Stegastes partitus*. De la misma manera, para 18S, en las especies cercanas genéticamente se encontraron especies arrecifales como nuevamente los meros, la lora (*Pseudolabrus sieboldi*), las doradas (*Acanthopagrus* sp) pero también la tilapia (*Oreochromis mossambicus*). Estudios filogenéticos usando análisis Bayesiano enseñaron una fuerte relación entre los Pomacentridos, y en mayor medida el clado de *Abudefduf* sp, con los cíclidos y los lábridos (Quenouille *et al.*, 2004; Zardoya *et al.*, 1996). Los resultados de alineación obtenidos en este estudio parecen soportar estas relaciones.

La secuencia de VTG también obtuvo buena calificación (76%) contra las otras secuencias disponibles en el GenBank del NCBI pero resultó más difícil de aislar. El análisis BLAST reveló similitudes fuertes con especies marinas representadas en los trópicos como el pargo (*Pagrus major*), la lisa (*Mugil cephalus*), el atún (*Thunnus thunnus*) y la lubina (*Morone saxatilis*). No se relacionaron con especies arrecifales, probablemente se deba a la escasez de secuencias de VTG disponibles para estas especies poco estudiadas en ecotoxicología. El diseño de los cebadores para obtener su secuencia se basó en alineaciones de genes de vitelogenina de otras especies de peces del orden Perciformis, pero ninguno de la familia Pomacentridae ni mucho menos del género *Abudefduf*. Estudios filogenéticos han demostrado que el grupo de los genes de VTG ha experimentado muchas variaciones a través de duplicaciones y re arreglos (Finn *et al.*, 2009). Existía desde antes de la separación entre los tetrápodos y los peces hace unos 450 millones de años, y se ha seguido diferenciando hasta el punto de que en los teleósteos se han descubierto la presencia de varias copias del gen o transcriptos (Finn *et al.*, 2009). Así mismo a la fecha, se han aislado hasta 20 genes de VTG en la trucha (*Oncorhynchus mykiss*), 11 en especies de labridos (*Centrolabrus exoletus* y *Labrus mixtus*) y 8 en el pez cebra (*Danio rerio*) (Finn *et al.*, 2009; Wang *et al.*, 2005). El nivel de expresión de estos genes parece depender de la especie, del sexo, de la etapa del desarrollo y hasta del tejido (Tong *et al.*, 2004). En efecto, genes de VTG se han encontrado en tejidos diferentes al hígado, aunque con expresiones inferiores, como las gónadas (ovarios y testículos) y los intestinos (Wang *et al.*, 2005, Woods *et al.*, 2009).

Las pocas zonas de conservación en el gen de VTG entre las especies y el número de copias dentro de una misma especie dificultan entonces el aislamiento. En este estudio se logró aislar y secuenciar una porción de un gen de VTG cuya expresión es inducida por 17β -estradiol (E_2) en el hígado. Por otra parte, el análisis BLAST indicó que se podría tratar de un gen de VTG B, también llamado Ab según las referencias. Se considera el gen VTG C como el más ancestral, siendo ortólogo con el de la gallina, se cree que se separó del gen VTG A tras un evento de duplicación del genoma entero. En los teleosteos, el VTG A se habrá duplicado nuevamente y se formaron dos parálogos: VTG A o Aa y VTG B o Ab (Finn *et al.*, 2009), los dos involucrados en la vitelogenesis.

Las secuencias parciales de los genes aislados aquí fueron registradas en el GenBank del NCBI. Números de submisión:

-VTG: BankIt1461145 VTG JN178942

-18S: BankIt1461147 18S JN178943

Por tener menos de 200 bp, la secuencia de β -actina no ha podido registrarse, se diseñarán nuevos cebadores para alargar esta secuencia.

Las dosis, empíricas, de exposición 5, 25 y 50 $\mu\text{g/g}$ PH se escogieron dada la alta lipofiliidad de los compuestos y su poca degradación biótica, características que les confiere un alto potencial de bioacumulación y biomagnificación. En efecto, las concentraciones reportadas de compuestos bloqueadores solares en aguas de Europa y Estados Unidos, son del rango de los ng/L hasta los $\mu\text{g/L}$; en comparación, las concentraciones encontradas en tejidos de peces provenientes de estos mismos cuerpos de agua son del orden de los ng/g hasta los $\mu\text{g/g}$ (Díaz-Cruz y Barceló, 2009, Weisbrod *et al.*, 2007, Coronado *et al.*, 2008). En aguas superficiales de ríos de Japón, Kameda y sus colaboradores recientemente (2011) reportaron niveles promedio de Oxibenzona y Octisalato de 25 ng/L y 266 ng/L respectivamente. En 2006, Loraine y Pettigrove midieron niveles de octinoxato y oxibenzona de 0,45 y 5,61 $\mu\text{g/L}$ en el agua potable del sur de California. No solamente los organismos acuáticos bioacumulan estos compuestos, se han encontrado hasta 445 ng/g de oxibenzona y octinoxato en lípidos de leche humana (Kunz y Fent, 2006). A la fecha, no se han reportado estudios sobre las concentraciones de compuestos bloqueadores en aguas y peces de lagunas arrecifales de un destino de turismo masivo como la Riviera Maya, lo que dificulta la evaluación de la relevancia ambiental para esta zona. Tomando en cuenta el elevado número de turistas que visitan la zona, las deficiencias del sistema general de tratamiento de aguas negras y el carácter cárstico del subsuelo, parece razonable esperar concentraciones de filtros UV iguales o mayores a las reportadas en Europa, Estados Unidos y Japón.

Los niveles de expresión genética del gen de VTG aislado inducido por los diferentes tratamientos se midieron por PCR en tiempo real usando los genes de β -actina y 18S como referencia en el bioensayo preliminar. En el bioensayo final se decidió analizar la inducción de VTG usando β -actina como gen de referencia. La selección del gen de referencia es un paso crítico para la validación de los resultados. Aunque Filby y sus colaboradores (2007) recomiendan el uso de 18S como gen de referencia en estudios estrogénicos, basándose en un cambio de expresión de β -actina en organismos expuestos a 17α -etinilestradiol, los C_{ts} obtenidos para β -actina en el bioensayo preliminar no variaron entre los tratamientos. En el estudio preliminar, el promedio de los C_{ts} obtenido para β -actina fue de 19,8 con una desviación estándar de 1,2 cuando los C_{ts} de 18S dieron una mayor variación con $9,08 \pm 2,07$. En las dosis empleadas en este estudio, ni E_2 ni los filtros UV tuvieron efecto en la expresión de β -actina, lo cual permite

pensar que su uso como gen de referencia fue adecuado. Permanece esencial realizar este tipo de pruebas antes de cualquier estudio para evitar utilizar un gen de referencia inapropiado ya que el gen de referencia ideal e universal no existe (Vandesompele *et al.*, 2002).

La mayoría de las expresiones relativas del gen de VTG en los hígados de los juveniles de sargentos expuestos no resultaron significativamente diferentes del control negativo. Únicamente en la dosis baja de Oxibenzona (5 µg/g PH) y el control positivo de E₂ se alcanzaron expresiones estadísticamente diferentes. La expresión relativa de VTG para la dosis baja de Oxibenzona fue unas 100 veces inferior a la expresión del control positivo. Por ser una técnica relativamente nueva, pocos estudios han reportado resultados de expresión genética relativa de VTG medida por PCR en tiempo real. Los niveles de expresión de VTG obtenidos para el control positivo fueron comparables con los niveles medidos por Jin *et al.* (2010) y Meng *et al.* (2010) en hígados de peces cebras machos expuestos a E₂ y xenoestrógenos. Por lo tanto, dadas las eficiencias de las lecturas, la ausencia de dímeros, la diferencia significativa del control positivo y las comparaciones con otros escasos trabajos, se deduce que las lecturas de PCR en tiempo real fueron confiables. En este estudio, no se pudo entonces observar expresión relativa de VTG debida a los compuestos bloqueadores solares, a la excepción de una ligera inducción en el tratamiento de Oxibenzona a 5 µg/g PH.

La síntesis de la proteína de VTG se midió usando el método adaptado de fosfatos lábiles al álcali (ALP por sus siglas en ingles) Gagné y Blaise (2000) y Hallgren *et al.* (2009).

Kramer *et al.*, (1998) reportaron niveles de hasta 2 mg/ml de VTG (medido por ALP) en el plasma de *Pimephales promelas* machos inducidos por E₂ a 5 ng/L. Por su parte, Leañón-Castañeda y sus colaboradores reportaron en 2007 niveles de 500 µg/ml (medido por ALP) en tilapias machos (*Oreochromis niloticus*) inducidos por dosis de E₂ parecida a la dosis empleada en el presente estudio (5 µg/g PH). En otro estudio, y usando esta vez la trucha como organismo expuesto, Leañón-Castañeda y Van der Kraak (2007) reportaron niveles de 10³ ng/ml de VTG en hepatocitos (medido esta vez por ELISA) de machos inducidos por la misma dosis de E₂ que el estudio anterior. Un estudio similar de Shilling y Williams (2000), empleando truchas, reportó niveles de 10³ ng/ml en hígados de machos (medido por ELISA). En hembras carpas (*Cyprinus carpio*) inducidas con E₂, Navas y Segner (2006) midieron niveles de 0,6µg/ml de VTG en sus hepatocitos (empleando ELISA). En hepatocitos de trucha *O. mykiss*, midieron de 7 a 19 µg/mg expuestos a concentraciones de E₂ de 10⁻⁵ a 10¹ M (Navas y Segner, 2006). La respuesta de vitelogenina también se usa como biomarcador en moluscos y gasterópodos. Aquí también se pudieron observar variaciones de niveles de la proteína, en el mejillón *Elliptio complanata* expuesto a nanomoles de E₂, Gagné y Blaise (2005), después de 72h, midieron por ALP concentraciones de 25 a 40 µg/ml de VTG. Gagnaire *et al.* (2009) estudiaron la VTG en diferentes especies de gasteropodos y reportaron resultados del orden de décimas de mg de ALP/mg. Los niveles de VTG medidos en plasma y hepatocitos parecen variar ampliamente dependiendo de la especie, del sexo y del tejido analizado pero no del método utilizado para medirla. El método ELISA parece tener mayor sensibilidad en concentraciones bajas, pero ALP es por mucho más accesible. En los hígados de los sargentos juveniles expuestos en este estudio se reportaron valores de alrededor de 5 µg/ml, significativamente diferentes del control negativo y ligeramente inferior al control positivo, correspondiendo al amplio intervalo

de resultados de la literatura. Los compuestos bloqueadores indujeron vitelogenesis en todas las concentraciones y en la mezcla. El grupo de Molina-Molina (2008) observó resultados similares *in vitro*, usando ELISA, estudiando el efecto de derivados de la benzofenona; una exposición de 10µg/ml resultó en una síntesis de entre 10 y 100 ng/ml dependiendo del compuesto. En las dosis altas (50 µg/g PH) se pudo observar una ligera disminución de respuesta, aunque no sea estadísticamente significativa, se pudo notar una tendencia. Molina-Molina *et al.* (2008) reportaron eventos citotóxicos causados por dos derivados de benzofenona a dosis altas, los cuales resultaron en una reducción marcada de la síntesis de VTG. De manera paralela a este estudio, se pudieron observar efectos de toxicidad de los compuestos estudiados, la discusión de estas observaciones se encuentran en el Anexo V; pudo conllevar una subestimación de la inducción de la síntesis de VTG.

En resumen, tanto en los resultados del bioensayo preliminar y del bioensayo final, se observó una ausencia de expresión genética de VTG inducida por los bloqueadores pero niveles de proteína ALP similares a los niveles inducidos por E₂ y xenoestrógenos de otros estudios.

A continuación se describen diferentes explicaciones de las causas de estas discrepancias entre las respuestas.

De manera simplificada, la vitelogenina se sintetiza en el hígado por inducción de su gen codificante por elementos de respuestas formados por E₂ en los receptores de estrógeno (Clelland y Peng, 2009), es una cadena compleja de reacciones. La exposición de los organismos a E₂ y los compuestos bloqueadores fue puntual y duró 96 horas, al final de las cuales se sacrificaron los organismos y se les midió dos etapas importantes de esta cadena de reacciones: la inducción de la expresión del gen y el producto final, la proteína sintetizada. Otros trabajos han observado este tipo de respuesta, existe un desfase entre la síntesis de la proteína y la expresión genética. Hyndman *et al.* (2010) estudiaron el efecto E₂ en la vitelogenesis de machos *Pimephales promelas*, variando las dosis de exposición pero también los tiempos. En los tratamientos que no habían recibido una exposición algunos días antes del final del bioensayo fue imposible medir la expresión genética de VTG pero sí el nivel de la proteína en el plasma. En 2002, Schmid y sus colaboradores realizaron un estudio de cinética de la vitelogenesis en machos *P.promelas*. Descubrieron un efecto de saturación de la producción de mARN seguida de una rápida reducción tres días después de la exposición. Parece coincidir con los tiempos requeridos para la síntesis de vitelogenina en diferentes especies de peces reportados por Navas y Segner (2006). En la trucha *O.mykiss*, Vaillant *et al.* (1988) lograron determinar un tiempo de dos horas para la inducción del mARN por Dot Blot y un tiempo de 20 horas para la síntesis de la proteína por método RIA, otros estudios, usando ELISA y ALP reportan tiempos de 24 a 96 horas (Navas y Segner, 2006). Debido a este desfase entre la expresión genética y los niveles de proteína, Scholz *et al.* (2004) recomiendan la cuantificación de los niveles de proteína por ELISA para estudios duraderos, en exposiciones cortas la detección del mARN puede ser suficiente. El retraso o desfase entre las dos respuestas reportado en otros trabajos probablemente fue lo que se pudo observar en los resultados de este estudio.

Por otra parte, se han descubierto varios genes codificantes de vitelogenina en diversas especies de peces, entre ellas, especies de labridos que dieron consensos altos en las alineaciones contra la secuencia aislada de *A.saxatilis* (Finn *et al.*, 2009). Es altamente posible que *A.saxatilis* no sea una excepción y también tenga varias secuencias de gen

de VTG. El pez cebra (*Danio rerio*) es una de las especies en las cuales las variantes de gen de VTG se ha estudiado ampliamente. Los grupos de Wang *et al.* (2005) y Tong *et al.* (2004) han establecido que los diferentes genes de VTG se expresaban diferencialmente según el sexo, el tejido y las dosis de E₂ en esta especie.

La regulación transcripcional se debe a la interacción directa de los receptores de estrógenos (ER por sus siglas en inglés) con los compuestos hormonales y el sistema transcripcional celular; son el enlace entre el E₂, la expresión genética y la cadena de mecanismos que desembocan en la síntesis de proteína (Brzozowski *et al.*, 1997). En mamíferos existen dos formas de ER: α y β, pero en peces, debido un evento de duplicación del genoma se han encontrado dos formas de ERβ llamados ERβ1 y ERβ2. Los ER se encuentran en diferentes tejidos "claves" del organismo: ovarios, testículos, hígado y cerebro entre los más estudiados. El reconocimiento de la hormona por el receptor se da por la complementariedad entre la cavidad del ligante y la parte no polar de E₂ que adopta entonces una formación de baja energía (Kah, 2009). Desafortunadamente, este receptor parece ser poco selectivo y se puede relacionar con una variedad de compuestos xenoestrogenos. Debido a la menor complementariedad que la hormona con el receptor, estos xenoestrogenos tienden en inducir menores respuestas que E₂ (Lawrence y Hemingway, 2003).

Recientemente, Meng *et al.* (2010) comprobaron que los receptores de estrógeno (ER) también tienen influencia diferencial en los genes de VTG del pez cebra. En hígados de hembras, los receptores ERα expresaron en niveles superiores a los genes de VTG, cuando en machos los receptores ERβ2 fueron los mayores responsables de su expresión. Así, los ER parecen tener afinidades diferentes según el tejido y el sexo; en 1999, Loomis y Thomas descubrieron un ER en los testículos del *Micropogonias undulatus* con mayor afinidad al E₂ y niveles de saturación muy bajos. El equipo de Hawkins (2000) identificó el ER del *M.undulatus* como un ERγ cuya expresión es mayor en las gónadas (ovarios y testis). Muchos sospechan que el ERγ y el ERβ2 sean finalmente el mismo tipo de ER. Los ER también tienen variantes de genes, estas isoformas se deben probablemente a un evento de duplicación del genoma de los peces antes de la evolución de los teleósteos (Nagler *et al.*, 2007). Varios equipos de investigación se han empeñado en descubrir cual de los ER tenía mayor influencia en la síntesis de la VTG por E₂ y potenciales xenoestrógenos. Usando compuestos agonistas y antagonistas por cada subtipo de ER expuestos a E₂, los investigadores han intentado aislar la respuesta de vitelogenesis. Muchos estudios apuntan hacia una implicación del ERα en la síntesis de VTG en el hígado inducida por E₂ (Marlatt *et al.*, 2010 para un resumen de varios estudios, Davis *et al.*, 2008) en varias especies de peces (*D.rerio*, *P.promelas*, *O. mossambicus*, *S.salar*). La mayoría de estos trabajos midieron las expresiones relativas de los genes de los subtipos de ER y de VTG, pero cuando Leañosa-Castañeda y Van Der Kraak en 2007 estudiaron los niveles de la proteína *de facto* sintetizada y las expresiones de los ER, encontraron un papel predominante de ERβ. En efecto, aunque ERα se haya expresado en niveles superiores a ERβ, no resultó en una síntesis de la proteína significativa, cuando ERβ pareció ser directamente relacionado a los niveles de VTG proporcionalmente a las concentraciones de exposición. Estos resultados son particularmente interesante en vista del presente trabajo, en efecto, Schreurs *et al.* (2005) y Molina-Molina *et al.* (2008) estudiando los efectos estrogénicos de varios filtros UV *in vitro* han demostrado que la oxibenzona y el octinoxato tienen mayor afinidad hacia el ERβ. Existen entonces varios genes de VTG, varios genes de ER y

se expresan diferencialmente según la especie, el sexo, el tejido y el compuesto de exposición.

Adicionalmente, rutas no transcripcionales o no genómicas de acción de los estrógenos han sido descubiertas. En efecto, ER asociados a la membrana pueden activar eventos rápidos paralelos de transducción de varias quinasas (MAPK, PKC y PI3K entre otras), influir en los canales iónicos y activar el grupo de proteína G (Kah, 2009, Wessler *et al.*, 2006). El mecanismo no transcripcional inducido por E₂, es decir sin una expresión genética ni producción de ARN, sigue poco entendido pero su función principal parece estar relacionada con el crecimiento celular (Levin, 2002). Estudios con células de cáncer de mama MCF-7 han demostrado que el E₂ y la progestina podían inducir de manera no transcripcional la síntesis de ADN, influyendo así en la proliferación celular (Castoria *et al.*, 1999). Simoncini *et al.* (2004) descubrieron un efecto protector no transcripcional del E₂ en el sistema cardiovascular de varios vertebrados por regulación del óxido nítrico. Xenoestrogenos también pueden tener impactos no transcripcionales, Silva *et al.* (2010) pusieron en evidencia este tipo de rutas tras la exposición de células MCF-7 con DDT, HCH y DDE. Dada la variedad de respuestas obtenidas, dedujeron que la habilidad de inducir los dos tipos de rutas (transcripcional y no-transcripcional) depende de las características del compuesto y de su interacción con el ER. La intervención de este tipo de mecanismo no transcripcional puede parecer una opción atractiva para explicar la ausencia de expresión genética contra la presencia de la proteína de VTG observadas en este estudio. No obstante, recientemente, Nagler y sus colegas (2010) estudiaron la posibilidad de una vía no transcripcional para la síntesis de la vitelogenina en hepatocitos de trucha. Realizaron extensos bioensayos *in vitro* e *in vivo* usando estradiol tratado especialmente para que se ligue a los ER de la membrana. Los resultados que obtuvieron no dejan mucho lugar a esta hipótesis; la síntesis de VTG siempre fue relacionada a la vía transcripcional por los ER nucleares. Claro esta que pueden existir diferencias entre especies pero la explicación no transcripcional para la obtención de VTG no parece sostenerse.

Para concluir, la discrepancia de resultados obtenida en este trabajo se puede entonces deber :

- Al desfase entre la expresión genética y la síntesis de la proteína, la exposición habiendo sido por única inyección y las respuestas medidas 96h después, es probable los niveles de mRNA de VTG hayan disminuido rápidamente y no se hayan podido medir.
- A la expresión diferencial de otros genes de VTG, donde el parcial del gen secuenciado fue inducido por E₂ pero no por los filtros UV; otros genes de VTG pudieron ser expresados por los filtros UV.
- A la diferencia de afinidad de E₂ y los filtros UV hacia los diferentes subtipos de ER, influenciando así la expresión del gen de VTG.
- A un impacto diferencial de tejido. Aquí, solamente el hígado se analizó; es probable que la expresión del gen de VTG haya sido diferente en otros tejidos.

Los bioensayos realizados en este estudio revelaron que la oxibenzona, el octinoxato, el octisalato, solos o en mezcla tuvieron efecto estrogénico induciendo la síntesis de la vitelogenina en juveniles de *A.saxatilis*. Estos resultados correspondieron con una amplia literatura de estudios realizados tanto *in vitro* como *in vivo* sobre los efectos estrogénicos de la oxibenzona y del octinoxato (Kunz y Fent, 2006, Axelstad *et al.*, 2011).

Desafortunadamente, hasta la fecha, pocas publicaciones son disponibles en cuanto a los efectos del octisalato. Los trabajos que estudiaron el octisalato reportaron resultados contradictorios. Por ejemplo, Díaz-Cruz y Barceló (2009) descubrieron en estudios *in vitro* usando receptores estrogénico y androgénico de levadura que la oxibenzona y el octinoxato tenían efectos estrogénicos, antiestrogénico y antiandrogénico, cuando el octisalato presentó efectos antiestrogénico, androgénico pero también antiandrogénico. Morohoshi *et al.* (2005) usando métodos similares reportan una actividad estrogénica de la oxibenzona y del octisalato pero ninguna del octinoxato. Schlenk *et al.* (2005) llamaron la atención sobre la tendencia de los estudios *in vitro* en subestimar el efecto estrogénico de varios xenoestrógenos. Los filtros UV parecen tener múltiples actividades hormonales cuyas magnitudes dependen considerablemente de los bioensayos realizados (*in vitro/in vivo*, concentraciones o dosis de exposición, especie modelo, parámetro estudiado). Aunque sus mecanismos de toxicidad sean diferentes, los compuestos bloqueadores de UV se encontraron en niveles comparables a los muy estudiados bifenilos policlorinados (PCBs) y diclorodifeniltricloroetano (DDT) en lípidos de peces (Heneweer *et al.*, 2005). La concientización de la importancia de protegerse de los rayos UV para prevenir problemas dermatológicos como el carcinoma, lleva a un uso mayor de productos conteniendo compuestos filtros de UV (Burnett y Wang, 2011), aunque sus riesgos hacia la salud ambiental todavía no estén claramente identificados. Investigaciones como ésta son entonces esenciales para un mejor entendimiento del comportamiento de los bloqueadores solares, solos y en mezcla, ya que se añaden a la lista siempre creciente de compuestos con efectos hormonales en el ambiente y el humano.

II. Conclusiones y recomendaciones

Varias conclusiones pudieron surgir de este estudio:

-Se logró obtener secuencias parciales de los genes de β -actina, 18S y de VTG y se reportaron en el GenBank del NCBI. Proseguir con estudios genómicos en *Abudefduf saxatilis* permitirían descubrir si en esta especie también existen variantes genéticas de VTG pudiendo participar a la vitelogénesis.

-La oxibenzona, el octinoxato y el octisalato a dosis de 5, 25 y 50 $\mu\text{g/g}$ PH pueden inducir la síntesis de VTG en hígado de juveniles de *A.saxatilis*, verificando así parcialmente la hipótesis formulada para esta investigación. Mediciones de la concentración de los compuestos en las lagunas arrecifales de Quintana Roo, y de manera ampliada, del Caribe, ayudarían a ajustar estas dosis a niveles ambientalmente relevantes y identificar así el riesgo ambiental que representan.

-Los procesos moleculares de tal efecto no pudieron ser establecidos, no se observó expresión del gen de VTG secuenciado. La complejidad de las acciones de xenoestrógenos en el eje endocrino necesita estudios aprofundizados para determinar la relación entre la afinidad hacia los receptores de estrógeno, las variantes de genes de VTG, los tejidos y el impacto sobre la síntesis de la proteína.

-Los filtros UV tuvieron efectos estrogénicos en las dosis empleadas en este estudio, se recomienda proseguir las investigaciones en este tema ya que estos compuestos son ampliamente utilizados y hasta ahora siguen siendo la mayor protección contra los efectos dañinos de la radiación solar. Los resultados pueden ayudar a la toma de decisión de los reguladores en el ámbito de la salud humana y ambiental.

F. Referencias

- Almada Villela PC, PF Sale, G Gold Bouchot and B Kjerfve, 2003. Manual of methods for the MBRS synoptic monitoring program. MBRS Technical document No4.
- Axelstad M, J Boberg, KS Hougaard, S Christiansen, P Rosenskjold Jacobsen, K Riiber Mandrup, C Nellemann, SP Lund and U Hass, 2011. Effects of pre and post natal exposure to the UV filter Octyl Methoxycinnamate OMC on the reproductive, auditory and neurological development of rat offspring. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 250, 278-290.
- Balmer M, Buser HR, Müller MD and Poiger T, 2005. Occurrence of some organic UV filters in wastewater, surface waters and in fish from Swiss lakes. *Environmental Sciences Technologies*. No 39, 953-962.
- Barucca M, A Canapa, E Olmo and F Regoli, 2006. Analysis of vitellogenin gene induction as a valuable biomarker of estrogenic exposure in various Mediterranean fish species. *Environmental Research*, No 101, 68-73.
- Brzozowski AM, ACW Pike, Z Dauter, RE Hubbard, T Bonn, O Engstrom, L Ohman, GL Greene, JA Gustafsson and M Carlquist, 1997. Molecular basis of agonism and antagonism in the estrogen receptor. *Nature*, 389, 753-758.
- Burnett ME and SQ Wang, 2011. Current sunscreen controversies: a critical review. *Photodermatology, Photoimmunology and Photomedicine*, 27, 58-67.
- Bustin SA, 2005. Real Time PCR. *Encyclopedia of Diagnostic Genomics and Proteomics*. DOI 10.1081, 1117-1125.
- Carson R, 1962. *Silent spring*. Ed. First Mariner Books 2002 NY. ISBN 0-618-25305-x.
- Castoria G, MV Barone, M Di Domenico, A Bilancio, D Ametrano, A Migliaccio and F Auricchio, 1999. Non transcriptional action of oestradiol and progestin triggers DNA synthesis. *EMBO Journal*, 18 (9), 2500-2510.
- Cheek AO, TH Brouwer, S Carroll, S Manning, JA McLacjlan and M Brouwer, 2001. Experimental evaluation of vitellogenin as a predictive biomarker for reproductive disruption. *Environmental Health Perspectives*, Vol 109, No 7, 681-690.
- Clelland E and C Peng, 2009. Endocrine/paracrine control of zebrafish ovarian development. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 312, 42-52.
- Colborn T, D Dumanoski and JP Myers, 1996. *Our Stolen Future*. Ed. Dutton, Penguin Books NY. ISBN 0-525-93982-2.
- Coronado M, H De Haro, Xin Deng, M A Rempel, R Lavado and D Schlenk, 2008. Estrogenic activity and reproductive effects of the UV filter oxybenzone(2-hydroxy-4-methoxyphenyl-methanone) in fish. *Aquatic Toxicology*, doi:10-1016/j.aquatox.2008.08.018.
- Crain A, Aw Rooney, Ed Orlando and L Guillette Jr, 2000. Endocrine disrupting contaminants and hormone dynamics: lessons from wildlife. *In Environmental endocrine disruptors: an evolutionary perspective*, Ed. Guillette and Crain, Pub. Taylor and Francis. ISBN: 1-56032-571-2.
- Cummings William Charles, 1968. Reproductive habits of the sergeant major *Abudefduf saxatilis* with comparative notes on four other damselfishes in the Bahamas islands. PhD Dissertation. University of Miami, Coral Gables, Florida.
- Danovaro R, La Bongiorno, C Corinaldesi, D Giovanelli, E Damiani, P Astolfi, L Greci and A Pusceddu, 2008. Sunscreens cause coral bleaching by promoting viral infections. *Environmental Health Perspectives*, Vol 116, No 4, 441-447.

- Davis LK, AL Pierce, N Hiramatsu, CV Sullivan, T Hirano and EG Grau, 2008. Gender specific expression of multiple estrogen receptors, growth hormone receptors, insulin like growth factors and vitellogenins, and effects of 17 β estradiol in the male tilapia (*Oreochromis mossambicus*). *General and Comparative Endocrinology*, 156, 544-551.
- Díaz Cruz S and D Barceló, 2009. Chemical analysis and ecotoxicological effects of organic UV absorbing compounds in aquatic ecosystems. *Trends in Analytical Chemistry*, Vol 28, No 6, 708-717.
- Ferreira F, MMSantos, L Filipe Castro, MA Reis Henriques, D Lima, MN Vieira and NM Monteiro, 2009. Vitellogenin gene expression in the intertidal blenny *Lipophrys polis*: a new sentinel species for estrogenic chemical pollution monitoring in the European Atlantic coast? *Comparative Biochemistry and Physiology Part C*, No149, 58-64.
- Filby AL, KL Thorpe, G Maack and CR Tyler, 2007. Gene expression profiles revealing the mechanisms of antiandrogen and estrogen induced feminization in fish. *Aquatic Toxicology*, 81, 219-231.
- Finn RN, J Kolarevic, H Kongshaug and F Nilsen, 2009. Evolution and differential expression of a vertebrate vitellogenin gene cluster. *BMC Evolutionary Biology*, 9:2.
- Fossi C, S Casini, L Marsili, S Ancora, G Mori, G Neri, T Romeo and A Ausili, 2004. Evaluation of ecotoxicological effects of endocrine disruptors during a four year survey of the Mediterranean population of swordfish *Xiphias gladius*. *Marine environmental research*, No 58, 425-429.
- Gagnaire B, F Gagné, C André, C Blaise, K Abbaci, H Budzinski, M H Dévier and JGarric, 2009. Development of biomarkers of stress related to endocrine disruptions in gastropods: Alkali labile phosphates, protein bound lipids and vitellogenin like proteins. *Aquatic toxicology*, Vol 92, 155-167.
- Gagné F and C Blaise, 2000. Organic Alkali Labile Phosphates in biological materials: a generic assay to detect vitellogenin in biological tissues. Environment Canada, Technical Methods Section, John Wiley and Sons, Inc, 243-247.
- Gagné F and C Blaise, 2005. Increased vitellogenin gene expression in the mussel *Elliptio complanata* exposed to 17 β -estradiol. *Frenesius Environ. Bull* 14 (10), 861-866.
- Gallagher SR and PR Desjardins, 2006. Quantitation of DNA and RNA with absorption and fluorescence spectroscopy. *Current protocols in Molecular Biology*, A3D.1-A3D.21.
- Ginzinger DG, 2002. Gene quantification using real time quantitative PCR: An emerging technology hits the mainstream. *Experimental Hematology*, 30, 503-512.
- Giokas D, A Salvador and A Chisvert, 2007. UV Filters: From sunscreens to human body and the environment. *Trends in Analytical Chemistry*, Vol. 26, No 5, 360-374.
- Goksoyr A, Arukwe A, Larsson J, Cajaraville MP, Hauser L, Nilsen BM, Lowe D and Matthiessen P, 2003. Molecular/Cellular Processes and the impact on reproduction. *In Effects of pollution on fish: Molecular effects and population responses*. Ed. Lawrence A and Hemingway K.
- Gore Andrea C, 2007. Introduction to endocrine disrupting chemicals. *In Endocrine disrupting chemicals: From basic research to clinical practice*. Ed. AC Gore. Humana Press Inc, Totowa, NJ.

- Green S and Chambon P, 1996. The oestrogen receptor: from perception to mechanism. In MG Parker (Ed), Nuclear Hormone receptors, 15-38. London Academic Press.
- Guillette L J Jr and Gundersen MP, 2001. Alterations in development of reproductive and endocrine systems of wildlife populations exposed to endocrine disrupting contaminants. *Reproduction*, 122, 857-864.
- Hallgren P, L Martensson and L Mathiasson, 2009. Improved spectrophotometric vitellogenin determination via alkali labile phosphate in fish plasma- a cost effective approach for assessment of endocrine disruption. *Intern.J.Envirn.Anal.Chem.* Vol 89, No 14, 1023-1042.
- Hansen PD, H Dizer, B Hock, A Marx, J Sherry, M McMaster and C Blaise, 1998. Vitellogenin-a biomarker for endocrine disruptors. *Trends in Analytical chemistry*, Vol 17, No 7, 448-451.
- Hawkins MB, JW Thornton, D Crews, JK Skipper, A Dotte and P Thomas, 2000. Identificaton of a third distinct estrogen receptor and reclassification of estrogen receptors in teleosts. *PNAS*, 97 (20), 10751-10756.
- Heneweer M, M Muusse, M Van den Berg, JT Sanderson, 2005. Additive estrogenic effects of mixtures of frequently used UV filters on pS2-gene transcription in MCF-7 cells. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 208, 170-177.
- Higuchi R, C Fockler, G Dollinger and R watson, 1993. Kinetic PCR analysis: real-time monitoring of DNA amplification reactions. *Biotechnology*, 11, 1026-1030.
- Hyndman KM, A Biales, SE Bartell and HL Schoenfuss, 2010. *Aquatic Toxicology*, 96, 264-272.
- INEGI, 2008. México y sus municipios. ISBN 978-970-13-4999-1.
- Jin Y, L Shu, L Sun, W Liu and Z Fu, 2010. Temperature and photoperiod effects of ethilenestradiol, nonylphenol and their binary mixture in zebrafish (*Danio rerio*). *Comparative Biochemistry and Physiology, Part C*, 151, 258-263.
- Kah O, 2009. Endocrine targets of the hypothalamus and pituitary. In *Fish Neuroendocrinology: Volume 28. Fish Physiology*. DOI:10.1016/S1546-5098(09)28002-2
- Kameda Y, K Kimura and M Miyazaki, 2011. Occurrence and profiles of organic sun blocking agents in surface waters and sediments in Japanese rivers and lakes. *Environmental Pollution*, 159, 1570-1576.
- Kerr Lobel LM and Davis E, 2002. Immunohistochemical detection of PCBs in field collected damselfish embryos and larvae. *Environmental Pollution*. No120, 529-532.
- Kime DE , JP Nash and AP Scott, 1999. Vitellogenesis as a biomarker of reproductive disruption by xenobiotics. *Aquaculture*, No177, 345-352.
- Kramer VJ, S Miles Richardson, SL Pierens and JP Giesy, 1998. Reproductive impairment and induction of alkaline labile phosphate, a biomarker of estrogen exposure, in fathead minnows (*Pimephales promelas*) exposed to waterborne 17 β -estradiol. *Aquatic Toxicology*, 40, 335-360.
- Kubista M, JM Andrade, M Bengtsson, A Forootan , J Jonák, K Lind, R Sindelka, R Sjöback, B Sjögreen, L Strömbom, A Stahlberg and N Zoric, 2006. The real time polymerase chain reaction. *Molecular Aspects of Medicine*, 27, 95-125.
- Kunz P and K Fent, 2006. Estrogenic activity of UV filter mixtures. *Toxicology and Applied Pharmacology*, Vol 217, 86-99.

- Lawrence A and K Hemingway, 2003. Effects of pollution on fish: Molecular effects and population responses. Ed. Lawrence A and K Hemingway. Blackwell Pub. ISBN 0-632-06406-4.
- Leaños Castañeda O, G Van der Kraak, 2007. Functional characterization of estrogen receptor subtypes, ER α and ER β , mediating vitellogenin production in the liver of rainbow trout. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 224, 116-125.
- Leaños Castañeda O, G Van der Kraak, A Lister, Simá Alvarez R and G Gold Bouchot, 2002. o,p'-DDT induction of vitellogenesis and its inhibition by tamoxifen in Nile tilapia *Oreochromis niloticus*. *Marine Environmental Research*, 54, 703-707.
- Leaños Castañeda O, G Van der Kraak, R Rodríguez Canul and G Gold, 2007. Endocrine disruption mechanism of o-p'- DDT in mature male tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Toxicology and Applied Pharmacology*, 221, 158-167.
- Levin ER, 2002. Cellular functions of plasma membrane estrogen receptors. *Steroids* 67, 471-475.
- Loomis AK and P Thomas, 1999. Binding characteristics of estrogen receptor ER in Atlantic croaker (*Micropogonias undulatus*) testis: different affinity for estrogens and xenobiotics from that of hepatic ER. *Biology of reproduction*, 61, 51-60.
- Loraine GA and ME Pettigrove, 2006. Seasonal variations in concentrations of pharmaceuticals and personal care products in drinking water and reclaimed wastewater in southern California. *Environ. Sci. Technol.*, 40, 687-695.
- Marlatt VL, J Lakoff, K Crump, CJ Martyniuk, J Watt, L Jewell, S Atkinson, JM Blais, J Sherry, TW Moon and VL Trudeau, 2010. Sex- and tissue-specific effects of waterborne estrogen and estrogen receptor subtypes and E2-mediated gene expression in the reproductive axis of goldfish. *Comparative Biochemistry and Physiology, Part A*, 156, 92-101.
- Matozzo V, F Gagné, MG Marin, F Ricciardi and C Blaise, 2008. Vitellogenin as a biomarker of exposure to estrogenic compounds in aquatic invertebrates: a review. *Environmental international*, Vol 34, 531-545.
- Meng X, C Bartholomew and JA Craft, 2010. Differential expression of vitellogenin and estrogen receptor genes in the liver of zebrafish, *Danio rerio*. *Anal. Bioanal. Chem.*, 396, 625-630.
- Molina Molina JM, A Escande, A Pillon, E Gomez, F Pakdel, V Cavallès, N Olea, S Aït Aïssa, P Balaguer, 2008. Profiling of benzophenone derivatives using fish and human estrogen receptor specific in vitro bioassays. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 232, 384-395.
- Morohoshi K, H Yamamoto, R Kamata, F Shiraishi, T Koda and M Morita, 2005. Estrogenic activity of 37 components of commercial sunscreen lotions evaluated by in vitro assays. *Toxicology in Vitro*, 19, 457-469.
- Nagler JJ, T Cavileer, J Sullivan, DG Cyr and C Rexroad III, 2007. The complete nuclear estrogen receptor family in the rainbow trout: discovery of the novel ER α 2 and both ER β isoforms. *Gene* 392, 164-173.
- Nagler JJ, TL Davis, N Modi, MM Vijayan and I Schultz, 2010. Intracellular, not membrane, estrogen receptors control vitellogenin synthesis in the rainbow trout. *General and Comparative Endocrinology*, 167, 326-330.
- Navas JM and H Segner, 2006. Vitellogenin synthesis in primary cultures of fish liver cells as endpoint for in vitro screening of the anti estrogenic activity of chemicals substances. *Aquatic Toxicology*, 80, 1-22.

- Organización Mundial de la Salud, 2002. Global assessment of the state of the science of Endocrine Disrupters. Ed. T Damstra, S Barlow, A Bergman, R Kavlok and G Van der Kraak. WHO/PCS/EDC/02.2.
- Ortiz Zarragoitia M and MP Cajaraville, 2005. Effects of selected xenoestrogens on liver peroxisomes, vitellogenin levels and spermatogenic cell proliferation in male zebrafish. *Comparative Biochemistry and Physiology, Part C*, 141, 133-144.
- Pfaffl MW, 2001. A new Mathematical model for relative quantification in real time RT PCR. *Nucleic Acids Research*, 29, N°9.
- Pfaffl MW, 2006. Relative quantification. In *Real-time PCR*. Ed Tevftk Dorak. ISBN 1-415-37734-X.
- Prappas J, L Greene and R White, 1991. Reproductive behavior of the sergeant major, *abudehduf saxatilis* within a closed system. *Environmental biology of fishes*, Vol31, 33-40.
- Quenouille B, E Bermingham and S Planes, 2004. Molecular systematics of the damselfishes (Teleostei: Pomacentridae): Bayesian phylogenetic analyses of mitochondrial and nuclear DNA sequences. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 31, 66-88.
- Robertson Ross, 1988. Settlement and population dynamics of *Abudehduf saxatilis* on patch reefs in Caribbean Panama. *Proceedings of the 6th Coral Reef Symposium, Australia*, Vol.2, 839-844.
- Rodil R, S Schrader and M Moeder, 2009. Non porous membrane assisted liquid liquid extraction of UV filter compounds from water samples. *Journal of chromatography A*, No 1216, 4887-4894.
- Rodríguez Fuentes G, Luna Ramírez K and M Soto, 2010. Sunscreen use behaviour and most frequently used active ingredients among beachgoers in Cancún, Mexico. *WebmedCentral DERMATOLOGY* 2010;1(12):WMC001364
- Rotchell JM and GK Ostrander, 2003. Molecular markers of endocrine disruption in aquatic organisms. *Journal of Toxicology and Environmental Health, Part B*, No 6, 453-495.
- Saiki RK, S Scharf, F Faloona, KB Mullis, GT Horn, HA Erlich and N Arnheim, 1985. Enzymatic amplification of beta globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. *Science*, 230, 1350-1354.
- Schlenk D, Y Sapozhnikova, MA Irwin, L Xie, W Hwang, S Reddy, BJ Brownawell, J Armstrong, M Kelly, DE Montagne, AP Kolodziej, D Sedlak and S Snyder, 2005. In vivo bioassay-guided fractionation of marine sediment extracts from the southern california bight, USA, for estrogenic activity. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 24 (11), 2820-2826.
- Schlenk Daniel, 1999. Necessity of defining biomarkers for use in ecological risk assessments. *Marine Pollution Bulletin*, Vol 39, No1, 48-53.
- Schlumpf M, B Cotton, M Conscience, V Haller, B Steinmann and W Lichtensteiger, 2001. In vitro and in vivo estrogenicity of UV screens. *Environmental Health Perspectives*, Vol 109, No3, 239-244.
- Schlumpf M, P Schmidt, S Durrer, M Conscience, K Maerkel, M Henseler, M Gruetter, I Herzog, S Reolon, R Ceccatelli, O Faass, E Stutz, H Jarry, W Wuttke and W Lichtensteiger, 2004. Endocrine activity and developmental toxicity of cosmetic UV filters-an update. *Toxicology*, No 205, 113-122.

- Schmid T, J Gonzalez Valero, H Ruffi and DR Dietrich, 2002. Determination of vitellogenin kinetics in male fathead minnows (*Pimephales promelas*). *Toxicology Letters*, 131, 65-74.
- Scholz S, C Kordes, J Hamann and H O Gutzeit, 2004. Induction of vitellogenin in vivo and in vitro in the model teleost medaka (*Oryzias latipes*): comparison of gene expression and protein levels. *Marine Environmental Research*, Vol 57, 235-244.
- Scholz Stefan and Ian Mayer, 2008. Molecular biomarkers of endocrine disruption in small model fish. *Molecular and Cellular Endocrinology*, No 293, 57-70.
- Schreurs RHMM, E Sonneveld, JHJ Jansen, W Seinen and B Van der Burg, 2005. Interaction of polycyclic musks and UV filters with the estrogen receptor ER, androgen receptor AR and progesterone receptor PR in reporter gene bioassays. *Toxicological sciences*, 83, 264-272.
- Shilling AD and Williams DE, 2000. Determining relative estrogenicity by quantifying vitellogenin induction in rainbow trout liver slices. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 164, 330-335.
- Silva E, A Kabil and A Kortenkamp, 2010. Cross-talk between non genomic and genomic signalling pathways-Distinct effect profiles of environmental estrogens. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 245, 160-170.
- Simoncini T, P Mannella, L Fornari, A Caruso, G Varone and AR Genazzani, 2004. Genomic and non genomic effects of estrogens on endothelial cells. *Steroids* 69, 537-542.
- Stanton MG, 1968. Colorimetric determination of inorganic phosphate in the presence of biological material and adenosine triphosphate. *Analytical Biochemistry* 2, 27-34.
- Sumpter John P, 1998. Xenoendocrine dsirupters-environmenta impacts. *Toxicology letters*. Vol 102, 337-342.
- Sumpter John P, 2005. Endocrine disrupters in the aquatic environment: an overview. *Acta hydrochim.hydrobiol*, Vol 33, No1, 9-16.
- Sumptler J and A C Johnson, 2005. Lessons from endocrine disruption and their application to other issues concerning trace organics in the aquatic environment. *Environmental Science and Technology*, Vol 39, No 12, 4321-4331.
- Tillitt DE, KR Solomon, EM Mihaich, G Cobb, L Touart and TJ Kubiak, 1998. Role of exposure assessment in characterizing risks of endocrine dsiruting substances to wildlife. *In Principles and processes for evaluating endocrine disruption in wildlife*. Ed. Kendall R, Dickerson R, Giesy J ans Suk W. SETAC publishing. ISBN 1-880611-17-1
- Tong Y, T Shan, YK Poh, T Yan, H Wang, SH Lam and Z Gong, 2004. Molecular cloning of zebrafish and medaka vitellogenin genes and comparison of their expression in response to 17 β -estradiol. *Gene* 328, 25-36.
- Vaillant C, C Le Guellec, F Pakdel and Y Valotaire, 1988. Vitellogenin gene expression in primary culture of male rainbow trout hepatocytes. *Gen. Comp. Endocrinol.*, 70, 284-290.
- Van der Kraak G, T Zacharewski, D Janz, B Sanders and J Gooch, 1998. Comparative endocrinology and mechanisms of endocrine modulation in fish and wildlife. *In Principles and processes for evaluating endocrine disruption in wildlife*. Ed. Kendall R, Dickerson R, Giesy J ans Suk W. SETAC publishing. ISBN 1-880611-17-1
- Van der Oost R, Jonny Br and NPE Vermeulen, 2003. Fish bioaccumulation and biomarker in environmental risk assessment: a review. *Environmental oxicology and Pharmacology*, No 13, 57-149.

- Vandesompele J, K De Preter, F Pattyn, B Poppe, N Van Roy, A De Paepe and F Speleman, 2002. Accurate normalization of real time quantitative RT PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. *Genome Biology* 3, 7, 0034.I-0034.II.
- Vega López A, L Martínez Tabche, ML Domínguez López, E García Latorre, E Ramón Gallegos and A García Gasca, 2006. Vitellogenin induction in the endangered goodeid fish *Girardinichthys viviparus*: Vitellogenin characterization and estrogenic effects of polycarbonated biphenyls. *Comparative Biochemistry and physiology, Part C, Vol 142*, 356-364.
- Wang H, JTT Tan, A Emelyanov, V Korzh and Z Gong, 2005. Hepatic and extrahepatic expression of vitellogenin genes in the zebrafish *Danio rerio*. *Gene* 356, 91-100.
- Weisbrod CJ, Kunz PY, AK Zenker and K Fent, 2007. Effects of UV filter benzophenone on reproduction in fish. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 225, 255-266.
- Wessler S, C Otto, N Wilck, V Stangl and KH Fritze-meier, 2006. Identification of estrogen receptor ligands leading to activation of non genomic signaling pathways while exhibiting only weak transcriptional activity. *Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*, 98, 25-35.
- Wong ML and JF Medrano, 2005. Real time PCR for mRNA quantitation. *Biotechniques*, 39, 1-11.
- Woods M, A Kumar, M Barton, A Woods and R Kookana, 2009. Localisation of estrogen responsive genes in the liver and testis of Murray rainbowfish *Melanotaenia fluviatilis* exposed to 17 β -estradiol. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 303, 57-66.
- Zapata-Perez O, V Ceja Moreno, M Roca Olmos, M T Pérez, M del Río-García, Mario Yarto, A Mendoza-Cantú, A I Ize-Iema, A Gavilán-García, Sanchez Teyer, L. Felipe and G Gold-Bouchot, 2007. Ecotoxicological effects of POPs on ariidae *Ariopsis felis* (Linnaeus, 1766) from three coastal ecosystems in the Southern Gulf of Mexico and Yucatan Peninsula. *Journal of Environmental Science and Health Part A, No 42*, 1513-1520.
- Zardoya R, DM Vollmer, C Craddock, J T Streelman, S Karl and A Meyer, 1996. Evolutionary conservation of microsatellite flanking regions and their use in resolving the phylogeny of cichlid fishes (Pisces: Perciformes). *Proc. R. Soc. London, B*, 263, 1589-1598.

Anexo I Eclosión y cultivo de *Artemia salina*

Los nauplios de artemia constituyen un alimento vivo ideal para el mantenimiento de diversos organismos acuáticos, incluyendo los peces. Para lograr una mayor eficiencia de eclosión se recomienda proceder a la “desencapsulación” de los quistes deshidratados:

- Pesar aproximadamente un gramo de quistes.
- Colocarlos en un solución al 10% de Cloro comercial y agitar ligeramente hasta que los quistes tomen un color naranja.
- Filtrar los quistes y enjuagar con agua limpia hasta que haya desaparecido el olor del Cloro, los quistes están ahora desencapsulados y limpios.
- Resuspender los quistes en un envase de 2 litros con agua de mar (de salinidad 35) y fuerte y mantenida aeración. Una botella de refresco volteada funciona perfectamente.
- La mayoría de los quistes habrán eclosionado de 24 a 36 horas después de su resuspensión en el agua de mar.
- Apagar la aeración y recolectar los nauplios de artemia, acercando una luz al envase se concentran los organismos eclosionados y vivos.
- Distribuir en los estanques
- Provecho

Anexo II Preferencias de codificación bases/aminoácidos

R	cgc	33.33 %
	agg	29.17 %
	aga	16.67 %
	cgt	16.67 %
	cgg	4.17 %

W	tgg	100 %
---	-----	-------

D	gac	66.67 %
	gat	33.33 %

G	gga	51.72 %
	ggg	20.69 %
	ggc	20.69 %
	ggt	6.90 %

N	aac	81.25 %
	aat	18.75 %

A	gcc	47.06 %
	gct	23.53 %
	gca	17.65 %
	gcg	11.76 %

Y	tac	77.27 %
	tat	22.73 %

L	ctg	64.15 %
	ctc	18.87 %
	ttg	9.43 %
	ctt	3.77 %
	cta	1.89 %
	tta	1.89 %

H	cac	64.29 %
	cat	35.71 %

Anexo III Extracción de RNA con Gen Elute Mammalian Total RNA Minipreparation Kit

Protocolo para: tejido fresco, congelado y estabilizado con RNA later

Se emplearon aproximadamente 40 mg de muestra

1. Transferir el tejido a un tubo nuevo
2. Agregar 500 ul de solución de lisis previamente preparada con 2-mercaptoetanol y mezclar hasta que no queden pedazos visibles de tejido (agregar 10 ul de 2-mercaptoetanol por cada 1 ml de solución de lisis)
3. Transferir el homogeneizado a un tubo Gen Elute Filtration (tubo azul)
4. Centrifugar a máxima velocidad 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 500 ul de etanol (grado biología molecular) al 70% Agitar con vortex
6. Transferir 700 ul de la solución (homogeneizado con reactivos) a una columna Gen Elute Binding Column (transparente con un O-ring rojo).
7. Centrifugar a máxima velocidad por 15 segundos. Tirar el sobrenadante y quedarse con la columna
8. Si falta más volumen por transferir, repetir el paso 6 y 7
9. Pasar la columna a un nuevo Collection Tube
10. Agregar 500 ul de Wash Solution II previamente preparado con etanol
11. Centrifugar a velocidad máxima por 15 segundos. Tirar el sobrenadante, quedarse con el tubo
12. Agregar otros 500 ul de Wash Solution II y centrifugar a máxima velocidad por 2 minutos para secar la columna
13. Para asegurar el secado de la columna tirar el sobrenadante y volver a centrifugar la columna por 1 minuto
14. Transferir la columna a un nuevo tubo "collection tube"
15. Agregar 40 ul de solución para eluir (Elute solution), centrifugar a máxima velocidad por 1 minuto
16. El RNA ya está listo en el sobrenadante. Es muy importante ponerlo en hielo mientras se usa o guardarlo a -70 °C para su posterior cuantificación / uso.

Anexo IV Retrotranscripciòn con Super Script III Platinum two steps kit

El kit cuenta con todos los reactivos necesarios para realizar la retrotranscripciòn. Los reactivos ya vienen listos, no se necesita prepararlos ni adicionar nada extra. Se deben mantener en congelaciòn, a -20 °C y la enzima solo se debe sacar al momento de utilizarla.

Preparar un tubo con los siguientes reactivos para realizar el primer paso de la retrotranscripciòn:

Reactivo	Cantidad
Muestra (RNA extraído)	ul necesarios para obtener de 10 pg a 1 ug de RNA
2XRT Reaction Mix	10 ul
RT Enzyme mix	2 ul
agua	X ul
<i>Volumen total</i>	<i>20 ul</i>

1. Mezclar con vortex e incubar en el termociclador a:
 - 25°C por 10 min
 - 42°C por 50 min
 - 85°C por 5 minEnfriar en hielo
2. Agregar 1 ul (2 U) de enzima (*E. coli* RNase H) e incubar en el termociclador a 37°C por 20 min
3. Guardar a -20°C hasta su uso.

Anexo V Análisis complementario de actividad de colinesterasas.

Dados los efectos neurotóxicos de los compuestos bloqueadores solares observados durante el bioensayo preliminar, se decidió, de manera complementaria y paralela, analizar la actividad de las colinesterasas en las cabezas de los organismos tratados. Este trabajo no forma parte de los objetivos del presente proyecto de tesis *per se* pero los resultados obtenidos son sumamente interesantes por lo cual se decidió añadir como anexo al documento.

En el bioensayo final, además de coleccionar los hígados, se removieron las cabezas de los organismos y se guardaron a -20°C.

Teniendo en cuenta que las colinesterasas fueron previamente caracterizadas en organismos no expuestos, se tomaron estos niveles como bases para el análisis (Rodríguez-Fuentes *et al.*,2009). De tal manera, se incluyen los resultados obtenidos en formato para su futura publicación.

Considerando los primeros resultados obtenidos en este análisis se invita a la reflexión sobre el hecho de que el enfoque sobre los efectos endócrinos de los bloqueadores solares haya llevado en subestimar otros tipos de impactos a los ecosistemas.

Cholinesterase inhibition due to exposure to UV filters on a tropical damselfish, *Abudefduf saxatilis*.

Mélina Soto and Gabriela Rodríguez-Fuentes

Abstract

In order to prevent from the detrimental effects of UV exposure, sunscreen products are widely used in tropical touristic areas like the Mayan Riviera. UV filters used in sunscreen products are mostly lipophilic organic chemicals. Concerns have emerged regarding their environmental safety, since they appear to bioaccumulate and act as potential xenoestrogens in aquatic organisms. Since neurotoxicity was observed during a bioassay with juveniles of *Abudefduf saxatilis*, head cholinesterase activity (ChE) was analyzed. Doses of 5, 25 and 50µg/g of the UV filters oxybenzone, octylsalate and octynoxate showed significant cholinesterase inhibition. More interestingly, a mixture of the three compounds in a proportion similar to the one used in commercial cosmetic products inhibited 48,8 ±3,5% compared to control. 17β-estradiol at a dose of 5µg/g, which is often used as positive control for estrogenic effect studies, produced a cholinesterase inhibition of 54,5 ±3,6 %. Changes in ChE activity by UV filters and E₂ may be linked to the production of reactive oxygen species (ROS), leading to oxidative stress.

Keywords: Cholinesterase, Oxybenzone, Octylsalate, Octynoxate, 17β-estradiol

Introduction

Acetylcholinesterase (AChE) is the enzyme responsible for the hydrolysis of the neurotransmitter acetylcholine in the synaptic gap, stopping the nerve impulse and allowing the neuron to return to its resting state. Insecticides

and other pollutants inhibit the action of AChE and considerably alter the nerve conduction, leading in some extreme cases to the death of the organism. The decrease in AChE activity has been widely used as a biomarker for monitoring neurotoxic

contaminants in environmental studies (Sturm *et al.*, 1999).

Studies on the effects of the UV-filters compounds oxybenzone, octylsalate and octynoxate on fish have almost entirely focused on their estrogenicity (Díaz Cruz *et al.*, 2009, Giokas *et al.*, 2007, Kunz and Fent, 2006, Schlumpf *et al.*, 2004). During a bioassay conducted to study the estrogenic effect of these compounds on juveniles sergeant major, *Abudefduf saxatilis*, a tropical damselfish, nervous toxicity symptoms have been observed: disorientation, erratic swimming etc.

We measured head cholinesterase activity on these organisms to assess a possible neurotoxic effect of oxybenzone, octylsalate, octynoxate and a mixture of the three compounds.

Materials and Methods

Juveniles of *A.saxatilis* were

captured from tide pools of a pristine rocky shore in the Mexican Caribbean. They were acclimatized in groups of no more than 10 individuals in 80L tanks with flow through filtered seawater during over two weeks. During this period they were fed *ad libitum* twice a day with live artemias and commercial flakes.

Three empirical doses (5, 25 and 50µg/g fish) of oxybenzone (Oxi), octylsalate (OS) and octynoxate (ONX) were intraperitoneally injected to seven organisms per treatment. The chemicals were dissolved in 25% molecular grade ethanol and 75% corn oil (Leaños-Castañeda *et al.*, 2002). The negative control group consisted of the solvents used in the treatments and the positive control group of 5µg/g of 17β-estradiol (E₂). A mixture of oxybenzone, octylsalate and octynoxate in the proportions similar to those used in the

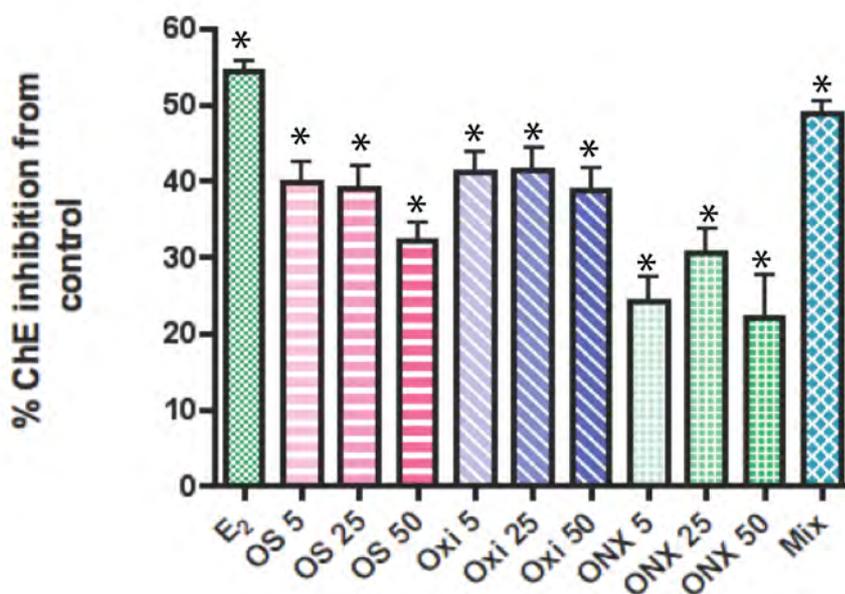


Figure 1: Percentage of total cholinesterase activity in *A.saxatilis* juveniles heads calculated against the control. All the treatment showed a significant inhibition: E₂=54,5±3,6%, OS5=39,76±5,3%, OS25=38,96±7,1%, OS50=32,08±6,2%,Oxi5=41,07±6,8%, Oxi25=41,37±6,6%, Oxi50=38,87±6,5%, ONX5=24,24±6,5%, ONX25=31±3,2%, ONX50=22±5,1%, Mix=48,8 ±3,5%. Significant difference from the other treatments **P<0,01, *P<0,05.

commercial sunscreen lotions (6%,5% and 7,5% respectively) for a final doses of oxybenzone of 5µg/g was included. After 96h exposure, organisms were rapidly terminated by hypothermia. Heads were removed and kept at -40°C until analysis.

The determination of cholinesterase activity was carried out with modifications to the method of Ellman *et al.* (1961). The rate of absorbance at 405nm was measured for 1 min with 5 sec intervals (Rodríguez-Fuentes and Gold Bouchot, 2004).

Protein concentration was measured using Bradford method (1976) using bovine albumin as standard.

One way analysis of variance (ANOVA) was conducted to assess statistical differences between the treatments.

Discussion

The present study investigated the effects of three UV filters and a mixture of them on the juvenile *Abudefduf saxatilis*. It has been found that all of them had a significant effect on inhibiting the cholinesterase activity.

As in a wide variety of marine teleost fishes, two kinds of cholinesterases have been characterized in *Abudefduf saxatilis*: Acetylcholinesterase and Pseudocholinesterase or Butyrylcholinesterase (BChE) (Rodríguez-Fuentes *et al.*,2009). In most marine teleost species, brain tissues contains almost exclusively AChE, whereas both AChE and BChE are present in muscle, nerve tissue and serum (Sturm *et al.*, 1999). As entire heads have been used in the analysis it is impossible to know whether oxybenzone, octisalate and octinoxate had a major impact on which cholinesterase, that is why the activity

is referred as of total cholinesterase. BChE is usually more sensitive than AChE and the indiscrimination between them can lead to an over estimation of the effect (Phillips *et al.*, 2002), thus the results should be interpreted with caution.

Because the organisms from the negative control were handled and injected the same way as the treatment, inhibition due to stress can be ruled out. In the same matter, no impact from the solvent was observed. We can reasonably conclude that the effects observed are indeed due to the chemicals used.

The mixture of the three compounds showed a significantly higher inhibition than any of the three compounds separately. This synergistic behavior is of great interest as most of the commercial sunscreen creams are a mixture of UV filters and are susceptible to enter the aquatic environment by a diversity of pathways (Giokas *et al.*, 2007).

To our knowledge none of the three compounds used in this study have been investigated for cholinesterase inhibition. Schlumpf *et al.* (2004) reported a developmental toxicity of others UV filters (4-methylbenzylidene camphor 4MBC and 3-benzylidene camphor 3BC) on rats offsprings. The litter size and surviving rate were significantly decreased with doses of 70µg/g/day of 4MBC and 24µg/g/day 3BC, and the puberty was delayed with doses 10 times lower. The reproductive organs and the central nervous system are indeed sensitive targets for developmental effects of xenobiotics compounds. Our data show that oxybenzone, octisalate and octinoxate, separately or in a mixture, have neurotoxic effects.

Despite the rather well known implication of E₂ in reproduction and growth, it also plays an important role on cognition, serotonin pathways, spatial memory and cholinergic system (Mc Ewen, 2001). It has been shown that E₂ induces acetylcholinesterase activity (Moudgil *et al.*, 1973, Greco *et al.*, 2007) and has the ability to enhance neuronal excitability by accelerating the closure of potassium channels in neuronal membrane (Fatehi *et al.*, 2005). Estrogens are now considered as neurotrophic and neuroprotective agents outside of the reproductive brain (Pellegrini *et al.*, 2005). Estrogen like E₂ appears to act through both estrogen-receptor and non-receptor mediated effects (Weiss *et al.*, 2002). Its antioxidant properties may help reduce the tissue damage, while the estrogen receptor ER α on cholinergic neuron seem to play a central role in neuroprotection by physiological E₂ (Mc Ewen, 2001). All these effects occur at physiological concentrations of E₂ in the range of ppt to ppb.

Welshons *et al.* (2003) show that at higher doses, in the range of the ppm, like the positive control used in that study (5 μ g/g), E₂ has acute cytotoxicity effects; it is its toxicological dose range. Although this doses have been used in other bioassays as a positive control for vitellogenin VTG analysis (Leaños-Castañeda *et al.*, 2002) on adult fishes, our experiment used juvenile organisms whom may be more sensitive to estrogen variation as they are in their developing phase. Furthermore, Petersen and Tollefsen (2011) have seen that rainbow trouts (*Onchorhynchus mikyss*) exposed to E₂ at ppb to ppm concentrations showed an important decrease in their cell viability when the response of vitellogenin

production did not change. Exposure to E₂ at ppb to ppm concentrations induced high mortality rates in tiger shrimp (*P.semisulcatus*) larvae and juveniles (Aktas *et al.*, 2011). Catalyze of estrogens by cytochrome P450 leads to the formation of semiquinones and quinones, which through redox cycling can produce reactive oxygen species (ROS) (Rempel *et al.*, 2009). If the glutathione metabolism fails to restaure the redox status, the ROS cause oxidative stress to the cell by enzyme inactivation, lipid peroxidation or DNA damage (Peña-Llopis *et al.*, 2003). Brain and cholinergic cells are particularly vulnerable to oxidative stress because neuronal membranes are potential substrates for lipid peroxidation and has relatively low levels of antioxidant enzymes compared to other tissue (Behl, 1999).

With E₂, like any other chemical compound, the dose makes the poison, and it is probably its oxidative effect causing the inhibition of the ChE observed in this study.

Conclusion

Oxybenzone, octylsalate and octynoxate were able to inhibit total cholinesterase activity at about a 35% of the activity of the negative control. The mixture of these three compounds had a synergistic effect, the inhibition observed reached 48,8 % \pm 3,5. Nevertheless, it is important to note that the exposures were based on doses that might not necessarily represent the environmental doses. The E₂ dose used as positive control for VTG was in fact in the toxicological range although no mortality was reported. Further studies on the mechanisms of toxicity of these UV filters, individually and in mixture, at environmentally relevant dose should

be conducted as the focus on their estrogenicity might have misled their impact on aquatic organisms.

Acknowledgments

We thank Dra Judith Sanchez-Rodríguez from Universidad Nacional Autónoma de México, Puerto Morelos for providing the infrastructure for the ChE analysis.

References

- Aktas M, Ayce Genc M, 2011. The effects of 17- β estradiol on growth, survival and feminization of green tiger shrimp *P.semisulcatus*. J. An. and Vet. Adv. Vol 10, 5, 562-565.
- Behl C, 1999. Alzheimer's disease and oxidative stress: implications for novel therapeutic approaches. Progress in Neurobiology, 57, 301-323.
- Bradford M, 1976. A rapid and sensitive assay of protein utilizing the principle of dye binding. Anal.Biochem.772,248-264.
- Díaz Cruz S and D Barceló, 2009. Chemical analysis and ecotoxicological effects of organic UV absorbing compounds in aquatic ecosystems. Trends in Analytical Chemistry, Vol 28, No 6, 708-717.
- Ellman GL, Courtney KD, Andres V, Featherstone Jr R, 1961. A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. Biochem. Pharmacol. 7, 88-95.
- Fatehi M, Maack G, Schäfers C, Segner H, 2005. 17 β .estradiol inhibits outward potassium currents recorded in rat parabrachial nucleus cells in vitro. Neuroscience 135, 175-186.
- Giokas D, A Salvador and A Chisvert, 2007. UV Filters: From sunscreens to human body and the environment. Trends in Analytical Chemistry, Vol. 26, No 5, 360-374.
- Greco L, Capri E, Rustad T, 2007. Biochemical responses in *Salmo salar* muscle following exposure to ethynylestradiol and tributyltin. Chemosphere, 68, 564-571.
- Kunz PY and Fent K, 2006. Estrogenic activity of UV filter mixtures. Tox. and App. Pharm., 217, 86-99.
- Leaños Castañeda O, Van Der Kraak G, Lister A, Simá-Alvarez R, Gold-Bouchot G, 2002. *o,p'*-DDT induction of vitellogenesis and its inhibition by tamoxifen in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*).Mar.Enviro.n.Res., 54, 703-707.
- Mc Ewen B, 2001. Estrogens effects on the brain: multiple sites and molecular mechanisms. J.Appl.Physiol. 91, 2786-2801.
- Mougdil VK and Kanungo MS, 1973. Effect of age of the rat on induction of acetylcholinesterase of the brain by 17 β -estradiol. Bioch.et Bioph. Acta, 329, 211-220.
- Pellegrini E, Menuet A, Lethimonier C, Adrio F, Gueguen MM, Tascon C, Anglade I, Pakdel F, Kah O, 2005. Relationship between aromatase and estrogen receptors in the brain of teleost fish. Gen. and Comp. Endoc. 142, 60-66.
- Peña-Llopis S, Ferrando MD, Peña JB, 2003. Fish tolerance to OP induced oxidative stress is dependent on the glutathione metabolism and enhanced by N-acetylcysteine. Aquatic Tox., 65, 337-360.
- Petersen K and Tollefsen KE, 2011. Assessing combined toxicity of estrogen receptor agonists in a primary cell culture of rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* hepatocytes. Aquatic toxicology, 101, 186-195.

- Phillips TA, Wu J, Summerfelt RC, Atchinson AJ, 2002. Acute toxicity and cholinesterase inhibition in larval and early juvenile walleye exposed to chlorpyrifos. *Enviro.Tox. and Chem.*, Vol21, 7, 1469-1474.
- Rempel MA, Hester brian, DeHaro H, Hong H, Wang Y, Schlenk D, 2009. Effects of 17 β -estradiol and its metabolite, 4-hydroxyestradiol on fertilization, embryo development and oxidative DNA damage in sand dollar. *Science Tot. Enviro.*, 407, 2209-2215.
- Rodríguez-Fuentes G and Gold-Bouchot G, 2004. Characterization of cholinesterase activity from different tissues of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Mar.Enviro. Res.* 58, 505-509.
- Rodríguez-Fuentes G, Soto M, Luna-Ramírez K, 2009 Cholinesterase in the damselfish *Abudefduf saxatilis*: use as biomarker in Mexican Caribbean. SETAC, 30th annual meeting, New Orleans.
- Schlumpf M, P Schmidt, S Durrer, M Conscience, K Maerkel, M Henseler, M Gruetter, I Herzog, S Reolon, R Ceccatelli, O Faass, E Stutz, H Jarry, W Wuttke and W Lichtensteiger, 2004. Endocrine activity and developmental toxicity of cosmetic UV filters-an update. *Toxicology*, No 205, 113-122.
- Sturm A, da Silva de Assis HC, Hansen PD, 1999. Cholinesterases of marine teleost fish: enzymological characterization and potential use in the monitoring of neurotoxic contamination. *Mar. Enviro. Res.*, 47, 389-398.
- Weiss HR, Doshi D, Sinha A, Liu X, Chi OZ, 2002. 17 β -estradiol blocks NMDA-induced increases in regional cerebral O₂ consumption. *Brain Research*, 951, 177-182.
- Welshons WV, Thayer KA, Judy BM, Taylor JA, Curran EM, Vom Saal FS, 2003. Large effects from small exposures.I. Mechanisms for endocrine disrupting chemicals with estrogenic activity. *Environ. Health Perspect.* Vol111, 8, 994-1006.