



2011, Año del Turismo en México.

ANÁLISIS DE EXPRESIÓN GENÉTICA POR PCR (POLYMERASE CHAIN REACTION) EN EMBRIONES DE PEZ CEBRA (ORGANISMO BLANCO) PARA IDENTIFICAR EFECTOS TÓXICOS POR COMPUESTOS ORGÁNICOS EMERGENTES Y DETECCIÓN DE ENTEROBACTERIAS: UN ENFOQUE POTENCIAL PARA EVALUAR EL EFECTO DE CONTAMINANTES EN TIEMPOS MENORES DE LAS METODOLOGÍAS CONVENCIONALES.

**DRA. ANA MARÍA SANDOVAL VILLASANA
DR. JESÚS HERNÁNDEZ ROMANO
DRA. GUADALUPE MEDRANO BACA
BIÓL. FABRICIO R. CERVANTES DACASA
P. ING. BIOTEC. ANTONIO GONZÁLEZ
SÁNCHEZ**

DICIEMBRE DE 2011

ÍNDICE

I.	RESUMEN EJECUTIVO.....	6
II.	INTRODUCCIÓN.....	8
III.	ANTECEDENTES.....	10
	III.1. Tipos de contaminantes emergentes.....	10
	III.2. Compuestos Disruptores Endócrinos (CDE) en el Ambiente Acuático.....	12
	III.3. Organismo modelo.....	13
	III.4. Sustancias químicas de prueba.....	14
	III.4.1. Atrazina.....	15
	III.4.2. Estradiol.....	16
	III.4.3. 17 α -etinilestradiol.....	17
	III.5. Bioacumulación.....	18
	III.5.1. Biomarcadores genómicos de exposición.....	19
IV.	OBJETIVO.....	20
V.	RESULTADOS ESPERADOS.....	20
VI.	MATERIALES Y MÉTODOS.....	21
	VI.1. Selección de genes.....	21
	VI.2. Diseño de sondas y primers.....	22
	VI.3. Análisis de interacciones entre sondas y oligos de Danio rerio.....	44
	VI.4. Esquemas de los genes control y de estudio.....	49
	VI.5. La homología.....	53
	VI.5.1. Análisis para evaluar las interacciones de ortólogos y parálogos.....	53
	VI.6. Mantenimiento y reproducción del pez cebra.....	58
	VI.7. Exposiciones.....	58
	VI.8. Sustancias químicas.....	59
	VI.9. Extracción de ARN.....	60
	VI.10. Síntesis de ADNc.....	61
	VI.11. Amplificación de ADNc (RT-PCR).....	62
VII.	RESULTADOS.....	64
	VII.1. Niveles de expresión general de genes endógenos (housekeeping).....	64
	VII.2. Atrazina.....	64
	VII.2.1. Niveles de expresión de genes blanco con respecto al gen endógeno β -actina.....	64
	...VII.2.2. Niveles de expresión de genes blanco con respecto al gen endógeno ef1a.....	65
	VII.2.3. Niveles de expresión de genes blanco con respecto al gen endógeno β -actina.....	68
	VII.2.4. Niveles de expresión de genes blanco con respecto al endógeno ef1a... ..	68
	VII.3. Estradiol.....	71
	VII.3.1. Niveles de expresión de genes blanco con respecto al gen endógeno β -actina.....	71
	VII.3.2. Niveles de expresión de genes blanco con respecto al endógeno ef1a... ..	71
	VII.4. 17 α -etinilestradiol.....	74
	VII.4.1. Niveles de expresión de genes blanco con respecto al gen endógeno β -actina.....	74
	VII.4.2. Niveles de expresión de genes blanco con respecto al endógeno ef1a... ..	74

	VII.4.3. Niveles de expresión de genes blanco con respecto al gen endógeno β -actina.....	77
	VII.4.4. Niveles de expresión de genes blanco con respecto al endógeno ef1a.....	77
	VII.4.5. Niveles de expresión de genes blanco con respecto al gen endógeno β -actina.....	81
	VII.4.6. Niveles de expresión de genes blanco con respecto al endógeno ef1a.....	81
VIII.	DISCUSIÓN.....	84
	VIII.1. Atrazina.....	84
	VIII.2. Estradiol y 17 α -etinilestradiol.....	85
IX.	CONCLUSIONES.....	88
X.	REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	90
XI.	ANEXO1.....	94

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Molécula de la atrazina.....	15
Figura 2. Molécula del estradiol.....	17
Figura 3. Molécula del 17 α -etinilestradiol	17
Figura 4. Sistema de apareamiento empelado en el pez silvestre.....	58
Figura 5. Exposición de huevos.....	58
Figura 6. Selección y lavado de embriones.....	59
Figura 7. Lisis celular de embriones.....	60
Figura 8. Separación de fases (acuosa y orgánica).....	60
Figura 9. Extracción y precipitación de del ARN total.....	61
Figura 10. Cuantificación de ARN total a 260 nm.....	61
Figura 11. Síntesis de ADNc con 500 ng μL^{-1} de ARN total.....	62
Figura 12. PCR en tiempo real.....	63
Figura 13. Placas de 96 pozos.....	63
Figura 14. Gráficas de medición de cDNA.....	63
Figura 15. Niveles de expresión de genes blanco con respecto al gen endógeno β -actina debido a atrazina a 120 h de exposición.....	66
Figura 16. Niveles de expresión de genes blanco con respecto al gen endógeno <i>ef1a</i> debido a atrazina a 120 h de exposición.....	67
Figura 17. Niveles de expresión de genes blanco con respecto al gen endógeno β -actina debido a atrazina a 120 h de exposición.....	69
Figura 18. Niveles de expresión de genes blanco con respecto al gen endógeno <i>ef1a</i> debido a atrazina a 120 h de exposición.....	70
Figura 19. Niveles de expresión de genes blanco con respecto al gen endógeno β -actina debido a estradiol a 6 h de exposición.....	72
Figura 20. Niveles de expresión de genes blanco con respecto al gen endógeno <i>ef1a</i> debido a estradiol a 6 h de exposición.....	73
Figura 21. Niveles de expresión de genes blanco con respecto al gen endógeno β -actina debido a 17 α -estradiol a 48 h de exposición.....	75
Figura 22. . Niveles de expresión de genes blanco con respecto al gen endógeno <i>ef1a</i> debido a 17 α -estradiol a 48 h de exposición.....	76
Figura 23. Niveles de expresión de genes blanco con respecto al gen endógeno β -actina debido a 17 α -estradiol a 120 h de exposición.....	79
Figura 24. Niveles de expresión de genes blanco con respecto al gen endógeno <i>ef1a</i> debido a 17 α -estradiol a 120 h de exposición.....	80
Figura 25. Niveles de expresión de genes blanco con respecto al gen endógeno β -actina debido a 17 α -estradiol a 144 h de exposición.....	82
Figura 26. Niveles de expresión de genes blanco con respecto al gen endógeno <i>ef1a</i> debido a 17 α -estradiol a 144 h de exposición.....	83

ÍNDICE DE ESQUEMAS

Esquema 1. Gen endógeno <i>βactina</i>	49
Esquema 2. Gen blanco <i>cyp1a</i>	49
Esquema 3. Gen blanco <i>fzr1</i>	49
Esquema 4. Gen blanco <i>ahr2</i>	50
Esquema 5. Gen blanco <i>hmox1</i>	50
Esquema 6. Gen blanco <i>hsp70</i>	50
Esquema 7. Gen blanco <i>maf1</i>	51
Esquema 8. Gen blanco <i>nfe1</i>	51
Esquema 9. Gen endógeno <i>gapdh</i>	51
Esquema 10. Gen blanco <i>vtg1</i>	52
Esquema 11. Gen blanco <i>mtz</i>	52
Esquema 12. Gen endógeno <i>ef1a</i>	52

ÍNDICE DE TABLAS

Tablas 1. Genes.....	21
Tablas 2. Las interacciones de las secuencias de las sondas y los oligos fueron analizadas empleando los softwares bioinformáticos de Vector NTI/IDT.....	44
Tablas 3. Análisis de Tm y % de GC de sondas y oligos.....	47



2011, Año del Turismo en México.

I. RESUMEN EJECUTIVO

En el estudio se llevó a cabo la implementación de la metodología de PCR en tiempo real, así como la del procesamiento de muestras para evaluar cambios en la expresión genética. Para el objeto del estudio, se seleccionaron nueve genes (*cyp1a*, *fzr1*, *ahr2*, *hmx*, *hsp70*, *mafg1*, *nfe212*, *vfg1* y *mt2*) cuya expresión se inducía frente a diferentes contaminantes ambientales, a partir de la información de reportes en los que se evaluaba a nivel genómico la expresión de más de 20,000 genes del pez cebra. Se realizó la validación de la metodología para evaluar la expresión relativa de genes, utilizando los embriones del pez cebra y empleando tres sustancias químicas consideradas como compuestos emergentes (el herbicida atrazina y las hormonas estradiol y 17 α -etinilestradiol) a diferentes tiempos de exposición y diferentes concentraciones (ng L^{-1}) de cada uno de ellos.

Si bien varios reportes proponen que los embriones del pez cebra pueden funcionar como detectores de contaminantes en agua, nuestros resultados sugieren que el modelo puede ser inadecuado debido al poco nivel de diferenciación tisular del mismo, lo que puede explicar la falta de expresión de algunos de los genes evaluados cuando se analizan muestras con cortos periodos de exposición, lo cual no ocurre cuando el modelo se expone durante un tiempo suficiente como para que alcancen la etapa de alevín, fase de desarrollo que muestra una mayor diferenciación tisular, fenómeno asociado con la mayor actividad transcripcional del genoma del pez.

De los genes endógenos seleccionados (*β -actina*, *ef1a* y *gapdh*), el *gapdh* no mostró un patrón de expresión consistente que permita utilizarlo como tal, mientras que *β -actina* y *ef1a* muestran variaciones importantes cuando se comparan entre sí, lo que sugiere que alguno de ellos varía en su expresión frente a las diferentes condiciones evaluadas y por lo tanto no puede usarse como endógeno.

Los resultados obtenidos hasta el momento, sugieren que se deben evaluar diferentes concentraciones de RNA para identificar el intervalo de concentración de RNA que permita optimizar la eficiencia de la amplificación para cada gen. Para consolidar este

2011, Año del Turismo en México.

trabajo se propone trabajar con el pez *Danio rerio* en su etapa adulta para llevar a cabo la evaluación de los perfiles del comportamiento transcripcional, debido a que en esta etapa se encuentran claramente definidos los perfiles del comportamiento transcripcional aportando más información que en la etapa embrionaria, además de que, se ampliaría la posibilidad de detección de genes que puedan actuar como genes marcadores de contaminantes ambientales en agua.

También se llevo a cabo la elaboración de los métodos para cuantificar las enterobacterias *Salmonella entérica* y *Escherichia coli* por la técnica de PCR.

Como resultado de los trabajos realizados, se publicó un artículo de divulgación denominado “Aplicación de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), para determinar el riesgo ambiental causado por compuestos disruptores endocrinos”, por: Sandoval-Villasana A.M., Cervantes-Dacasa F.R., Medrano-Baca M.G., González-Sánchez A. y Hernández-Romano J. en la página web “ATL el Portal del Agua desde México” (<http://www.atl.org.mx>) y en la red interna del IMTA (imtanet).

II. INTRODUCCIÓN

Los contaminantes emergentes son una preocupación compleja y presionante en salud ambiental y nuevos enfoques, como la ecotoxicogenómica, son necesarios para evaluar el riesgo para los ecosistemas acuáticos y suministros de agua. Estos contaminantes emergentes son sustancias no reglamentadas, que están siendo de preocupación ambiental ya sea a través de avances en las técnicas analíticas para detectarlos, o por su asociación con un efecto recientemente reportado, o a través de su creciente introducción en el ambiente. Son una clase distinta de sustancias con una estructura común, como es el caso de los herbicidas, pesticidas, químicos industriales (p. e., plastificantes, poliestirenos, bifenilos, policlorinados), aril hidrocarburos, tensoactivos (sufactantes) no iónicos y sus productos de descomposición (compuestos alquilfenólicos), así como algunos productos químicos farmacéuticos. El riesgo de estos compuestos para la fauna de los ecosistemas acuáticos se desconoce. Su número sigue en aumento y se ha reportado que sólo una pequeña fracción, de más de 30,000 sustancias en el comercio, han sido estudiadas (Poyton, 2009).

En este grupo de contaminantes emergentes se encuentran los compuestos disruptores endócrinos (CDE), que actúan vía interacción con las hormonas esteroides receptoras nucleares. La investigación internacional ha reportado sobre la alteración endócrina inducida químicamente por estrógenos ambientales que alteran el desarrollo y la función sexual en pez, y también han sido reportados sus efectos sobre otros procesos fisiológicos, incluyendo crecimiento, desarrollo, osmorregulación, respuesta inmune y al estrés (Filby, 2007). En 2004, Aervi reportó que la acumulación de estas sustancias puede afectar la salud y, posiblemente, la fertilidad de los seres humanos y de la vida silvestre.

La ecotoxicología ha adoptado en años recientes las tecnologías genómicas para crear el campo de rápido crecimiento de la ecotoxicogenómica (Snape *et al.*, 2004). Las herramientas genómicas eligen como blanco las respuestas moleculares que experimentan los organismos en reacción al contaminante y proporcionan una imagen sugerente del efecto tóxico sufrido por los organismos y los mecanismos compensatorios que el organismo ha movilizado en su defensa (Poyton, 2009).

2011, Año del Turismo en México.

El análisis genómico de la expresión genética puede evaluar la reacción de un organismo a un estresante ambiental. El proceso inicia cuando un organismo es expuesto a un contaminante químico que entra y se distribuye a lo largo de su cuerpo, el contaminante interactúa con células y componentes celulares en una forma dependiente de sus propiedades químicas, resultando en daño celular específico. En respuesta, el organismo reacciona al contaminante en múltiples niveles, los cuales incluyen alteración de la expresión de genes, niveles de proteínas, o concentraciones de metabolitos. Estos cambios podrían ayudar a proteger al organismo del estresante particular o mitigar los efectos adversos del estresante. El grupo de genes particular (o proteínas o metabolitos) que son alterados, son dependientes y específicos de los mecanismos de acción del contaminante. De esta manera, puede esperarse que cambios en la expresión del gen puedan ser usados como biomarcadores de toxicidad.

Con los avances analíticos basados en efectos moleculares se proporciona una mejor comprensión de la acción tóxica; por consiguiente, la detección de efectos moleculares promete ser un valioso avance para el monitoreo ambiental del potencial tóxico de una sustancia química. Métodos basados en PCR-tiempo real pueden apoyar en la caracterización de los efectos adversos de los contaminantes emergentes y ofrecen un nuevo enfoque para detectarlos en el ambiente.

III. ANTECEDENTES

Para muchos contaminantes emergentes, su toxicidad en organismos acuáticos es ampliamente desconocida. Incluso sustancias farmacéuticas, que son sometidas a pruebas extensas en modelos mamíferos, pueden exhibir toxicidad diferente en especies acuáticas (Crane *et al.*, 2006). Asimismo, se ha reportado que muchas sustancias farmacéuticas y CDEs no responden a ensayos de toxicidad tradicional que miden la mortalidad o la reproducción en una sola generación (Sumpter and Johnson, 2005), lo que hace necesario que las agencias reguladoras replanteen los requerimientos de las pruebas (Gray, 1998). Esto podría aplicarse también a otras sustancias emergentes, incluyendo PBDEs y nanomateriales, cuyos mecanismos de acción se desconocen.

Se ha reportado que pocas clases de contaminantes emergentes son altamente persistentes en el ambiente y los esfuerzos realizados en su monitoreo muestran su distribución global. Para otros contaminantes, hay información limitada respecto a su destino y transporte. Las nanopartículas específicamente plantean un reto único. Por su tamaño inusual y la diversidad de sus propiedades químicas se conoce poco de dónde es probable que los nanomateriales existan en el ambiente. Estos contaminantes han sido encontrados en efluentes complejos en combinación con otras sustancias, además de que su situación reglamentaria actual o anticipada permanece incierta.

III.1. Tipos de contaminantes emergentes.

De manera general se muestran las características, distribución y propiedades químicas de estos contaminantes.

El uso pequeño, pero acumulativo, de productos farmacéuticos y de cuidado personal (PFCP) por un gran número de individuos resulta en una contaminación extensa, pero significativa, difícil de controlar. Su ruta primaria al ambiente es a través de la excreción humana, disposición de productos no usados o caducos, o a través del uso agrícola o en el ganado. Se caracterizan por ser sustancias activas y son disponibles en el sitio de

2011, Año del Turismo en México.

acción debido a que son principios activos en medicinas, causando efectos ambientales adversos en concentraciones bajas. Estos residuos farmacéuticos y PFCP han sido detectados en tejidos de peces en aguas que reciben efluentes de plantas de tratamiento de aguas residuales, que se acumulan en músculos y órganos críticos de organismos vivos.

Los compuestos disruptores endócrinos (CDE) son contaminantes que interfieren con el funcionamiento normal del sistema endócrino, resultando en efectos adversos en reproducción, desarrollo, y función inmune. En este grupo se incluyen las hormonas naturales y sintéticas, sustancias farmacéuticas, pesticidas, plastificantes, y compuestos organometálicos.

Los difenil éteres polibrominados o PBDEs son sustancias que se usan como retardadores de flama en una variedad de resinas de polímeros y plásticos, y se encuentran en muebles, televisores, estéreos, computadoras, alfombras, y cortinas. Son contaminantes globales, ubicuos, que se bioacumulan rápidamente en organismos vivos.

Los compuestos perfluorinados (PCPF) (como el perfluorooctano sulfonato y ácido perfluorooctanoico) son usados ampliamente por su hidrofobicidad, lipofilicidad, y solubilidad moderada. Se encuentran en empaques de comida, como revestimientos en útiles de cocina, en pinturas, como tensoactivos, y también tienen muchas otras aplicaciones. Son compuestos muy estables, lo que los hace extremadamente persistentes en el ambiente.

La nanotecnología se ocupa de compuestos supra-moleculares en el rango “nano” (0.1-100 nm en diámetro), son productos que se fabrican a partir de átomos. Las propiedades de estos productos dependen de cómo estén esos átomos dispuestos, ejemplos de ello, si se reubican los átomos del grafito (compuesto por carbono, principalmente) de la mina del lápiz se pueden producir diamantes (carbono puro cristalizado), si se reubica los átomos de la arena (compuesta básicamente por sílice) y se agregan algunos elementos extras se pueden producir los chips de un ordenador. Su diversidad plantea retos a los

2011, Año del Turismo en México.

ambientalistas, quienes deben evaluar los riesgos planteados por cada una de estas partículas y entender cómo las alteraciones químicas afectan el ambiente.

Los contaminantes emergentes también incluyen organismos, como algunos agentes infecciosos y especies invasoras (toxinas algales y microorganismos). El comercio global ha facilitado la aparición de introducciones de especies invasoras, con consecuencias ecológicas y económicas (Stryer *et al.*, 2006). Las técnicas genómicas han sido desarrolladas y empleadas para identificación de especies, y tienen aplicaciones para patógenos emergentes y especies invasoras.

III.2. Compuestos Disruptores Endócrinos (CDE) en el Ambiente Acuático.

Los disruptores endócrinos son compuestos cuyas moléculas interfieren en las funciones reproductivas e imitan o antagonizan los efectos de hormonas endógenas, tales como los estrógenos. Un creciente número de los llamados xeno-estrógenos, presentes en la comida o en el ambiente, se ha identificado que ponen en peligro las capacidades reproductivas de varios animales, incluyendo a los humanos. La transmisión adecuada de la señal transmitida por el estrógeno es de hecho necesaria para la reproducción (Bardet, 2002).

En este grupo se incluyen sustancias naturales, como fitoestrógenos, micoestrógenos (ejemplo, zeranol favorece la aparición de glándulas mamarias en machos) y sustancias hechas por el hombre, como los plaguicidas organoclorados, bifenilopoliclorados (PCBs), hidrocarburos aromáticos policíclicos (PAHs), dibenzodioxinopolicloradas (PCDDs), tensoactivos (surfactantes) y plastificadores. Se reporta que más de 60,000 sustancias hechas por el hombre son de uso irregular y es probable que otras sustancias o grupos de sustancias resultarán ser estrogénicas (Sumpter, 1995).

Estos compuestos disruptores endocrinos son usados en industrias como la agricultura, la industria petroquímica, la industria del plástico, y la industria de jabones y detergentes, generándose grandes volúmenes de ellos estas en el ambiente acuático. Ejemplo de ello,

2011, Año del Turismo en México.

son los alquilfenol-etoxilatos: debido a que alrededor de 30,000 ton son usadas anualmente, casi el 60% de éstos terminan en el ambiente acuático, donde son degradados a sustancias estrogénicas persistentes ambientalmente.

Algunos estrógenos sintéticos, particularmente etinilestradiol, pueden contaminar el ambiente acuático, debido a que es usado ampliamente como anticonceptivo en todo el mundo. Sin embargo, es excretado por mujeres preferentemente en formas conjugadas, que son consideradas biológicamente inactivas; ambos, etinilestradiolglucoronide y sulfato, son inactivos como estrógenos en truchas.

Cuando se pretende valorar el impacto de la contaminación del ambiente acuático por sustancias químicas estrogénicas, es necesario considerar las potencias estrogénicas de estas sustancias químicas y sus concentraciones en el ambiente. Es imposible proporcionar un cálculo real de la concentración de alguna sustancia química estrogénica en el ambiente acuático, porque los valores reportados (cuando se dispone de ellos) varían mucho. Esta variabilidad es entendible, dado que han sido usadas técnicas diferentes y muestras diferentes (como influente, efluente, agua de río, agua subterránea, etc.) y han sido analizadas en distintas áreas del mundo (Sumpter, 1995). Por lo tanto, especificar exactamente a qué concentración está expuesto un pez es imposible e incluso puede no ser particularmente significativo, porque lo importante es la concentración en el pez (Sumpter, 1995).

III.3. Organismo modelo.

Nuestra investigación utiliza el pez cebra (*Danio rerio*) como organismo prueba, se usa ampliamente en biología del desarrollo, principalmente en su etapa embrionaria, y en la investigación genética se ha utilizado desde hace 30 años. Su genoma ha sido secuenciado totalmente (http://www.ensembl.org/Danio_rerio/index.html), reduciendo así los retos bioinformáticos cuando se evalúan alteraciones en expresión de gen y de proteína. Además, se han desarrollado diversos métodos moleculares y genéticos para el pez cebra (Hill *et al.*, 2005, Muncke *et al.*, 2006a). También es usado como un modelo *in*

2011, Año del Turismo en México.

vivo para la identificación de pequeñas partículas que pueden interferir con desarrollo normal (Peterson *et al.*, 2000) o procesos fisiológicos. Se ha convertido en un modelo animal para estudios moleculares ecotoxicogenómicos, para trabajos exploratorios o generadores de hipótesis enfocados sobre los efectos de CDEs con diferente respuesta de genes y proteínas (Hoffmann *et al.*, 2008).

Actualmente existen en el mundo varios programas analizando diversos CDEs, la mayoría de los cuales incluye pruebas en peces, debido a los impactos adversos de CDEs sobre poblaciones de peces en los ecosistemas; esto difiere de la situación en humanos, donde la exposición a y efectos subsecuentes de CDEs ambientales son inciertos (WHO, 2002). Los estudios de mecanismos con compuestos químicos como los CDE que se han realizado con este pez se deben a la facilidad de disponer de los organismos (ejemplo de ello, se puede generar un gran número de organismos de calidad óptima en etapas de vida adecuadas), a su dinámica de exposición a sustancias químicas, a su flexibilidad biológica, así como al tamaño pequeño del pez, que se adapta convenientemente a cualquier tipo de estudio a realizar debido a su ciclo-de-vida, donde incluso respuestas a bajas dosis que no causan trastornos visibles, no obstante pueden causar una variedad de otros efectos y respuestas que pueden detectarse por análisis molecular. (Ankley and Johnson, 2004) (Bresh, 1991) (Sawle, 2010). Existen algunos aspectos únicos en la endocrinología reproductiva del pez, como la estructura básica y función del eje hormonal hipotálamo hipófisis-gónadas (HPG), que en los vertebrados tiende a ser bien conservada. Por consiguiente, los resultados de los estudios en pez con CDEs pueden servir potencialmente como base de extrapolación de efectos potenciales entre especies.

III.4. Sustancias químicas de prueba.

En la investigación realizada se empleó el pez cebra (*Danio rerio*) en su etapa embrionaria como sistema de prueba, con la finalidad de detectar cambios en la expresión relativa de genes seleccionados después de exposición al herbicida atrazina y a las hormonas estradiol (E2) y 17 α -etinilestradiol (EE2).

III.4.1 Atrazina.

La atrazina (2-cloro-4-etilamina-6-isopropilamina-s-triazina) (Fig. 1) es un herbicida ampliamente usado en el mundo, incluyendo México (Hernández, 2011). Se considera un presunto disruptor-endócrino potencial (Muncke *et al.*, 2006). Bloquea la fotosíntesis mediante la reducción de la fijación de CO₂ en plantas por desplazamiento de la plastoquinona en el sitio de unión Q_b, después de lo cual el fotosistema II es bloqueado. La fitotoxicidad de la atrazina está basada en mecanismos de desintoxicación que involucran las fases I y II de los sistemas de enzimas en plantas superiores. Existen tres posibles vías de desintoxicación para atrazina: (1) N-desalquilación por citocromo P450 (fase I); (2) conjugación con glutatión por glutatión S-transferasas (GSTs) (fase II); y (3) hidrólisis no enzimática catalizada por benzoxaninona. La inducción de GST proporciona resistencia efectiva a las plantas contra la atrazina (Wiegand, 2001).

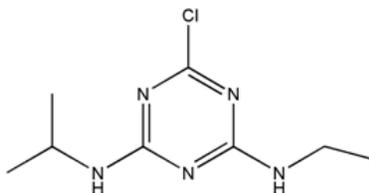


Fig. 1 Molécula de la atrazina.

Este herbicida está registrado para el control de malezas de hoja ancha y malas hierbas, y es comúnmente usado en el cultivo de maíz. Es persistente en suelo, especialmente en condiciones secas y frías. Se metaboliza en cuatro compuestos hidroxiatrazina y tres compuestos de atrazina clorados. Los principales productos de descomposición de atrazina, metabolitos de hidroxiatrazina, no se mueven fácilmente en el suelo. Se encuentra comúnmente en aguas superficiales, de lluvia, límnicas, marinas, y subterráneas localizadas en áreas de agricultura debido a su relativa persistencia, combinada con su amplio uso agrícola. En un inicio su biodegradación es posible; no obstante, es uno de los contaminantes en agua más persistentes (Solomon *et al.*, 1996), donde organismos no elegidos como blanco son afectados (Wiegand, 2001).

2011, Año del Turismo en México.

La atrazina es un caso interesante de contaminación acuática peligrosa porque sus impactos en la salud humana no son tan claros como los de otros contaminantes altamente tóxicos y está sujeto a controversia. La concentración ambiental en países que usan atrazina es de 5 µg/L en promedio, pero hasta 1 mg L⁻¹ puede ser encontrado en pequeños cuerpos de agua usados en la agricultura, debido a la deriva o escurrimiento de partículas de suelo, o disolución en aguas superficiales, con niveles altos en primavera, cuando es usada como herbicida preemergente. Han sido observados efectos adversos en ecosistemas afectados por escurrimiento, con niveles biológicos efectivos persistiendo por varias semanas (Wiegand, 2001).

La relevancia ecotoxicológica de la atrazina en ecosistemas acuáticos ha sido analizada resultando que el organismo con mayor sensibilidad es el fitoplancton seguido por bentos, zooplancton y pez. Este herbicida cambia la conducta del pez cebra en una concentración ambientalmente relevante de 5 µg L⁻¹. Causa daño al epitelio de la branquia; perturbaciones fisiológicas, incluyendo desarreglos de osmorregulación, respiración incrementada, reflejos disminuidos, e inhibición de la acetilcolinesterasa en suero de sangre y cerebro; necrosis de las células del endotelio renal y tejido hematopoyético renal; y excreción renal incrementada de sodio, potasio, cloro, y proteínas. Debido a su lipofilicidad, la atrazina se bioconcentra en los organismos (Wiegand, 2001).

III.4.2 Estradiol.

El estradiol (E2 o 17β-estradiol) es una hormona esteroide sexual femenina. El estradiol se abrevia como E2, ya que tiene dos grupos hidroxilos en su estructura molecular (Fig. 2). El estradiol es alrededor de 10 veces más potente que la estrona y alrededor de 80 veces más potente que el estriol en sus efectos estrogénicos. El estradiol es el estrógeno predominante durante los años reproductivos, tanto en los niveles séricos absolutos como en la actividad estrogénica. Está presente también en los hombres, siendo producido como un metabolito activo de la testosterona por la enzima aromatasa. Los niveles de estradiol en los hombres (8-40 pg/ml) son comparables a los de una mujer posmenopáusica. El estradiol no sólo tiene un impacto crítico en el funcionamiento sexual y reproductivo, sino que también afecta a otros órganos, incluyendo los huesos.

2011, Año del Turismo en México.

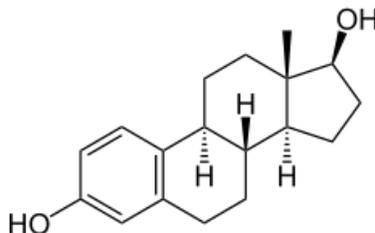


Fig. 2 Molécula del estradiol.

III.4.3 17 α -etinilestradiol.

El 17 α -etinilestradiol (EE2) es un estrógeno sintetizado (Fig. 3). Los metabolitos del etinilestradiol se excretan por la bilis en las heces y por la orina como conjugados de glucuronida y sulfatos.

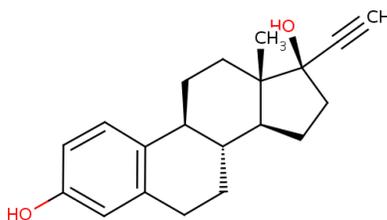


Fig. 3 Molécula del 17 α -etinilestradiol

Los estrógenos son pequeñas moléculas lipofílicas que cruzan la membrana celular y están unidos por receptores nucleares específicos. En mamíferos, han sido identificados dos receptores de estrógeno: ER α y ER β . Los ER presentan capacidades de traslape y unión-ligando diferente, patrones de expresión genética durante el desarrollo y en el adulto (Bardet, 2002). La exposición humana a estrógenos puede generar susceptibilidad al cáncer de próstata, mama, ovario y útero, y también puede influir en la orientación sexual. (Wingar *et al.*, 1998). Además, hay estudios que indican que el cáncer vaginal se asocia con la exposición a hormonas sintéticas en las mujeres.

2011, Año del Turismo en México.

Los peces son el único taxa de toxicidad acuática que tienen receptores de estrógeno. Muchos estudios reportan que varias especies de peces responden a concentraciones de nanogramo por litro (ng L^{-1}) de EE2 por sintetización de VTG. Aunque existen estudios de laboratorio en los cuales la exposición causa un incremento en VTG en peces machos y coinciden con efectos reproductivos adversos observados (Caldwell, 2008).

La información disponible sugiere que estas hormonas naturales y sintéticas (E2 y EE2) representan la mayoría de la actividad estrogénica en muchos efluentes (Kolpin et al., 2002; Westerhoff et al., 2005; Caldwell, 2008).

III.5 Bioacumulación.

La mayoría de las sustancias químicas estrogénicas referidas arriba son lipofílicas e hidrofóbicas y, por consiguiente, tienen una fuerte tendencia a bioconcentrarse y bioacumularse en organismos acuáticos (plantas y animales) (Sumpter, 1995).

Organismos diferentes bioconcentrarán sustancias químicas estrogénicas diferentes, en grados diferentes. Incluso en un solo organismo, el compuesto bioconcentrado es improbable que esté diseminado por igual en todos los tejidos; probablemente esté concentrado preferentemente en unos pocos tejidos, como la grasa. Lo que pase con estos compuestos una vez bioconcentrados en un organismo, es esencialmente desconocido; pueden estar fisiológicamente inactivos mientras están conservados en tejido adiposo, pero cuando esta grasa es movilizada (lo que ocurre frecuentemente durante la reproducción), el compuesto puede ser liberado para actuar en cualquier parte o puede ser metabolizado en otros compuestos que pueden o no ser activos como estrógenos (Sumpter, 1995).

III.5.1 Biomarcadores genómicos de exposición.

Un biomarcador es cualquier respuesta biológica frente a un químico ambiental a nivel sub-individual, es decir, manifiesta el efecto producido por un tóxico, sin embargo, no proporciona información acerca de la magnitud que ese efecto tendrá a niveles de organización superiores. El uso de biomarcadores a nivel subcelular constituye una herramienta para diagnosticar el estrés ecotoxicológico, al que están sometidos los organismos, en el escenario ambiental planteado. Para la identificación de biomarcadores, se ha sugerido que el perfil de expresión génica puede predecir la exposición a contaminantes en el ambiente (Ankley *et al.*, 2006). Estudios recientes en diversos organismos han sido efectuados para probar que sustancias diferentes producen diferentes perfiles de expresión génica, incluyendo algunos estudios investigando contaminantes emergentes (Poyton, 2009).

Los perfiles de expresión génica son útiles para determinar el agente causal en un efluente complejo. Sin embargo, permanece la cuestión sobre cómo es influenciada la firma de expresión génica por la presencia de otras sustancias. Se sabe que las sustancias químicas pueden interactuar en mezclas, causando consecuencias inesperadas para la sobrevivencia y la reproducción (Walker *et al.*, 2006). Es posible que combinaciones de sustancias tengan efectos diferentes de los de sustancias individuales sobre la expresión génica de organismos. Sustancias que causan una respuesta aditiva en bioensayos agudos o crónicos, pueden tener también un perfil de expresión aditivo. Sustancias que muestran efectos antagónicos o sinérgicos en bioensayos estándar, pueden tener perfiles de expresión distintos, no parecidos a los perfiles de expresión de las sustancias solas.

2011, Año del Turismo en México.

IV. OBJETIVO

Implementar y validar metodologías por PCR que permitan en un tiempo corto conocer resultados para la toma de decisiones relativas a situaciones de emergencia por contaminación y efectos agudos en salud.

V. RESULTADOS ESPERADOS

- a) Metodología validada para evaluación de la expresión diferencial de genes causada por contaminantes emergentes, mediante la reacción en cadena de la polimerasa acoplada a la reversa transcriptasa usando el sistema de PCR en tiempo real y electroforesis en gel.
- b) Dos metodologías para cuantificación de las enterobacterias *Salmonella entérica* y *Escherichia coli*.

VI. MATERIALES Y MÉTODOS

La validación de expresión relativa de genes debida a la exposición a atrazina, estradiol, y 17 α -etinilestradiol mediante la reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real, se llevó a cabo en las siguientes etapas.

VI.1 Selección de genes.

Mediante una amplia revisión de literatura científica fueron seleccionados los genes β -actina, (Morse *et al.*, 2005; Nishimura *et al.*, 2006), *ef1a* (Filby *et al.*, 2007, Frost *et al.*, 2003; (Ingerslev *et al.*, 2005; Olsvik *et al.*, 2005) y *gapdh* (Nishmura *et al.*, 2006; Gorzelniak *et al.*, 2001), basados en su uso previo como controles internos o genes housekeeping en estudios de expresión génica, así como por la disponibilidad de secuencias en peces y especies relacionadas (Muncke *et al.*, 2006; Filby *et al.*, 2007; Muncke *et al.*, 2007; Tang *et al.*, 2007; Kausch *et al.*, 2008; Liedke *et al.*, 2008; McCurley *et al.*; 2008; Weil *et al.*, 2009). Para estudiar la expresión relativa se seleccionaron los genes blanco *cyp1a*, *fzr1*, *ahr2*, *hmx*, *hsp70*, *mafg1*, *nfe212*, *vtg1* y *mt2* debido a que muestran roles en funciones celulares diferentes (Muncke *et al.*, 2006; Muncke *et al.*, 2007; Kausch *et al.*, 2008; Liedke *et al.*, 2008; McCurley *et al.*; 2008; Weil *et al.*, 2009), además de que se ha identificado su expresión diferencial en respuesta a una exposición particular, pudiendo representar una firma de expresión génica para esa condición de exposición (Tabla 1).

GEN	FUNCIÓN
<i>β-actina</i>	Organización del citoesqueleto celular
<i>ef1a</i>	Biosíntesis de proteínas
<i>gapdh</i>	Metabolismo celular basal
<i>cyp1a</i>	Eliminación de compuestos tóxicos en el hígado
<i>fzr1</i>	Eliminación celular sin inflamación
<i>ahr2</i>	Regulación de la expresión genética

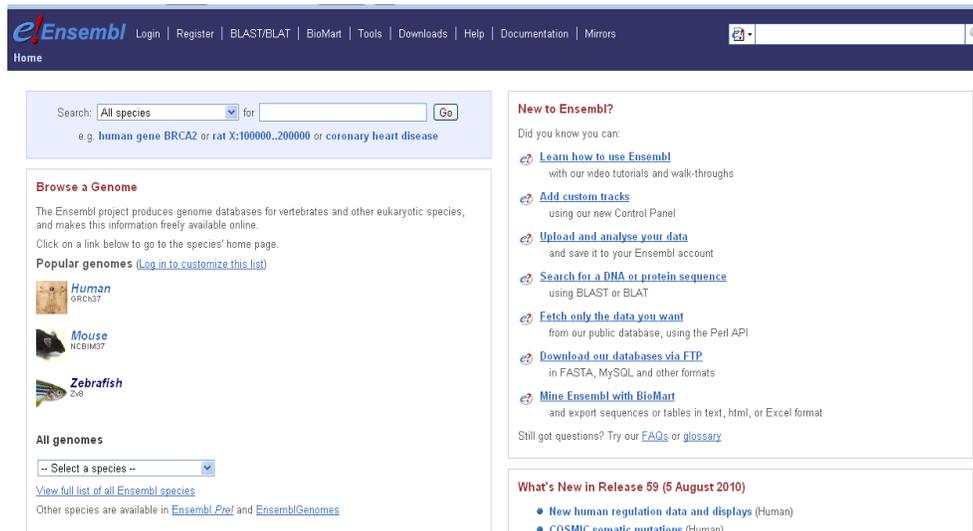
2011, Año del Turismo en México.

<i>hmox</i>	Hemo-exogenasa, posiblemente involucrado en metabolismo de ácidos nucleicos
<i>hsp70</i>	Chaperona, involucrada en plegamiento adecuado de proteínas
<i>maf1</i>	Factor de transcripción, participa en la regulación de la expresión genética
<i>nfe212</i>	Factor de transcripción, participa en la regulación de la expresión genética
<i>vtg1</i>	Vitelogenina, participa como fuente de nutrientes en el desarrollo embrionario
<i>mt2</i>	Metalotioneína, se une a metales pesados y a radicales libres de oxígeno

VI.2 Diseño de sondas y primers.

Para llevar a cabo los ensayos de PCR, se diseñaron oligonucleótidos específicos para las secuencias de los genes mencionados empleando un sistema de software Ensembl que mantiene anotaciones automáticas en los genomas de eucariotas.

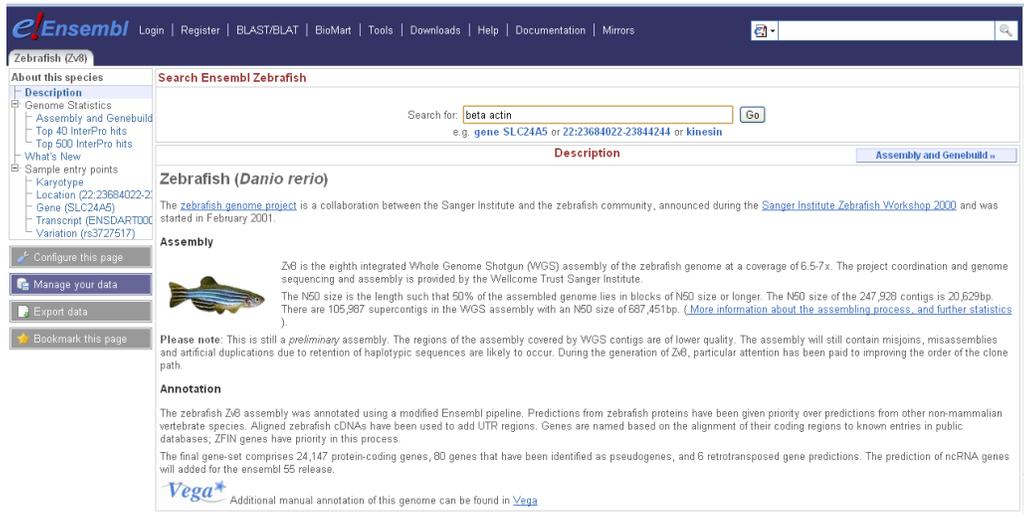
a) Se ingresa a la página web www.ensembl.org



The screenshot shows the Ensembl website interface. At the top, there is a navigation bar with links for Login, Register, BLAST/BLAT, BioMart, Tools, Downloads, Help, Documentation, and Mirrors. Below the navigation bar is a search box with a dropdown menu set to 'All species' and a 'Go' button. A search example is provided: 'human gene BRCA2 or rat X:100000..200000 or coronary heart disease'. The main content area is divided into two columns. The left column is titled 'Browse a Genome' and contains a description of the Ensembl project, a link to species home pages, and a section for 'Popular genomes' featuring Human (GRCh37), Mouse (NCBIM37), and Zebrafish (Zv8). Below this is a dropdown menu for 'All genomes' and a link to 'View full list of all Ensembl species'. The right column is titled 'New to Ensembl?' and lists several helpful links: 'Learn how to use Ensembl', 'Add custom tracks', 'Upload and analyse your data', 'Search for a DNA or protein sequence', 'Fetch only the data you want', 'Download our databases via FTP', and 'Mine Ensembl with BioMart'. At the bottom right, there is a section for 'What's New in Release 59 (5 August 2010)' listing 'New human regulation data and displays (Human)' and 'COSMIC somatic mutations (Human)'.

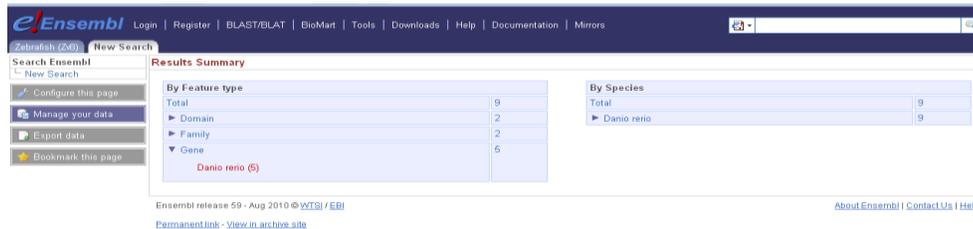
2011, Año del Turismo en México.

b) Se selecciona el genoma de Zebrafish. En el cuadro de búsqueda, introducir el gen seleccionado previamente.



The screenshot shows the Ensembl Zebrafish (Zv8) search results page. The search term 'beta actin' has been entered, and the results are displayed under the 'Description' tab. The page includes a navigation menu on the left, a search bar at the top, and detailed information about the Zebrafish genome project, assembly, and annotation. A small image of a zebrafish is also visible.

c) En la base de datos se despliega una lista con los genes del pez *Danio rerio*.



The screenshot shows the Ensembl Zebrafish (Zv8) Results Summary page. The search results are displayed in a table format, showing the total number of genes and the number of genes for each species. The table is as follows:

By Feature type		By Species	
Total	9	Total	9
▶ Domain	2	▶ Danio rerio	9
▶ Family	2		
▼ Gene	5		
Danio rerio (5)			

The page also includes a navigation menu on the left, a search bar at the top, and footer information including the Ensembl release date and version.

d) Como ejemplo, introducir *β-actin1*.

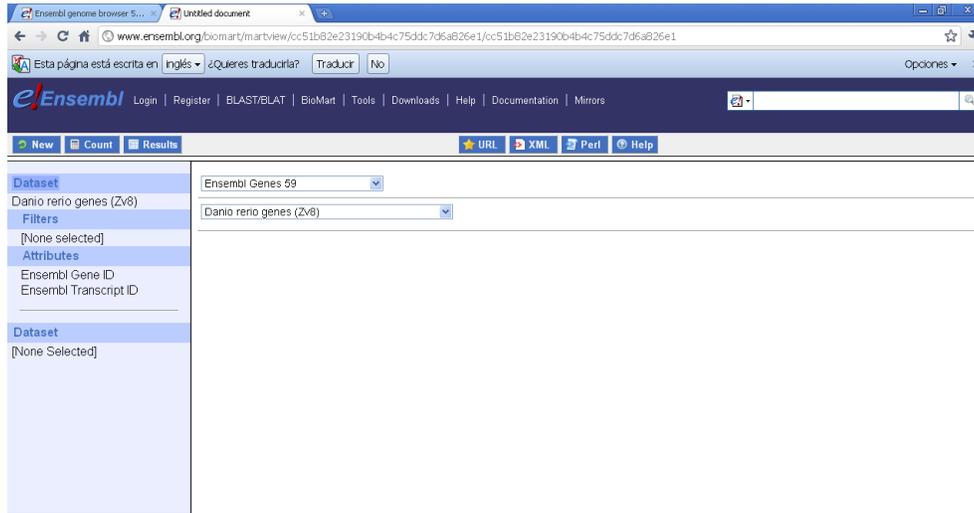
The screenshot shows the Ensembl search results for the query "beta actin corporate/tree:Top/Species/Danio rerio". The search returned 5 entries. The first entry is "actin"-related protein 3-beta (Gene: ENSDARG00000008790, ZFIN: zgc:158823). The second entry is Actin, cytoplasmic 1 (Beta-actin-1) (Gene: ENSDARG00000037746, ZFIN: bactin1), which is highlighted in green. The third entry is Actin, cytoplasmic 2 (Beta-actin-2) (Gene: ENSDARG00000037870, ZFIN: bactin2). The fourth entry is actin, beta-like 2 (Gene: ENSDARG00000079111, ZFIN: zgc:86725). The fifth entry is capping protein (actin) filament) muscle Z-line, beta (Gene: ENSDARG00000046004, HGNC Symbol: CAPZB).

e) Se despliegan las características del gen y se selecciona su identificador.

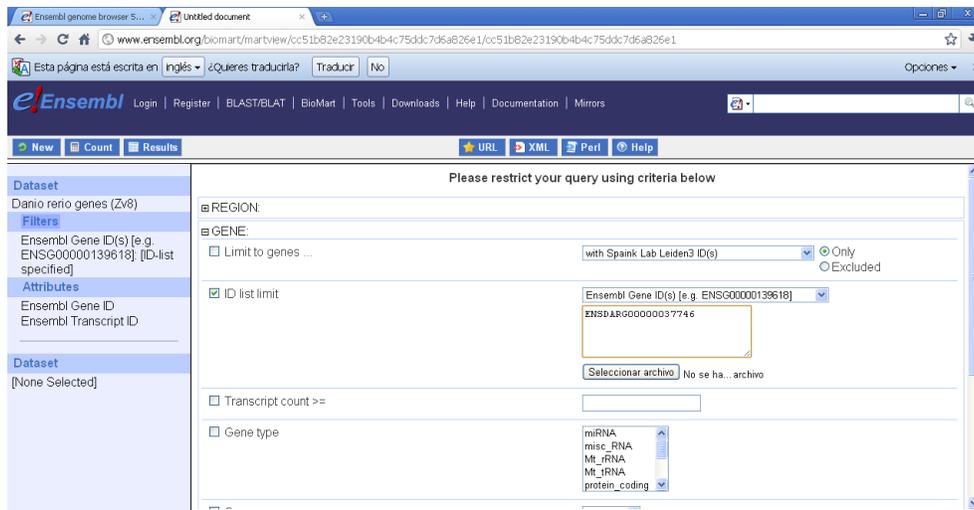
The screenshot shows the Ensembl gene page for **bactin1** (ENSDARG00000037746). The gene is described as "Actin, cytoplasmic 1 (Beta-actin-1) (Contains Actin, cytoplasmic 1, N-terminally processed)". The location is Chromosome 1: 6,883,072-6,886,615 reverse strand. A table of transcripts is shown with one entry: **bactin1** (ENSDART00000054987), 1698 bp, protein ID ENSDARF00000054986, 375 aa, protein coding. A "Transcript and Gene level displays" dialog box is open, explaining that Ensembl provides displays at two levels: transcript level (cDNA and CDS) and gene level (orthologues, paralogues, regulatory regions, and splice variants). The gene summary section shows the name **bactin1** (ZFIN), synonyms (actine, B-ACTZF, bact, wu.f01805), and gene type (Known protein coding). The prediction method is "Transcripts were annotated by the Ensembl genebuild". At the bottom, a genomic track shows the gene structure with exons and introns, and a contig track below it.

2011, Año del Turismo en México.

f) En el menú de Ensembl se selecciona Biomart, dar click en la base de datos Genes 59 de *Danio rerio* genes (Zv8)

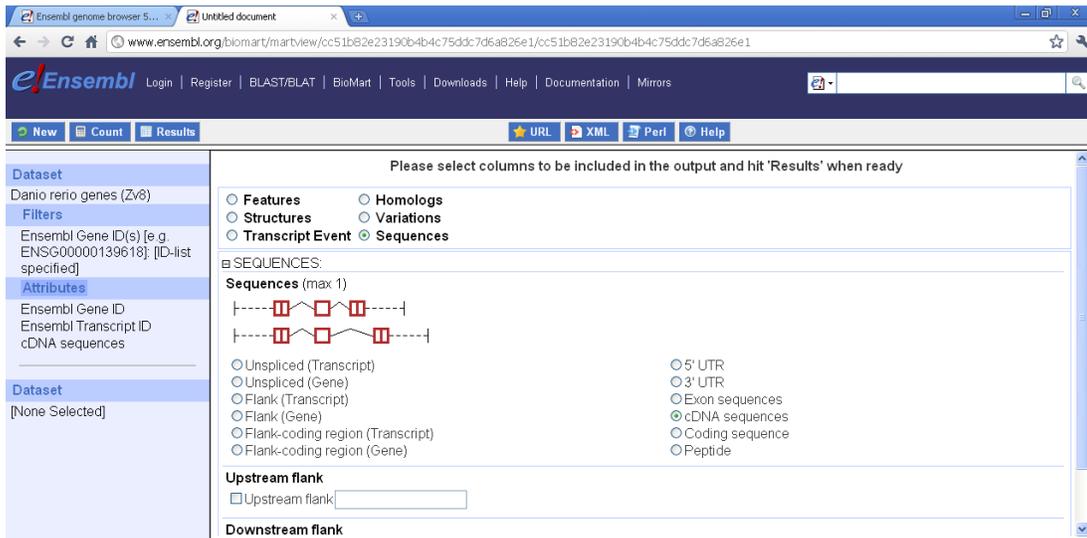


g) Del lado izquierdo de esta página se encuentra el menú Filters, desplegamos Ensembl Gene ID, activar la casilla de verificación de ID list limit y en el recuadro pegar el identificador del gen con el que se está trabajando.

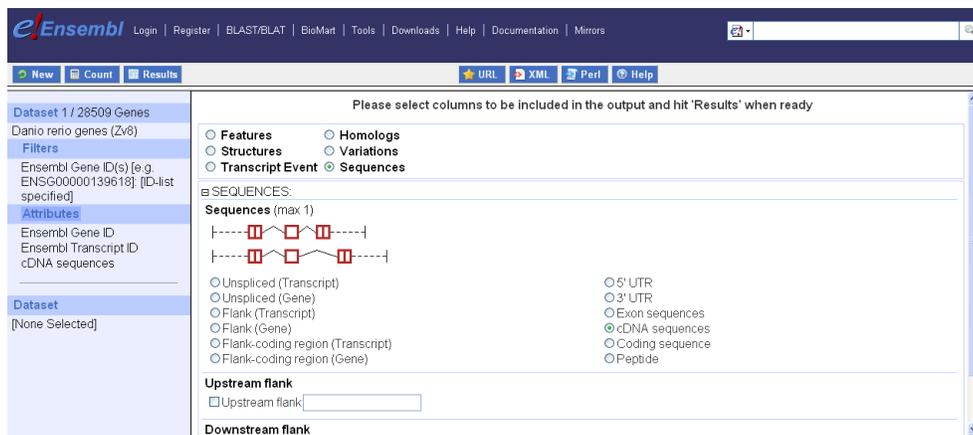


2011, Año del Turismo en México.

h) En el menú Attributes, seleccionar la opción Sequences. Al desplegarse este menú, elegir cDNA sequences.

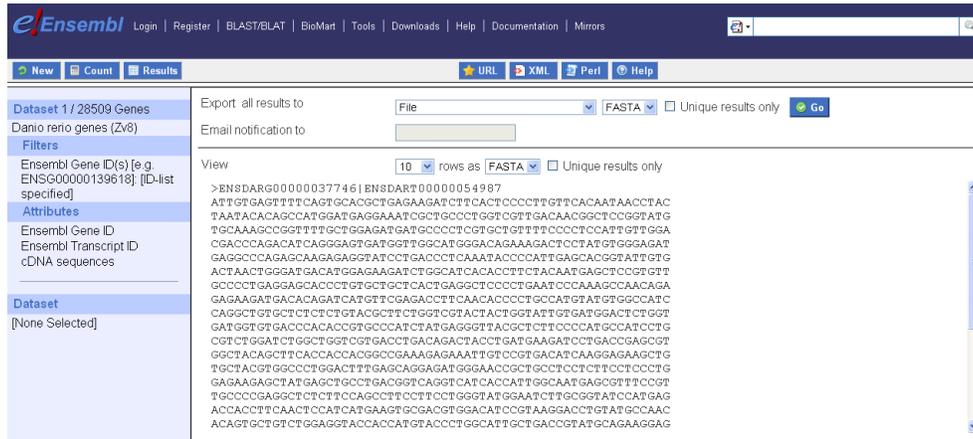


i) Dar click en Count y el programa desplegará el número de genes de *Danio rerio* en la parte Dataset.



2011, Año del Turismo en México.

j) Dar click en Results y se desplegará el código en formato FASTA la secuencia de cDNA del gen seleccionado.



The screenshot shows the Ensembl genome browser interface. On the left, there is a sidebar with 'Dataset 1 / 28509 Genes' and 'Danio rerio genes (Zv8)'. Below this, there are sections for 'Filters', 'Attributes', and 'Dataset'. The 'Attributes' section is expanded, showing 'Ensembl Gene ID', 'Ensembl Transcript ID', and 'cDNA sequences'. The main content area displays the FASTA sequence for a specific gene, starting with '>ENSDARG00000037746|ENSDART00000054987'. The sequence is shown in a monospaced font, with line wrapping. At the top of the main area, there are options to 'Export all results to' (File) and 'View' (10 rows as FASTA). A 'Go' button is visible at the end of the export options.

k) Exportar con el icono →Go y guardar el archivo con el nombre mart_export.txt. Cambiar el nombre del archivo por el del gen correspondiente. Seguidamente, abrir el archivo con WordPad y guardar conservando el formato FASTA.

l) El diseño de los oligonucleótidos (primers) dentro de la secuencia homóloga para cada transcripto se realizó con el programa VECTOR NTI el cual es un software de bioinformatica que permite el diseño de primers y sondas. Se empieza realizando los siguientes pasos:

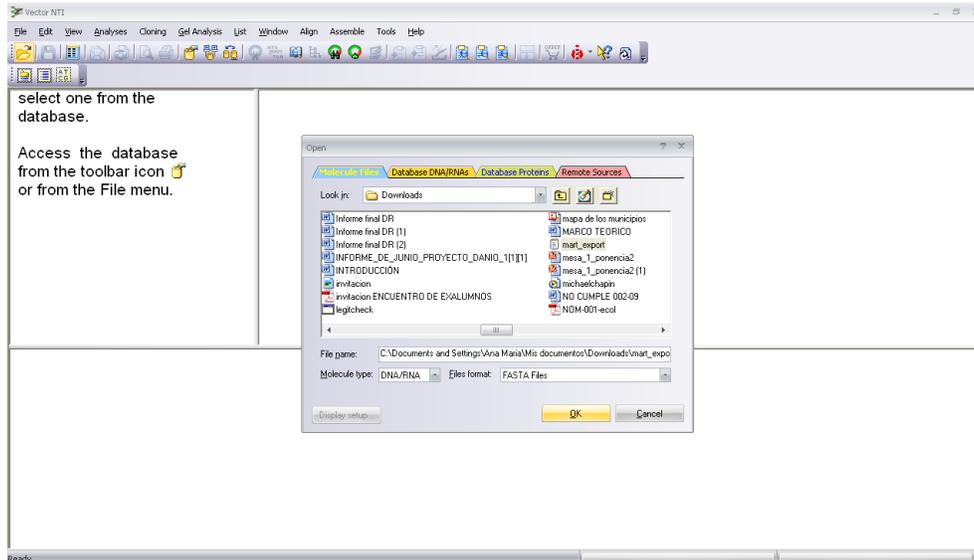
OPEN/ MOLECULE FILES

MOLECULE TYPE: DNA/RNA

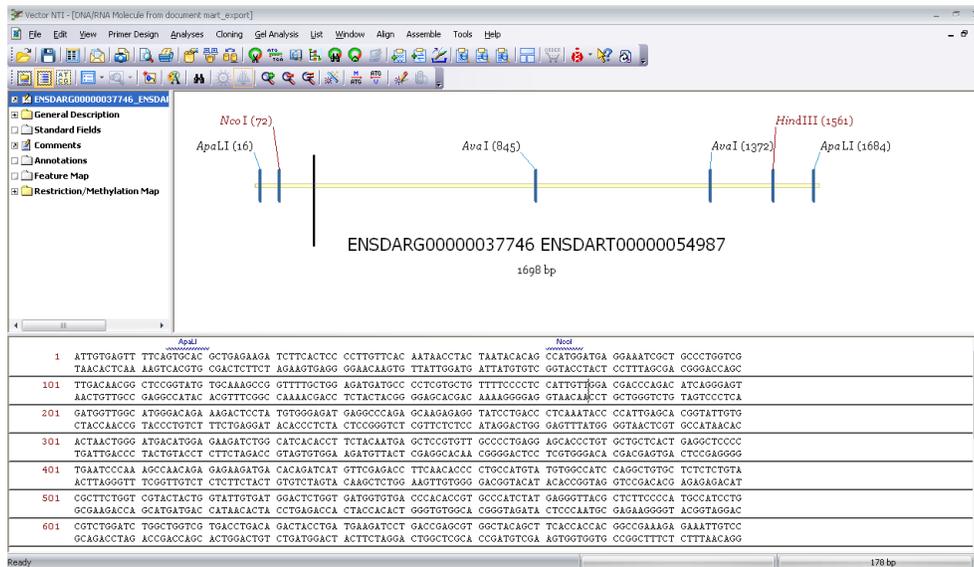
FILES FORMAT: FASTA files

Buscar el archivo mart_export.txt /OK

2011, Año del Turismo en México.

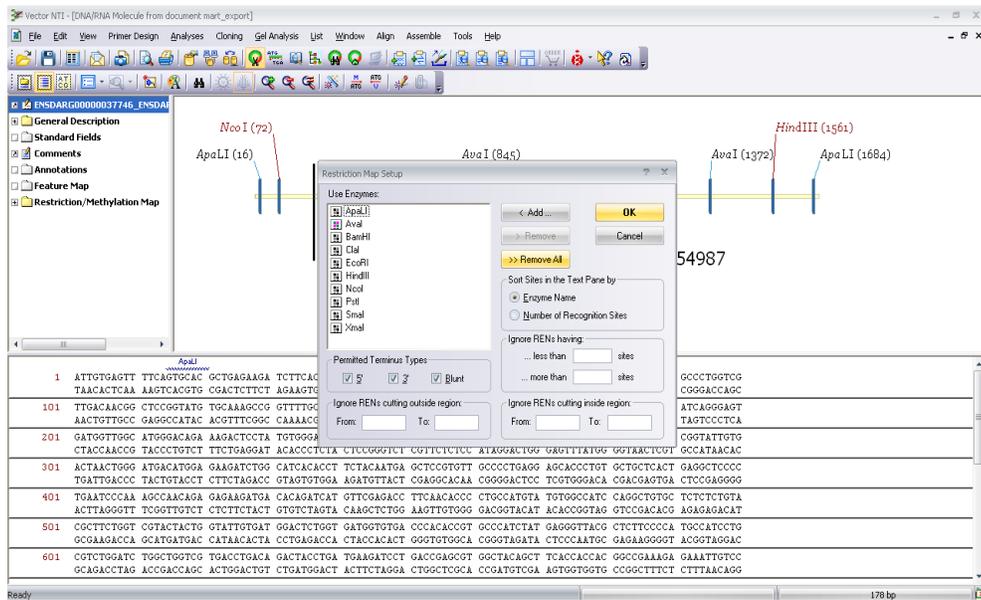


m) Desplegar la secuencia del gen de la siguiente manera:

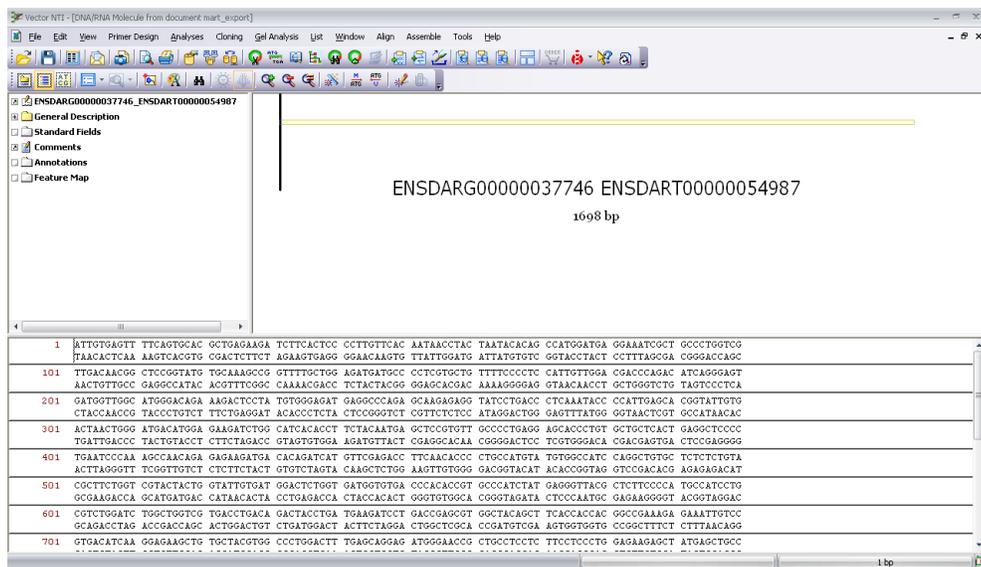


2011, Año del Turismo en México.

n) Dar click derecho sobre la imagen del gen/display setup/quitar la selección en restriction analysis o menú Analyses/Restriction analyses/Restriction sites/Remove all para quitar las marcas de las enzimas de restricción dentro del oligo.

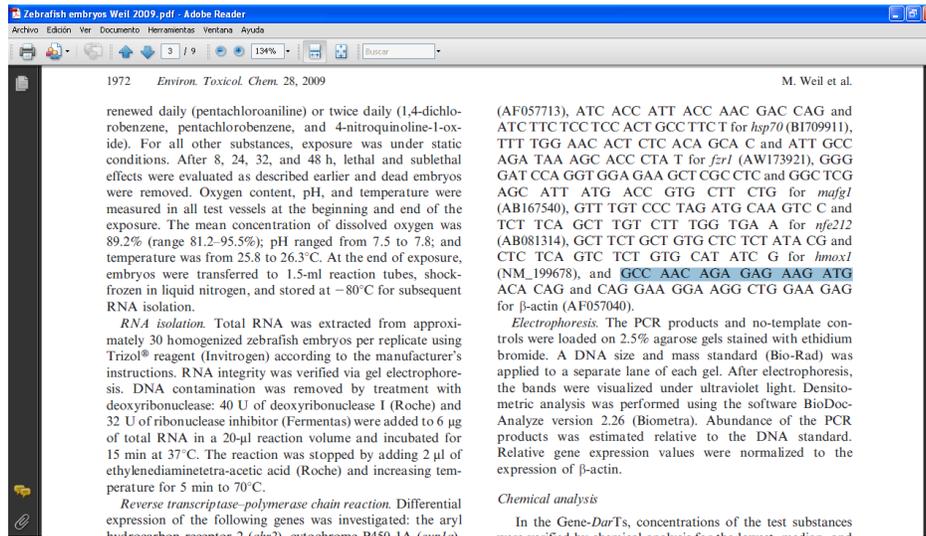


ñ) El gen queda sin alguna interferencia



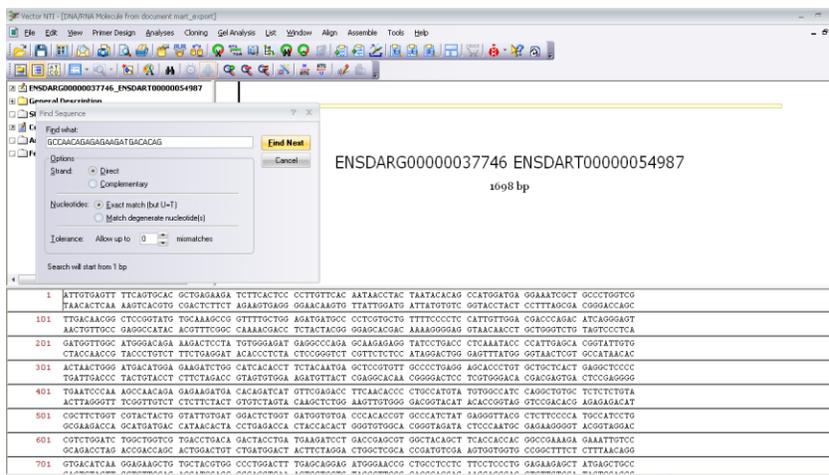
2011, Año del Turismo en México.

o) Abrir la información y copiar la secuencia de los oligos del gen que se está trabajando (quitando los espacios, en caso de que los hubiera).

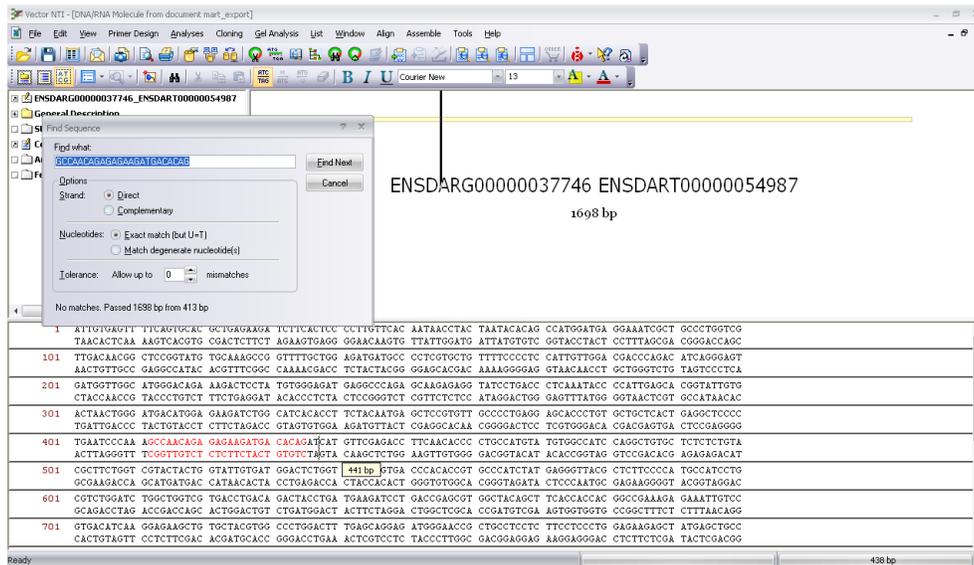


p) En el programa VECTOR NTI seleccionar Menú Edit/ Find Sequence/ Find what y pegar la secuencia del oligo.

En el mismo recuadro se despliega Options. Seleccionar la cadena en la cual se encuentra el oligo que se esté buscando Direct (Foward) o Complementary (Reverse). Dar click en Find Next.



q) Se despliega la secuencia que se está buscando, de forma resaltada. Se cambiar el color o bien se deja en negrita para no perderla de vista



Vector NTI - [DNA/RNA Molecule from document_mart_export]

File Edit View Primer Design Analyses Cloning Gel Analysis List Window Align Assemble Tools Help

Find Sequence

Find what: GGGGACAGGAGAGATGGGAGG

Options: Direct Complementary

Nucleotides: Exact match (but U-T) Match degenerate nucleotide(s)

Tolerance: Allow up to 0 mismatches

End Next

Cancel

ENSDARG0000037746 ENSDART0000054987

1698 bp

No matches. Passed 1698 bp from 413 bp

1 ATTGTGAGTT TTCAGTGCAC GCTGAGAAAG TCTTCACCTC UCTTTTTCAC AATAACCTAC TAATACACAG CCATGGATGA GGAAATCGCT GCGCTGGTGC
 TAACACTCAA AAGTCACTGG CGACTCTTCT AGAAGTGAAG GGAACAAGTG TTATTGGATG ATTATGTGTG GGTACTACTC CTTTATGGCA CGGGACACGC

101 TTGACACAGG CTCGGGTATG TGGAAAGCCG GTTTTGTCTG AGATGATGCC CCTCTGTCTG TTTTCCCTCT CATTGTGGA CGACCCAGAC ATCAGGGAGT
 AACTGTTGCC GAGGCCATAC ACGTTTCGGC CAAAAGACC TTAACAAGGC GAGACACGAC AAAAGGGGAG GTAACAACCT GCTGGGTCTG TAGTCCCTCA

201 GATGGTTGGC ATGGACAGA AAGACTCCTA TOTGGAGAT GAGGCCAGA GCAAGAGAGG TATCTTGACC CTCAATACC CCATTGAGCA CGGTATTGTG
 CTACCACCG TACCCTGTCT TCTGAGGAT ACACCTCTCA CTCGGGCTCT CTTTCTCTCC ATAGACTGCG GAGTTTATGG GGTAACTGCT GCCATAACAC

301 ACTAATCGGG ATGACATGGA GAAGACTGCG CATCACACT TCTACAATGA GCTCCGTGTT GCGCCTGAGG AGCACTGCTG GCTGCTACT GAGGCTCCGC
 TGATTGACCC TACTGTACTC CTTTAGACC GTAAGTGGGA AGATTACTC GAGGCCACAA CGGGACTCC TCGTGGGACA CGACGAGTGA CTCGGAGGGG

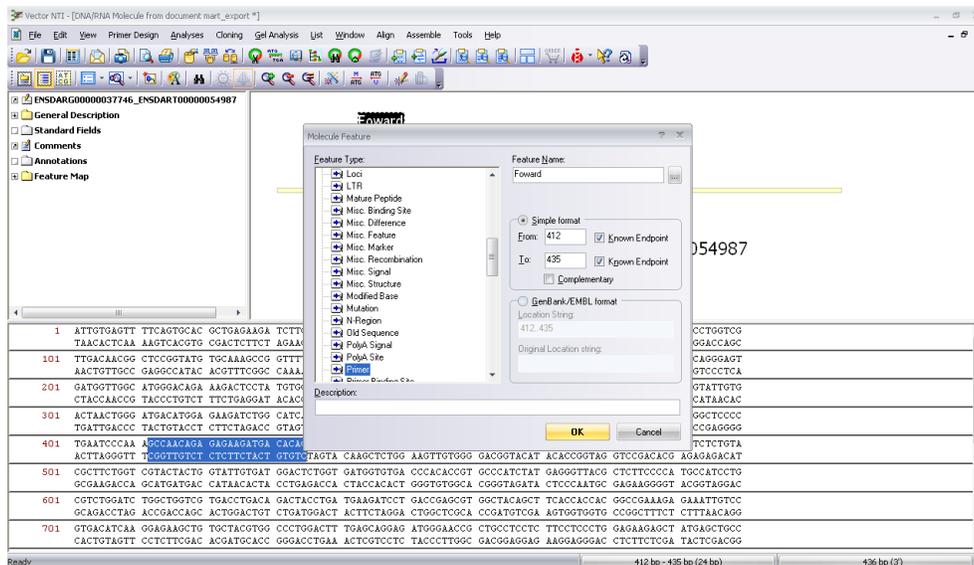
401 TGAATCCAA AAGCACAGA GAGAGATGA CACAGATAT GTTCGAGCC TTCACACCC CTCGCATGA TOTGGCATC GAGGCTGTC TCTCTGTA
 ACTTAGGGTT TGGGTTGTTCT CTTCTTACT GTGTGTGTA CAAGCTCTGG AAGTTGTGGG GAGGTTACT ACACGGTAGG GTCCGACAGC AGAGACAT

501 CCGCTTGTGT COTACTACTG GTATTGTGAT GGAATCTGTT 413 bp GGA CCGCACCGT GCCATCTAT GAGGGTTAGC CTCCTCCCA TGCCATCTGT
 GCGAGACCA GATGATGAC CATAACACTA CTCGAGACCA CTACACACT GGGTTGGCA CGGTAGATA CTCGCCATGC GAGAGGGGT ACGGTAGGAC

601 CCGTGTGATC TGGCTGGTGC TGAACCTGAC GACTACCTGA TGAAGATCCT GACCGAGGT GGCTACAGCT TCACCACCC GCGCGAAGA GAAATTGTCC
 GAGACCTAG ACCGACACGC ACTGGACTGT CTGATGACT ACTTCTAGGA CTGGCTGCA CCGATGTGGA AGTGGTGGTG CCGGCTTCT CTTTAAACAG

701 GTGACATCAA GAGAAAGCTG TGCTACGTGG CCTGACTT TGAGCAGGAG ATGGAAACC CTGCTCTCT TTCTCCCTG GAGAAAGCT ATGAGCTGCC
 CACTGTAGTT CCTCTTGAC ACGATGCACC GGGACTGAA ACTGTCTCT TACCCTTGGC GAGCGAGGAG AAGGAGGAC CTCCTTCTGA TACTGACCG

r) Se selecciona el icono Add feature dentro de esta ventanilla desplegable se elige lo que se desea marcar, primers o exones. Poner el nombre y dar click en aceptar.



Vector NTI - [DNA/RNA Molecule from document_mart_export *]

File Edit View Primer Design Analyses Cloning Gel Analysis List Window Align Assemble Tools Help

Molecule Feature

Feature Type: LTR

Feature Name: Forward

From: 412 Known Endpoint

To: 435 Known Startpoint

Complementary

GenBank/EMBL format

Location String: 412..435

Original Location string:

Description:

OK Cancel

ENSDARG0000037746 ENSDART0000054987

1 ATTGTGAGTT TTCAGTGCAC GCTGAGAAAG TCTTCACCTC UCTTTTTCAC AATAACCTAC TAATACACAG CCATGGATGA GGAAATCGCT GCGCTGGTGC
 TAACACTCAA AAGTCACTGG CGACTCTTCT AGAAGTGAAG GGAACAAGTG TTATTGGATG ATTATGTGTG GGTACTACTC CTTTATGGCA CGGGACACGC

101 TTGACACAGG CTCGGGTATG TGGAAAGCCG GTTTTGTCTG AGATGATGCC CCTCTGTCTG TTTTCCCTCT CATTGTGGA CGACCCAGAC ATCAGGGAGT
 AACTGTTGCC GAGGCCATAC ACGTTTCGGC CAAAAGACC TTAACAAGGC GAGACACGAC AAAAGGGGAG GTAACAACCT GCTGGGTCTG TAGTCCCTCA

201 GATGGTTGGC ATGGACAGA AAGACTCCTA TOTGGAGAT GAGGCCAGA GCAAGAGAGG TATCTTGACC CTCAATACC CCATTGAGCA CGGTATTGTG
 CTACCACCG TACCCTGTCT TCTGAGGAT ACACCTCTCA CTCGGGCTCT CTTTCTCTCC ATAGACTGCG GAGTTTATGG GGTAACTGCT GCCATAACAC

301 ACTAATCGGG ATGACATGGA GAAGACTGCG CATCACACT TCTACAATGA GCTCCGTGTT GCGCCTGAGG AGCACTGCTG GCTGCTACT GAGGCTCCGC
 TGATTGACCC TACTGTACTC CTTTAGACC GTAAGTGGGA AGATTACTC GAGGCCACAA CGGGACTCC TCGTGGGACA CGACGAGTGA CTCGGAGGGG

401 TGAATCCAA AAGCACAGA GAGAGATGA CACAGATAT GTTCGAGCC TTCACACCC CTCGCATGA TOTGGCATC GAGGCTGTC TCTCTGTA
 ACTTAGGGTT TGGGTTGTTCT CTTCTTACT GTGTGTGTA CAAGCTCTGG AAGTTGTGGG GAGGTTACT ACACGGTAGG GTCCGACAGC AGAGACAT

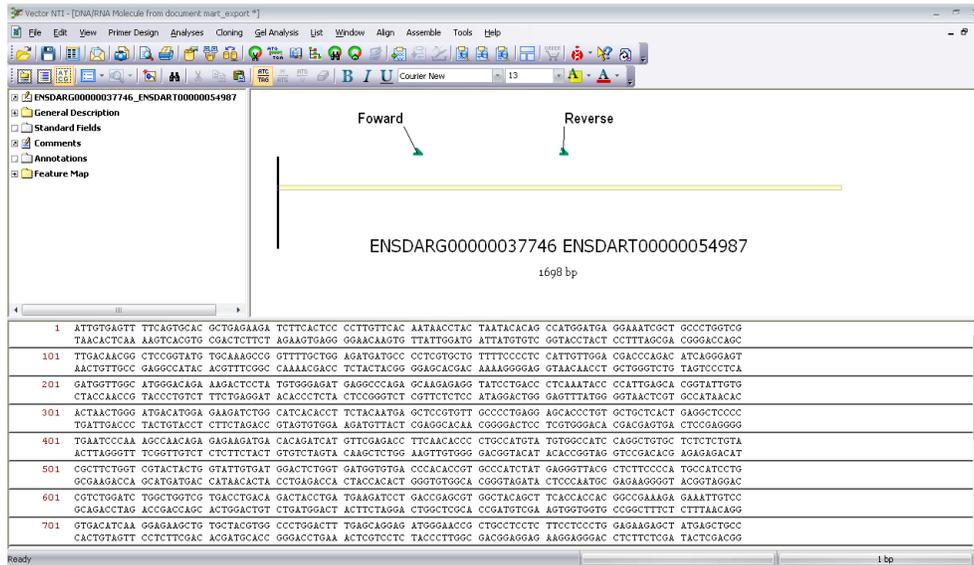
501 CCGCTTGTGT COTACTACTG GTATTGTGAT GGAATCTGTT GATGGTGGGA CCGCACCGT GCCATCTAT GAGGGTTAGC CTCCTCCCA TGCCATCTGT
 GCGAGACCA GATGATGAC CATAACACTA CTCGAGACCA CTACACACT GGGTTGGCA CGGTAGATA CTCGCCATGC GAGAGGGGT ACGGTAGGAC

601 CCGTGTGATC TGGCTGGTGC TGAACCTGAC GACTACCTGA TGAAGATCCT GACCGAGGT GGCTACAGCT TCACCACCC GCGCGAAGA GAAATTGTCC
 GAGACCTAG ACCGACACGC ACTGGACTGT CTGATGACT ACTTCTAGGA CTGGCTGCA CCGATGTGGA AGTGGTGGTG CCGGCTTCT CTTTAAACAG

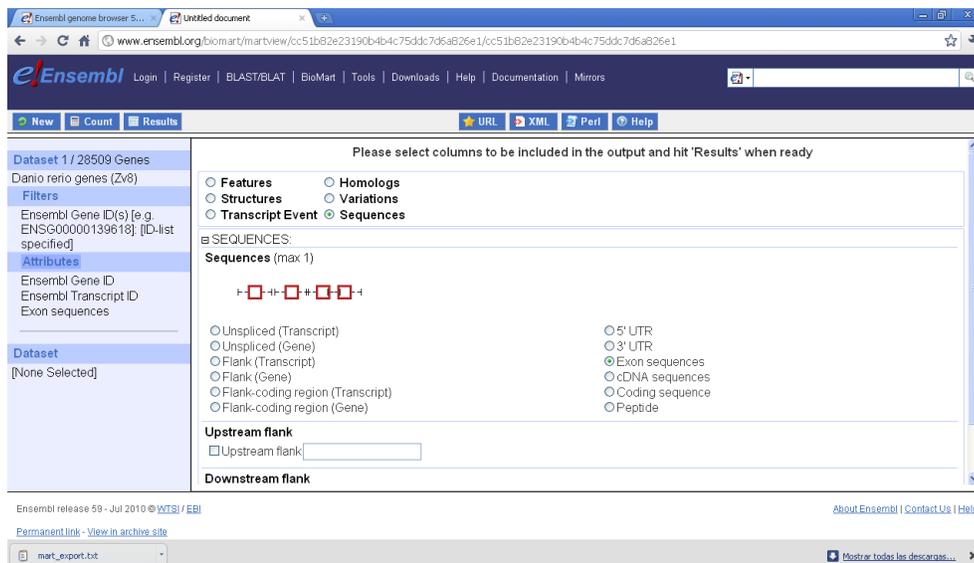
701 GTGACATCAA GAGAAAGCTG TGCTACGTGG CCTGACTT TGAGCAGGAG ATGGAAACC CTGCTCTCT TTCTCCCTG GAGAAAGCT ATGAGCTGCC
 CACTGTAGTT CCTCTTGAC ACGATGCACC GGGACTGAA ACTGTCTCT TACCCTTGGC GAGCGAGGAG AAGGAGGAC CTCCTTCTGA TACTGACCG

2011, Año del Turismo en México.

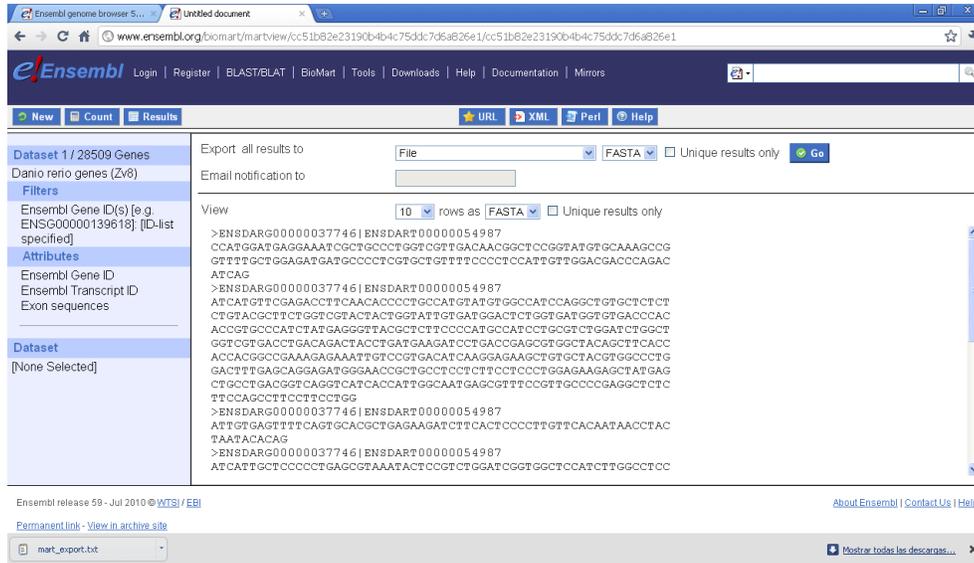
s) Enseguida, se despliega el Foward y el Reverse que se buscaron en la opción de Find sequence.



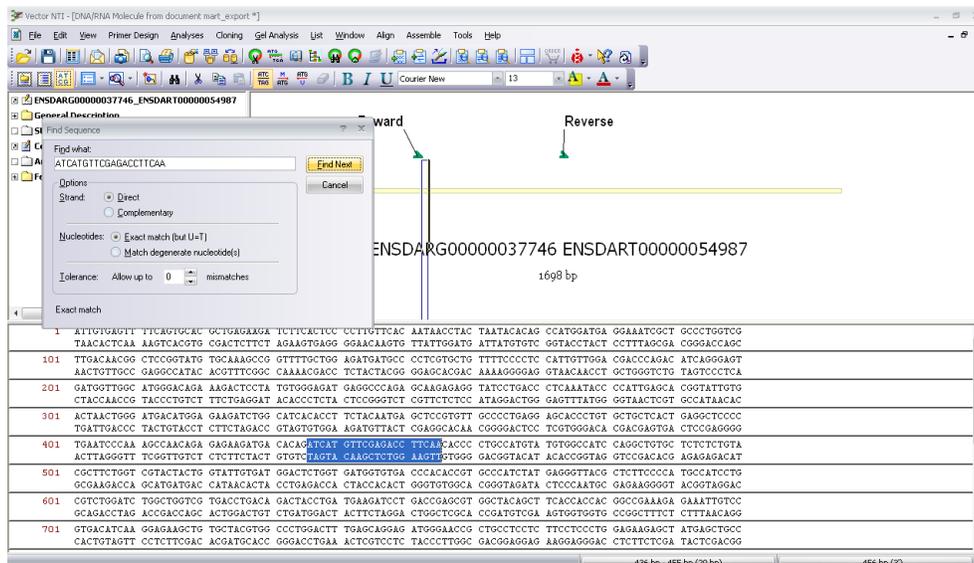
t) Para marcar los exones, ir a Biomart de Ensembl.



u) En la opción Attributes seleccionar Exon sequences/Resultados.

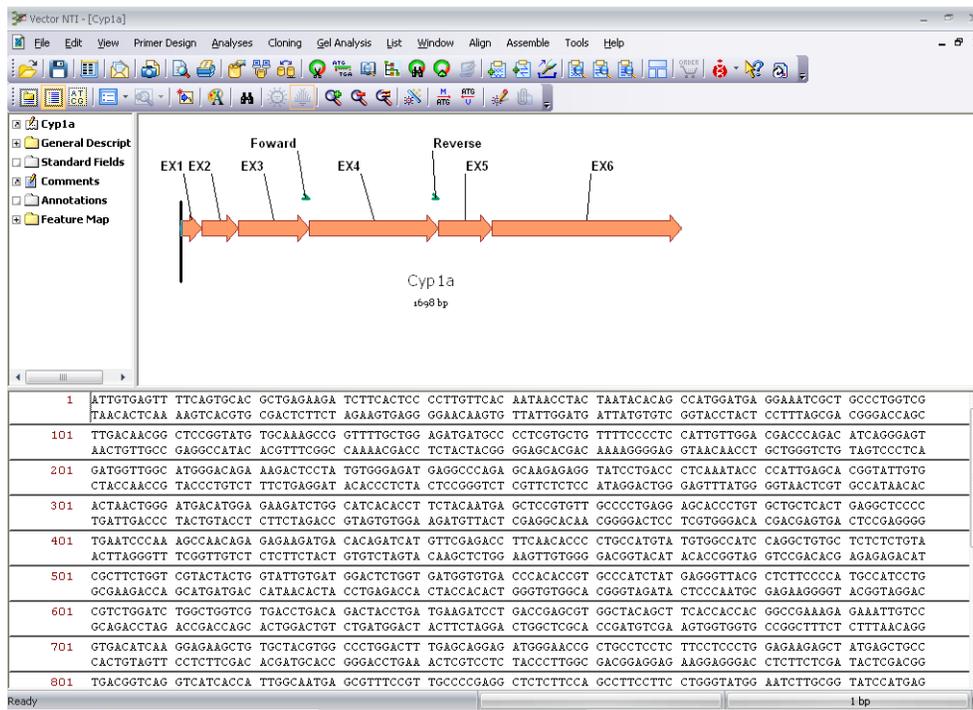


v) Exportar el archivo de exones, abrirlo. Seleccionar las primeras 10-20 letras de la secuencia y buscar en Vector. Marcar con color deseado.



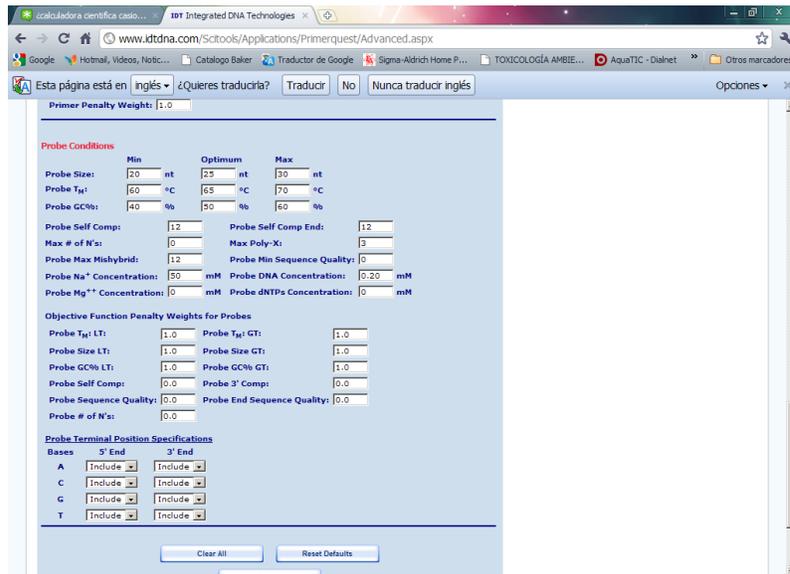
w) Seleccionar las últimas 10-20 letras de la secuencia del exón. Buscar y posteriormente marcar el exón completo, seleccionándolo con un color.

Etiquetar con la herramienta Add feature, poner la etiqueta de exón. Se despliega la marca de flecha del exón. Realizar las mismas indicaciones con los exones restantes.



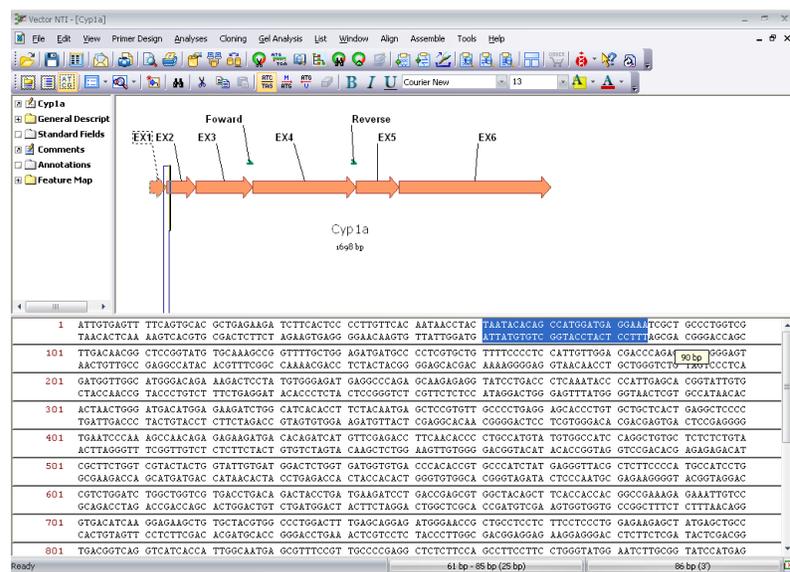
x) Para diseñar la sonda que pegue en la frontera exón-exón, ir a la página de idt, desplegar la ventana de Advanced para verificar las condiciones óptimas que se requieren para la sonda. En ella se verifica el tamaño de la sonda, la Tm y el %GC

2011, Año del Turismo en México.



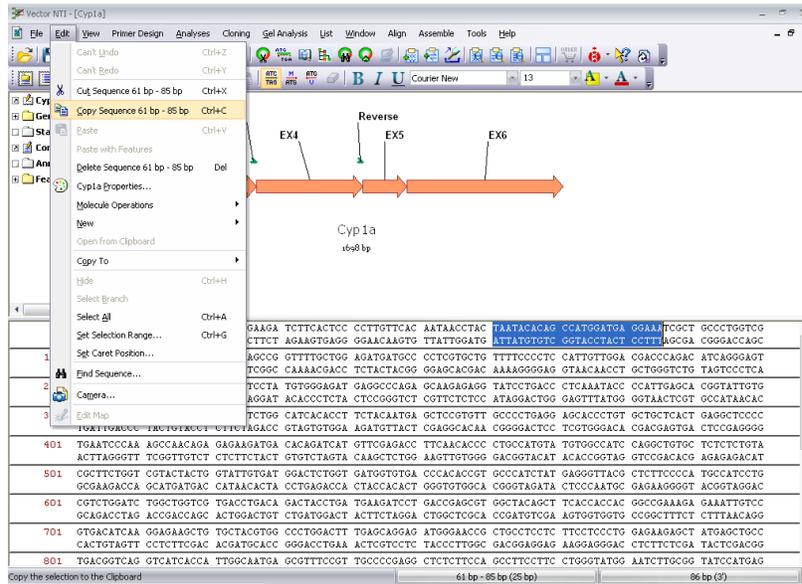
y) Posteriormente a esta verificación, ir a Vector NTI y cargar la secuencia con los exones identificados.

Considerando los datos de idt, ubicarse en un exón y tomar las últimas trece letras de éste y doce letras del siguiente exón, para que sean 25 pb en total de la sonda que se está diseñando.

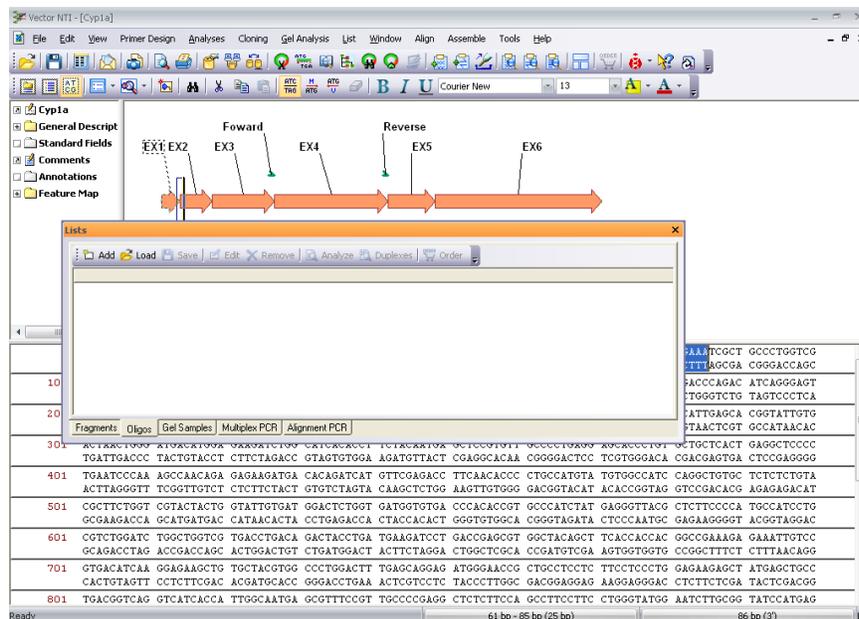


2011, Año del Turismo en México.

z) Se selecciona la secuencia y se va al menú Edit/ Copy sequence y se copia la secuencia, o bien se puede realizar con el método abreviado Ctrl+C.

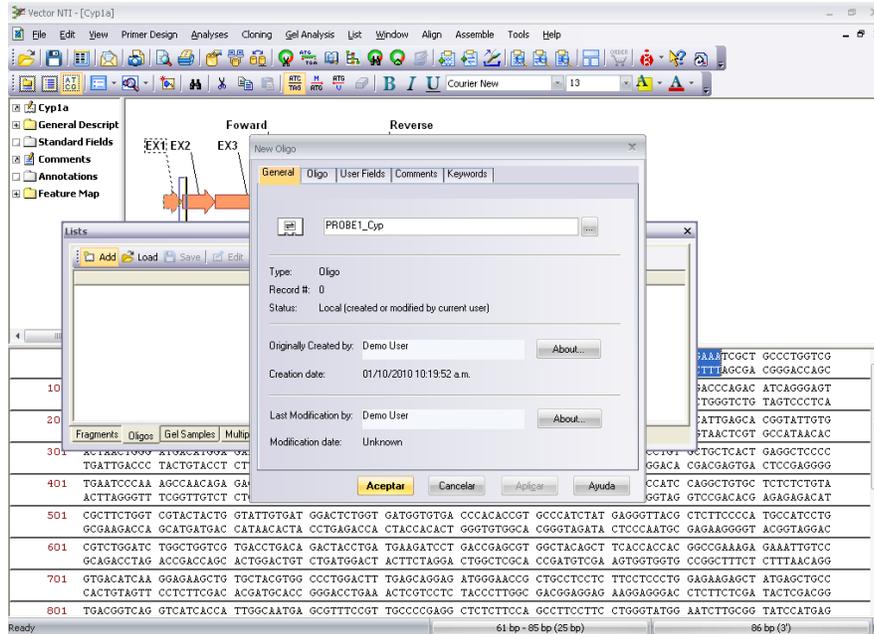


aa) Posteriormente, en el menú List, seleccionar la opción Oligo list y seleccionar el ícono Add para agregar la secuencia anterior.

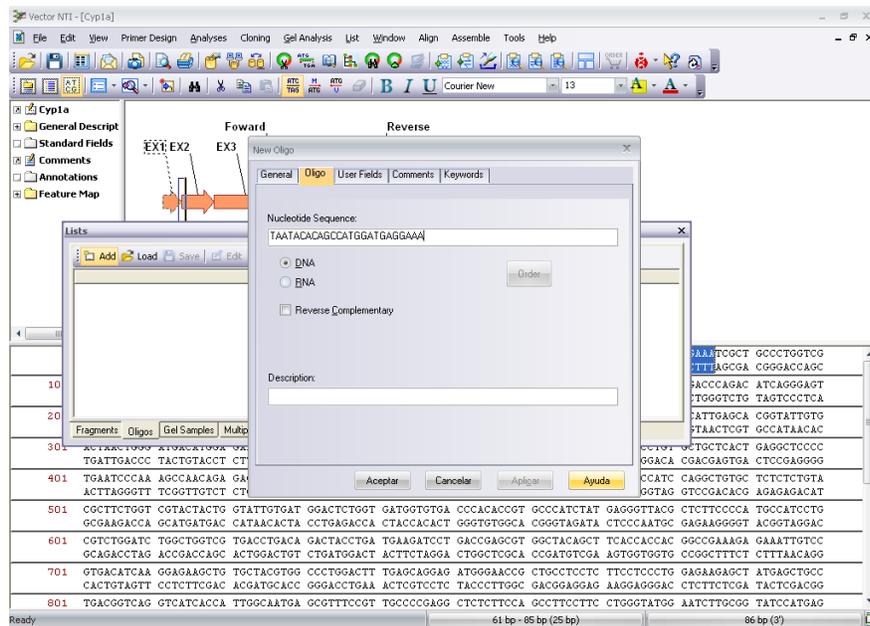


2011, Año del Turismo en México.

ab) Asignar nombre al oligo.

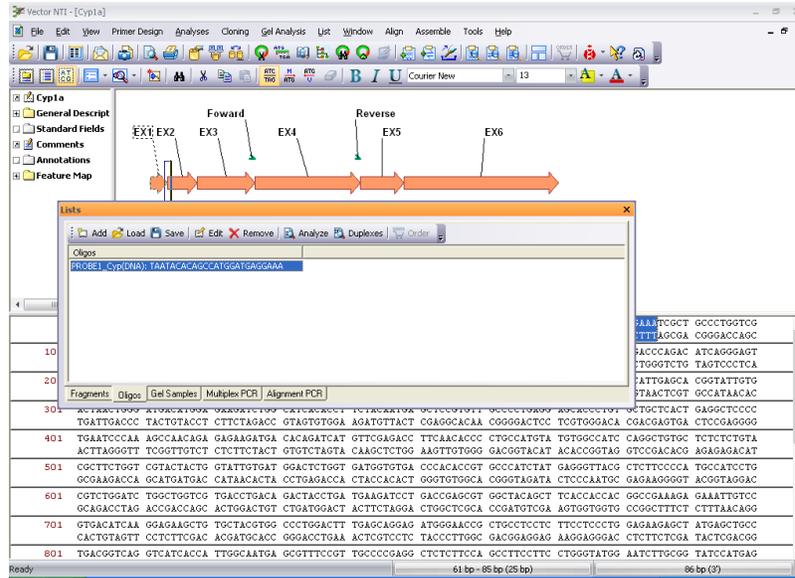


ac) En la ventana New Oligo/Oligo/Nucleotide Sequence pegar la secuencia de la sonda y dar click en aceptar.

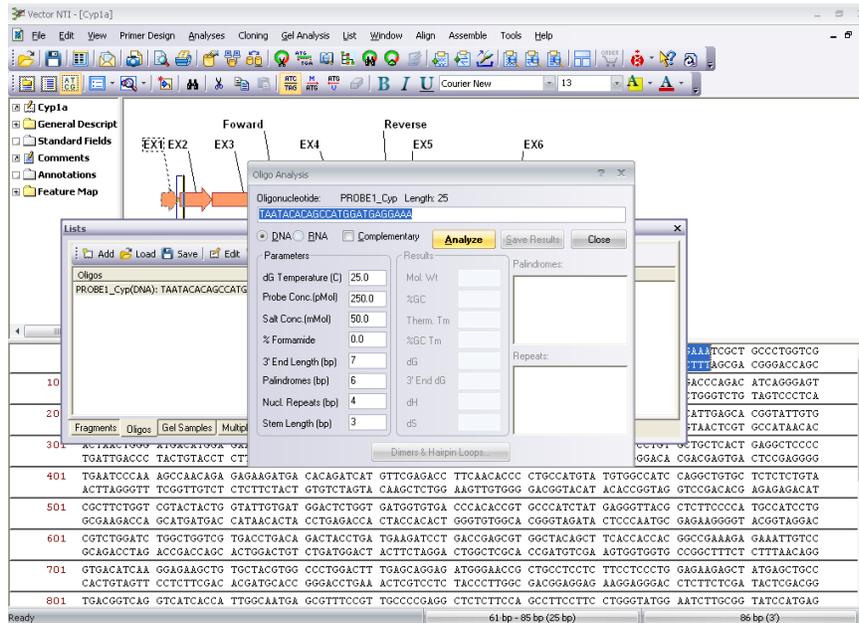


2011, Año del Turismo en México.

ad) Se despliega la lista de oligos.

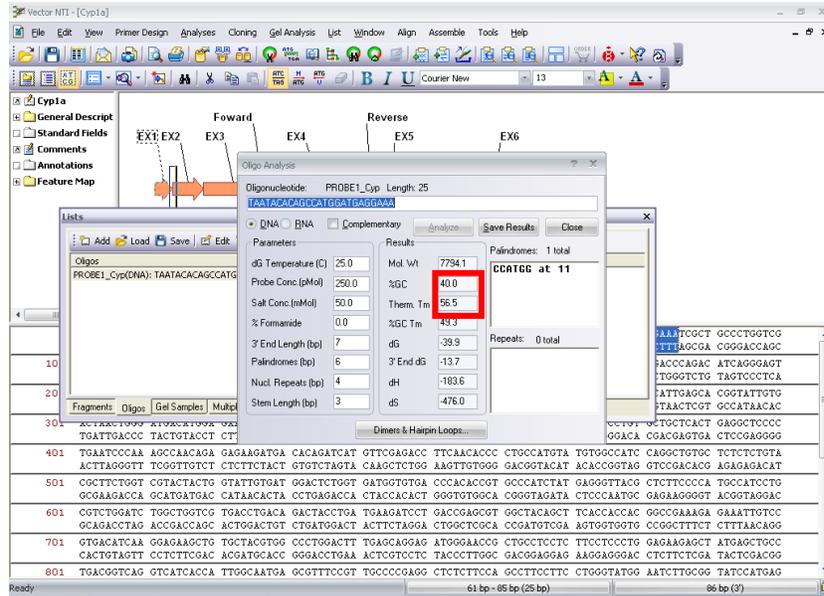


ae) Seleccionar Oligo Analysis/Analyze y proceder a analizar la secuencia.

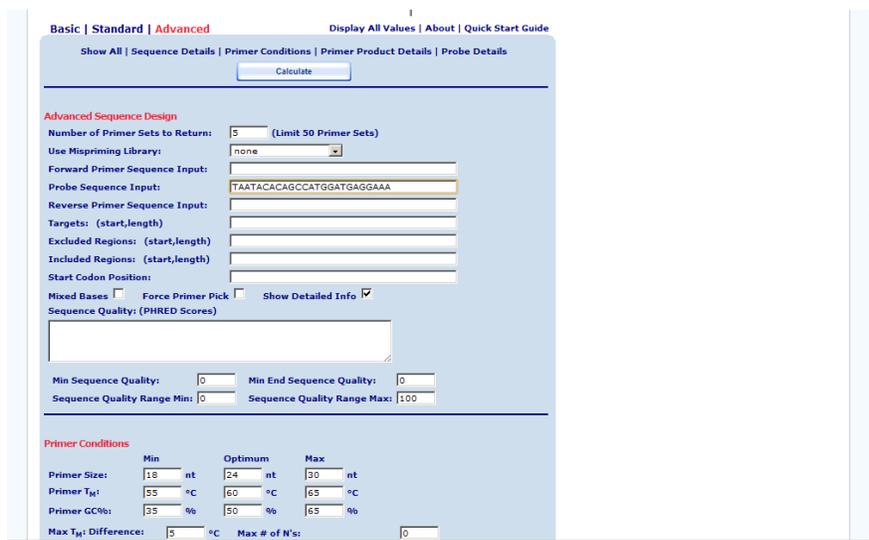


2011, Año del Turismo en México.

af) Se despliega el % GC y la Tm.

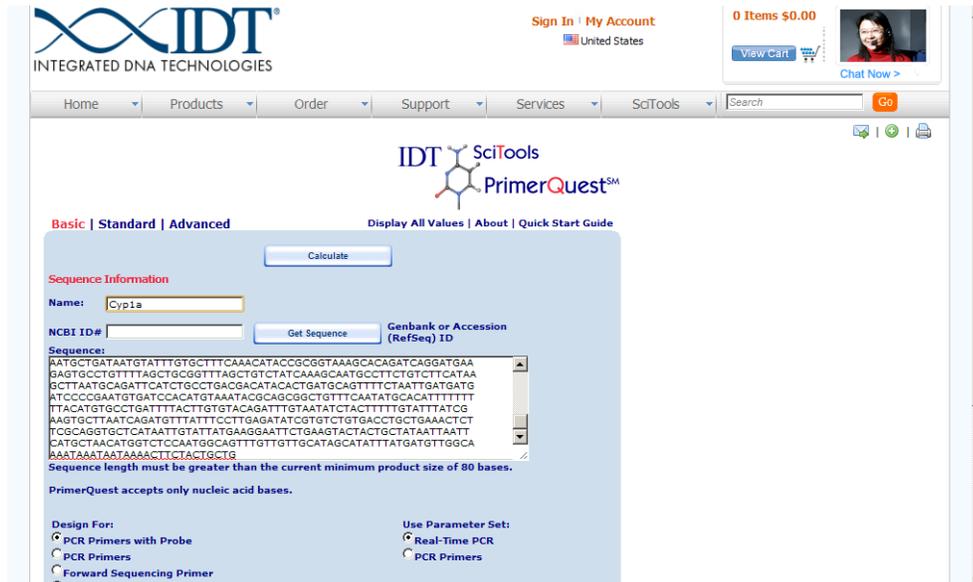


ag) Si la Tm y el %GC corresponden a las condiciones óptimas en idt, continuar con el análisis. Regresar a idt y pegar la secuencia de la sonda en la ventana de Probe, y calcular.

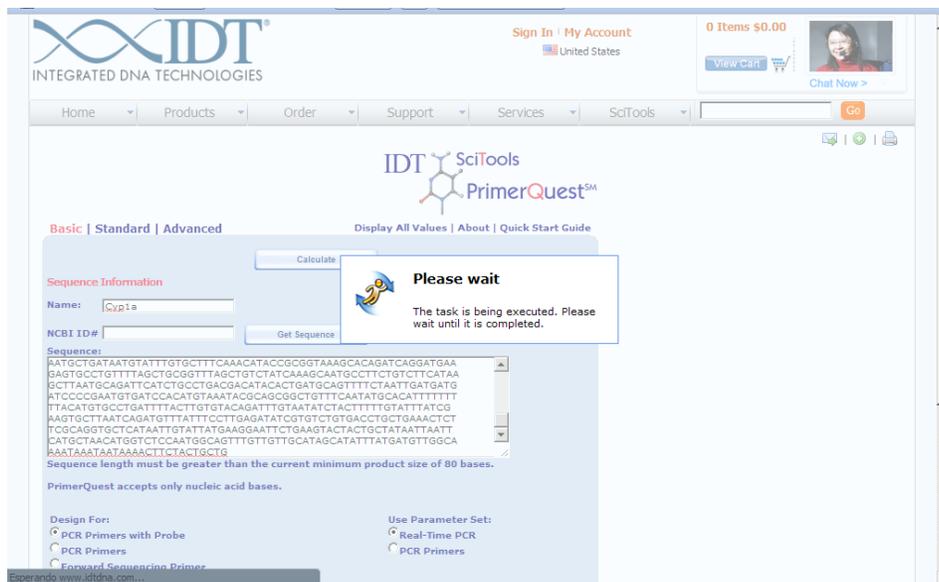


2011, Año del Turismo en México.

Nota: En la pestaña Basic, poner el nombre del gen que se está analizando y la secuencia completa del gen en el recuadro

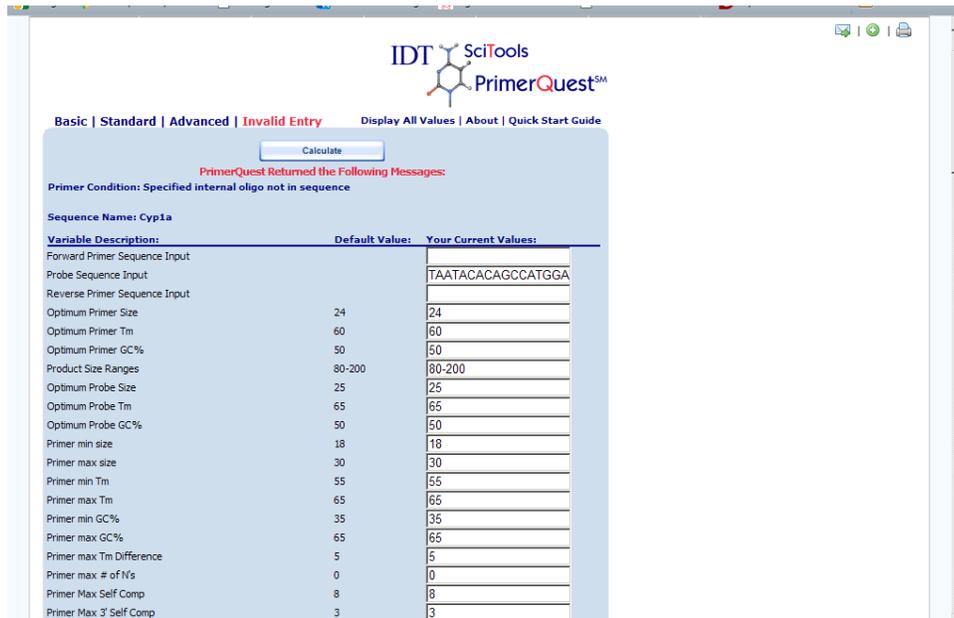


Si no se obtienen las condiciones en el primero, continuar con las siguientes hasta contar con el adecuado.



2011, Año del Turismo en México.

ah) El no encontrarlo posiblemente se deba que el oligo especificado no esté dentro de la secuencia.



PrimerQuest Returned the Following Messages:
Primer Condition: Specified internal oligo not in sequence

Sequence Name: Cyp1a

Variable Description:	Default Value:	Your Current Values:
Forward Primer Sequence Input		
Probe Sequence Input		TAATACACAGCCATGGA
Reverse Primer Sequence Input		
Optimum Primer Size	24	24
Optimum Primer Tm	60	60
Optimum Primer GC%	50	50
Product Size Ranges	80-200	80-200
Optimum Probe Size	25	25
Optimum Probe Tm	65	65
Optimum Probe GC%	50	50
Primer min size	18	18
Primer max size	30	30
Primer min Tm	55	55
Primer max Tm	65	65
Primer min GC%	35	35
Primer max GC%	65	65
Primer max Tm Difference	5	5
Primer max # of N's	0	0
Primer Max Self Comp	8	8
Primer Max 3' Self Comp	3	3

ai) Secuencias de los oligos para el análisis de la expresión genética.

Las secuencias de los oligos que se seleccionaron son las siguientes

2011, Año del Turismo en México.

>*β_actina_F*
 ATTGGCAATGAGCGTTTCCGTTGC
 >*β_actina_R*
 TCCAGACAGCACTGTGTTGGCATA
 >*β_actina_Sonda*
 CCTTCCTCCTGGGTATGGAATCTTGC

>*cyp1a_F*
 TGCAAGTGTCCGATGAGAAGATCG
 >*cyp1a_R*
 TCCAATTCTCTTTGCAGTCGCTCC
 >*cyp1a_sonda*
 ACCTATTCGGAGCCGGTTTCGACACTATCA

>*fzr1_F*
 TACTGCGGCAGATCAACGTCCAAA
 >*fzr1_R*
 TTGCTTGGCGATGACAATGGTGAC
 >*fzr1_sonda*
 TGACAACACCAGCCCTATGAAAGCA

>*hsp70_F*
 AGAGTGTTGGGACAGTGATTGGGA
 >*hsp70_R*
 AGTGATGCGGTTTCCCTGGTCATT
 >*hsp70_sonda*
 ACCTTGGGACCACATACTCCTGTGTT

>*ahr2_F*
 ATGGACAAACAGCTTCCAGTCTGGA
 >*ahr2_Sonda*
 CTGTTGTTGCAGGCACTCAATGGCT

>*ahr2_R*
 ATACGTAACCTTCAGCCGTGACCA
 >*maf1_F*
 GGAGAGCAGCATTTCGTGGTATGACTA
 >*maf1_R*
 ACAGACATGGACACCAGCTCATCATCT
 >*maf1_Sonda*
 AAAGCACTGAAGGTGAAGCGAGAGC

>*nfe2l2_F*
 GGCGTTTACCCAGAATCCTTTGCT
 >*nfe2l2_Sonda*
 CCAGAGTTGCAGCAGTGCCTCAACA
 >*nfe2l2_R*
 GGTTGGTGCTTCTGTGGAAGGTTT

>*hmox1_F*
 CAGAGCATTTCGAGTTCAACATTGATGTGTT
 >*hmox1_Sonda*
 AGCTTCCTCTGTGATGCTCAGCATTT
 >*hmox1_R*
 TGCTGCTTCATTTCTTTATCACTTG

>*vtg1-F*
 ATGAGAGCTGTTGTGCTTGCCTTG
 >*vtg1-R*
 TGTCGTGGCACTGATGAGAACCTT
 >*vtg1-sonda*
 GTAGCCCTCGTGGCATGTCAACAATTC

>*gapdh_F*
 AGTCCGTCTTGAGAAACCTGCCAA
 >*gapdh_R*



2011, Año del Turismo en México.

GCGTCAAAGATGGATGAACGGCAA
>gapdh_sonda
GATGAGATCAAGAAAGTCGTCAAGGCTGC
>mt2_F
CAAGCTCTTTGTGGATACTCTCTGG
>mt2_Sonda
AGTCTTGGCACATTCGCAGGGGTCCA
>mt2_R
AACCAGATGGGCAGCAAGAACAAC

>ef1a_F
TCTACAAATGCGGTGGAATCGAC
>ef1a_R
TTTGTCCAACACCCAGGCGTACTT
>ef1a_sonda
AGGAAGCCGCTGAGATGGGCA

2011, Año del Turismo en México.

VI.3 Análisis de interacciones entre sondas y oligos de *Danio rerio*.

Las interacciones de las secuencias de las sondas y los oligos fueron analizadas empleando los softwares bioinformáticos de Vector NTI/IDT (Tabla 2).

	β _actin a_F	β _actina _R	β _actina_S onda	cyp1a _F	cyp1a _R	cyp1a_so nda	fzr1 _F	fzr1_ R	fzr1_so nda
β _actina_F	---								
β _actina_R	0/0	---							
β _actina_S onda	0/0	0/0	---						
cyp1a_F	0/0	0/0	0/0	---					
cyp1a_R	0/0	0/0	0/0	0/0	---				
cyp1a_sonda	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	---			
fzr1_F	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	---		
fzr1_R	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	---	
fzr1_sonda	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	---

	ahr2 _F	ahr2_So nda	ahr2_ R	hmox1 _F	hmox1_So nda	hmox1 _R	hsp70 _F	hsp70_So nda	hsp70 _R
ahr2_F	-----								
ahr2_Sonda	0 / 0	-----							
ahr2_R	0 / 0	0 / 0	-----						
hmox1_F	0 / 0	0 / 0	0 / 0	-----					
hmox1_So nda	0 / 0	0 / 0	0 / 0	0 / 0	-----				
hmox1_R	0 / 0	0 / 0	0 / 0	0 / 0	0 / 0	-----			
hsp70_F	0 / 0	0 / 0	0 / 0	0 / 0	0 / 0	0 / 0	-----		
hsp70_Son da	0 / 0	0 / 0	0 / 0	0 / 0	0 / 0	0 / 0	0 / 0	-----	
hsp70_R	0 / 0	0 / 0	0 / 0	0 / 0	0 / 0	0 / 0	0 / 0	0 / 0	-----

	maf1 _F	maf1 _R	maf1_So nda	nfe212 _F	nfe212 _R	nfe212_So nda	gapdh _F	gapdh _R	gapdh_So nda
maf1_F	---								
maf1_R	0/0	---							
maf1_So nda	0/0	0/0	---						
nfe212_F	0/0	0/0	0/0	---					
nfe212_R	0/0	0/0	0/0	0/0	---				
nfe212_So nda	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	---			
gapdh_F	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	---		
gapdh_R	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	---	
gapdh_So nda	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	---

2011, Año del Turismo en México.

	mt2_ F	mt2_ R	mt2_Sond a	vtg1_ F	vtg1_ R	vtg1_Sond a	ef1a_ F	ef1a_ R	ef1a_Sond a
mt2_F	---								
mt2_R	0/0	---							
mt2_Sond a	0/0	0/0	---						
vtg1_F	0/0	0/0	0/0	---					
vtg1_R	0/0	0/0	0/0	0/0	---				
vtg1_Sond a	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	---			
ef1a_F	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	---		
ef1a_R	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	---	
ef1a_Sond a	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	---

2011, Año del Turismo en México.

Interacciones compatibles

PRIMER TRÍO:

<i>β-actina</i> (control)	(ENSDART00000054987)	(FAM)
<i>cyp1a</i>	(ENSDART00000038200)	
NEDTM/TAMRATM/Cy3		
<i>fzr1</i>	(ENSDART00000015891)	CY5

SEGUNDO TRÍO:

<i>ahr2</i>	(ENSDART00000105762)	(FAM)
<i>hmx1</i>	(ENSDART00000030890)	
NEDTM/TAMRATM/Cy3		
<i>hsp70</i>	(ENSDART00000010079)	CY5

TERCER TRÍO:

<i>maf1</i>	(ENSDART00000022410)	(FAM)
<i>nfe2l2</i>	(ENSDART00000062854)	
NEDTM/TAMRATM/Cy3		
<i>gapdh</i> (control)	(ENSDART00000063800)	CY5

CUARTO TRÍO

<i>vtg1</i>	(ENSDART00000078276)	(FAM)
<i>mt2</i>	(ENSDART00000061007)	
NEDTM/TAMRATM/Cy3		
<i>ef1a</i> (control)	(ENSDART00000023156)	CY5

Los parámetros para este diseño fueron los siguientes:

Longitud equivalente a 30 nt

Cantidad de GC \geq 50%

Temperatura de alineamiento \geq 60 °C

Alta compatibilidad

NOTA: El diseño de los oligos se realizó únicamente en regiones exón-exón, evitando aquellas secuencias entre las uniones exón-intrón, con la finalidad de evitar una probable amplificación inespecífica de ADN genómico.

En la Tabla 3 se muestra la longitud, la Tm y el % de GC diseñaron primers y sondas específicos marcados con FAM, TAMRA y Quasar para cada gen.

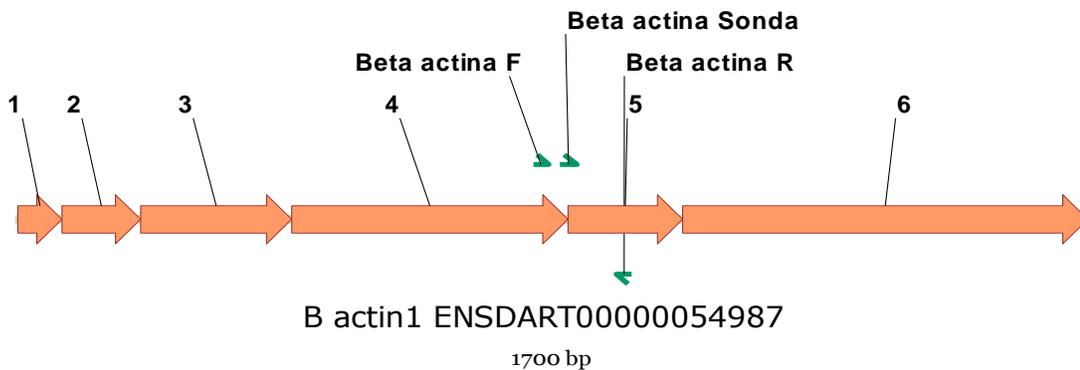
Tabla 3. Análisis de Tm y % de GC de sondas y oligos

Gen	Primer	Secuencia	Longitud	Tm		% GC	
				V/IDT	V/IDT	V/IDT	V/IDT
<i>β-actina</i> (gen endógeno)	F	ATTGGCAATGAGCGTTTCCGTTGC	24	64.6	61.1	50	50
	R	TCCAGACAGCACTGTGTTGGCATA	24	59.2	60.5	50	50
	S	CCTTCCTTCCTGGGTATGGAATCTTGC	27	63.6	60.8	51.9	51.9
<i>cyp1a</i>	F	TGCAAGTGTCCGATGAGAAGATCG	24	60.1	58.9	50	50
	R	TCCAATTCTCTTTGCAGTCGCTCC	24	60.5	59.4	50	50
	S	ACCTATTCGGAGCCGGTTTCGACACTA TCA	30	67.4	63.6	50	50
<i>fzr1</i>	F	TACTGCGGCAGATCAACGTCCAAA	24	62.3	60.8	50	50
	R	TTGCTTGGCGATGACAATGGTGAC	24	62.6	60.3	50	50
	S	TGACAACACCAGCCCTATGAAAGCA	25	61.4	60.6	48	48
<i>ahr2</i>	F	ATGGACAAACAGCTTCCAGTCTGGA	24	59.9	60.2	48	48
	R	ATACGTAACCTTCAGCCGTGACCA	24	58.6	60	50	50
	S	CTGTTGTTGCAGGCACTCAATGGCT	25	63.1	62.2	52	52
<i>hmox1</i>	F	CAGAGCATTTCGAGTTCAACATTGATGT GTT	30	63.2	59.4	40	40
	R	TGCTGCTTCATTTCTTTATCACTTG	26	56	57.8	38.5	38.5
	S	AGCTTCCTCTGTGATGCTCAGCATTT	26	60.6	60.5	46.2	46.2
<i>hsp70</i>	F	AGAGTGTGGGACAGTGATTGGGA	24	58.4	60	50	50
	R	AGTGATGCGGTTTCCCTGGTCATT	24	61.5	60.9	50	50
	S	ACCTTGGGACCACATACTCCTGTGTT	26	59.8	61.5	50	50
<i>maf1</i>	F	GGAGAGCAGCATTTCGTGGTATGACTA	26	60	59.6	50	50
	R	ACAGACATGGACACCAGCTCATCATCT	27	60.9	61.3	48.1	48.1
	S	AAAGCACTGAAGGTGAAGCGAGAGC	25	61.1	61.4	52	52
<i>nfe2l2</i>	F	GGCGTTTACCCAGAATCCTTTGCT	24	60.5	59.8	50	50
	R	GGTTGGTGCTTCTGTGGAAGGTTT	24	59.	59.	50	50

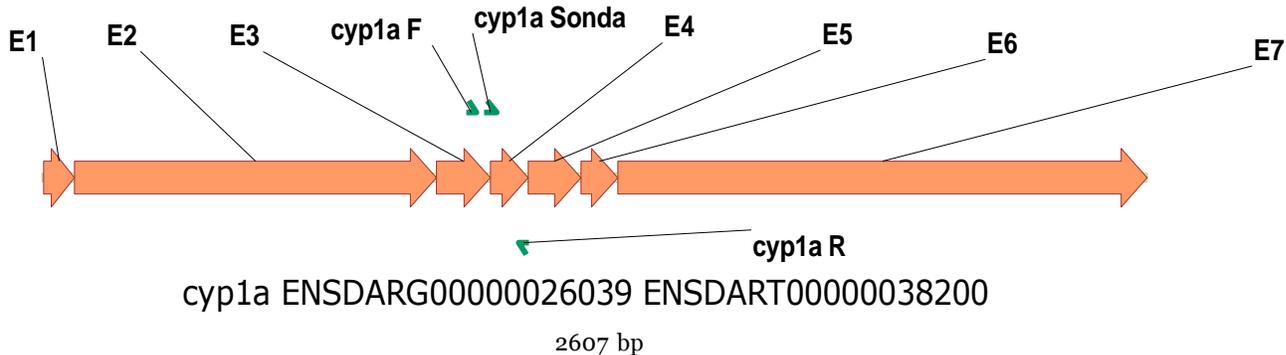
2011, Año del Turismo en México.

				3	9		
	S	CCAGAGTTGCAGCAGTGCCTCAACA	25	64	63	56	56
<i>gapdh</i> (gen endógeno)	F	AGTCCGTCTTGAGAAACCTGCCAA	24	60	60. 5	50	50
	R	GCGTCAAAGATGGATGAACGGCAA	24	63. 7	60. 2	50	50
	S	CACGGAGCACCAGGTTGTGTCCACT	25	64. 9	64. 9	60	60
<i>vtg1</i>	F	ATGAGAGCTGTTGTGCTTGCCTTG	24	59. 5	60	50	50
	R	TGTCGTGGCACTGATGAGAACCTT	24	61. 6	60. 4	50	50
	S	GTAGCCCTCGTGGCATGTCAACAATTC	27	64. 3	61. 6	51. 9	50
<i>mt2</i>	F	CAAGCTCTTTGTGGATACTCTCTGG	25	55. 4	57. 1	48	48
	R	AACCAGATGGGCAGCAAGAACAAC	24	60. 2	60. 2	50	50
	S	AGTCTTGGCACATTCGCAGGGGTCC	25	66. 7	65. 1	60	60
<i>ef1a</i> (gen endógeno)	F	TCTACAAATGCGGTGGAATCGAC	23	57. 7	57. 3	47. 8	47. 8
	R	TTTGTCCAACACCCAGGCGTACTT	24	60. 5	60. 9	50	50
	S	AGGAAGCCGCTGAGATGGGCA	21	62. 7	63. 7	61. 9	61. 9

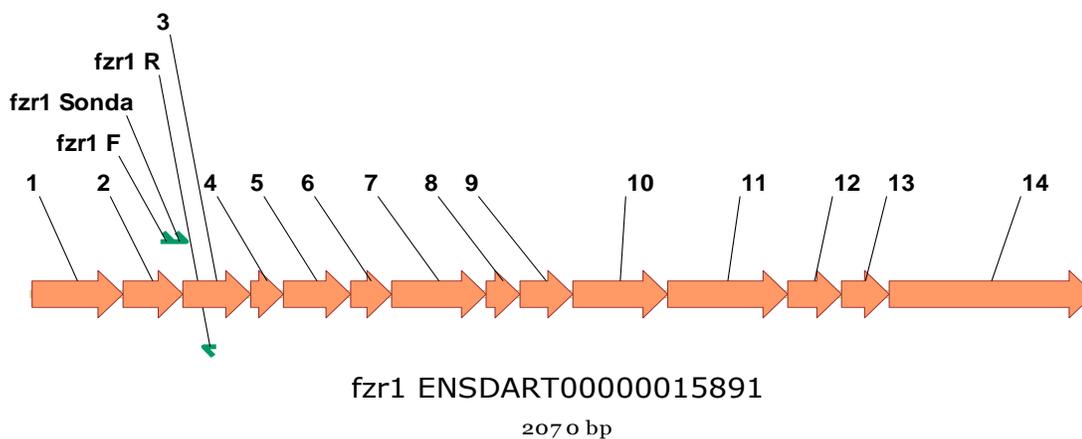
VI.4 ESQUEMAS DE LOS GENES CONTROL Y DE ESTUDIO.



Esquema 1. Gen endógeno β -actina1.

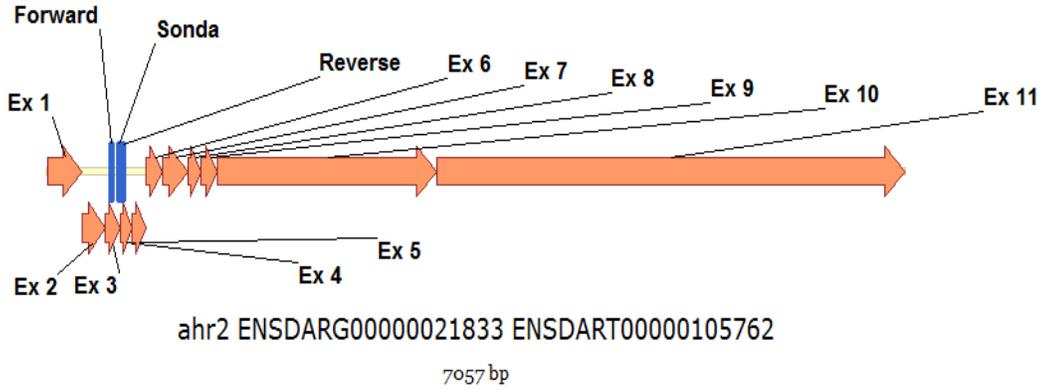


Esquema 2. Gen blanco cyp1a.

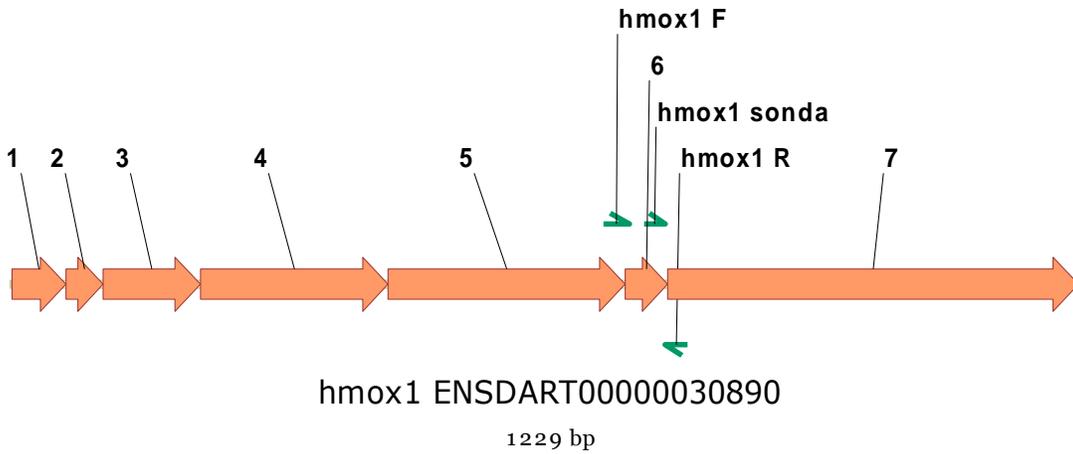


Esquema 3. Gen blanco fzr1.

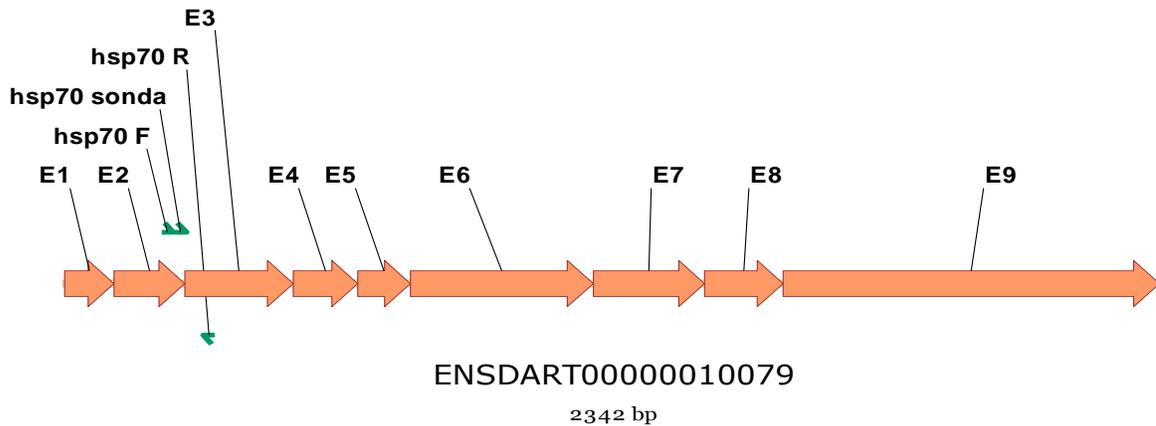
2011, Año del Turismo en México.



Esquema 4. Gen blanco ahr2.

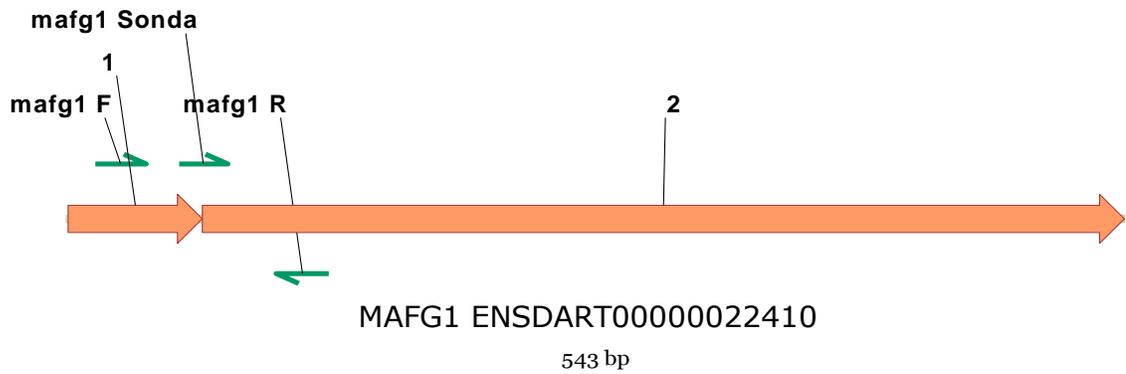


Esquema 5. Gen blanco hmox1.

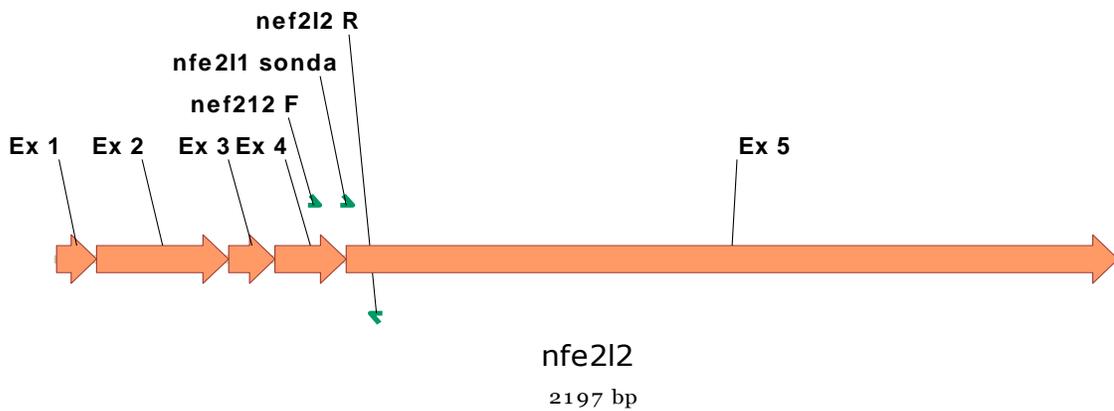


2011, Año del Turismo en México.

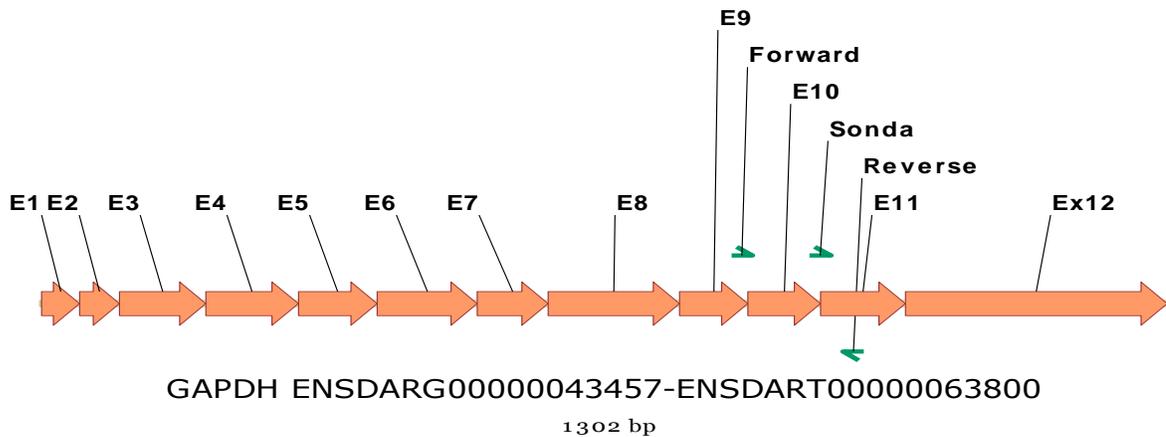
Esquema 6. Gen blanco hsp70.



Esquema 7. Gen blanco mafg1.

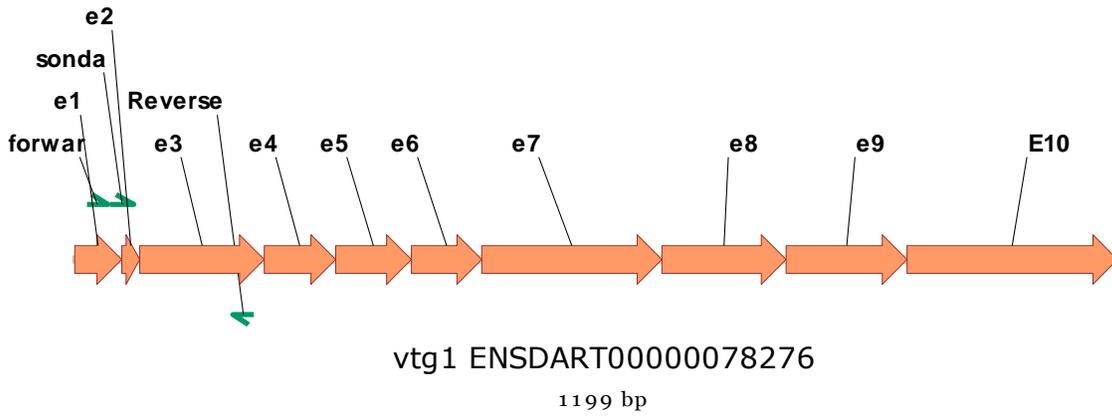


Esquema 8. Gen blanco nfe212.

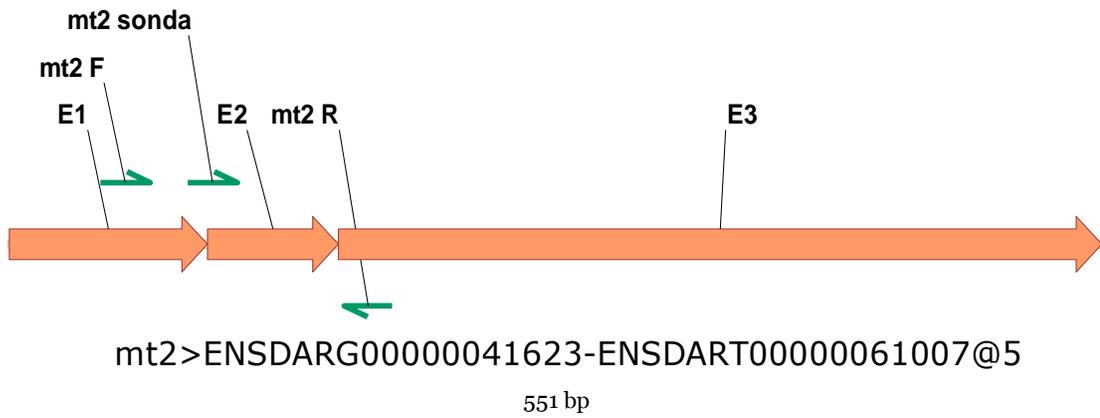


Esquema 9. Gen endógeno gapdh.

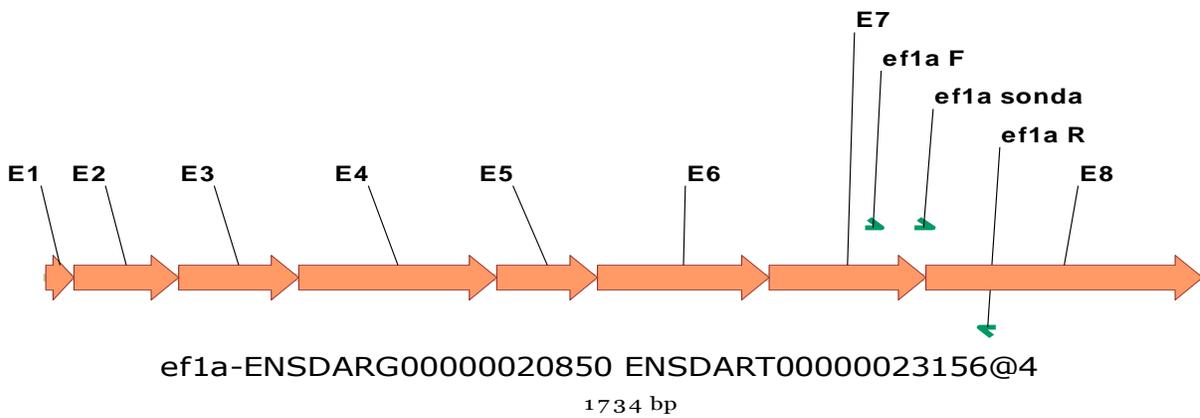
2011, Año del Turismo en México.



Esquema 10. Gen blanco vtg1.



Esquema 11. Gen blanco mt2.



Esquema 12. Gen endógeno ef1a.

2011, Año del Turismo en México.

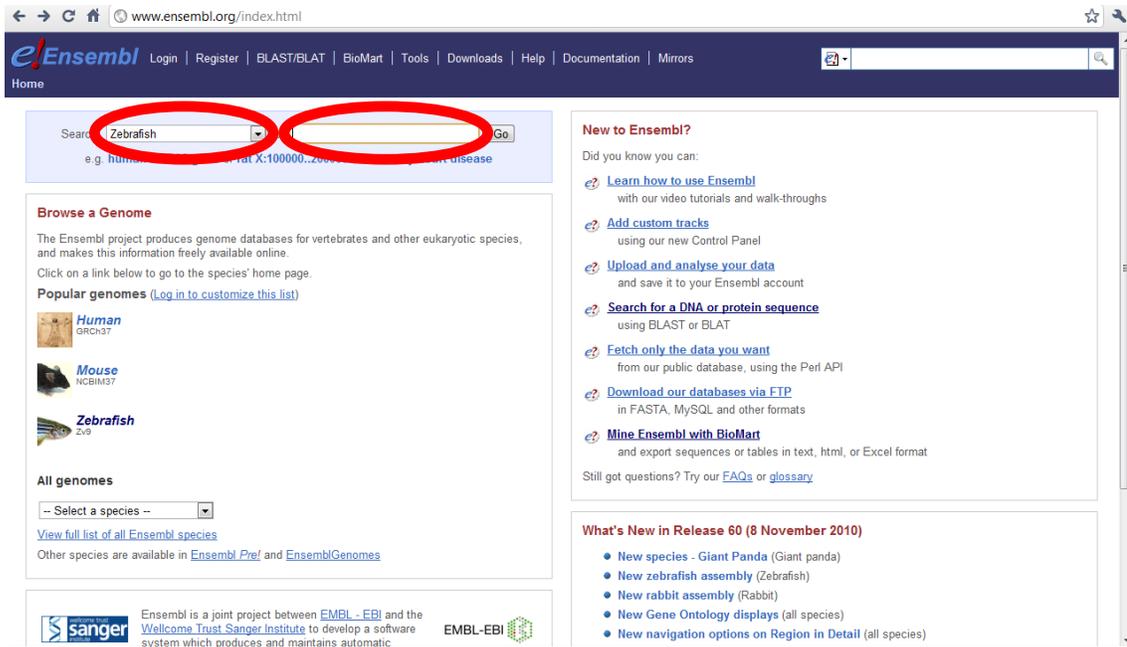
VI.5 La homología.

Dentro de la homología de secuencia se distinguen dos tipos de homología: la ortología y la paralogía. Se denomina genes ortólogos a los que son semejantes por pertenecer a dos especies que tienen un antepasado común. Además existen genes parálogos, que son aquellos que se encuentran en el mismo organismo, y cuya semejanza revela que uno procede de la duplicación del otro. La ortología requiere que se haya producido especiación, mientras que ésta no es necesaria en el caso de la paralogía, que puede producirse sólo en los individuos de una misma especie.

VI.5.1 Análisis para evaluar las interacciones de ortólogos y parálogos.

a) Abrir la página electrónica <http://www.ensembl.org>

En el menú desplegable en el área de búsqueda seleccionar Zebrafish, escribir el gen de interés en el campo siguiente de búsqueda y dar click en el botón Go.



The screenshot shows the Ensembl website interface. At the top, there is a navigation menu with links like 'Login', 'Register', 'BLAST/BLAT', 'BioMart', 'Tools', 'Downloads', 'Help', 'Documentation', and 'Mirrors'. Below the navigation is a search bar with a dropdown menu set to 'Zebrafish' and a 'Go' button. The main content area is divided into several sections: 'Browse a Genome' with a description of the project, 'Popular genomes' listing Human, Mouse, and Zebrafish, 'All genomes' with a species selector, 'New to Ensembl?' with various utility links, and 'What's New in Release 60' with a list of recent updates.

2011, Año del Turismo en México.

b) En el área de resumen de resultados seleccionar el gen deseado.

www.ensembl.org/Danio_rerio/Lucene/Results?species=Danio_rerio;id=x;q=vtg1

Results Summary

By Feature type		By Species	
Total	1	Total	1
Gene	1	Danio rerio	1

Ensembl release 60 - Nov 2010 © WTSI / EBI

c) Seleccionar el gen de interés.

www.ensembl.org/Danio_rerio/Lucene/Details?species=Danio_rerio;id=x;end=1;q=vtg1

Result in Detail

1 Gene matches your query

vtg1 [Ensembl gene: ENSDARG00000078429]

Description: hypothetical protein LOC678536 [Source: RefSeq peptide; Acc: NP_001038759] [Type: protein coding Ensembl gene];

Location: 22:25203632-25330515-1

Source: e60; Feature type: Gene; Species: Danio rerio;

Ensembl release 60 - Nov 2010 © WTSI / EBI

d) En el menú de la izquierda seleccionar Paralogues.

www.ensembl.org/Danio_rerio/Gene/Summary?g=ENSDARG00000078429;r=22:25203632-25330515

Gene: vtg1 (ENSDARG00000078429)

Description: hypothetical protein LOC678536 [Source: RefSeq peptide; Acc: NP_001038759]

Location: Chromosome 22: 25,203,632-25,330,515 reverse strand.

Transcripts: There are 10 transcripts in this gene

Transcript ID
ENSDART00000050238
ENSDART000000051223
ENSDART000000078276
ENSDART00000113682
ENSDART00000105237
ENSDART00000109411
ENSDART00000078225
ENSDART00000129486
ENSDART00000114647
ENSDART00000078216

Gene-based displays

- Gene summary
- Splice variants (10)
- Supporting evidence
- Sequence
- External references
- Regulation
- Comparative Genomics
 - Genomic alignments (12)
 - Gene Tree (image)
 - Gene Tree (text)
 - Gene Tree (alignment)
- Paralogues (3)**
- Genetic Variation
 - Variation Table
 - Variation Image
- External Data
- Personal annotation
- ID History
- Gene history

Transcript and Gene level displays

In Ensembl a gene is made up of one or more transcripts. We provide displays at two levels:

- Transcript views which provide information specific to an individual transcript such as the cDNA and CDS sequences and protein domain annotation.
- Gene views which provide displays for data associated at the gene level such as orthologues, paralogues, regulatory regions and splice variants.

This view is a gene level view. To access the transcript level displays select a Transcript ID in the table above and then navigate to the information you want using the menu at the left hand side of the page. To return to viewing gene level information click on the Gene tab in the menu bar at the top of the page.

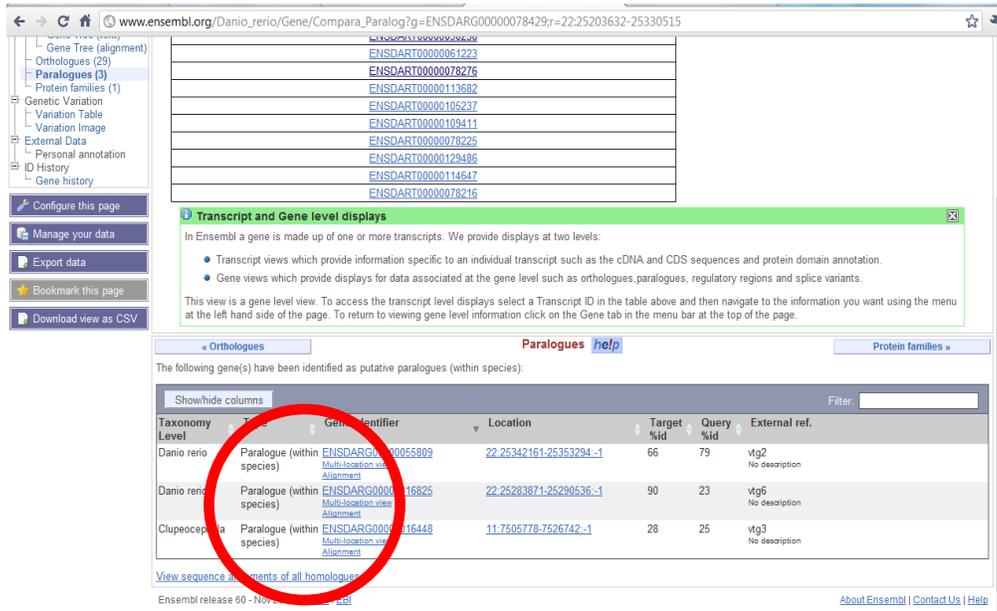
Gene summary help **Splice variants »**

Name: vtg1 (ZFIN)

Synonyms: si.dkcy-4c23.1, vg7, wu.fb62f05 [To view all Ensembl genes linked to the name click here]

2011, Año del Turismo en México.

e) En la parte inferior se despliega un cuadro con los diferentes parálogos que existen, copiar los identificadores en bloc de notas, quedándose con sólo el identificador.



www.ensembl.org/Danio_riero/Gene/Compara_Paralog?g=ENSDARG00000078429;r=22:25203632-25330515

Gene Tree (alignment)
Orthologues (29)
Paralogues (3)
Protein families (1)
Genetic Variation
Variation Table
Variation Image
External Data
Personal annotation
ID History
Gene history

Configure this page
Manage your data
Export data
Bookmark this page
Download view as CSV

Transcript and Gene level displays

In Ensembl a gene is made up of one or more transcripts. We provide displays at two levels:

- Transcript views which provide information specific to an individual transcript such as the cDNA and CDS sequences and protein domain annotation.
- Gene views which provide displays for data associated at the gene level such as orthologues, paralogues, regulatory regions and splice variants.

This view is a gene level view. To access the transcript level displays select a Transcript ID in the table above and then navigate to the information you want using the menu at the left hand side of the page. To return to viewing gene level information click on the Gene tab in the menu bar at the top of the page.

« Orthologues **Paralogues help** Protein families »

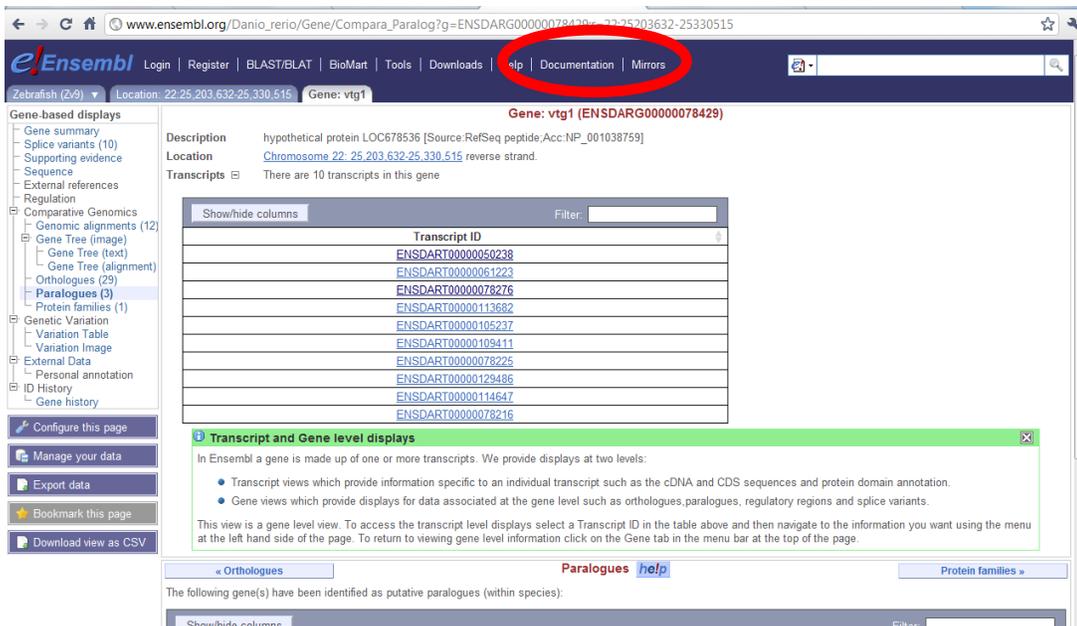
The following gene(s) have been identified as putative paralogues (within species):

Taxonomy Level	Gene Identifier	Location	Target %id	Query %id	External ref.
Danio riero	Paralogue (within species) ENSDARG00000055809	22:25342161-25353294-1	66	79	vtg2 No description
Danio riero	Paralogue (within species) ENSDARG00000016825	22:25283871-25290536-1	90	23	vtg6 No description
Clupeocephala	Paralogue (within species) ENSDARG00000016448	11:7505778-7526742-1	28	25	vtg3 No description

View sequence alignments of all homologues

Ensembl release 60 - Nov 2010

f) Además de los parálogos, es necesario copiar al bloc de notas el identificador del gen de interés, el cual se encuentra en la parte superior de la página de Ensembl.



www.ensembl.org/Danio_riero/Gene/Compara_Paralog?g=ENSDARG00000078429;r=22:25203632-25330515

Ensembl Login | Register | BLAST/BLAT | BioMart | Tools | Downloads | **Help** | Documentation | Mirrors

Zebrafish (Zv9) Location: 22:25,203,632-25,330,515 Gene: **vtg1**

Gene: vtg1 (ENSDARG00000078429)

Description: hypothetical protein LOC678536 [Source RefSeq peptide; Acc:NP_001038759]
Location: [Chromosome 22: 25,203,632-25,330,515 reverse strand.](#)

Transcripts: There are 10 transcripts in this gene

Transcript ID
ENSDART00000050238
ENSDART00000061223
ENSDART00000078276
ENSDART00000113682
ENSDART00000105237
ENSDART00000109411
ENSDART00000078225
ENSDART00000129486
ENSDART00000114647
ENSDART00000078216

Transcript and Gene level displays

In Ensembl a gene is made up of one or more transcripts. We provide displays at two levels:

- Transcript views which provide information specific to an individual transcript such as the cDNA and CDS sequences and protein domain annotation.
- Gene views which provide displays for data associated at the gene level such as orthologues, paralogues, regulatory regions and splice variants.

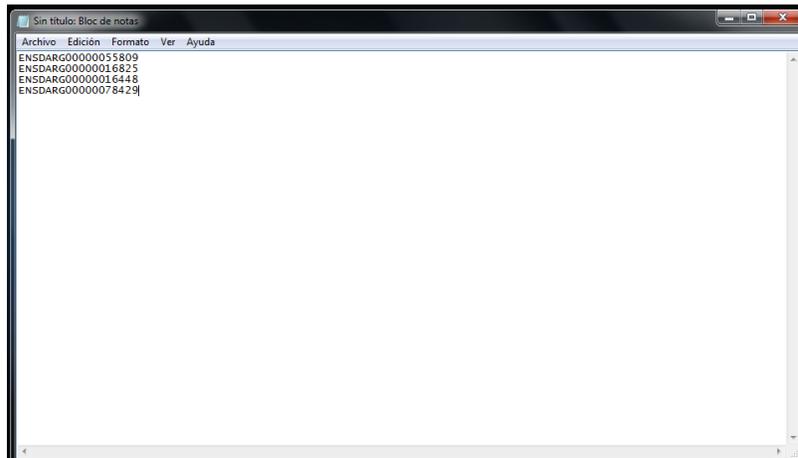
This view is a gene level view. To access the transcript level displays select a Transcript ID in the table above and then navigate to the information you want using the menu at the left hand side of the page. To return to viewing gene level information click on the Gene tab in the menu bar at the top of the page.

« Orthologues **Paralogues help** Protein families »

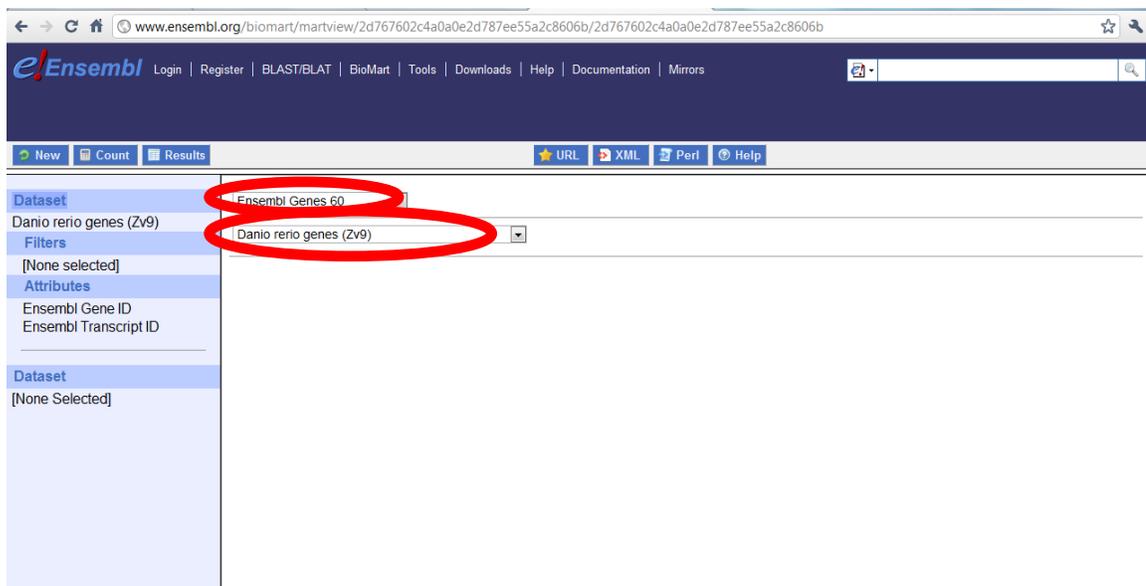
The following gene(s) have been identified as putative paralogues (within species):

2011, Año del Turismo en México.

g) Teniendo la lista con el identificador de los genes parálogos, proceder a abrir BioMart. El link para abrir BioMart se encuentra ubicado en la parte superior de la página electrónica de Ensembl.

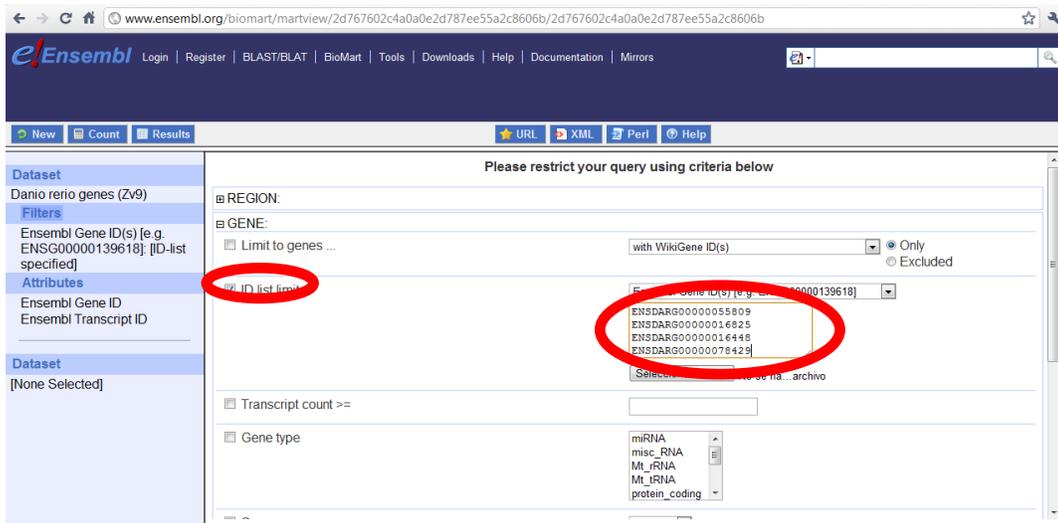


h) Seleccionar la base de datos Ensembl Genes 60 y posteriormente el organismo *Danio rerio* genes (Zv9).

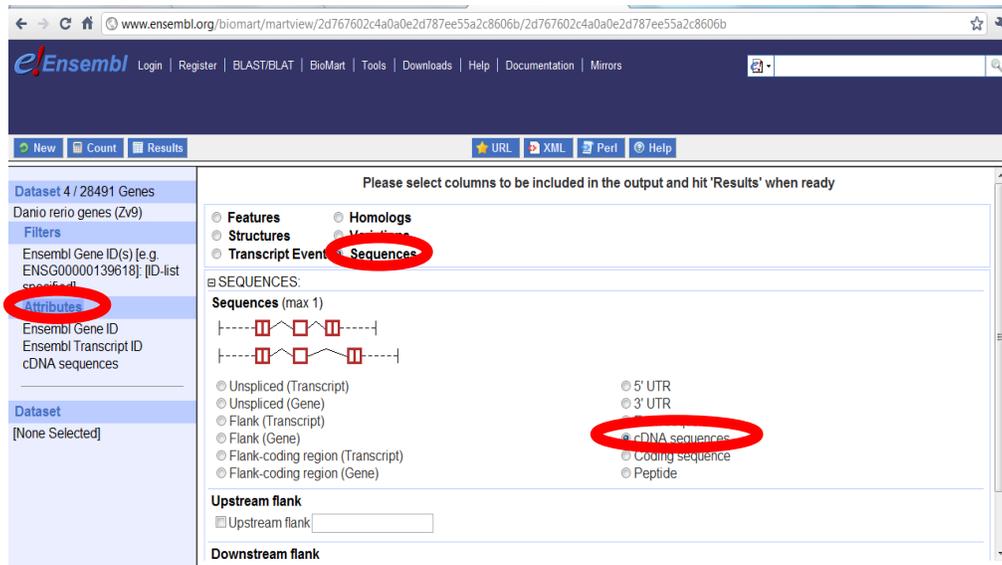


i) Proceder a seleccionar Filters en el menú de la izquierda y GENE en la parte de la derecha.

Marcar la casilla ID list limit y pegar los identificadores de genes del bloc de notas en el cuadro de la derecha.



j) Seguidamente, en el menú de la izquierda seleccionar Attributes, elegir Sequences y en la parte inferior cDNA sequences.



VI.6 Mantenimiento y reproducción del pez cebra.

El pez cebra tipo-silvestre fue conservado en peceras de vidrio de 40 L en grupos de ~ 40 peces en un sistema de flujo estático. Fueron alimentados dos veces al día con hojuelas vitaminadas y por intervalos regulares fueron alimentados *ad libitum* con alimento vivo de *Artemia salina*. El ciclo de luz fue establecido en 14 h luz/10 h oscuridad y la temperatura ambiental fue constante a 28° C. Se llevó a cabo el apareamiento y al día siguiente, al amanecer, los peces depositaron sus huevos en bandejas de vidrio colocadas en el fondo de las peceras la noche anterior al inicio de los experimentos (Fig. 4).

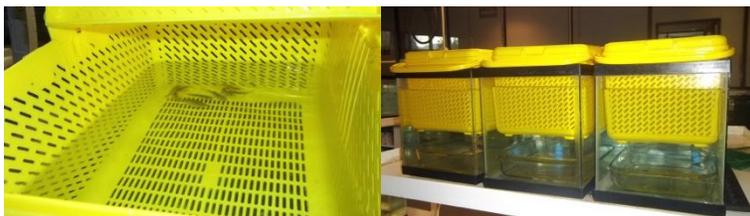


Fig. 4. Sistema de apareamiento empleado en el pez silvestre.

VI.7 Exposiciones.

Después de cosechar los huevos de todas las peceras, fueron reunidos y lavados completamente con medio de lavado de embriones E3 (5 mM NaCl, 0.17 mM KCl, 0.33 mM CaCl₂, 0.33 mM MgSO₄,) (Muncke *et al.*, 2006a). Las exposiciones fueron iniciadas en los 15 min después de la fertilización, siendo éste el tiempo mínimo tomado para seleccionar los huevos en lotes de tres réplicas. Asimismo, se realizaron exposiciones a 3, 6, 24, 48 y 120 h. Los huevos fueron colocados en grupos de 100 en placas de Petri de 30 mm conteniendo 20 mL del medio E3, la sustancia de exposición y hasta 0.01 % del solvente dimetilsulfoxido (DMSO) o etanol (EtOH) y el compuesto a analizar, usando pipetas serológicas de borosilicato (Fig. 5). Las placas fueron colocadas en una incubadora a 26° C. El ciclo de luz durante la exposición fue establecido en 14 h luz/ 10 h oscuridad y la temperatura fue constante a 28 °C. Independientemente del tiempo de exposición, cada placa fue sacada de la incubadora cada 24 h para separar los embriones muertos e inmediatamente la placa fue rellenada con la solución de prueba apropiada. Las placas fueron cubiertas con su tapa de borosilicato y recolocadas en la incubadora.

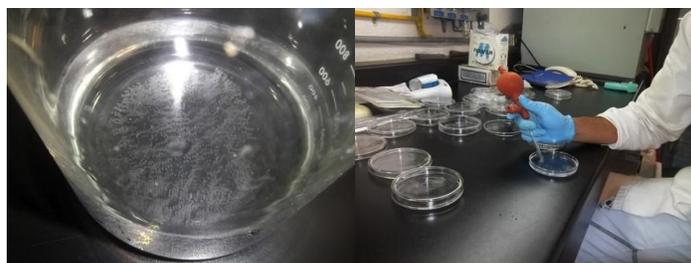


Fig. 5. Exposición de huevos.

2011, Año del Turismo en México.

VI.8 Sustancias químicas.

En el presente estudio fueron investigados los efectos de la atrazina (Chem Service), estradiol (E2) y 17α -etinilestradiol (EE2) (Sigma-Aldrich) con respecto al blanco y al DMSO (Aldrich) y etanol (Merck) en embrión de pez cebra y sobre la expresión de los genes seleccionados. La expresión de cada gen blanco fue comparada con respecto a cada gen endógeno a las diferentes concentraciones de los compuestos mencionados anteriormente en las etapas de vida temprana del pez cebra.

Las exposiciones con atrazina fueron realizadas a 0.64, 3.2, 16, 80, 400 y $2 \times 10^3 \mu\text{g L}^{-1}$ con un factor de separación de 10, se incluyó un blanco y DMSO como solvente de dilución. Las exposiciones con estradiol (E2) se realizaron a 27.24, 272.4, 2723.8, 27 238, 272 380 ng L^{-1} . Mientras que para las exposiciones con 17α -etinilestradiol (EE2) fueron de 1.6, 8, 40, 200 y 1000 ng L^{-1} . Se empleó un factor de separación de cinco en las concentraciones de E2 y EE2, incluyéndose un blanco y etanol como solvente de dilución. Todos los experimentos se repitieron al menos tres veces, en experimentos independientes. Las concentraciones se seleccionaron de acuerdo con estudios publicados previamente, mientras que para las exposiciones se realizaron exposiciones preliminares, verificando la mortalidad de los huevos y larvas durante 120 h después de la fertilización (hpf).

Transcurrido el tiempo de exposición se tomaron 60 embriones y fueron colocados en tubos estériles de 1.5 mL. Ahí se lavaron con agua DEPC (dietil-pirocarbonato) por decantación, manteniéndose en 1 mL de agua DEPC, congelándose a -70°C en ultracongelador hasta la realización del ensayo posterior, el cual se realizó en el menor tiempo posible para evitar degradación de ARN (Fig. 6).



Fig. 6. Selección y lavado de embriones.

2011, Año del Turismo en México.

VI.9 Extracción de ARN.

Se rompió el corión de los embriones y el tejido de los alevines con un disruptor de tejidos (Eppendorf, Hamburg, Germany). La extracción del ARN total se realizó por el método de extracción fenólica con Tri Reagent (Sigma-Aldrich). Este método se basa en el uso de una solución monofásica de fenol e isotiocianato de guanidina para la lisis celular (Fig. 7) y la separación de la muestra en dos fases (acuosa y orgánica) (Fig. 8), seguidas por la extracción y precipitación del ARN total con cloroformo e isopropanol, respectivamente, a partir de la fase acuosa (Fig. 9). El pelet de ARN se disolvió en 30 – 50 μ L de agua DEPC, almacenándose a -20 °C. Se tomó una alícuota para determinar la concentración de ARN total calculada de la absorbencia a 260 nm (A_{260nm} ; Thermo Scientific) (Fig. 10) y la calidad del ARN fue verificada por la relación $A_{260nm}/A_{280nm} > 1.8$.



Fig. 7. Lisis celular de embriones.



Fig. 8. Separación de fases (acuosa y orgánica)

2011, Año del Turismo en México.



Fig. 9. Extracción y precipitación del ARN total.



Fig. 10. Cuantificación de ARN total a 260 nm.

VI.10 Síntesis de ADNc.

Por cada muestra, $500 \text{ ng } \mu\text{L}^{-1}$ de ARN total fueron tratados con RiboLock RNase Inhibitor y RevertAid H Minus M-MuLV RT (Fermentas). El molde de cADN fue sintetizado del ARN tratado con DNase usando primers hexámeros aleatorios (5'-NNNN-3'; Biosearch Technologies Inc, Novato, CA) y virus de leucemia Moloney-murine (M-MKV) transcriptasa inversa (Fermentants), de acuerdo con las instrucciones del fabricante (Fig. 11).

2011, Año del Turismo en México.

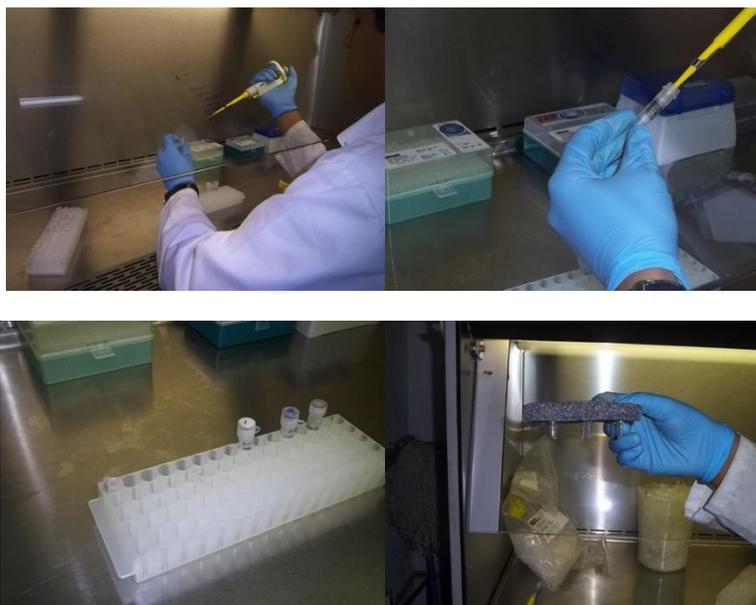


Fig. 11. Síntesis de ADNc con $500 \text{ ng } \mu\text{L}^{-1}$ de ARN total.

VI.11 Amplificación de ADNc (RT-PCR).

La PCR en tiempo real se realizó usando TaqMan Universal PCR Master Mix (Applied Biosystems) (Fig. 12) con 500 ng cDNA por reacción, en un equipo 7500 (Applied Biosystems). Todas las muestras se realizaron por triplicado en placas de 96-pozos, con un volumen final de reacción de $25 \mu\text{L}$ (Fig. 13). Los controles incluyeron $12.5 \mu\text{L}$ de Master mix 2x, 500 ng de cDNA y $12.5 \mu\text{L}$ de agua libre de nucleasas. Las condiciones usadas para el ciclo de amplificación termal fueron: 2 min a 50°C , 10 min a 95°C (15 s a 95°C , 1 min a 60°C) x 40 ciclos. Las sondas FAM; TAMRA y QUASAR60 fueron sintetizadas por Biosearch Technologies, Inc. (Novato, CA). Las concentraciones de primers en las reacciones finales de PCR tiempo real fueron 300 nM , y la concentración de reacción final de las sondas marcadas FAM, TAMRA, QUASAR fue 100 nM . Los primers fueron diseñados para anclarse en diferentes exones. Los exones fueron identificados buscando para cada gen en la secuencia de genoma completa (http://www.ensembl.org/Danio_rerio/index.html), usando la gene's GenBank cDNA sequence. (Fig. 14). Las secuencias de primers y sondas, así como los sitios de unión al exón, se muestran en los esquemas 1 al 12.

2011, Año del Turismo en México.

La evaluación de los datos de PCR en tiempo real fue realizada usando el método qGen desarrollado por Muller, 2002. Este método calcula la abundancia de mRNA basado en la eficiencia de la reacción de amplificación de PCR específicamente para cada gen, relacionándolo con el gen de referencia. Las expresiones de β -actin, *ef1a* y *gapdh* fueron usados como control interno para normalización. Como parte de la muestra analizada, es compensado por la variable de procesamiento de la eficiencia de la normalización.



Fig. 13. Placas de 96 pozos.



Fig. 12. PCR en tiempo real.

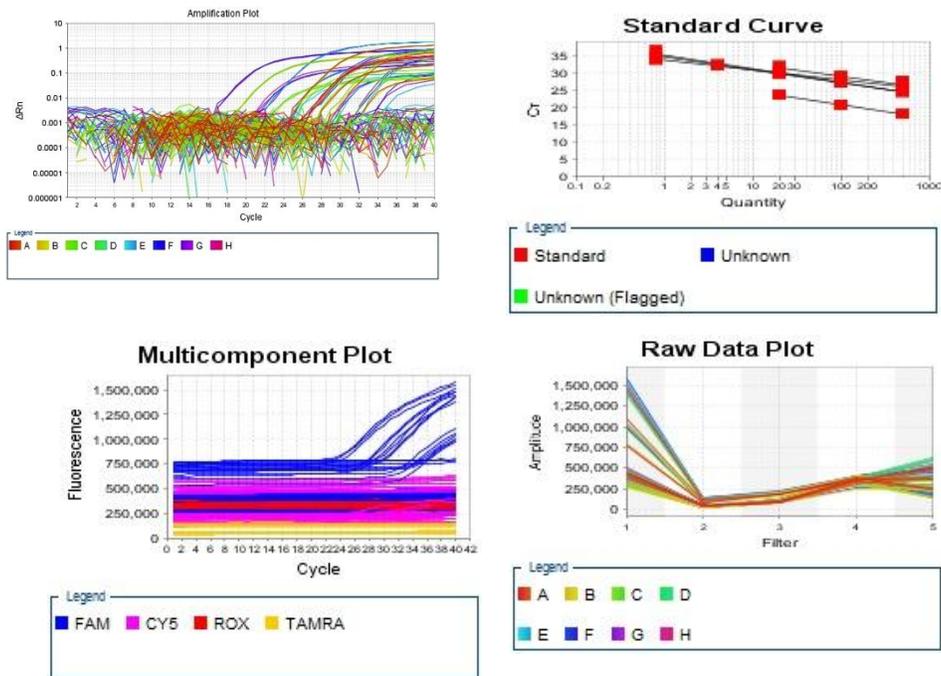


Fig. 14. Gráficas de medición de cDNA.

VII. RESULTADOS

VII.1 Niveles de expresión general de genes endógenos (housekeeping).

Se calcularon (basados en valores promedio de ciclo umbral [Ct] de PCR tiempo real en los embriones control) los niveles de expresión general de los genes seleccionados como endógenos (housekeeping). Filby *et. al.*, en 2007 reporta que niveles de expresión extremadamente altos o bajos pueden impedir la utilidad de estos genes como controles internos (Tabla 1).

La evaluación de los datos de real-time PCR se realizó utilizando el método Qgene (Muller *et al.*, 2002). Este método calcula la abundancia de mRNA basado en la eficiencia de la reacción de amplificación de PCR específicamente para cada gen, relacionándolo con el gen de referencia. Las expresiones de β -actin, *ef1a* y *gapdh* fueron usados como control interno para normalización. Como parte de la muestra analizada, es compensado por la variable de procesamiento de la eficiencia de la normalización.

VII.2 Atrazina.

En el experimento realizado a una concentración de 500 ng μ L⁻¹ de cDNA y con exposición a 120 h, los genes blanco despegaron niveles de expresión o se reprimieron con respecto a los genes endógenos β -actina ó *ef1a* de la siguiente manera:

VII.2.1 Niveles de expresión de genes blanco con respecto al gen endógeno β -actina.

El gen *ahr2* se expresó hasta en 1.3 veces con el DMSO, y a las concentraciones de 640, 3200, 1.6E+04 y 8E+04 ng L⁻¹ de atrazina, mientras que, a concentraciones de 4E+05 y 2E+06 ng L⁻¹ se reprimió hasta en -1.7 veces. El gen *ef1a* se expresó hasta en 0.7 veces con el DMSO y a las concentraciones de 640, 3200, 1.6E+04 y 8E+04, 4E+05 ng L⁻¹, caso contrario, a la concentración de 2E+06 ng L⁻¹ se reprimió hasta en -1 vez. El gen *gapdh* se reprimió tanto para el DMSO como para todas las concentraciones analizadas hasta en -3.9 veces. El gen *hmox* se expresó hasta en 0.99 veces con el DMSO y a las concentraciones de 640, 1.6E+04, y 2E+06 ng L⁻¹, mientras que, a 3200, 8E+04 y 4E+05 ng L⁻¹ de atrazina, se reprimió hasta en -1 vez. El gen *hsp70* se expresó hasta en 0.7 veces con el DMSO, y a 640, 3200, 1.6E+04, 8E+04 y 2E+06 ng L⁻¹ de atrazina y se reprimió hasta en -1 vez a 4E+05 ng L⁻¹ (Figura 15).

VII.2.2 Niveles de expresión de genes blanco con respecto al gen endógeno *ef1a*.

El gen *ahr2* se expresó hasta en 0.95 veces con el DMSO y a las concentraciones de 640, 3200, 1.6E+04, 8E+04 y 2E+06 ng L⁻¹ de atrazina; mientras que, a la concentración de 4E+05 ng L⁻¹ se reprimió hasta en -1.8 veces. El gen *β-actina* se reprimió hasta en -0.7 veces con el DMSO a las concentraciones de 640, 3200, 1.6E+04 y 8E+04, 4E+05 ng L⁻¹, y se expresó hasta en 1 vez a la concentración de 2E+06 ng L⁻¹. El gen *gapdh* se reprimió hasta en -4 veces para el DMSO y para todas las concentraciones estudiadas. El gen *hmox* se expresó con el DMSO y a las concentraciones de 640 y 2E+06 hasta en 2 veces, sin embargo, a las concentraciones de 3200, 1.6E+04, 8E+04 y 4E+05 ng L⁻¹ se reprimió hasta en -1.5 veces. El gen *hsp70* se expresó hasta en 0.89 veces con el DMSO y a las concentraciones de 640, 3200, 1.6E+04, 8E+04 y 2E+06 ng L⁻¹, y por el contrario, se reprimió hasta en -1.2 veces a 4E+05 ng L⁻¹ de atrazina (Figura 16).

2011, Año del Turismo en México.

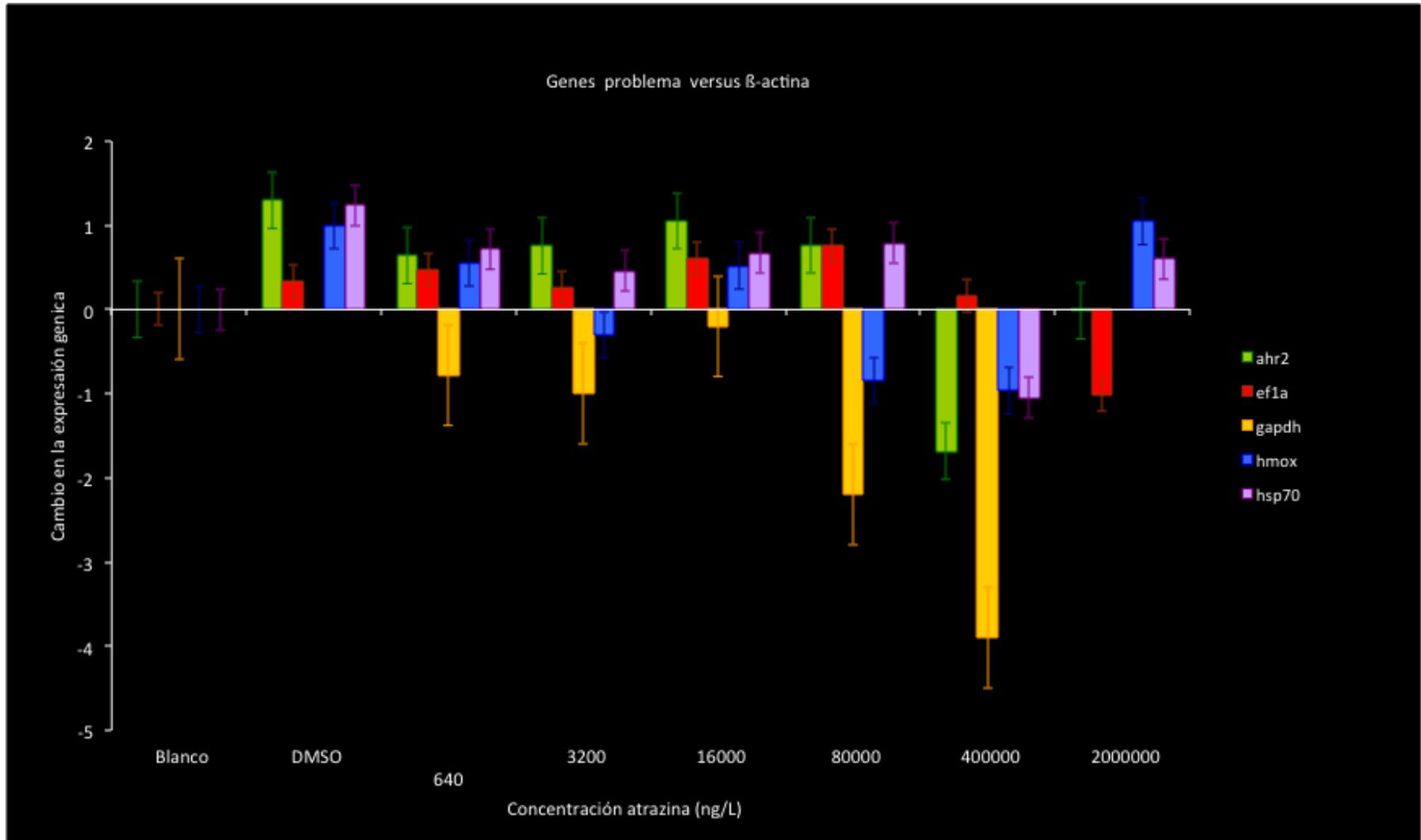


Fig.15. Niveles de expresión de genes blanco con respecto al gen endógeno β -actina debido a atrazina a 120 h de exposición.

2011, Año del Turismo en México.

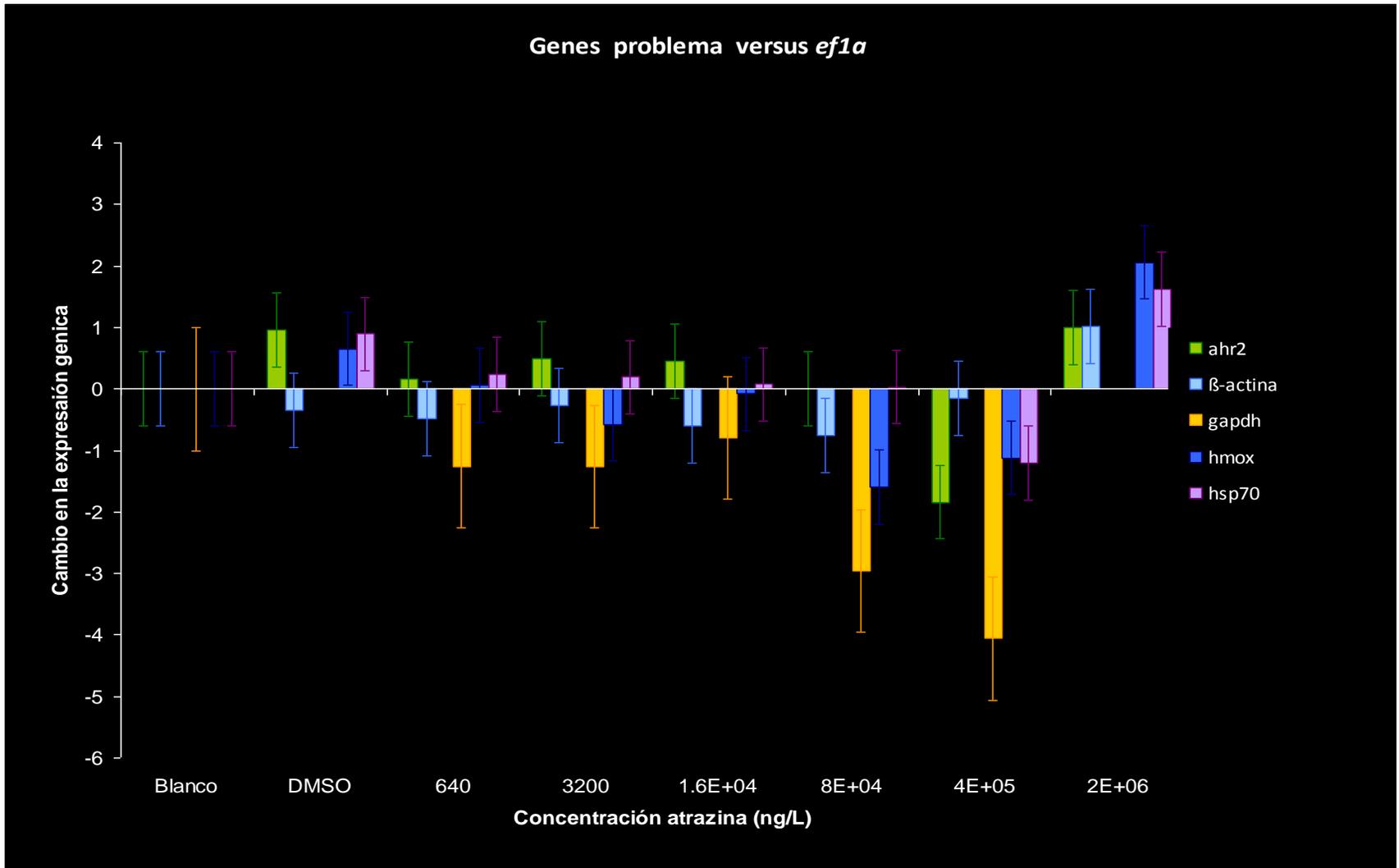


Fig. 16. Niveles de expresión de genes blanco con respecto al gen endógeno *ef1a* debido a atrazina a 120 h de exposición

2011, Año del Turismo en México.

En el experimento realizado a 120 horas de exposición a una concentración de $1000 \text{ ng } \mu\text{L}^{-1}$ de cDNA y con exposición a 120 h, los genes blanco exhibieron niveles de expresión o se reprimieron con respecto a los genes endógenos β -actina ó *ef1a* de la siguiente manera:

VII.2.3 Niveles de expresión de genes blanco con respecto al gen endógeno β -actina.

El gen *ahr2* se expresó hasta en 1.7 veces con el DMSO y además con las concentraciones de 640, 3200, $1.6\text{E}+04$ y $8\text{E}+04 \text{ ng L}^{-1}$ de atrazina, sin embargo, se reprimió hasta en -5.4 veces a las concentraciones $4\text{E}+05$ y $2\text{E}+06$. El gen *ef1a* se expresó hasta en 1.3 veces con el DMSO y con la atrazina a 3200, $1.6\text{E}+04$ y $8\text{E}+04$, $4\text{E}+05 \text{ ng L}^{-1}$, por el contrario, se reprimió hasta en -0.4 veces a 640 y $2\text{E}+06 \text{ ng L}^{-1}$. El gen *fzr1* se expresó hasta en 0.44 veces a $1.6\text{E}+04 \text{ ng L}^{-1}$, sin embargo, se reprimió hasta en -0.77 veces con DMSO, y a las concentraciones de 3200, $8\text{E}+04 \text{ ng L}^{-1}$. Por otra lado, no se expresó a las concentraciones de 640, $4\text{E}+05$ y $2\text{E}+06 \text{ ng L}^{-1}$ de atrazina. El gen *gapdh* se reprimió hasta en -3.3 veces tanto para el DMSO como para todas las concentraciones analizadas. El gen *hmox* se expresó hasta en 1 vez con el DMSO y a las concentraciones de 640 y $1.6\text{E}+04 \text{ ng L}^{-1}$ de atrazina, aunque, se reprimió hasta en -3 veces a las concentraciones de 3200, $8\text{E}+04$, $4\text{E}+05$ y $2\text{E}+06 \text{ ng L}^{-1}$. El gen *hsp70* se expresó hasta en 6.6 veces con el DMSO y a las concentraciones de 640, 3200, $1.6\text{E}+04$ y $8\text{E}+04 \text{ ng L}^{-1}$, aunque, a la concentración de $4\text{E}+05$ $2\text{E}+06 \text{ ng L}^{-1}$ se reprimió hasta en -4.2 veces (Fig. 17).

VII.2.4 Niveles de expresión de genes blanco con respecto al endógeno *ef1a*

El gen *ahr2* se expresó hasta en 1.8 veces con el DMSO y a las concentraciones de 640, 3200, $1.6\text{E}+04$ y $8\text{E}+04 \text{ ng L}^{-1}$ de atrazina, en cambio, a la concentración de $4\text{E}+05$ y $2\text{E}+06$ se reprimió hasta en -5 veces. El gen β -actina se reprimió hasta en -1.3 veces con el DMSO y a las concentraciones de 3200, $1.6\text{E}+04$ y $8\text{E}+04$, $4\text{E}+05 \text{ ng L}^{-1}$, no obstante, a la concentración de 640 y $2\text{E}+06$, se expresó hasta en 0.43 veces. El gen *fzr1* se expresó hasta en 1 vez con el DMSO, y a las concentraciones de 640, 3200 y $8\text{E}+04 \text{ ng L}^{-1}$, por el contrario, a la concentración de $1.6\text{E}+04$, se reprimió hasta 0.17 veces, en cambio, a las concentraciones de $4\text{E}+05$ y $2\text{E}+06$ no registró expresión. El gen *gapdh* se expresó hasta en 1.38 veces para el DMSO, y a la concentración de $2\text{E}+06 \text{ ng L}^{-1}$, aunque a, 640, 3200, $1.6\text{E}+04$, $8\text{E}+04$ y $4\text{E}+05 \text{ ng L}^{-1}$ se reprimió hasta en -4.7 veces. El gen *hmox* se expresó hasta en 1.6 veces a 640 ng L^{-1} , por otro lado, se reprimió hasta en 3 veces con el DMSO y a las concentraciones de 3200, $1.6\text{E}+04$, $8\text{E}+04$, $4\text{E}+05$ y $2\text{E}+06 \text{ ng L}^{-1}$. El gen *hsp70* se expresó hasta en 5 veces a las concentraciones de 640, 3200, $1.6\text{E}+04$ y $8\text{E}+04 \text{ ng L}^{-1}$, sin embargo, se reprimió hasta en -3.8 veces con el DMSO y a las concentraciones de $4\text{E}+05$ y $2\text{E}+06 \text{ ng L}^{-1}$ (Fig. 18).

2011, Año del Turismo en México.

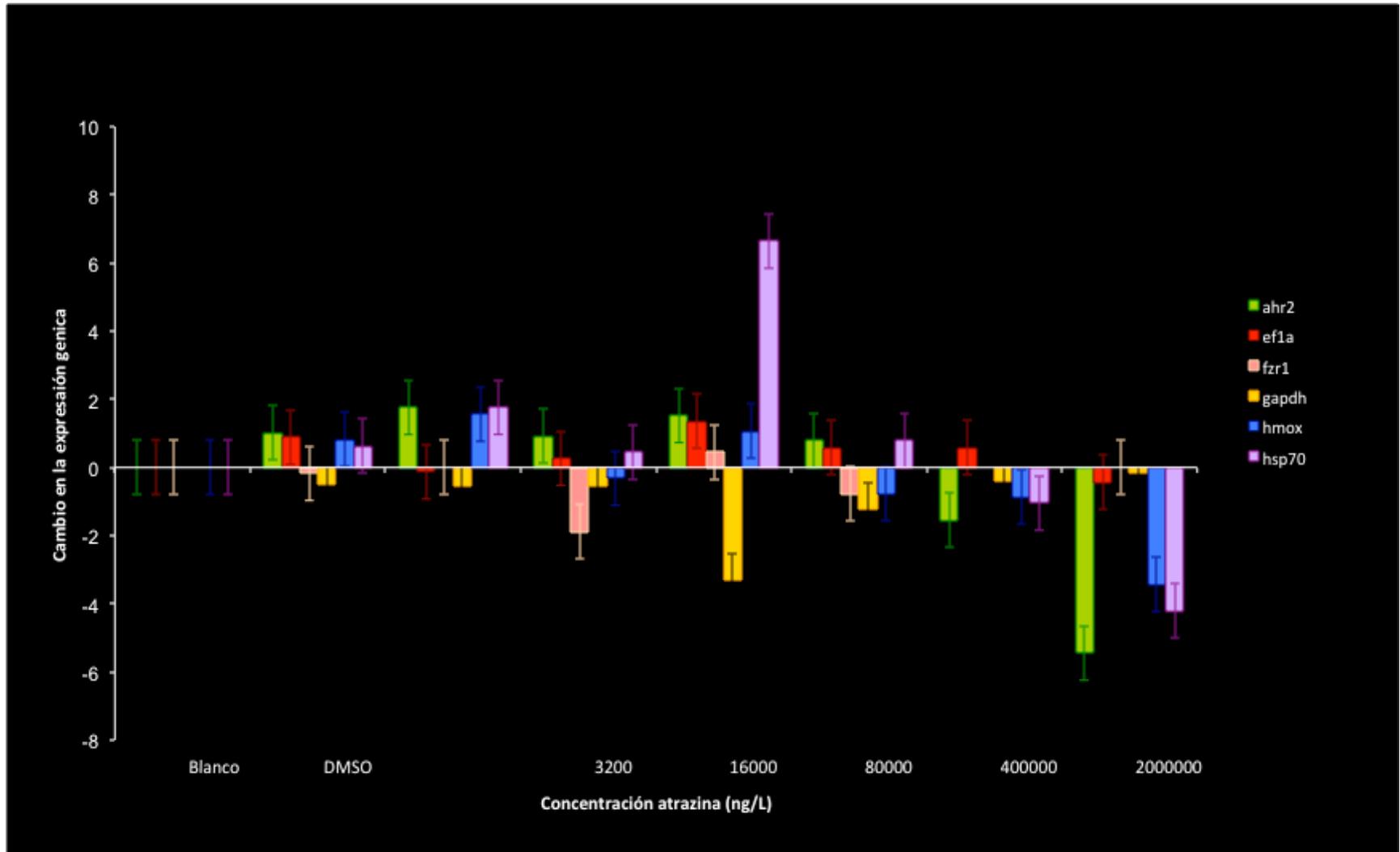


Fig. 17. Niveles de expresión de genes blanco con respecto al gen endógeno β -actina debido a atrazina a 120 h de exposición.

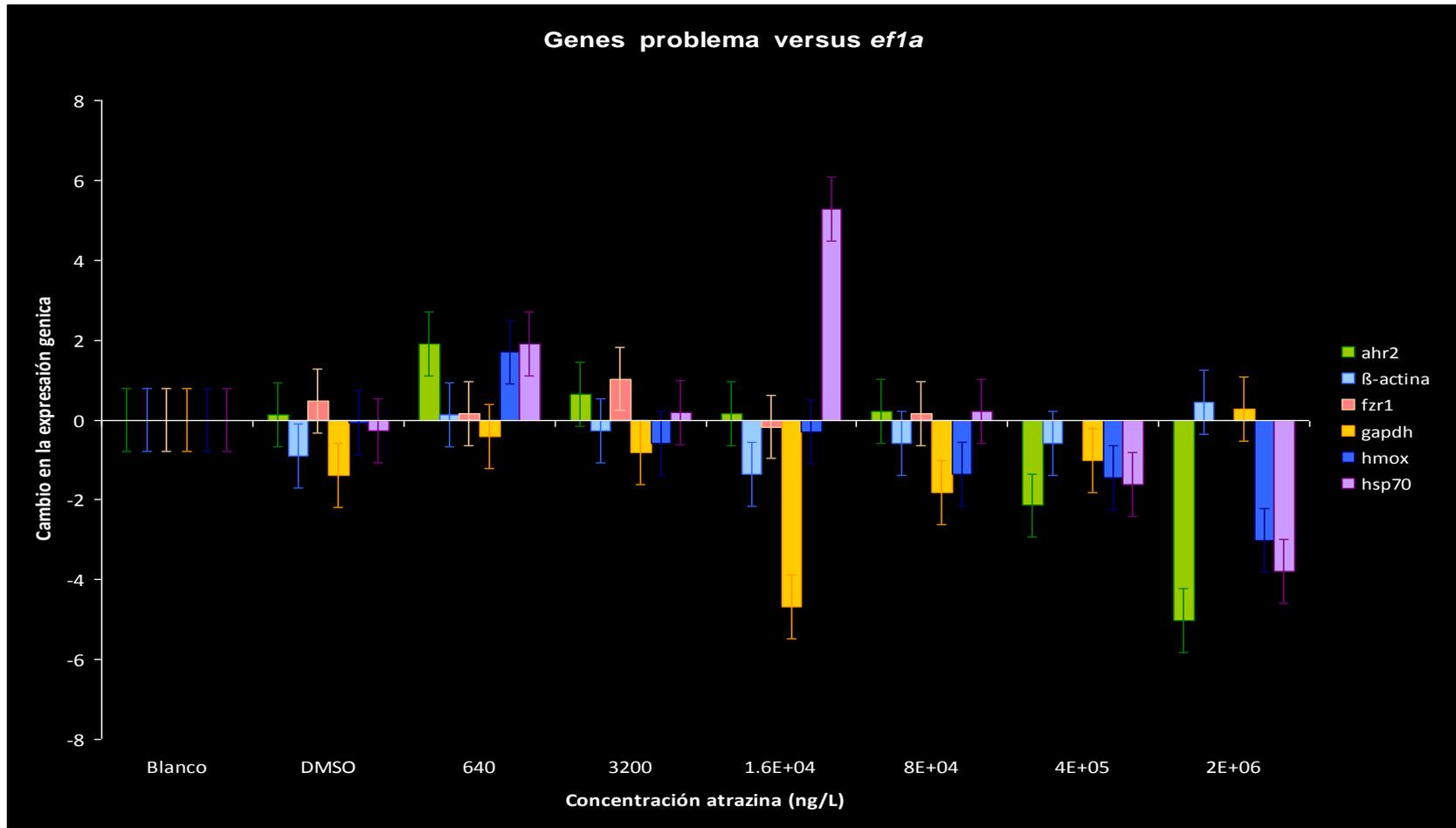


Fig. 18. Niveles de expresión de genes blanco con respecto al gen endógeno *ef1a* debido a atrazina a 120 h de exposición.

VII.3 Estradiol.

En el experimento realizado a 6 horas de exposición se utilizó una concentración $1000 \text{ ng } \mu\text{L}^{-1}$ de cDNA, los genes blanco revelaron niveles de expresión o se reprimieron con respecto a los genes endógenos β -actina ó *ef1a* de la siguiente manera:

VII.3.1 Niveles de expresión de genes blanco con respecto al gen endógeno β -actina.

El gen *ahr2* se expresó hasta en 1.8 veces con etanol y a las concentraciones de 27.2, $2.72\text{E}+02$, $2.72\text{E}+03$ y $2.72\text{E}+04$, mientras que, se reprimió hasta en -2.1 veces la concentración de $2.72\text{E}+05 \text{ ng L}^{-1}$ de estradiol. El gen *ef1a* se expresó hasta en 0.38 veces con etanol y a las concentraciones de 27.2, $2.72\text{E}+02$, $2.72\text{E}+03$ y $2.72\text{E}+05 \text{ ng L}^{-1}$, en cambio, se reprimió hasta en -0.002 veces a $2.72\text{E}+04 \text{ ng L}^{-1}$. El gen *fzr1* se expresó hasta en 0.14 veces a las concentraciones de $2.72\text{E}+02$, $2.72\text{E}+03$, $2.72\text{E}+04$ y $2.72\text{E}+05 \text{ ng L}^{-1}$, por el contrario, se reprimió hasta en 0.01 veces con etanol y a la concentración de 27.2 ng L^{-1} . Los genes *gapdh* y *hmox* no mostraron expresión debida a estradiol. El gen *hsp70* se expresó hasta en 0.93 veces con etanol y a las concentraciones de 27.2, $2.72\text{E}+02$, $2.72\text{E}+03$, $2.72\text{E}+04$ y $2.72\text{E}+05 \text{ ng L}^{-1}$ de estradiol (Fig. 19).

VII.3.2 Niveles de expresión de genes blanco con respecto al endógeno *ef1a*

El gen *ahr2* se expresó hasta en 1.89 veces con etanol y a las concentraciones de 27.2, $2.72\text{E}+02$, $2.72\text{E}+03$ y $2.72\text{E}+04 \text{ ng L}^{-1}$ de estradiol, por otro lado, se reprimió hasta en -2.1 veces a la concentración de $2.72\text{E}+05 \text{ ng L}^{-1}$. El gen β -actina se expresó hasta en 1.89 veces con etanol y a 27.2 , $2.72\text{E}+02$, $2.72\text{E}+03$ y $2.72\text{E}+05 \text{ ng L}^{-1}$, sin embargo, se reprimió hasta en -2.1 veces a la concentración de $2.72\text{E}+04 \text{ ng L}^{-1}$. El gen *fzr1* se expresó hasta en 0.34 veces con etanol y a las concentraciones de 27.2, $2.72\text{E}+02$, $2.72\text{E}+03$ y $2.72\text{E}+05$, aunque, se reprimió hasta -2.1 veces a $2.72\text{E}+04 \text{ ng L}^{-1}$. Los genes *gapdh* y *hmox* no manifestaron expresión al estradiol. El gen *hsp70* se expresó hasta en 0.54 veces a $2.72\text{E}+02$, $2.72\text{E}+03$ y $2.72\text{E}+04$ $2.72\text{E}+05 \text{ ng L}^{-1}$, aunque, se reprimió hasta en -0.019 veces en 27.24 ng L^{-1} (Fig. 20).

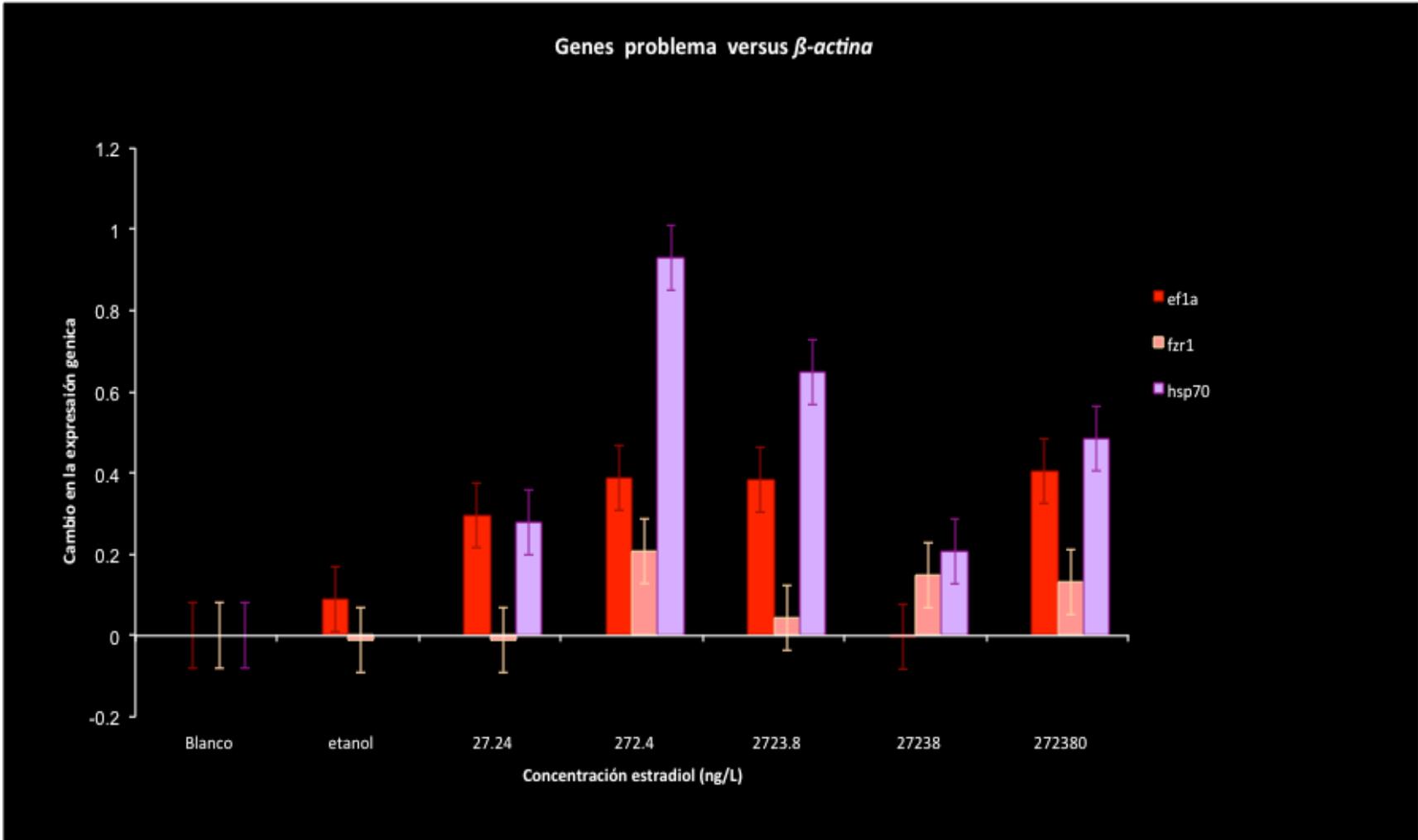


Fig. 19. Niveles de expresión de genes blanco con respecto al gen endógeno β -actina debido a estradiol a 6 h de exposición

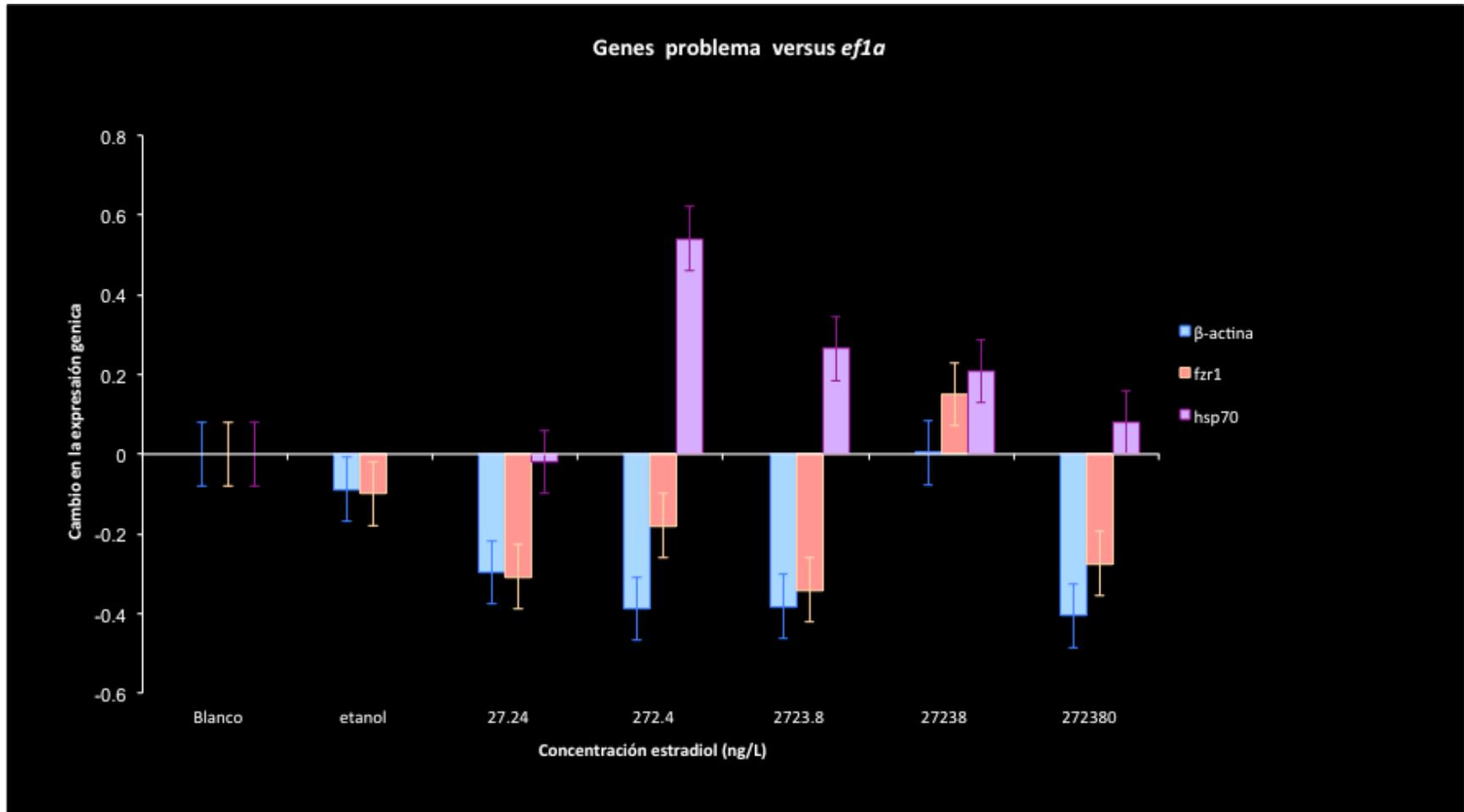


Fig. 20. Niveles de expresión de genes blanco con respecto al gen endógeno *ef1a* debido a estradiol a 6 h de exposición

VII.4 17 α -etinilestradiol.

En el experimento realizado a 48 horas de exposición se utilizó una concentración de 1000 ng μL^{-1} de cDNA, los genes blanco expusieron niveles de expresión ó se reprimieron con respecto a los genes endógenos β -actina ó *ef1a* de la siguiente manera:

VII.4.1 Niveles de expresión de genes blanco con respecto al gen endógeno β -actina.

El gen *ahr2* se expresó hasta 0.71 veces a las concentraciones de 1.6, 40 y 200 ng L^{-1} , sin embargo, se reprimió hasta en -1.1 veces con el etanol, y a 8 y 1000 ng L^{-1} de 17 α -etinilestradiol. El gen *ef1a* se expresó hasta en 0.37 veces tanto con etanol, y a 1.6, 8, 40, 200 y 1000 ng L^{-1} . El gen *fzr1* se expresó hasta 0.76 veces a todas las concentraciones analizadas, sin embargo, se reprimió hasta en 1.9 veces con el etanol. El gen *gapdh* se expresó hasta 0.28 veces con el etanol y a las concentraciones de 1.6, 40, 200 y 1000 ng L^{-1} , por el contrario, se reprimió en 0.05 veces a 8 ng L^{-1} . El gen *hmox* se expresó hasta 1.1 veces y a las concentraciones de 1.6, 40, y 200 ng L^{-1} , por el contrario, se reprimió hasta en -1.1 veces con el etanol y a 8 y 1000 ng L^{-1} . El gen *hsp70* se expresó hasta 1.8 veces con el etanol, y a 1.6, 40, 200 y 1000 ng L^{-1} , aunque, se reprimió en -0.25 veces a la concentración de 8 ng L^{-1} (Fig. 21).

VII.4.2 Niveles de expresión de genes blanco con respecto al endógeno *ef1a*

El gen *ahr2* se expresó hasta en 0.33 veces con la concentración de 40 ng L^{-1} con 17 α -etinilestradiol, en cambio, se reprimió hasta en -0.97 veces con el etanol, y a las concentraciones de 1.6, 8, 200 y 1000 ng L^{-1} . El gen β -actina se reprimió con el etanol y a las concentraciones de 1.6, 8, 40, 200 y 1000 ng L^{-1} hasta en 0.37 veces. El gen *fzr1* se expresó a las concentraciones de 1.6, 8, 40, 200 y 1000 ng L^{-1} hasta en 0.38 veces, aún cuando, se reprimió con el etanol -1.9 veces. El gen *gapdh* se expresó con el etanol en -1.9 veces, en cambio, se reprimió hasta en 0.29 veces a las concentraciones 1.6, 8, 40, 200 y 1000 ng L^{-1} de 17 α -etinilestradiol. El gen *hmox* se expresó hasta en 0.76 veces a las concentraciones de 40 y 200 ng L^{-1} , aún cuando, se reprimió -1.16 veces con el etanol y a las concentraciones de 1.6, 8 y 1000 ng L^{-1} . El gen *hsp70* se expresó hasta en 1.5 veces con el etanol, y a las concentraciones de 40, 200 y 1000 ng L^{-1} , aunque, se reprimió -0.45 veces a las concentraciones de 1.6 y 8 ng L^{-1} de 17 α -etinilestradiol (Fig. 22).

2011, Año del Turismo en México.

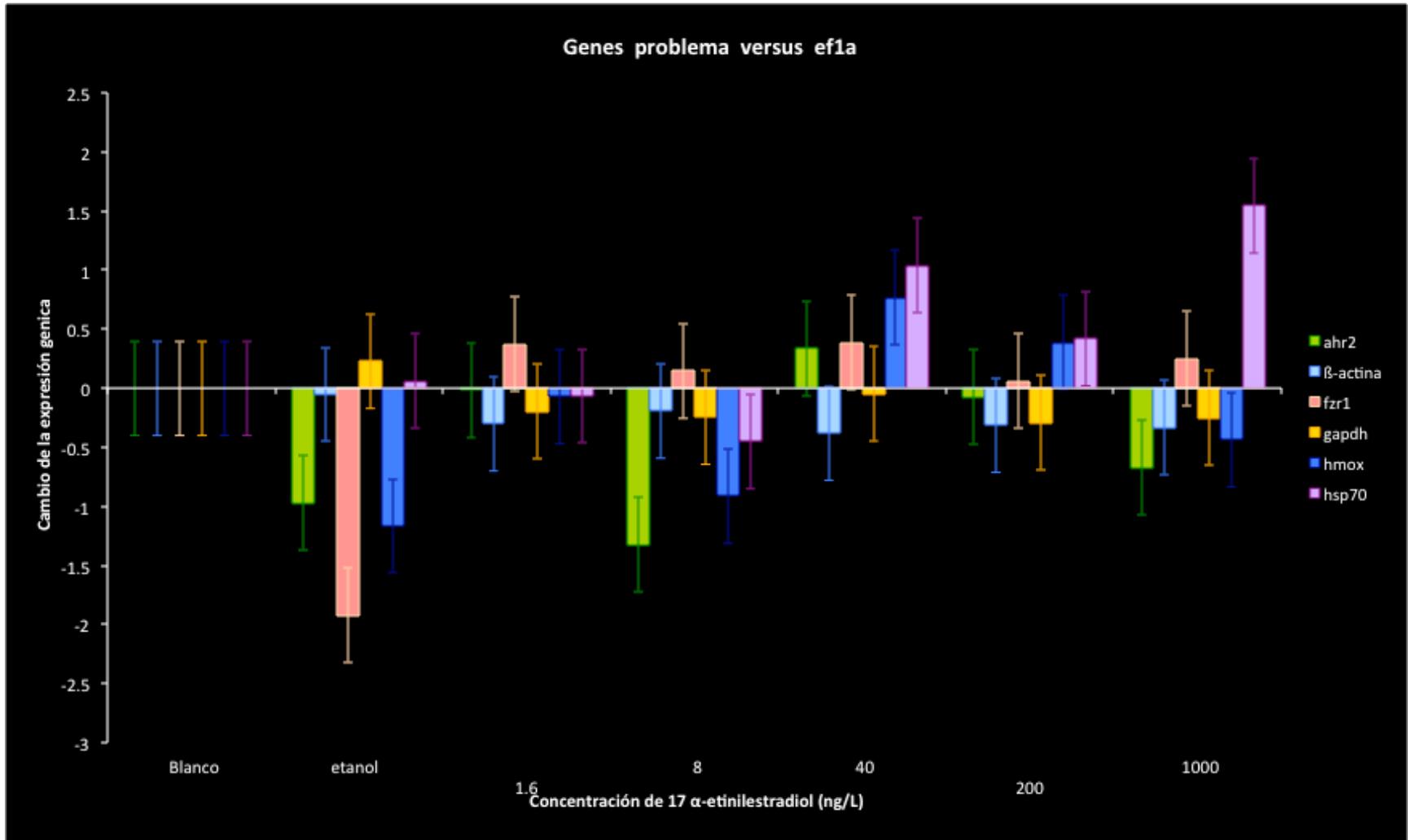


Fig. 21. Niveles de expresión de genes blanco con respecto al gen endógeno β -actina debido a 17 α -estradiol a 48 h de exposición

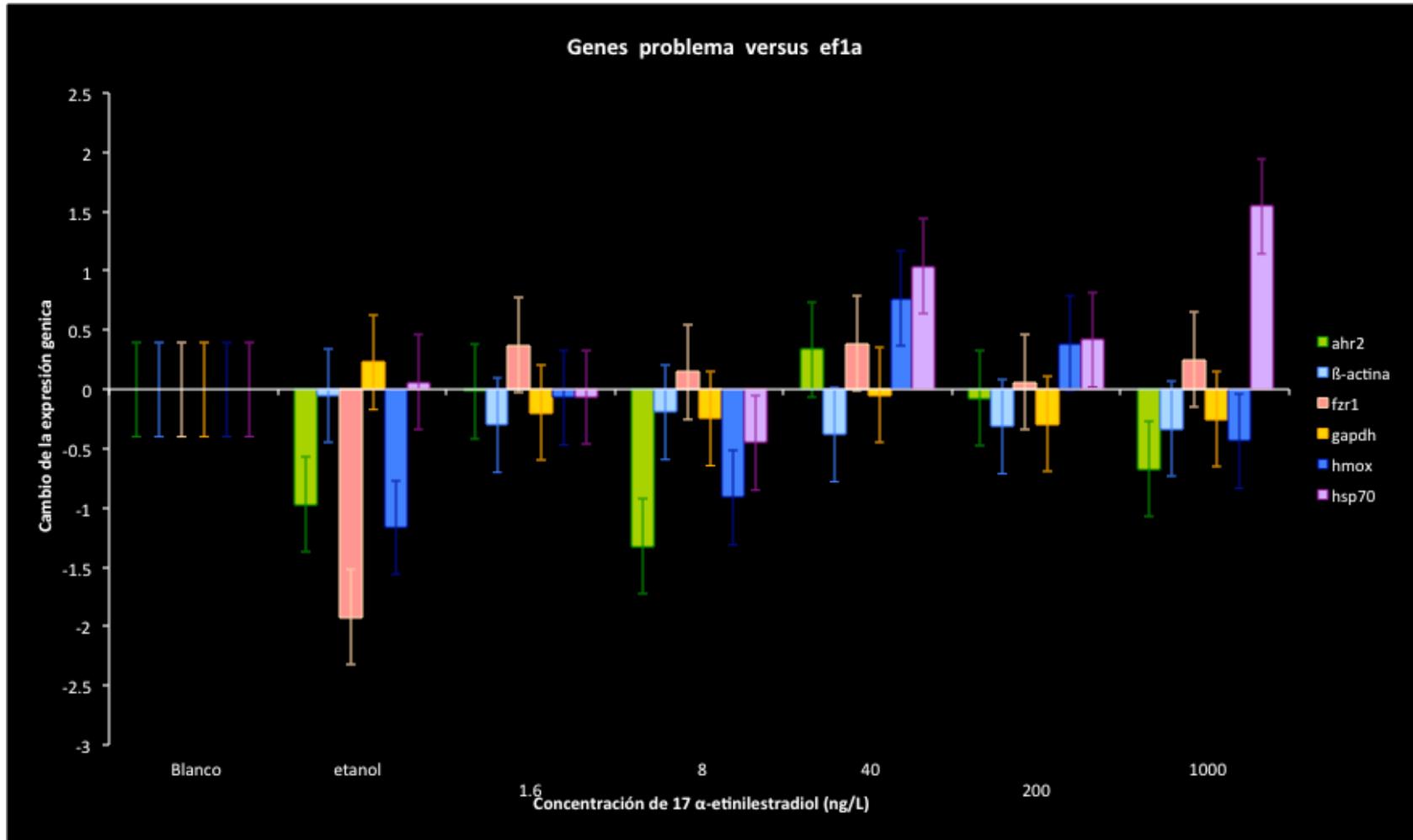


Fig. 22. Niveles de expresión de genes blanco con respecto al gen endógeno *ef1a* debido a 17α-estradiol a 48 h de exposición

2011, Año del Turismo en México.

En el experimento realizado a 120 horas de exposición a 17 α -estradiol se utilizó una concentración de 1000 ng μ L⁻¹ cDNA, los genes blanco expusieron niveles de sobre-expresión ó se reprimieron con respecto a los genes endógenos β -actina ó *ef1a* de la siguiente manera:

VII.4.3 Niveles de expresión de genes blanco con respecto al gen endógeno β -actina.

El gen *ahr2* se expresó 0.27 veces con el etanol y a las concentraciones de 1.6, 8, 40 y 200 ng L⁻¹, aunque, se reprimió -0.06 veces a 1000 ng L⁻¹ de 17 α -etinilestradiol. El gen *ef1a* se expresó hasta en 0.51 veces con el etanol como con todas las concentraciones (1.6, 8, 40, 200 y 1000 ng L⁻¹) analizadas. El gen *fzr1* se expresó hasta 0.34 veces con el etanol, y a todas las concentraciones analizadas de 17 α -etinilestradiol. El gen *gapdh* se expresó hasta en 0.46 veces a 1.6, 8, 200 y 1000 ng L⁻¹, por otra parte, se reprimió hasta en -0.46 veces con el etanol y a la concentración de 40 ng L⁻¹. El gen *hmox* se expresó hasta en 0.22 veces con el etanol y a las concentraciones de 1.6, 8 y 1000 ng L⁻¹, pero, se reprimió hasta en -0.28 veces a las concentraciones de 40 y 200 ng L⁻¹. El gen *hsp70* se expresó hasta en 0.57 veces con el etanol y a las concentraciones de 1.6, 8, 40, 200 y 1000 ng L⁻¹. El gen *mafg1* se expresó hasta en 0.34 veces con el etanol y 1.6, 8 y 40 ng L⁻¹, en cambio, se reprimió hasta en -0.23 a las concentraciones de 200 y 1000 ng L⁻¹. El gen *ef1a* se expresó hasta en 0.36 veces con el etanol, y a las concentraciones de 1.6, 8, 40, 200 y 1000 ng L⁻¹ de 17 α -etinilestradiol (Fig.23).

VII.4.4 Niveles de expresión de genes blanco con respecto al endógeno *ef1a*.

El gen *ahr2* se expresó hasta en 0.12 veces a 8 y 40 ng L⁻¹ de 17 α -etinilestradiol, en cambio, se reprimió hasta en -0.37 veces con el etanol, y con las concentraciones de 1.6, 200 y 1000 ng L⁻¹. El gen β -actina se reprimió hasta en 0.51 veces tanto con el etanol y a las concentraciones analizadas. El gen *fzr1* se expresó 0.17 veces a 8 y 100 ng L⁻¹ de 17 α -etinilestradiol, mientras que, se reprimió hasta en -0.17 veces con el etanol y las concentraciones 1.6, 40 y 200 ng L⁻¹. El gen *gapdh* se expresó hasta en 0.12 veces a 1.6, 8 y 1000 ng L⁻¹, por otro lado, se reprimió hasta en -0.57 veces con el etanol y las concentraciones 40 y 200 ng L⁻¹. El gen *hmox* se expresó hasta 0.05 veces a 8 ng L⁻¹ de 17 α -etinilestradiol, por otra parte, se reprimió -0.36 veces con el etanol, y a las concentraciones de 1.6, 40, 200 y 1000 ng L⁻¹. El gen *hsp70* se expresó hasta en 0.48 veces con las concentraciones de 8, 40, 200 y 1000 ng L⁻¹, no obstante, se reprimió hasta en -0.22 veces con el etanol y la concentración de 1.6 ng L⁻¹. El gen *mafg1* se

2011, Año del Turismo en México.

expresó 0.16 veces a 40 ng L^{-1} de 17α -etinilestradiol, en contraste, se reprimió hasta en -0.31 veces con el etanol y a 1.6, 8, 200 y 1000 ng L^{-1} (Fig.24).

2011, Año del Turismo en México.

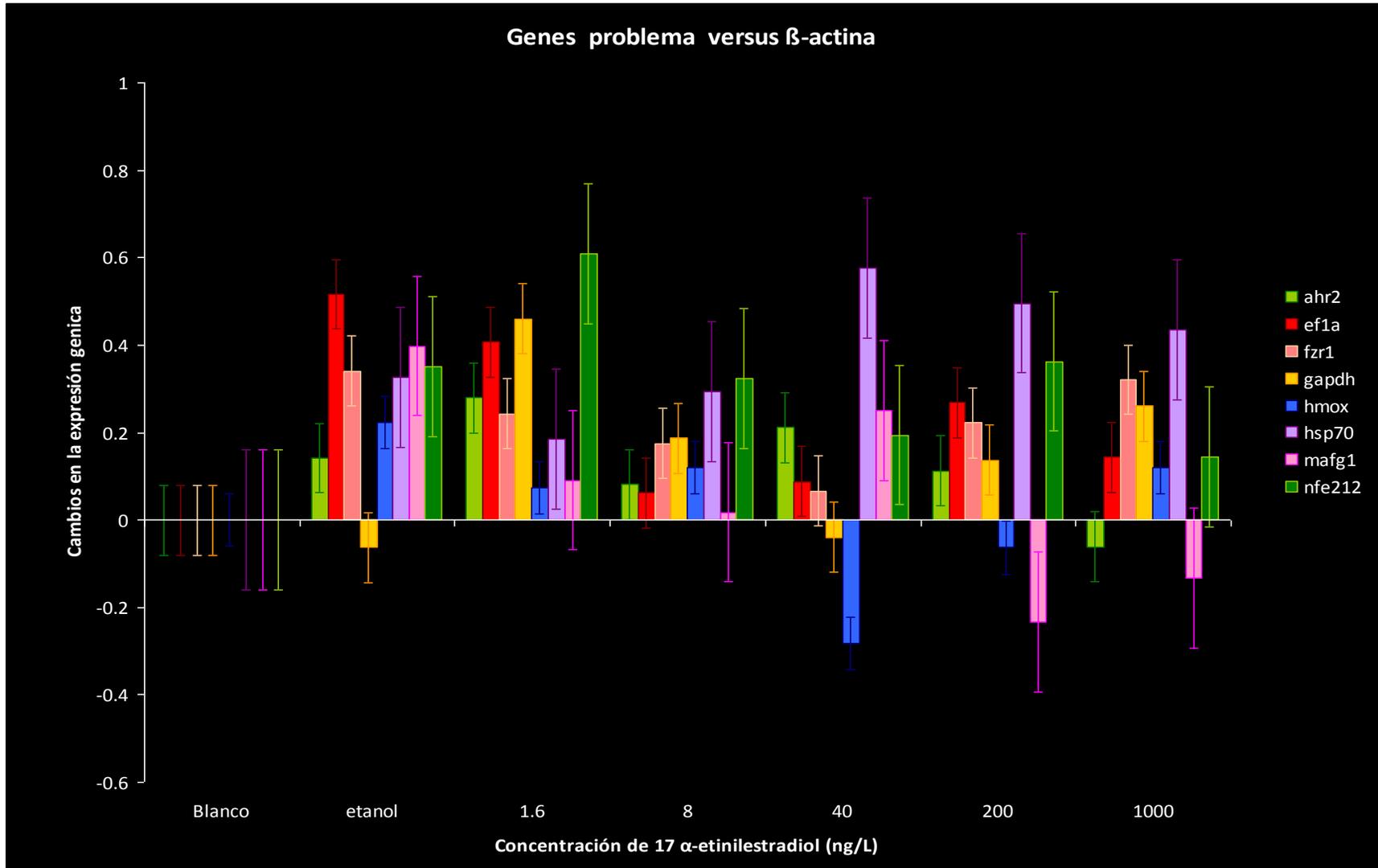


Fig. 23. Niveles de expresión de genes blanco con respecto al gen endógeno β -actina debido a 17 α -estradiol a 120 h de exposición.

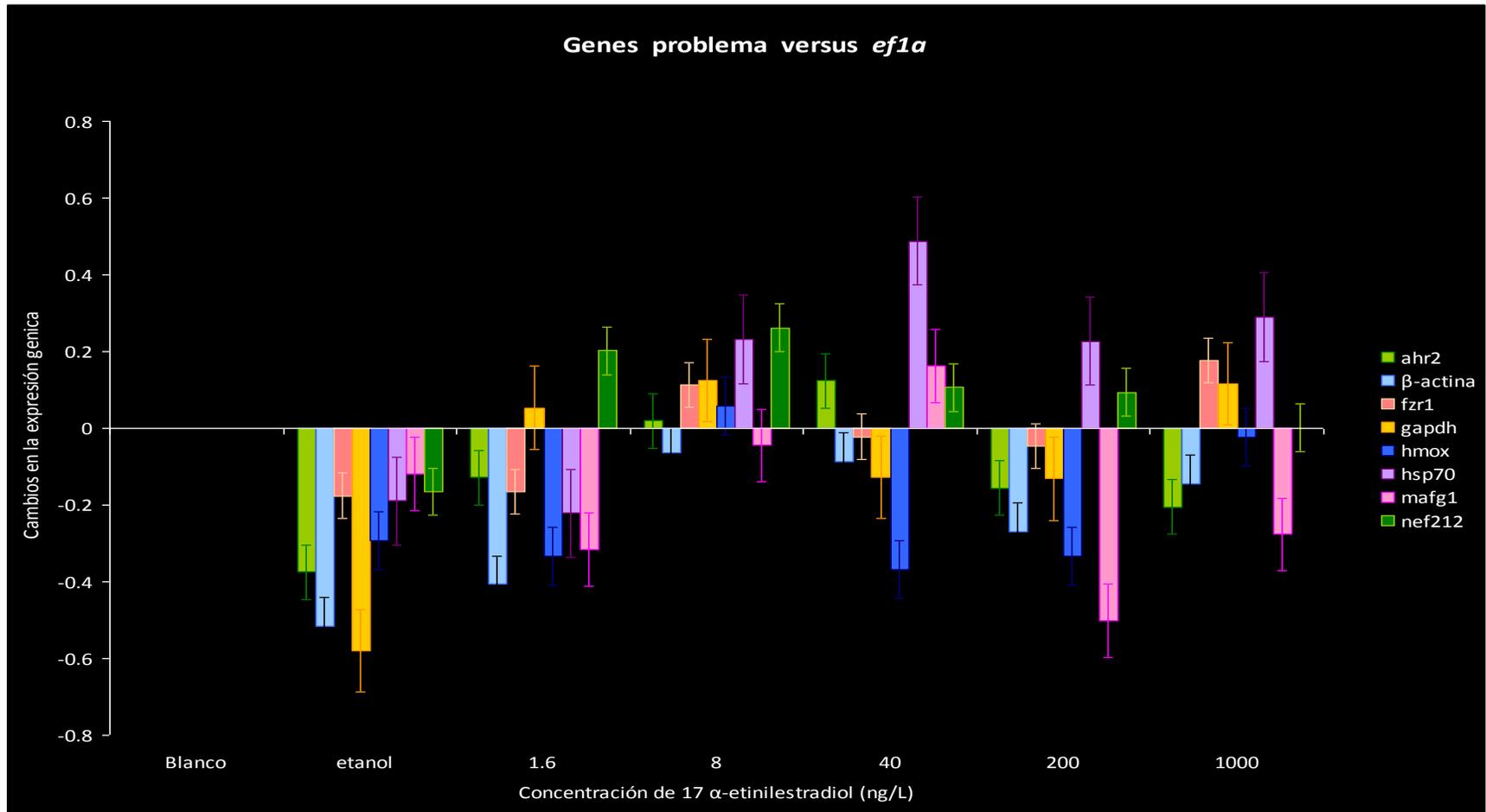


Fig. 24. Niveles de expresión de genes blanco con respecto al gen endógeno *ef1a* debido a 17α-estradiol a 120 h de exposición.

2011, Año del Turismo en México.

En el experimento realizado a 144 horas de exposición a 17α -estradiol se utilizó una concentración de $1000 \text{ ng } \mu\text{L}^{-1}$ cDNA, los genes blanco expusieron niveles de expresión ó se reprimieron con respecto a los genes endógenos β -actina ó *ef1a* de la siguiente manera:

VII.4.5 Niveles de expresión de genes blanco con respecto al gen endógeno β -actina.

El gen *ahr2* y el gen *ef1a* se reprimieron - 0.89 veces y - 1.2 veces, respectivamente, tanto con el etanol y a todas las concentraciones analizadas. El gen *fzr1* se expresó hasta en 0.68 veces con el etanol, y a las concentraciones de 1.6 y $40 \text{ ng } \text{L}^{-1}$ de 17α -etinilestradiol, por otro lado, se reprimió hasta en -0.09 veces a $1000 \text{ ng } \text{L}^{-1}$, mientras que, a 8 y $200 \text{ ng } \text{L}^{-1}$ no mostró expresión. El gen *gapdh* se reprimió con el etanol, y con todas las concentraciones (1.6, 8, 40, 200 y $1000 \text{ ng } \text{L}^{-1}$) hasta en -1.7 veces. El gen *hmox* se expresó con las concentraciones de 40, 200 y $1000 \text{ ng } \text{L}^{-1}$ hasta en 0.6 veces se reprimió con el etanol, y con las concentraciones de 1.6 y $8 \text{ ng } \text{L}^{-1}$ hasta en -0.84 veces. El gen *hsp70* se expresó con las concentraciones de 40 y $200 \text{ ng } \text{L}^{-1}$ hasta en 0.32 veces se reprimió con el etanol, y con las concentraciones de 1.6, 8 y $1000 \text{ ng } \text{L}^{-1}$ hasta en -0.41 veces (Fig. 25).

VII.4.6 Niveles de expresión de genes blanco con respecto al endógeno *ef1a*.

El gen *ahr2* se expresó hasta en 0.12 veces a las concentraciones de 1.6, $1000 \text{ ng } \text{L}^{-1}$, por el contrario, se reprimió -0.8 veces con el etanol, y a 8, 40 y $200 \text{ ng } \text{L}^{-1}$ 17α -etinilestradiol. El gen β -actina se expresó 1.2 veces con el etanol, y a las concentraciones 1.6, 8, 40, 200 y $1000 \text{ ng } \text{L}^{-1}$. El gen *fzr1* se expresó hasta en 1.1 veces con el etanol, y a las concentraciones de 1.6, 40 y $1000 \text{ ng } \text{L}^{-1}$, en cambio, no se expresó a 8 y $200 \text{ ng } \text{L}^{-1}$. El gen *gapdh* se expresó 2.7 veces con el etanol, y a 1.6, 8, 40, 200 y $1000 \text{ ng } \text{L}^{-1}$. El gen *hmox* se expresó hasta en 1.4 veces a 1.6, 40, 200 y $1000 \text{ ng } \text{L}^{-1}$, no obstante, se reprimió hasta en -0.75 veces con el etanol, y a $8 \text{ ng } \text{L}^{-1}$. El gen *hsp70* se expresó hasta en 0.81 veces con las concentraciones de 1.6, 40, 200 y $1000 \text{ ng } \text{L}^{-1}$, por otra parte, se reprimió -0.3 veces con el etanol y la concentración de $8 \text{ ng } \text{L}^{-1}$ 17α -etinilestradiol (Fig.26).

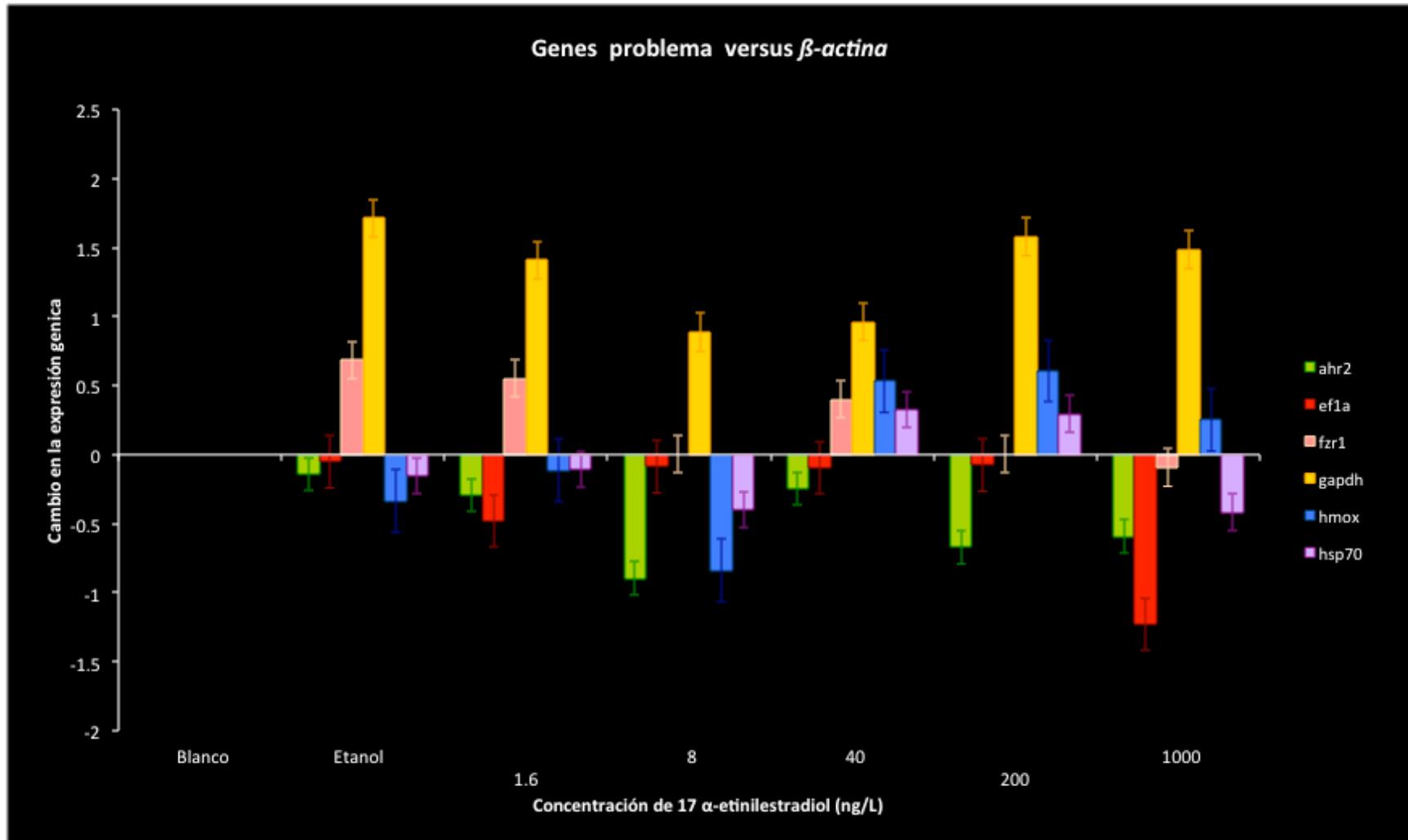


Fig. 25. Niveles de expresión de genes blanco con respecto al gen endógeno β -actina debido a 17 α -estradiol a 144 h de exposición.

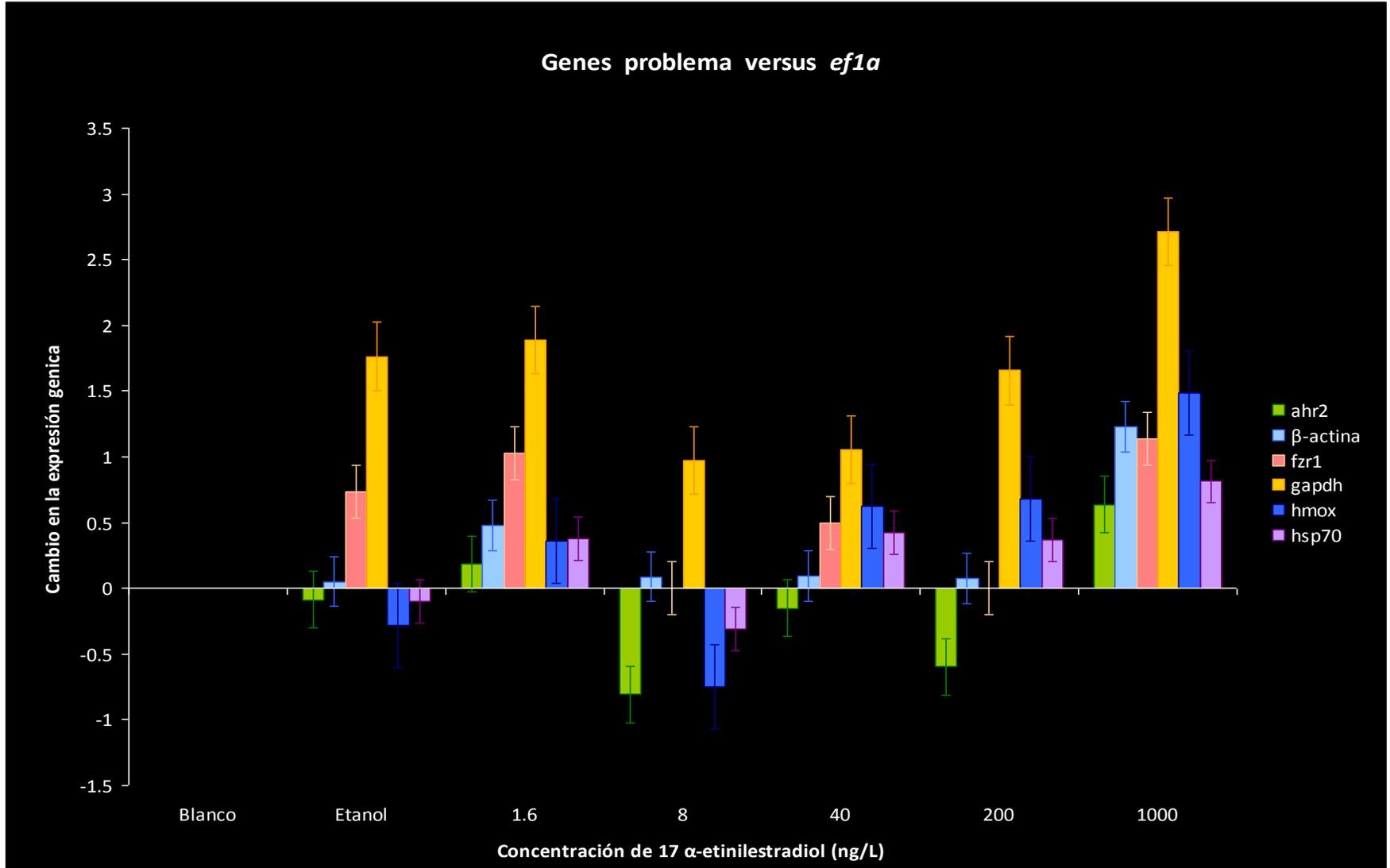


Fig. 26. Niveles de expresión de genes blanco con respecto al gen endógeno *ef1a* debido a 17 α -estradiol a 144 h de exposición

VIII. DISCUSIÓN

VIII.1 Atrazina.

La exposición a 120 h con atrazina, y considerando 500 ng μL^{-1} de molde de cDNA y β -actina como gen normalizador, el gen *ef1a* se expresó ligeramente con el DMSO, mientras que *gapdh* no mostró expresión. Asimismo, considerando a β -actina como gen normalizador respecto a los genes blanco *ahr2*, *hmox* y *hsp70* mostraron expresión con el DMSO e incluso a la concentración de 640 ng L^{-1} de atrazina, en contraste, los mismos genes se reprimieron con una concentración de atrazina de 4E+05 ng L^{-1} . De modo similar y considerando a *ef1a* como gen normalizador, el gen β -actina se reprimió ligeramente con el DMSO, mientras que *gapdh* no mostró expresión. Por otro lado, considerando al gen *ef1a* como gen normalizador con respecto a los genes blanco *ahr2*, *hmox* y *hsp70* se expresaron con el DMSO e incluso a las concentraciones de mínimas y máximas de atrazina (640 y 4E+05 ng L^{-1}). Esto muestra que una misma sustancia, a diferentes concentraciones, pueden tener distintos efectos en la expresión genética. En el caso de la atrazina, existen reportes que muestran que a bajas concentraciones actúa como disruptor endocrino, pero no a elevadas concentraciones. Este resultado pone de manifiesto por un lado, la complejidad de los mecanismos que regulan la expresión genética, y por otro, los efectos pleiotrópicos de agentes como la atrazina.

En otro experimento independiente de 120 h de exposición a atrazina y considerando 1000 ng μL^{-1} de molde de cDNA y β -actina como gen normalizador, se encontró que *ef1a* se expresó ligeramente con el DMSO, mientras que *gapdh* se reprimió. Además, considerando a β -actina como gen normalizador respecto a los genes blanco *ahr2*, *hmox* y *hsp70* se expresaron con el DMSO inclusive a 640 ng L^{-1} de atrazina, y se reprimieron a la máxima concentración de 4E+05 ng L^{-1} . Cabe destacar que a 1.6E+04 ng L^{-1} el gen *hsp70* mostro su máxima expresión 6.64 veces. Análogamente a las condiciones mencionadas y considerando a *ef1a* como gen normalizador, el gen β -actina se reprimió ligeramente con el DMSO, mientras que *gapdh* no mostró expresión. Por otro lado, considerando al gen *ef1a* como gen normalizador con respecto a los genes blanco *ahr2*, *hmox* y *hsp70* se expresaron con el DMSO incluso a las concentraciones de 640 hasta 8E+04 ng L^{-1} ; en contraste, los tres genes se reprimieron a 2E+06 ng L^{-1} . Cabe destacar que a 1.6E+04 ng L^{-1} el gen *hsp70* mostro su máxima expresión

2011, Año del Turismo en México.

5.28 veces; mientras que, el gen blanco *fzr1* se expresó a 640 y 3200 ng L⁻¹. Existe una discusión permanente sobre el mejor gen endógeno para los diversos estudios que usan el pez cebra como modelo. Reportes recientes, aunque no definitivos, sugieren que entre los mejores genes endógenos se encuentra *ef1a*, sin embargo, bajo nuestro contexto, *β-actina* mostró ser el mejor gen normalizador con respecto a los genes blanco. Mientras que los genes blanco *fzr1*, *maf1* y *nef212* no se expresaron en ninguna circunstancia. En reportes previos, se muestra que estos genes se inducen frente a distintos agentes contaminantes, sin embargo, en nuestro estudio no se observó tal efecto. El proceso de expresión genética tisular, puede visualizarse como un proceso gradual, puesto que en un huevo recién fecundado los genes expresados representan una minoría comparados con los genes expresados en el mismo organismo completamente desarrollado.

VIII.2 Estradiol y 17α-etinilestradiol.

La exposición a 6 h con estradiol, y considerando 1000 ng μL⁻¹ de molde de cDNA y *β-actina* como gen normalizador, el gen *ef1a* se expresó ligeramente con etanol, mientras que *gapdh* se reprimió. Asimismo, considerando a *β-actina* como gen normalizador respecto al gen blanco *ahr2* mostro expresión con etanol, mientras que el gen *fzr1* se reprimió y el gen *hsp70* no se expresó. A 27.24 ng L⁻¹ del estrógeno se expresaron *hsp70* y *ahr2*, mientras que *fzr1* no se expresó, en contraste, los tres genes se expresaron a 2.72E+04 ng L⁻¹ de estradiol. De modo similar y considerando a *ef1a* como gen normalizador, el gen *β-actina* se expresó con el etanol, mientras que *gapdh* no se expresó. Considerando al gen *ef1a* como gen normalizador con respecto al gen blanco *ahr2* este se expresó con etanol, mientras que los genes blanco *fzr1* y *hsp70* no se expresaron con este solvente. A 27.24 ng L⁻¹ de estradiol se expresó *ahr2* y se reprimió *fzr1* y *hsp70* no se expresó. A 2.72E+04 ng L⁻¹ de estradiol se expresaron los tres genes blanco..

La exposición con 17α-etinilestradiol a 48 h y con 1000 ng μL⁻¹ de molde de cDNA y como gen normalizador *β-actina*, se encontró que *ef1a* y *gapdh* se expresaron escasamente. Asimismo, considerando a *β-actina* como gen normalizador respecto a los genes blanco *ahr2*, *fzr1*, *hmox* estos se reprimieron con etanol, en contraste, *hsp70* mostro expresión con etanol. A las concentraciones de 1.6 y 1000 ng L⁻¹ se expresaron los genes *ahr2*, *fzr1*, *hmox* y *hsp70*. Bajo

2011, Año del Turismo en México.

las mismas condiciones de exposición y *ef1a* como gen normalizador, *β-actina* se reprimió ligeramente con etanol, mientras que *gapdh* se expresó. En cuanto a las diferentes concentraciones del estrógeno y como gen normalizador *ef1a*, se reprimieron *ahr2*, *fzr1* y *hmox* con etanol, en contraste, *hsp70* se expresó. A las concentraciones de 1.6 ng L^{-1} se expresó *fzr1*, mientras que *ahr2*, *hmox* y *hsp70* se reprimieron. A 1000 ng L^{-1} del estrógeno se expresó *fzr1* y *hsp70* y se reprimieron *ahr2* y *hmox*.

La exposición con 17α -etinilestradiol a 120 h y con $1000 \text{ ng}/\mu\text{L}$ de molde de cDNA y como gen normalizador *β-actina*, se encontró que *ef1a* se expresó mínimamente con etanol y *gapdh* se reprimió. Bajo las mismas condiciones y *ef1a* como gen normalizador, *β-actina* y *gapdh* se reprimieron ligeramente con etanol. En cuanto a las diferentes concentraciones del estrógeno y como gen normalizador *β-actina*, *ef1a* y *gapdh* se expresaron; considerando *ef1a* como gen normalizador se reprimieron tanto *β-actina* y *gapdh*. Por lo que el gen *β-actina* mostró ser el mejor gen normalizador con respecto al 17α -etinilestradiol.

La exposición con 17α -etinilestradiol a 144 h y con $1000 \text{ ng}/\mu\text{L}$ de molde de cDNA y como gen normalizador *β-actina*, se encontró que *ef1a* se reprimió con etanol y *gapdh* se expresó. Bajo las mismas condiciones y *ef1a* como gen normalizador, *β-actina* y *gapdh* se expresaron ligeramente con etanol. En cuanto a las diferentes concentraciones del estrógeno y como gen normalizador *β-actina*, *ef1a* se reprimió y *gapdh* se expresó; considerando *ef1a* como gen normalizador se expresaron tanto *β-actina* y *gapdh*. Por lo que el gen *ef1a* mostró ser el mejor gen normalizador con respecto al 17α -etinilestradiol.

Finalmente, se observa que tanto ambos estrógenos y la atrazina no mostraron un patrón de expresión definido de los genes blanco. Nuestra hipótesis es que el modelo utilizado (embrión del pez cebra), al ser un organismo no diferenciado, resulta inadecuado por este tipo de análisis. Las razones que creemos apoyan nuestra hipótesis son:

1. El gen *ef1a* es un factor de elongación que actúa durante la síntesis de proteínas. Varios trabajos utilizan este gen como control endógeno dado que se considera que la síntesis de proteínas es un proceso que se mantiene a niveles basales en un organismo, sin

2011, Año del Turismo en México.

embargo esto no necesariamente está ocurriendo en el embrión, el cual está experimentando diferenciación celular y tisular, proceso acompañado de importantes variaciones en la actividad traduccional y en la expresión de los genes involucrados en el proceso, tales como *ef1a*.

2. El gen de la β -actina juega un papel central en la estructuración del citoesqueleto celular. El embrión obviamente está sujeto a una elevada tasa de proliferación celular, por lo tanto, el gen de la β -actina muy probablemente no se está expresando a un mismo nivel en diferentes momentos del desarrollo del embrión, de ahí que los perfiles de expresión de los genes blanco sean tan variables.
3. El gen *gapdh* codifica para la enzima gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa, es decir, su actividad enzimática permite que el embrión tenga energía para continuar con sus etapas de maduración, por lo que su papel es de suma importancia en la evolución del embrión.

Los resultados muestran que el perfil de expresión genética en el embrión del pez cebra se modifica conforme se incrementa la edad del organismo, con más genes blanco expresados conforme la edad del embrión se incrementa. De forma similar, los perfiles de expresión obtenidos usando los dos genes endógenos seleccionados que se expresaron, son muy diferentes, cuando deberían concordar si ambos genes se comportaran realmente como genes control. Con el objetivo de obtener resultados más informativos, se propone analizar la expresión de los genes blanco en el pez adulto, en donde los procesos de diferenciación celular y recambio celular ya se encuentran estabilizados y en donde los genes endógenos se espera que se comporten como tales.

IX. CONCLUSIONES

Se implementó la metodología de PCR en tiempo real y de procesamiento de muestras para evaluar cambios en la expresión genética en el pez *Danio rerio*. A partir de reportes en los que se evaluaba a nivel genómico la expresión de más de 20,000 genes del pez cebra, se seleccionaron nueve genes (*cyp1a*, *fzr1*, *ahr2*, *hmx*, *hsp70*, *mafg1*, *nfe212*, *vtg1* y *mt2*) cuya expresión se inducía frente a diferentes contaminantes ambientales.

Se realizó la validación de la metodología para evaluar la expresión relativa de genes utilizando los embriones del pez cebra empleando tres contaminantes considerados como emergentes, el herbicida atrazina y las hormonas estradiol y 17 α -etinilestradiol.

Si bien varios reportes proponen que los embriones del pez cebra pueden funcionar como bioindicadores de contaminantes en agua, nuestros resultados sugieren que el modelo puede ser inadecuado debido al poco nivel de diferenciación tisular del mismo, lo que puede explicar la falta de expresión de algunos de los genes evaluados cuando se analizan muestras con cortos periodos de exposición, lo cual no ocurre cuando el modelo se expone durante un tiempo suficiente como para que alcancen la etapa de alevín, fase de desarrollo que muestra una mayor diferenciación tisular, fenómeno asociado con la mayor actividad transcripcional del genoma del pez.

De los genes endógenos seleccionados (*β -actina*, *ef1a* y *gapdh*), este último no mostró un patrón de expresión consistente que permita utilizarlo como tal, mientras que *β -actina* y *ef1a* muestran variaciones importantes cuando se comparan entre sí, lo que sugiere que alguno de ellos varía en su expresión frente a las diferentes condiciones evaluadas y por lo tanto no puede usarse como endógeno. La investigación se continúa con los análisis para determinar cuál de los dos genes pudiera ser el óptimo para ser utilizado como gen endógeno de control de la expresión.

Los resultados obtenidos hasta el momento, sugieren que se deben evaluar diferentes concentraciones de RNA para identificar el intervalo de concentración de RNA que permita optimizar la eficiencia de la amplificación para cada gen. Adicionalmente a los perfiles observados en el comportamiento transcripcional de los genes evaluados en las etapas embrión y alevín, en la siguiente etapa de esta investigación se propone trabajar con el pez *Danio rerio* en etapa adulta debido a que aportaría más información en la expresión relativa dado que los procesos de diferenciación celular y recambio celular ya se encuentran estabilizados y en

2011, Año del Turismo en México.

donde los genes endógenos se espera que se comporten como tales. Además de que se propone la inclusión de nuevos genes con la finalidad de ampliar la posibilidad de detección de genes que puedan actuar como genes marcadores de contaminantes ambientales en agua.

También se elaboraron los métodos para cuantificar las enterobacterias *Salmonella entérica* y *Escherichia coli* por la técnica de PCR.

Se publicó un artículo de divulgación denominado “Aplicación de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), para determinar el riesgo ambiental causado por compuestos disruptores endocrinos. Por: Sandoval-Villasana A.M., Cervantes-Dacasa F.R., Medrano-Baca M.G., González-Sánchez A. y Hernández-Romano J. en la página web ATL el Portal del Agua desde México (<http://www.atl.org.mx>) y en la red interna del IMTA (imtanet).

X. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.

Aerni H.R., Kobler B., Rutishauser B. V., Wettstein F. E., Fischer R., Giger W., Hungerbühle, A., Marazuela M.D., Peter A., Schönenberger R., Vögeli A.C., Suter M.J. y Eggen R.I. (2004). *Combined biological and chemical assessment of estrogenic activities in wastewater treatment plant effluents*. Analytical and Bioanalytical Chemistry. 378(3), 688-696.

Ankley G. T., Bencic D. C., Breen M. S., Collette T. W., Conolly R. B., Denslow N. D., Edwards S. W., Ekman D. R., Garcia-Reyero N., Jensen K. M., Lazorchak J. M., Martinovic D., Miller D. H., Perkins E. J., Orlando E. F., Villeneuve D. L., Wang, R. y Watanabe K. H. (2009). *Endocrine disrupting chemicals in fish: Developing exposure indicators and predictive models of effects based on mechanism of action*. Aquatic Toxicology 92:168-178.

Bardet P.L., Horard B., Robinson-Rechavi M., Laudet V., y Vanacker J.M. (2002). *Characterization of oestrogen receptors in zebrafish (Danio rerio)*. Journal of Molecular Endocrinology. 28(3), 153-163.

Bresch H. (1991). *Early life-stage in zebrafish versus a growth test in rainbow trout to evaluate toxic effects*. Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology. 46:641-648.

Engel R., Heijerick D., Janssen C., Anderson P. D. y Sumpter J. P. (2008). *Derivation of an Aquatic Predicted No-Effect Concentration for the Synthetic Hormone, 17 α -Ethinyl Estradiol*. Environmental Science and Technology. 42:7046-7054.

Filby A.L. y Tyler C.R. (2007). Appropriate 'housekeeping' genes for use in expression profiling the effects of environmental estrogens in fish. *BMC Molecular Biology* 8:10.

Frost P, Nilsen F. (2003). *Validation of reference genes for transcription profiling in the salmon louse, Lepeophtheirus salmonis, by quantitative real-time PCR*. Veterinary Parasitology. 118:169-174.

Gray, L.E., (1998). *Tiered Screening and Testing Strategy for Xenoestrogens and Antiandrogens*. Toxicology Letters 102-103:677-680.

Gorzelnik K, Janke J, Engeli S, Sharma AM. (2001). *Validation of endogenous controls for gene expression studies in human adipocytes and preadipocytes*. Hormone and Metabolism Research. 33:625-627.

Haffter P., Granato M., Brand M., Mullins M.C., Hammerschmidt M., Kane D.A., Odenthal J., van Eeden F.J., Jiang Y.J., Heisenberg C.P., Kelsh R.N., Furutani-Seiki M., Vogelsang E., Beuchle D., Schach U., Fabian C. y Nusslein-Volhard C. (1996). *The identification of genes with unique and essential functions in the development of the zebrafish, Danio rerio*. Development. 123:1-36.

2011, Año del Turismo en México.

Hernández-Antonio A. Hansen A. M. (2011). *Uso de plaguicidas en dos zonas agrícolas de México y evaluación de la contaminación de agua y sedimentos*. Revista internacional de contaminación ambiental. 115-127.

Hill AJ, Teraoka H, Heideman W, Peterson RE. (2005). *Zebrafish as a model vertebrate for investigating chemical toxicity*. Toxicol Sci. 86:6–19.

Hoffmann, J.L., Thomason, R.G., Lee, D.M., Brill, J.L., Price, B.B., Carr, G.J., Versteeg, D.J., (2008). *Hepatic gene expression profiling using GeneChips in zebrafish exposed to 17 α -methyl-dihydrotestosterone*. Aquat. Toxicol. 87, 69–80.

Ingerslev HC, Pettersen EF, Jakobsen RA, Petersen CB, Wergeland HI. (2005). *Expression profiling and validation of reference gene candidates in immune relevant tissues and cells from Atlantic salmon (Salmo salar L.)*. Molecular Immunology. 43:1194-1201

Kausch U., Alberti M., Haindl S., Budczies J. y Hock B. (2008). *Biomarkers for Exposure to Estrogenic Compounds: Gene Expression Analysis in Zebrafish (Danio rerio)*. Environmental Toxicology DOI 10.1002/tox

Kazeto Y., Place A.R. y Trant J.M. (2004). *Effects of endocrine disrupting chemicals on the expression of CYP19 genes in zebrafish (Danio rerio) juveniles*. Aquatic Toxicology. 69:25–34.

Kolpin D.W.; Furlong E.T.; Meyer M.T.; Thurman E.M.; Zaugg, S.D.; Barber, L.B.; Buxton, H.T. (2002). *Pharmaceutical, hormones, and other organic wastewater contaminants in U.S Streams, A national Reconnaissance*. Environmental Science & Technology, Vol. 36, Num. 6 pp 1202-1211.

Liedtke A., Muncke J., Rüfenacht K. y Eggen R. (2008). *Molecular multi-effect screening of environmental pollutants using the MolDarT*. Environmental Toxicology 23:59-67.

McCurley A. y Callard V.G. (2008). *Characterization of housekeeping genes in zebrafish: male-female differences and effects of tissue type, developmental stage and chemical treatment*. BMC Molecular Biology, 9:102

Morse DL, Carroll D, Weberg L, Borgstrom MC, Ranger-Moore J, Gillies RJ. (2005). *Determining suitable internal standards for mRNA quantification of increasing cancer progression in human breast cells by real-time reverse transcriptase polymerase chain reaction*. Analytical Biochemistry. 342:69-77.

Muller PY, Janovjak H, Miserez AR, Dobbie Z. (2002). *Processing of gene expression data generated by quantitative real-time RT-PCR*. Biotechniques 32:1372–1379.

Muncke J. y Eggen R.I.L. (2006). *Vitellogenin 1 mRNA as an early molecular biomarker for endocrine disruption in developing zebrafish (Danio rerio)*. Environmental Toxicology and Chemistry. 25 (10), 2734-2741.

Muncke J., Junghans M., Eggen R.I. (2007). *Testing estrogenicity of known and novel (xeno-) estrogens in the MolDarT using developing zebrafish (Danio rerio)*. Environmental Toxicology 22:185-193.

- Nishimura M, Koeda A, Suzuki E, Shimizu T, Kawano Y, Nakayama M, Satoh T. (2006). *Effects of prototypical drug-metabolizing enzyme inducers on mRNA expression of housekeeping genes in primary cultures of human and rat hepatocytes*. Biochemical and Biophysical Research Communications. 346(3): 1033-9
- Olsvik PA, Lie KK, Jordal AO, Nilsen TO, Hordvik I. (2005). *Evaluation of potential reference genes in real-time RT-PCR studies of Atlantic salmon*. BMC Molecular Biology. 6:21.
- Peterson RT, Link BA, Dowling JE & Schreiber SL., (2000). *Small molecule developmental screens reveal the logic and timing of vertebrate development*. PNAS 97 12965–12969
- Poynton H. C. y Vulpe C. D. (2009). *Ecotoxicogenomics: Emerging Technologies for Emerging Contaminants*. Journal of the American Water Resources Association. 45:83–96.
- Sawle A. D., Wit E., Whale G. y Cossins, A. R. (2010). *An information-rich, alternative, chemicals testing strategy using a high definition toxicogenomics and zebrafish (Danio rerio) embryos*. Toxicological Sciences. 118:128-139.
- Snape, J.R., S.J. Maund, D.B. Pickford, and T.H. Hutchinson, (2004). *Ecotoxicogenomics: The Challenge of Integrating Genomics Into Aquatic and Terrestrial Ecotoxicology*. Aquatic Toxicology 67(2):143-154.
- Solomon K.R., Baker D.B., Richards R.P., Dixon K.R., Klaine S.J., La Point T.W., Kendall R.J., Weisskopf C.P., Giddings J.M., Giesy J.P., Hall L.W. y Williams W.M. (1996). *Ecological risk assessment of atrazine in North American surface waters*. Environmental Toxicology and Chemistry. 15:31-76.
- Sumpter J.P. y Jobling S. (1995). *Vitellogenesis as a biomarker for estrogenic contamination of the aquatic environment*. Environmental Health Perspectives 7:173-178.
- Tang R., Dodd A., Lai. D., McNabb C. W. Y Love R. D., (2007). *Validation of Zebrafish Reference Genes for Quantitative Real-time RT-PCR Normalizations*. 39(5):384-390.
- Weil M., Scholz S., Zimmer M., Sacher F. y Duis K. (2009), *Gene expression analysis in zebrafish embryos: A potential approach to predict effect concentrations in the fish early life stage test*. Environmental Toxicology and Chemistry. 28: 1970–1978.
- Westerhoff P.; Yoon Y.; Shyder S.; Wert E. (2005). *Fate of endocrine-disruptor pharmaceutical, and personal care product chemicals during simulated drinking water treatment processes*. Environmental Science & Technology, Vol. 39 pp 6643-6649
- Wiegand C., Krause E., Steinberg C. y Plugmacher S. (2001). *Toxicokinetics of atrazine in embryos of the zebrafish (Danio rerio)*. Ecotoxicology and Environmental Safety. 49:199-205.
- Wingar D.; Turiel J. (1998). *Long-term of exposure to diethylbestrol*. Journal of Western Medicine, Vol. 149, pp 551-554.



2011, Año del Turismo en México.

World Health Organization (WHO), (2002). *IPCS Global Assessment of the State-of-the-Science of Endocrine Disruptors*. International Programme on Chemical Safety, WHO/PCS/EDC/02.2.



2011, Año del Turismo en México.

XI. ANEXO 1