

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE TLAXCALA
CENTRO DE INVESTIGACIÓN EN GENÉTICA Y AMBIENTE
MAESTRÍA EN CIENCIAS EN SISTEMAS DEL AMBIENTE



EVALUACIÓN DE BIOMARCADORES MOLECULARES EN
***Cyprinus carpio* COMO BIOINDICADOR AMBIENTAL EN LA**
PRESA DE ATLANGATEPEC, TLAXCALA

TESIS
QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADÉMICO DE
MAESTRA EN CIENCIAS EN SISTEMAS DEL AMBIENTE

PRESENTA
BIÓL. IVETT PÉREZ SÁNCHEZ

REALIZADO BAJO LA DIRECCIÓN DE
DRA. EDELMIRA GARCÍA NIETO
DR. JORGE ALBERTO RUBIO PIÑA

TUTORAS
DRA. ARELY ANAYA HERNÁNDEZ
DRA. ALINE LÓPEZ LÓPEZ



IXTACUIXTLA, TLAX., ENERO 2019



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE TLAXCALA
CENTRO DE INVESTIGACIÓN EN GENÉTICA Y AMBIENTE
MAESTRIA EN CIENCIAS EN SISTEMAS DEL AMBIENTE
AUTORIZACIÓN DE IMPRESIÓN

Código: 505-RGE-04
Publicación: Febrero 2018
Revisión: 9001 2015 02

BIÓL. IVETT PÉREZ SÁNCHEZ
CANDIDATA A MCSA
PRESENTE

En cumplimiento al artículo 52 fracción "d" del Reglamento General de Evaluación Académica, el comité de titulación ha revisado el trabajo de investigación titulado: "Evaluación de biomarcadores moleculares en *Cyprinus carpio* como bioindicador ambiental en la presa de Atlangatepec, Tlaxcala", realizado bajo la dirección de la Dra Edelmira García Nieto y Dr. Jorge Alberto Rubio Piña. No habiendo encontrado objeción alguna, se autoriza su impresión:

Dra. Alba Mónica Montiel González
Dra. Libertad Juárez Santacruz
Dra. Edelmira García Nieto
Dra. Arely Anaya Hernández
MC. Estrella Carro Córdoba

Sin otro particular, reciba un cordial saludo.

"POR LA CULTURA A LA JUSTICIA SOCIAL"
Ixtacuixtla, Tlax., 25 de enero de 2018



MSP. PATRICIA LIZÓN HUÉRFAN
COORDINADORA DE LA MCSA
CENTRO DE INVESTIGACIÓN
EN GENÉTICA Y AMBIENTE
MAESTRIA EN CIENCIAS
EN SISTEMAS DEL AMBIENTE

c.c.p. Expediente



El presente trabajo se realizó en el Laboratorio de Toxicología y Química Ambiental del Centro de Investigación en Genética y Ambiente de la Universidad Autónoma de Tlaxcala.

Contó con la participación de la asociación Zahuapan Vivo AC en la identificación de fuentes antrópicas en la zona de estudio y el muestreo biológico.

Obtuvo financiamiento a través de
Proyecto Cátedras-CONACyT No. 467
Beca de Maestría No. 607228

AGRADECIMIENTOS

A mis padres quienes me dieron la oportunidad de crecer en un hogar lleno de amor, por brindarme las herramientas necesarias para mi educación, por todos esos sacrificios que hicieron para que yo pudiera alcanzar mi sueño, en especial a ti mamá por enseñarme que pase lo que pase mientras luchemos se puede continuar.

A mis hermanas, porque el hecho de crecer a su lado siempre será una bendición, a pesar de los malos momentos sé que estaremos unidas, pero especialmente a ti Angy, por apoyarme a seguir con mis estudios por aquellas cosas que sacrificaste con tal de que yo llegara al lugar donde hoy me encuentro.

A la Dra. Edelmira García Nieto, al Dr. Jorge Alberto Rubio Piña, a la Dra. Arely Anaya Hernández y finalmente a la Dra. Aline López López quienes fungieron como directores de este trabajo de igual manera a la Dra. Libertad Juárez Santacruz por su infinita paciencia, conocimientos, comprensión y apoyo ante las situaciones que se presentaron durante la realización de este proyecto, por todo el tiempo dedicado desde la planeación hasta la culminación del mismo. Gracias por brindarme la oportunidad de conocerlos y compartir

experiencias que enriquecieron mi formación profesional y personal.

A los investigadores de CIGYA quienes durante los días de trabajo en laboratorio hicieron que pasara momentos agradables e inolvidables, gracias por compartir su experiencia y por todo el apoyo brindado.

A los revisores y sínodos de tesis, por su atención, tiempo y disposición para la revisión y culminación del trabajo.

A mis compañeros de maestría, por todos esos momentos buenos y malos que comoartimos que nos dejaron enseñanzas y bellos recuerdos en nuestras mentes, gracias por brindarme su amistad.

Sinceramente a todos muchas gracias.

ÍNDICE

INDICE DE FIGURAS.....	viii
INDICE DE TABLAS.....	ix
RESUMEN.....	x
ABSTRACT.....	xii
1. INTRODUCCIÓN.....	1
1.1 Evaluación de riesgo.....	2
1.2 Biomarcadores y expresión génica	5
1.2.1 Citocromo P450 1A1 (CYP1A1).....	7
1.2.2 Glutation-transferasa (GST).....	9
1.2.3 Uridina difosfato glucoronil transferasa (UDPGT).....	10
1.2.4 Catalasa (CAT).....	10
1.2.5 Vitelogenina (VTG).....	11
1.2.6 Proteína supresora de tumores P53.....	11
1.3 Bioindicador.....	12
1.3.1 <i>Cyprinus carpio</i>	13
1.4 Sitio de estudio.....	14
2. ANTECEDENTES.....	16
3. JUSTIFICACIÓN.....	21
4. HIPÓTESIS.....	23
5. OBJETIVOS.....	25
5.1 Objetivo general.....	26
5.2 Objetivos específicos.....	26
6. METODOLOGÍA.....	27
6.1 Trabajo de campo.....	28
6.1.1 Muestreo.....	28
6.2 Trabajo de laboratorio.....	30

6.2.1 Determinación del factor de condición de Fulton.....	31
6.2.2 Extracción de ARN del hígado.....	32
6.2.3 Síntesis de ADNc.....	34
6.2.4 Diseño de cebadores para los genes: <i>CYP1A1, GST, CAT, UDPGT, VTG y P53</i>	34
6.2.5 Evaluación de la expresión de los genes por RT-PCR.....	35
6.2.6 Densitometría.....	36
6.2.7 Análisis estadístico.....	37
7. RESULTADOS.....	38
7.1 Determinación del factor de condición de Fulton.....	39
7.2 Extracción de ARN total y síntesis de ADNc.....	41
7.3 Síntesis de ADNc.....	42
7.4 Evaluación de la expresión de los genes por RT-PCR.....	43
8. DISCUSIÓN.....	53
9. CONCLUSIONES.....	63
10. LITERATURA CITADA.....	65
11. ANEXOS.....	71

ÍNDICE DE FIGURAS

Pág.

<i>Fig. 1</i>	Imagen de <i>Cyprinus carpio</i>	13
<i>Fig. 2</i>	Localización del área de estudio	13
<i>Fig. 3</i>	Área de estudio	27
<i>Fig. 4</i>	Recolecta de peces en campo	28
<i>Fig. 5</i>	Medición y pesaje de peces	28
<i>Fig. 6</i>	Extracción de muestras de hígado	29
<i>Fig. 7</i>	Grupo control	30
<i>Fig. 8</i>	Extracción de ARN por el método de Trizol	32
<i>Fig. 9</i>	Análisis densitométrico utilizando el programa ImageJ	35
<i>Fig. 10</i>	Relación potencial del total de muestras recolectadas	39
<i>Fig. 11</i>	Relación potencial de las muestras de Atlangatepec con respecto al género.	40
<i>Fig. 12</i>	Fragmentos del ARN total en hígado de <i>Cyprinus carpio</i>	41
<i>Fig. 13</i>	Fragmentos del gen constitutivo de β -ACTINA en hígado de <i>Cyprinus carpio</i> .	41
<i>Fig. 14</i>	Fragmentos de los genes CAT (452 pb), UDPGT (289 pb) y el gen β -ACTINA (356 pb), en hígado de <i>Cyprinus carpio</i> .	42
<i>Fig. 15</i>	Fragmentos de los genes GST (399 pb) y P53 (333 pb), en hígado de <i>Cyprinus carpio</i> .	43
<i>Fig. 16</i>	Fragmentos del gen CYP1A1 (375 pb) en hígado de <i>Cyprinus carpio</i> .	43
<i>Fig. 17</i>	Fragmentos del gen VTG (405 pb) en hígado de <i>Cyprinus carpio</i> .	44
<i>Fig. 18</i>	Comparación de la expresión de los genes de estudio en hembras en cada sitio de estudio.	46
<i>Fig. 19</i>	Comparación de la expresión de los genes de estudio en machos en cada sitio de estudio.	47
<i>Fig. 20</i>	Comparación de la expresión de CAT y GST entre sitios y género.	48
<i>Fig. 21</i>	Comparación de la expresión de CYP1A1 y UDPGT entre sitios y género.	49
<i>Fig. 22</i>	Comparación de la expresión de VTG y P53 entre sitios y género.	50

ÍNDICE DE TABLAS

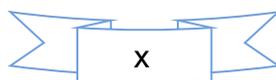
Pág.

<i>Tabla 1</i>	Cebadores diseñados para evaluar la expresión de los genes de estudio.	34
<i>Tabla 2</i>	Parámetros morfométricos y factor de condición	38
<i>Tabla 3</i>	Densitometría de los genes de estudio en <i>Cyprinus carpio</i> recolectados en cada sitio de estudio expresados en unidades arbitrarias.	45

RESUMEN

El objetivo de este trabajo fue evaluar la expresión de algunos genes en hígado de *Cyprinus carpio* como bioindicador de contaminación para analizar el riesgo genotóxico potencial en la Presa de Atlangatepec. Se recolectaron 18 peces hembra y 10 machos en la Presa de Atlangatepec (A), se capturaron cuatro peces macho en un estanque en Ixtacuixtla como grupo de Referencia (R), además se expusieron bajo condiciones de laboratorio 3 peces hembra y 5 machos como grupo Control (C). Se midieron parámetros morfométricos y se extrajo el hígado para analizar la expresión de los genes *CAT*, *GST*, *CYP1A1*, *UDPGT*, *VTG* y *P53* mediante la técnica de RT-PCR. Los peces del grupo R ($b = 1.51$) y C ($b = 1.44$) presentaron un crecimiento alométrico negativo, mientras que los peces del grupo A mostraron un crecimiento isométrico ($b = 2.63$). Con respecto a la expresión de genes se presentó una gran variabilidad en los tres grupos y el análisis estadístico no muestra diferencias significativas entre los grupos. La expresión de *CAT* en machos estuvo en un intervalo de 1.8 a 171.5 ua, con medianas similares entre los tres grupos (A = 118.7, R = 116.1 y C = 102.2 ua), pero ligeramente mayores a los encontrados en las hembras (A = 93.5 y C = 81.5 ua).

La expresión de *GST* fue ligeramente mayor en machos (100.0 ua) que en hembras (85.1 ua) del grupo A, con una gran variabilidad (0.8 a 350 ua). El 50 % de los individuos machos del grupo R y de hembras del grupo A tuvieron una expresión menor a 75 ua. La expresión del gen *CYP1A1* en los peces machos del grupo A osciló entre 10.2 a 373.8 ua con un valor de la mediana de 116.3 ua, esto fue 1.7 veces mayor que la expresión en las hembras (69.1 ua) pero similar al grupo C de ambos sexos. Para *UDPGT* en los machos del grupo A se aprecia una expresión (118 ua) mayor que en las hembras (21.4 ua), es notable una disminución en la expresión de este gen en las hembras del grupo A con respecto a las del grupo C (105.5 ua). La expresión de *VTG* en las hembras del grupo A (58.1 ua) es menor que en los machos de la misma presa (104.2 ua) y del grupo C (100.2 ua) del mismo sexo. La expresión de *P53* varió de 0.9 a 444.9 ua. En la hembras la mediana de la



expresión es notablemente mayor en la presa (80.8 ua) superando por 2.6 veces el valor del grupo C del mismo sexo, y es ligeramente inferior a la expresión en los machos del mismo grupo (105.5 ua). No se observaron diferencias estadísticamente significativas al comparar la expresión de los genes en hembras de la presa con el grupo C ($p < 0.05$). No obstante, se observa una tendencia de disminución en la expresión en los genes *CYP1A1*, *UDPGT* y *VTG* en los peces del grupo A, mientras que para el caso del gen *P53* se aprecia una sobreexpresión. En el caso de los machos los niveles de expresión tienden a comportarse de una manera más uniforme, a excepción de *GST* y *VTG*, donde se observa una disminución de la expresión en el sitio de referencia con respecto a los otros grupos de estudio.

Aunque no se presentaron diferencias estadísticamente significativas en la expresión de la mayoría de los genes evaluados, los resultados muestran una tendencia en el caso de aquellos que están relacionados en el proceso de detoxificación en la fase de conjugación, los valores fueron menores en la Presa de Atlangatepec en comparación con los grupos de Referencia y Control; lo que sugiere que en el sitio de estudio existen sustancias que pueden estar suprimiendo su expresión. Los peces se encuentran cerca de la cima de la cadena alimenticia en los ecosistemas acuáticos por lo cual reflejan la salud de los mismos, por lo tanto, los efectos de los contaminantes en estos organismos pueden manifestarse en todos los niveles de organización biológica.

La combinación de parámetros moleculares y fisiológicos ofrece información relevante sobre la determinación del estado de salud de los peces, son de suma importancia como herramientas de “alerta temprana” que muestran estados biológicos alterados en la biota de un ecosistema, lo que justifica llevar a cabo la evaluación de la calidad ambiental con la inclusión de biomarcadores de exposición y estudios de poblaciones, para evaluar la integridad ecológica en un ecosistema.

ABSTRACT

The aim of the present work was to assess some gene expression in liver from as a contamination bioindicator to analyze the potential genotoxic risk in the Presa Atlangatepec. Eighteen female and 10 male fish were collected at the Presa Atlangatepec (A), four male fish were captured from a pond in Ixtacuixtla as a Reference group (R), in addition 3 female and 5 male fish as a Control group (C) were exposed under laboratory conditions. Morphometric parameters were measured, and the fish liver was removed to analyze the *CAT*, *GST*, *CYP1A1*, *UDPGT*, *VTG* and *P53* gene expression using the RT-PCR technique. The fishes in group R ($b = 1.51$) and C ($b = 1.44$) had negative allometric growth, while the fishes in group A showed isometric growth ($b = 2.63$). With respect to gene expression, a great data dispersion was presented in all three groups and statistical analysis showed no significant differences among the groups. The *CAT* expression in males was in an interval of 1.8 to 171.5 ua, with similar medians among the three groups (A = 118.7, R = 116.1 and C = 102.2 ua), but slightly greater than those found in females (A = 93.5 and C = 81.5 ua).

The *GST* expression was slightly higher in males (100.0 ua) than females (85.1 ua) of group A, with a great data dispersion (0.8 to 350 ua). Fifty percentage of male fish in group R and females in group A had an expression less than 75 ua. The *CYP1A1* expression in male fish in group A ranged from 10.2 to 373.8 ua, with a median value of 116.3 ua, this value was 1.7 times higher than the expression in females (69.1 ua), but similar to group C of both sexes. In group A, the expression *UDPGT* in the fish male (118 ua) was greater than in females (21.4 ua), a notable decrease in the gene expression from females of group A compared to those of group C (105.5 ua). The *VTG* expression in fish female of group A (58.1 ua) is lower than in males of the same Presa (104.2 ua) and group C (100.2 ua) of the same sex. The *P53* expression ranged from 0.9 to 444.9 ua. In females the median expression is significantly higher in Presa (80.8 ua) exceeding by 2.6 times the value of group C of the same sex and is slightly lower than the expression in males of the same group (105.5 ua). No

statistically significant differences were observed when gene expression of fish female from the Presa were compared with group C ($p < 0.05$). However, a trend of decreased expression is observed in the *CYP1A1*, *UDPGT* and *VTG* genes of fish from A group fi, while in the case of the P53 gene overexpression is observed. In the case of male fish, expression levels tend to behave more uniformly with the *GST* and *VTG* exception, where a decrease in expression is observed at the Reference site compared to the other study groups.

Although there were no statistically significant differences in the expression of the most genes evaluated, the results showed a trend for those who are related to the detoxification process in the conjugation phase, the values were lower in the Presa Atlangatepec compared to the Reference and Control groups; suggesting the presence of substances on the study area that, may be suppressing their expression. Fishes are found near to food chain top in aquatic ecosystems, thus reflecting their health state, thereby the pollutants effects on these organisms can manifest at all levels of biological organization.

The combination of molecular and physiological parameters provides relevant information on the health status of fish, they are of paramount importance as "early warning" tools that show altered biological states in the biota of an ecosystem, which justifies carrying out environmental quality assessment with the inclusion of exposure biomarkers and population studies, to assess ecological integrity in an ecosystem.

1. INTRODUCCIÓN



1.1 EVALUACIÓN DE RIESGO

Con el desarrollo de nuevas tecnologías y el surgimiento de numerosas actividades que se adaptan a la sociedad moderna las cuales dependen directamente del uso de nuevas sustancias químicas para la producción de bienes y servicios, que afectan el bienestar de los ecosistemas, se han implementado estrategias que permiten identificar el impacto de estas sustancias que se manifiesta y se expresa en ambientes naturales. La evaluación de riesgo tiene su fundamento en evaluar una situación de riesgo particular causado por un lugar o sitio preciso que se encuentre contaminado con sustancias potencialmente tóxicas, partiendo de una evaluación de los sitios en donde se cuantifican compuestos tóxicos en matrices ambientales involucradas en las rutas de exposición para después generar estimaciones e inferir el riesgo en salud humana y/o en poblaciones ecológicas, es decir, consiste en realizar la recolección de datos para relacionar los efectos sobre la salud humana y sobre la de los integrantes de un ecosistema, mediante la respuesta que generan debido a la exposición a ciertas dosis de sustancias peligrosas (NAS 1983). El riesgo se identifica como la probabilidad de que un individuo o una población presenten daños, enfermedades o muerte, bajo condiciones específicas, y puede ser expresado en términos cuantitativos o cualitativos (USEPA, 2001).

La Agencia de Protección Ambiental (EPA, por sus siglas en inglés) y la Agencia para Sustancias Tóxicas y Registro de Enfermedades (ATSDR, por sus siglas en inglés), son las primeras organizaciones que han desarrollado metodologías que permiten llevar a cabo la evaluación de riesgo, su fundamento es evaluar una situación de riesgo particular causado por un lugar o sitio preciso que se encuentre contaminado con sustancias que pueden ser tóxicas. Estas opciones parten de una evaluación ambiental en donde se cuantifican compuestos tóxicos en matrices ambientales involucradas en las rutas de exposición para después generar estimaciones e inferir el riesgo sobre las poblaciones.

La Organización Panamericana de la Salud (OPS) realizó un análisis crítico de las metodologías para mejorarlas, disminuyendo la incertidumbre de la exposición al proponer el empleo de biomarcadores de exposición; cuantificación de sustancias tóxicas o sus metabolitos en fluidos biológicos o tejidos de las poblaciones expuestas, y biomarcadores de efecto; medición de las alteraciones a diferentes niveles de organización, lo que representa el hecho de que el tóxico ha sido absorbido.

El empleo de biomarcadores ayuda a un mejor entendimiento acerca de las alteraciones biológicas que son provocadas por xenobióticos en poblaciones silvestres en un contexto real, reduciendo la incertidumbre en las evaluaciones ambientales y en estudios con organismos de laboratorio en un sistema controlado. De esta manera, se obtiene un panorama más claro de las respuestas que podrían presentar los organismos receptores, puesto que, en muchas ocasiones no se producen efectos letales, sino que pueden ser sub-letales a diferentes niveles de organización biológica, lo que puede influir en la viabilidad de las poblaciones a largo plazo (Díaz-Barriga, 1999).

Para llevar a cabo el proceso de evaluación de riesgo se sigue una relación de cuatro pasos, los cuales consisten en la evaluación de la fuente o el mecanismo de emisión, la evaluación de la exposición, la evaluación de los efectos y finalmente la caracterización del riesgo en donde se reconoce la probabilidad de que los cambios sobre los individuos expuestos ocurran por la presencia actual o futura de un estresor asociado con las diferentes actividades (Peña *et al.*, 2001; Medina *et al.*, 2004).

Para profundizar en el proceso, se puede mencionar que en la primera etapa de la evaluación de riesgo se trata de identificar y describir el escenario de un sitio que se considere potencialmente peligroso. En este sentido, Los cuerpos de agua se han convertido en receptores directos o indirectos de los desechos generados por las actividades industriales, urbanas y agrícolas estos desechos han provocado

que la capacidad de autodepuración de estos ecosistemas se vea disminuida, trayendo como consecuencia alteraciones sobre la calidad del agua, que es un componente determinante para la salud de las diversas poblaciones y la calidad de vida humana (Guzmán *et al.*, 2016), lo que los convierte en un sitio potencialmente peligroso.

Dentro del estado de Tlaxcala se encuentran diversos cuerpos de agua, el más importante debido a su capacidad de almacenamiento es la Presa de Atlangatepec la cual se ha visto afectada por actividades relacionadas con el cambio de uso de suelo, esto para llevar a cabo actividades agrícolas, pecuarias e industriales, así como procesos de urbanización, lo que ha provocado la producción e introducción de diferentes sustancias químicas en este sistema hidrológico impulsando un desequilibrio en el ambiente.

La exposición de organismos a contaminantes ambientales produce diferentes efectos entre ellos los efectos letales que generalmente se asocian a una intoxicación aguda y los efectos subletales, que derivan en sutiles cambios bioquímicos, celulares, fisiológicos o incluso en alteraciones conductuales o de desarrollo, los cuales son más frecuentes en la naturaleza y repercuten en la viabilidad de las poblaciones silvestres. (Wagner *et al.*, 2014; Sendarrubias, R. 2016), estos efectos estarán influenciados por diferentes factores tales como: el grado de toxicidad, concentración y tiempo de exposición al contaminante así como las características ambientales del sistema receptor, capacidad de biodegradación del compuesto y procesos de transporte (mecanismos de detoxificación).

Durante las últimas décadas, el desarrollo de estudios en genética y biología molecular ha permitido conocer mejor la función y participación de los genes en los organismos. Es bien conocido que los genes se encuentran en el interior de las células de todos los organismos vivos (en el núcleo para el caso de los eucariontes), y que existen dos tipos de macromoléculas que contienen la información genética funcional de los organismos. Estas macromoléculas son el ácido

desoxirribonucleico (ADN) y el ácido ribonucleico ARN conocidos ambos como los ácidos nucleicos (Bolívar, 2004). Estas macromoléculas juegan un papel muy importante en la transcripción de genes con el objeto de sintetizar nuevas proteínas necesarias para el funcionamiento y desarrollo de los organismos (Baker et al., 1987). Diferentes estudios acerca de la expresión génica tanto en procariontes como en eucariontes nos han proporcionado información valiosa acerca del desarrollo, la diferenciación, la homeostasis y la regulación del ciclo celular.

Como una segunda etapa en la metodología de evaluación de riesgo de un ecosistema, se encuentra la medición de la respuesta de los organismos cuando se encuentran expuestos a compuestos xenobióticos, mediante la aplicación de biomarcadores de efecto. Se emplean diversas herramientas de medición de daño como indicadores bioquímicos, fisiológicos, conductuales y moleculares los cuales se definen como la respuesta funcional, fisiológica o bioquímica a nivel celular e interacciones moleculares que representan una señal integrada del nivel de contaminación. Esto constituye una herramienta poderosa para identificar las vías metabólicas perjudicadas por las perturbaciones ambientales, el modo de acción de dichas perturbaciones y las consecuencias para el crecimiento, supervivencia y la reproducción de los organismos (Lacroix *et al.*, 2014). Para un mejor entendimiento de esta etapa, se describe a continuación información referente a los biomarcadores.

1. 2 BIOMARCADORES Y EXPRESIÓN GÉNICA

Los biomarcadores se definen como sustancias o moléculas que permiten medir la respuesta o alteración bioquímica, fisiológica, morfológica e histopatológica de los organismos, ocasionada por la exposición a contaminantes. Éstos tienen amplia importancia ecológica debido a que pueden ser expresados y cuantificados en los receptores ecológicos a diferentes niveles de acción, desde la exposición a agentes tóxicos hasta la aparición de efectos adversos o la presentación clínica de la enfermedad (Peakall, 1994).

En este sentido, y con el fin de conocer el estado de alteración en el que se encuentran los organismos habitantes de los ecosistemas, se han empleado herramientas nuevas incluyendo las técnicas moleculares, que con el avance de la biología molecular y el descubrimiento de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) permiten el estudio de secuencias específicas de ADN o ARN susceptibles de presentar una alteración en su estructura o función, revelando características novedosas relacionadas con la exposición a xenobióticos (Toro-Restrepo, 2011). Estas herramientas facultan un análisis de la expresión génica dentro de las células y el organismo, evaluando los cambios en la presencia de secuencias específicas que codifican genes de importancia metabólica, mismos que han permitido evaluar la expresión génica. Para tal efecto, ha sido necesario conocer las secuencias de los genes seleccionados para poder diseñar cebadores específicos a partir de los extremos de las secuencias, que comúnmente corresponden con un gen que codifica para una proteína. La información obtenida a través de este método ha sido incorporada a diversos programas de monitoreo para aguas marinas y dulces como biomarcadores de exposición/efecto, los cuales son de suma importancia como herramientas de “alerta temprana” que muestran estados biológicos alterados en la biota de un ecosistema, lo que justifica llevar a cabo la evaluación de la calidad ambiental (de la Torre Fernando *et al.*, 2005; Chèvre *et al.*, 2003).

La aplicación de la tecnología para la medición de la incorporación de modificaciones genéticas (expresión de genes y proteínas) ha mejorado nuestra comprensión del efecto de la contaminación ambiental sobre la biota. Diferentes estudios realizados en organismos han demostrado que la expresión de genes y síntesis de proteínas involucradas en las actividades metabólicas que intervienen en procesos de detoxificación como son el Citocromo P4501A (CYP1A), glutathion S-transferasa (GST), metalotioneína (MT), catalasa (CAT) y vitelogenina (VTG), pueden ser modificadas por diferentes compuestos inorgánicos y orgánicos como metales pesados, hidrocarburos aromáticos policíclicos, bifenilos policlorados, plaguicidas, dioxinas y furanos (Kerambrun *et al.*, 2012; Faria *et al.*, 2009; Navarro *et al.*, 2011), sugiriendo la pertinencia de ser evaluados como biomarcadores.

Por su parte, desde 1985 se ha utilizado la expresión de genes como la VTG como indicador de exposición a Contaminantes Orgánico Persistentes (COPs). Estos compuestos tienen la característica de modificar el sistema endocrino de los organismos, ya sea afectando la capacidad reproductora, el comportamiento sexual, la producción y función de las hormonas, y la actividad de los receptores, causando mortandad en las poblaciones.

En estudios recientes se ha demostrado la elevada toxicidad de los COPs, hay evidencia de daños a nivel neurotóxico (Roberts *et al.*, 2007), genotóxico (Torres y López, 2007), incluso se han reportado efectos carcinogénicos (Ward *et al.*, 2009) y reproductivos (Wang *et al.*, 2009).

Todos estos efectos están mediados por la respuesta metabólica del organismo que se relaciona directamente con el mecanismo de detoxificación, en el cual intervienen una serie de enzimas cuyo fin es llevar a cabo la transformación de los compuestos xenobióticos para su eliminación. Este proceso se divide en dos fases; en la primera se llevan a cabo reacciones de oxidación, reducción e hidrólisis en donde la mayoría de las sustancias son catalizadas por enzimas microsomales como la súper familia del Citocromo P450 y las enzimas de función múltiple. En la segunda fase, en conjunto con compuestos generados en las reacciones que son bio-sintetizadas, los metabolitos o los xenobióticos, son enlazados covalentemente a una molécula endógena. Entre las enzimas que participan en el proceso se encuentran la uridina difosfato glucuronil transferasa (UDPGT) y la glutation S-transferasa (GST).

1.2.1 CITOCROMO P450 1A1 (CYP1A1)

Las isoenzimas del citocromo P450 constituyen una súper familia integrada por 13 familias (CYP1 – CYP13), 22 subfamilias (A, B y C). Son hemoproteínas con actividad de oxigenasa y son las responsables de la biotransformación oxidativa de múltiples fármacos, contaminantes ambientales y compuestos endógenos, para su detoxificación. La subfamilia CYP1A1 comprende dos genes *CYP1A1* y *CYP1A2* (Goksoyr y Forlin, 1992). La inducción de *CYP1A1* tiene efectos nocivos potenciales

a través de la oxidación de xenobióticos transformándolos a metabolitos carcinógenos, los cuales muestran una alta afinidad de unión al ADN formando aductos (Schober et al., 2006; Ma y Lu, 2007). Los niveles de proteínas pueden ser determinados inmunológicamente en el hígado el cual es el órgano más importante, aunque también se han observado en otros tejidos (Rendon von Osten, 2005). La expresión del gen *CYP1A1* está regulada por la activación del receptor de hidrocarburos arilo (AhR), que en su estado basal se encuentra en el citoplasma como parte de un complejo con proteínas chaperonas como la HSP90, P23 y XAP2 (Nebert y Dalton 2006). El dímero formado por el xenobiótico y el AhR es transportado al núcleo por medio del translocador nuclear de hidrocarburos arilo (ARNT), que funciona como un factor de transcripción de varios genes al unirse a elementos de respuesta en el ADN que codifican para diversas enzimas que participan el metabolismo de compuestos endógenos y xenobióticos (Hamada et al., 2006). Se han desarrollado estudios en donde analizan los niveles de expresión del gen *CYP1A1* en peces como marcador biológico para el análisis y control de contaminantes orgánicos en el medio acuático, a través de la evaluación de los niveles de expresión cuantitativa utilizando la técnica qRT-PCR, debido a que esta técnica tiene la ventaja de emitir una respuesta en menor tiempo con respecto a las técnicas bioquímicas (Piña et al., 2007).

Las isoenzimas del citocromo P450 constituyen una súper familia integrada por 13 familias (CYP1 – CYP13), 22 subfamilias (A, B y C). Son hemoproteínas con actividad de oxigenasa y son las responsables de la biotransformación oxidativa de múltiples fármacos, contaminantes ambientales y compuestos endógenos, para su detoxificación. La subfamilia CYP1A1 comprende dos genes *CYP1A1* y *CYP1A2* (Goksoyr y Forlin, 1992). La inducción de *CYP1A1* tiene efectos nocivos potenciales a través de la oxidación de xenobióticos transformándolos a metabolitos carcinógenos, los cuales muestran una alta afinidad de unión al ADN formando aductos (Schober et al., 2006; Ma y Lu, 2007). Los niveles de proteínas pueden ser determinados inmunológicamente en el hígado el cual es el órgano más importante, aunque también se han observado en otros tejidos (Rendon von Osten, 2005). La

expresión del gen *CYP1A1* está regulada por la activación del receptor de hidrocarburos arilo (AhR), que en su estado basal se encuentra en el citoplasma como parte de un complejo con proteínas chaperonas como la HSP90, P23 y XAP2 (Nebert y Dalton 2006). El dímero formado por el xenobiótico y el AhR es transportado al núcleo por medio del translocador nuclear de hidrocarburos arilo (ARNT), que funciona como un factor de transcripción de varios genes al unirse a elementos de respuesta en el ADN que codifican para diversas enzimas que participan en el metabolismo de compuestos endógenos y xenobióticos (Hamada *et al.*, 2006). Se han desarrollado estudios en donde analizan los niveles de expresión del gen *CYP1A1* en peces como marcador biológico para el análisis y control de contaminantes orgánicos en el medio acuático, a través de la evaluación de los niveles de expresión cuantitativa utilizando la técnica qRT-PCR, debido a que esta técnica tiene la ventaja de emitir una respuesta en menor tiempo con respecto a las técnicas bioquímicas (Piña *et al.*, 2007).

1.2.2 GLUTATIÓN-S-TRANSFERASA (GST)

La glutatión es una familia de enzimas con isoformas citosólicas, las cuales están constituidas por dos subunidades proteínicas idénticas, mientras que las isoformas microsomales son trímeros. Sin embargo, en ambos casos la función primaria de la enzima es catalizar la conjugación de glutatión reducido con una gran cantidad de compuestos orgánicos (Sharma *et al.*, 2004). Se ha reportado que la actividad de la enzima es inducible en algunas especies por la exposición a elementos y contaminantes tales como metales y PCBs. Esta enzima ha sido utilizada como biomarcador de exposición ante diversos compuestos xenobióticos (Kamohara *et al.*, 1984) como los plaguicidas (Forlin *et al.*, 1986). Para que esta enzima lleve a cabo su acción en la detoxificación, el contaminante debe tener ciertas características como ser hidrofóbico, debe reaccionar de manera no enzimática con la GST a una tasa medible y en su estructura deben contener un átomo de carbono electrofílico. Al respecto, estudios en peces muestran que los órganos tales como el hígado y las branquias son idóneos para realizar la determinación de la actividad de esta enzima. Así mismo, se ha observado que la respuesta de las enzimas frente

a sustancias tóxicas ambientales, es menos pronunciada con aquellas de la fase II que las de la fase I. Sin embargo, a pesar de la baja respuesta relativa, ésta es suficiente para representar graves riesgos para los organismos acuáticos (Van der Oost *et al.*, 1996; Schreiber *et al.*, 2006).

1.2.3 URIDINA DIFOSFATO GLUCURONIL TRANSFERASA (UDPGT)

El proceso de glucorodinación en donde participa la enzima UDPGT es la principal ruta de inactivación y excreción de compuestos endógenos y xenobióticos. Participa en el metabolismo de fase II, donde se lleva a cabo la conjugación de un cofactor endógeno con una molécula del agente tóxico el cual que posee un grupo funcional específico, esta reacción facilita la excreción del agente tóxico por la adición de grupos más polares (Van der Oost *et al.*, 2003). Su forma activa tiene 10 cisteínas; 3 de ellas están localizadas en el citoplasma, utiliza como cofactor endógeno al ácido glucorónico activado (UDPGA). Esta enzima presenta diferentes isoformas las cuales se encuentran localizadas en el retículo endoplásmico hepático (Senay *et al.*, 2002). La mayoría de los productos metabólicos del sistema enzimático CYP450 son sustratos de la enzima UDPGT. La transformación biológica de xenobióticos mediante este sistema produce sustancias reactivas del oxígeno. Bajo condiciones de estrés oxidativo, la actividad catalítica de CYP450 se inhibe y bioactiva a la enzima UDPGT, alterando la biotransformación, lo que puede conducir a cambios en la toxicocinética y toxicodinámica de dichos compuestos. En peces como en la mayoría de los animales, el hígado es el principal órgano donde se llevan a cabo las reacciones de glucorinidación de xenobióticos, sin embargo, también se han reportado reacciones de conjugación con UDPGT en tejidos extra hepáticos, como el riñón, las branquias y el intestino. La actividad de esta enzima está influenciada por diferencias en el género, época del año, pH y temperatura (George, 1994).

1.2.4 CATALASA (CAT)

La enzima se encuentra en las mitocondrias y en los peroxisomas, forma parte del sistema de defensa antioxidante de las células. Su principal función es catalizar la reducción de peróxido de hidrógeno generando como productos finales agua y

oxígeno molecular. Está implicada en el metabolismo de los ácidos grasos y se encarga de la eliminación de especies reactivas de oxígeno (EROS) que se producen por la presencia de contaminantes. Los xenobióticos ejercen sus efectos a través del ciclo redox generando EROS, sustancias tóxicas muy reactivas que actúan sobre las biomoléculas a través de reacciones de oxidación en cascada. Un desequilibrio entre la producción de EROS y las defensas antioxidantes a favor de las primeras, puede conducir al estrés oxidativo que se manifiesta como daño oxidativo y que altera la estructura y función de lípidos, proteínas entre otras (Manduzio *et al.*, 2003; Gorinstein *et al.*, 2003; Kerambrun *et al.*, 2011).

1.2.5 VITELOGENINA (VTG)

La vitelogenina está clasificada como una fosfo-glico-lipoproteína de alto peso molecular (dependiendo de la especie) que transporta importantes cantidades de material lipídico, carbohidratos y grupos fosfato. Es sintetizada en hepatocitos bajo un control multi-hormonal, la transcripción de su RNAm es activada por estrógenos, principalmente el 17β -estradiol (E2) (Jones *et al.*, 2000). Esta proteína es producida por las hembras en peces, como precursora de las proteínas de reserva del huevo. Es considerada como biomarcador de exposición estrogénica en machos jóvenes o anti-estrogénica en hembras ovíparas. De manera general solo se encuentra en hembras, pero los peces machos pueden presentar la expresión hepática de la VTG, cuando están expuestos a ambientes contaminados con químicos estrogénicos (pesticidas organoclorados, bifenilos policlorados, ftaltos y estrógenos naturales o sintéticos) que interactúan con el receptor del estrógeno y alteran el metabolismo estrogénico limitando la acción del esteroide natural 17β -estradiol (E2) (Gilbert, 2012; Jobling *et al.*, 2004; Schwaiger y Negele, 1998; Rose *et al.*, 2002). La enzima VTG se asocia con eventos fisiológicos como el comportamiento y diferenciación sexual en donde se ha reportado hermafroditismo en peces (Ramirez *et al.*, 2015).

1.2.6 PROTEÍNA SUPRESORA DE TUMORES (P53)

La enzima P53 es una fosfoproteína denominada así debido a su peso molecular (53 kDa), el gen se localiza en el cromosoma 17p13, 1, es un factor transcripcional,

que se activa cuando existen estímulos de estrés oxidativo, activación de oncogenes, alteraciones metabólicas, escasez de nutrientes y falta de ribonucleótidos (Li *et al.*, 2007). Se encarga de la regulación de la proliferación celular, prevención de la replicación de ADN dañado y activación del proceso de apoptosis para eliminar células defectuosas que están presentes en la patogenia de diversas enfermedades autoinmunes y neurodegenerativas (Joerger *et al.*, 2008; Sionov *et al.*, 1999). El gen *P53* ha sido llamado el guardián del genoma debido a que detecta una alteración y bloquea el ciclo celular a nivel de la fase G1, dando tiempo a que el ADN se repare antes de que se continúe la replicación. Las alteraciones de este gen con pérdida de su función están relacionadas con el desarrollo de neoplasias malignas.

Recientemente el uso de la expresión de genes se ha considerado en diferentes estudios ecotoxicológicos, principalmente para identificar cambios moleculares en los genes inducidos y reprimidos en organismos acuáticos expuestos a contaminantes ambientales en donde a través del desarrollo de modelos con animales se lleva a cabo una selección adecuada donde se consideran tres enfoques el primero es identificar los tóxicos potenciales, el segundo realizar ensayos para caracterizar mejor los cambios observados y el tercero comprende estudios especiales sobre los mecanismos de acción del compuesto (Denslow *et al.*, 1999; Roling *et al.*, 2004). Con base a lo anterior uno de órganos más estudiados es el hígado del cual se recomienda extraer el ARN para analizar la expresión de los genes, ya que en este órgano es donde se sintetizan la mayoría de las proteínas de los diferentes genes (Hyllner *et al.*, 1991) que posteriormente son secretadas y transportadas por la sangre a las gónadas (Mommsen and Walsh, 1988; Oppen-Berntsen *et al.* 1992b).

1.3 BIOINDICADOR

Se ha empleado este término para definir a cualquier organismo que pueda reaccionar ante los impactos ambientales de los contaminantes, pero que además pueda proveer información integrada acerca de la cantidad, disponibilidad y el

efecto, por lo que son ampliamente utilizados en el área toxicológica para realizar monitoreo ambiental. Para llevar a cabo la selección de un bioindicador se debe considerar ciertas características como: ser sensible a la perturbación o estrés durante su ciclo de vida, debe tener una tolerancia moderada a la variabilidad ambiental, ser abundante y común presentando una densidad de población adecuada en el área específica, su distribución, hábitos alimenticios e importancia ecológica debe ser ampliamente conocida y su taxonomía tiene que estar bien documentada. También se considera la importancia económica, pública y comercial (Ankley y Johnson, 2004; Markert, 2007)

1.3.1 *Cyprinus carpio*

Esta especie pertenece a la familia de Cyprinidae, son habitantes habituales del fondo, consumen sedimento o pueden buscar su alimento en las capas media y superior del cuerpo de agua; insectos acuáticos, larvas de insectos, gusanos, moluscos o zooplacton (Fig. 1). Un crecimiento adecuado de esta especie se observa con un intervalo de temperaturas del agua entre 23°C y 30°C. La especie puede sobrevivir en bajas concentraciones de oxígeno (0.3-0.5 mg/L) o en el caso contrario a saturación.

Para alcanzar la madurez, las hembras requieren alrededor de 11 000 a 12 000 grados-días en zonas climáticas templadas y tropicales, mientras que los machos maduran en un periodo que es 25 a 35 % más corto. La cantidad de huevos liberados por las hembras es de 100 a 230 g/kg de peso corporal. El desarrollo embrionario de esta especie dura tres días a una temperatura de 20 a 23 °C (60 - 70 grados-días). Los organismos eclosionados se adhieren al sustrato y posterior a los tres días de la eclosión se desarrolla la vejiga natatoria que les permite nadar y consumir alimento (rotíferos).



Figura 1. Imagen de *Cyprinus carpio*.

1.4 SITIO DE ESTUDIO

La Presa de Atlangatepec se encuentra ubicada en la parte central norte-sur del estado de Tlaxcala, entre las coordenadas $19^{\circ} 33' 39''$ N y $98^{\circ} 10' 49''$ O, con una extensión de 1200 ha, dentro de la región hidrológica 18 del río Balsas y en el interior de la cuenca del río Atoyac, la cual cubre el 74.46 % de la superficie total del estado, drenando las aguas del centro y del sur de la entidad (Fig. 2). Es considerada la más importante del distrito de riego dadas sus dimensiones, cuenta con una capacidad de 54 000 000 m³ de agua (CONAGUA, 2007).

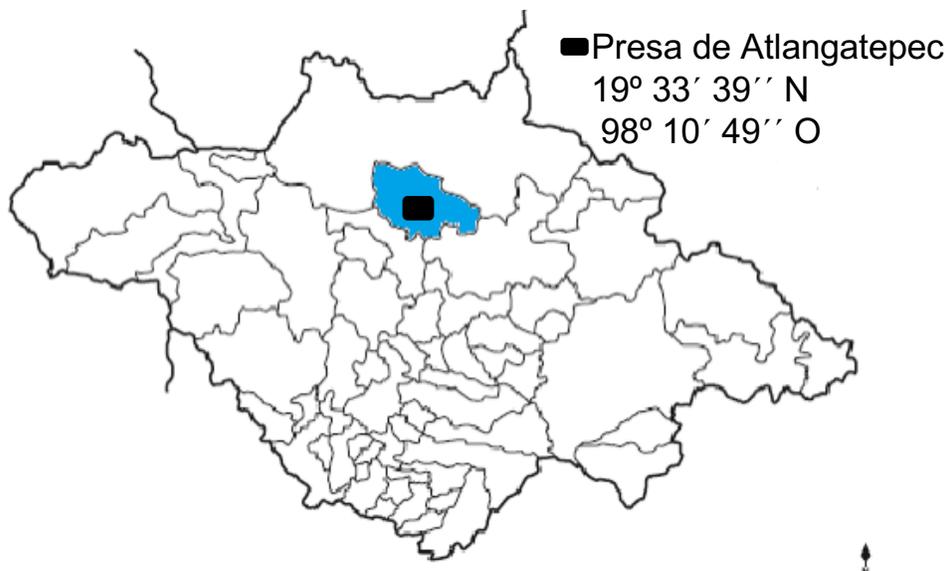


Figura 2. Localización del área de estudio.

Fisiográficamente se encuentra en la provincia del Eje Neovolcánico, distinguiéndose en el paisaje la presencia de volcanes y llanos extensos (Escalante *et al.* 2005). Con clima templado-subhúmedo, semifrío con lluvias en verano y semiseco templado y frío dentro de los principales tipos de vegetación se encuentra el bosque de pino, bosque de encino, matorral xerófito, pastizal entre otros (INEGI, 2006).

Está considerada desde el año 2009 como un humedal de importancia internacional inscrita como sitio RAMSAR (convención celebrada en 1971 en Ramsar, Irán), a pesar de ello la región ha sido impactada negativamente por actividades agrícolas y pecuarias, además la deforestación de los alrededores ha provocado altos niveles de azolvamiento con la consecuente pérdida de almacenamiento de agua.

Dentro de las actividades que se realizan se encuentra la producción pesquera, donde se distinguen varias especies de la familia Cyprinidae: 1) *Cyprinus carpio*, entre las que se encuentran tres subespecies (carpa común, *Cyprinus carpio communis*; carpa espejo o de Israel, *Cyprinus carpio specularis* y carpa barrigona, *Cyprinus carpio rubrofusus*. 2) *Hypophthalmichthys molitrix*, conocida como carpa plateada. 3) *Carassius auratus* cuyo nombre común es carpa criolla o dorada. 4) *Ctenopharyngodon idella*, también conocida como carpa herbívora). Además se encuentran especies introducidas del género *Chirostoma* (charal, *Chirostoma sp*), *Cambarellus* (acocil, *Cambarellus montezumae*) y *Ambystoma* (ajolote, *Ambystoma velasci*).

2. ANTECEDENTES

En los últimos cuarenta años se ha incrementado las evidencias de la asociación entre la liberación al ambiente de sustancias químicas antrópicas con diversos efectos adversos para la salud humana y los ecosistemas, por esta razón se han realizado numerosas investigaciones donde se describen los daños por la exposición a sustancias tóxicas utilizando parámetros bioquímicos, inmunológicos y fisiológicos, entre otros.

Hernandez-Moreno *et al.* (2008) realizaron un estudio en la Tenca (*Tinca tinca L*) donde evaluaron las actividades de las enzimas Ethoxyresorufin-O-deethylase (EROD), Benzyloxy-4-trifluoromethylcoumarin-O-debenzyloxylase (BFCOD) y UDPGT, en fracciones microsomales, para validarlos como biomarcadores efectivos de contaminación mediante una exposición a largo plazo del insecticida deltametrina (DM) a dos concentraciones diferentes 0.0039 y 0.039 µg/l. Los resultados mostraron que la actividad hepática de la enzima EROD presentó una inhibición en los peces expuestos con la concentración más alta de DM con respecto al control, valores que fueron significativamente menores después de la exposición por 50 días. La actividad de la enzima BFCOD incrementó después de 10 días de exposición pero a los 70 días se observó una disminución de la actividad. En ambas enzimas, la concentración baja de DM no mostró una asociación con los parámetros bioquímicos. Con respecto a la enzima UDPGT, la exposición a la DM inhibió la actividad enzimática en ambas concentraciones, con la concentración de 0.039 µg/l de DM se observaron disminuciones significativas en los tratamientos de 10, 50 y 70 días de exposición. Las actividades de las enzimas EROD y UDPGT presentaron resultados más contundentes como biomarcadores de efecto para evaluar diferentes tipos de contaminación ambiental.

Por su parte Ferreira *et al.* (2009), realizaron un estudio en la costa Atlántica Europea, en peces inter mareales de la especie *Lipophrys polus* como especie sensible a la contaminación por químicos estrogénicos, determinando el efecto a través del análisis de la expresión génica de VTG. Tomaron en cuenta peces machos provenientes de dos poblaciones que difieren en el grado de contaminación

antropogénica y de manera adicional realizaron la exposición en el laboratorio en concentraciones de 5 y 15 ng/L del compuesto Etinilestradiol (EE2). El resultado de la RT-PCR semi-cuantitativa mostró una inducción significativa con un aumento en promedio de hasta 4.18 mayor en la intensidad de la banda en los especímenes colectados en el área urbana, en comparación con el sitio de referencia, lo que sugiere la exposición a químicos estrogénicos. En relación a la exposición de los organismos durante 21 días se observó un aumento dependiente de la dosis en la intensidad de la banda normalizada, en la dosis más alta indujo un aumento de la intensidad de hasta 13 veces más.

Kerambrum *et al.* (2016) evaluaron las variaciones en los niveles de expresión relativa de nueve genes involucrados en actividades metabólicas de la célula (citocromo c-oxidasa, *COX*; ATP-sintasa, *ATP*; metalotioneina, *MT*; glutatión-s-transferasa, *GST*; catalasa, *CAT*; superóxido dismutasa, *SOD*; glutatión peroxidasa, *GPX*; amilasa, *AMY*; y celulasa, *GHF*) en la glándula digestiva, durante primavera y otoño. De manera adicional midieron la bioacumulación de metales en el tejido y los parámetros morfométricos para interpretar las respuestas moleculares. Los resultados mostraron que durante la primavera la expresión de *MT*, *SOD*, *GPX*, *CAT*, *ATP*, *AMY* y *GHF*, fue significativamente mayor en mejillones con la bioacumulación de metal más bajo. En otoño, los niveles más altos de expresión se observaron en *GPX*, *CAT*, *ATP* y *AMY*. En el estudio también señalan que existen diferentes fuentes de variabilidad en la expresión génica asociadas con el tamaño individual, temporada del año, recursos tróficos y origen de los mejillones, los cuales son fluctuaciones inevitables en el ambiente natural.

Particularmente, dentro de los estudios que se han realizado en el estado de Tlaxcala relacionados a la contaminación de ecosistemas acuáticos, se encuentra el de Garcia-Nieto *et al* (2011), quienes realizaron una evaluación ambiental en el sistema hidrológico Zahuapan-Atoyac, en donde cuantificaron las concentraciones de arsénico y plomo. Los resultados mostraron concentraciones de As en un intervalo de 0.06 a 0.87 mg/L en agua y de 1.3 a 127 mg/Kg en las muestras de

sedimento. El valor más alto de plomo en agua (1.05 mg/L) se reportó en el sitio denominado “El Ojito”, mientras que en la matriz de sedimento la mayor concentración de este metal (89.5 mg/Kg) se encontró en el sitio llamado Apizaco. En el punto de muestreo de la Presa de Atlangatepec la concentración de As fue de 0.26 mg/L y de Pb fue de 0.90 mg/L en agua; la concentración de As fue de 127 mg/Kg, y la de Pb de 39.9 mg/Kg en sedimento. Los resultados mostraron que las concentraciones de estos elementos superaban los límites de las normas internacionales establecidas para la protección de vida acuática en la Presa de Atlangatepec.

Por su parte Muñoz-Nava *et al.* (2012) realizaron un estudio en la subcuenca del río Zahuapan teniendo como punto de muestreo la presa de Atlangatepec donde correlacionaron la materia orgánica como demanda bioquímica de oxígeno con la población humana que habita en la subcuenca. Los resultados mostraron valores de la DBO altos en aquellos sitios donde existe la presencia de asentamientos humanos que se establecen a una distancia de 20 km del río, lo que trae como consecuencia el aumento en las concentraciones de nitrógeno amoniacal, sulfatos y coliformes, los cuales sobrepasan los límites establecidos en los criterios ecológicos de calidad del agua.

Posteriormente Juárez Santacruz *et al.* (2013), evaluaron el potencial genotóxico de los sedimentos superficiales de los ríos Zahuapan y Atoyac, en donde evidenciaron la presencia de compuestos orgánicos persistentes detectando valores de Σ PCBs (18 % de las muestras) que superan los 500 μ g/kg para uso agrícola (NOM-133-ECOL-2000), y para HCB, Σ DDTs, Σ HCHs, y Σ PCBs (56 % de las muestras), en el punto de muestreo ubicado en Tlaxco que es donde nace el río Zahuapan, se encontraron concentraciones de 18, 4, 50 y 284 μ g/kg de DDT, DDE, HCH y PCB respectivamente, en el punto ubicado en la presa de Atlangatepec reportaron concentraciones de DDE (3 μ g/kg), HCH (31 μ g/kg) y PCB (80 μ g/kg), estos valores superaron las concentraciones de los límites máximos permisibles para la protección de la vida acuática (norma canadiense ISQG).

Salomón- Serna *et al.* (2003) realizaron un estudio en la presa de Atlangatepec en donde analizaron la contaminación por bacterias coliformes en cinco localidades y dos afluentes durante el verano, otoño e invierno y su relación con la temperatura, oxígeno disuelto y pH, los resultados manifestaron una relación inversa en estos parámetros a excepción del pH en donde se mantuvo constante, reportan que la presa presenta un alto índice de contaminación por coliformes a lo largo del año, acentuando que la contaminación se da principalmente de manera alóctona, donde destacan que la principal fuente de contaminación por coliformes proviene de sus alrededores y de las descargas de aguas negras provenientes de Tlaxco. Finalmente, de acuerdo con los diferentes estándares de calidad de agua potable, recreación y riego agrícola, se rebasan los límites de tolerancia permitidos, lo que evidencia un problema potencial de riesgo para la salud humana.

3. JUSTIFICACIÓN

3. JUSTIFICACIÓN

Los ecosistemas acuáticos del estado de Tlaxcala se han visto afectados por la contaminación generada por las diversas actividades humanas realizadas a su alrededor, teniendo como consecuencia la alteración de la calidad ambiental con la acumulación de compuestos peligrosos en los organismos abióticos y bióticos de estos ecosistemas, con consecuencias potenciales adversas sobre las poblaciones de vida silvestre que habitan estos cuerpos de agua. Los estudios ambientales de estos ecosistemas enfocados a la identificación y/o cuantificación de algunos compuestos orgánicos o inorgánicos, es solo la primera etapa en una evaluación de riesgo ecológico, en donde para minimizar las incertidumbres como la biodisponibilidad de los compuestos presentes y el daño real ocasionado por la mezcla de sustancias, se requiere la aplicación de biomarcadores de exposición y de efecto, que en conjunto con el análisis ambiental permitirá llevar a cabo una caracterización del riesgo.

Bajo este contexto, el estudio con peces que habitan en la Presa de Atlangatepec ya sea de manera natural o introducida constituyen una excelente alternativa como bioindicadores para evaluar el impacto ambiental en este ecosistema, aunado al empleo de biomarcadores moleculares como herramienta para evaluar alteraciones sobre la expresión génica, incluso antes de que se presenten daños a nivel de órganos o sistemas biológicos. Esto contribuirá por una parte a la generación de información sobre la expresión de genes en una especie ampliamente utilizada como bioindicador ambiental pero poco conocida sobre la expresión basal de genes involucrados en el metabolismo de xenobióticos, y por otra parte avalar y fortalecer la importancia de su aplicación en estudios de evaluación de riesgo.

4. HIPÓTESIS

4. HIPÓTESIS

En la Presa de Atlangatepec se encuentran sustancias capaces de alterar la expresión génica en *Cyprinus carpio*, la magnitud de la expresión dependerá del tipo y concentración de los xenobióticos presentes en la Presa y será diferente a la expresada en un grupo de peces bajo condiciones de laboratorio.

5. OBJETIVOS

5.1 OBJETIVO GENERAL

Evaluar la expresión de algunos genes en hígado de *Cyprinus carpio* como bioindicador de contaminación para analizar el riesgo genotóxico potencial en la Presa de Atlangatepec.

5.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Medir los parámetros morfométricos para obtener el factor de condición de Fulton y conocer de manera general el estado de salud de *Cyprinus carpio* recolectados en la Presa de Atlangatepec.

Evaluar la expresión de los genes *CYP1A1*, *GST*, *CAT*, *UDPGT*, *VTG* y *P53* mediante la técnica de Reacción en Cadena de la Polimerasa Transcriptasa Reversa (RT-PCR) en hígado de *Cyprinus carpio*.

6. METODOLOGÍA

6.1 TRABAJO DE CAMPO

6.1.1 MUESTREO

El muestreo se realizó en la Presa de Atlangatepec en el estado de Tlaxcala el día 16 de diciembre del 2016 (Fig.3).

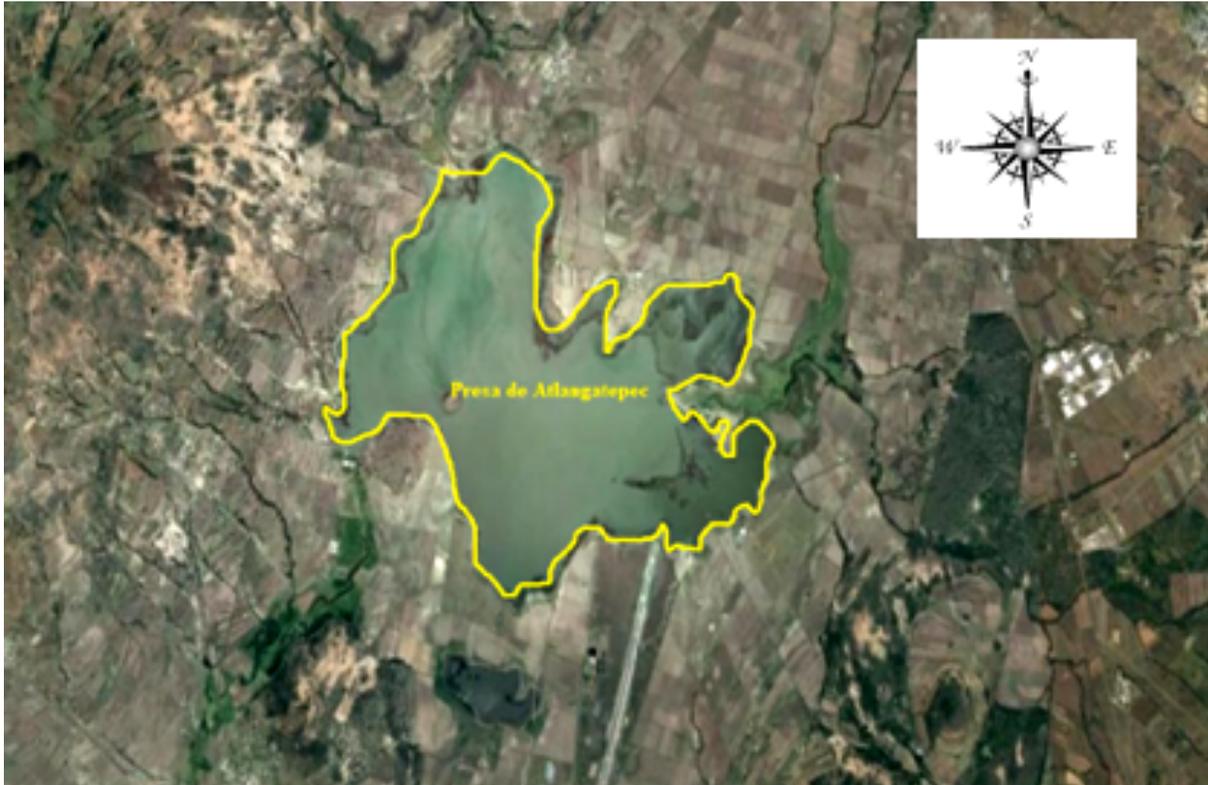


Figura 3. Área de estudio

La recolecta de los ejemplares se realizó con ayuda del pescador de la zona, el cual utilizó redes de pesca (con luz de malla de 2 a 5 cm). Se recolectaron 28 ejemplares de *Cyprinus carpio* los cuales fueron sexados *in situ* mediante la observación de sus gónadas, donde se identificaron 18 organismos como hembras y 10 machos (Fig.4).

Enseguida se les tomaron medidas de longitud y peso a todos los peces, las cuales sirvieron para obtener el factor de condición de Fulton (K) y el coeficiente de crecimiento (Fig.5)



Figura 4. Recolecta de peces en campo



Figura 5. Medición y pesaje de peces.

Posterior a la obtención de los parámetros morfométricos, los peces fueron disectados in situ para extraer el hígado, el cual se introdujo en tubos criogénicos y se depositaron en el tanque de nitrógeno líquido ($195.8\text{ }^{\circ}\text{C}$) para su conservación y transporte al laboratorio de toxicología y química ambiental del CIGyA para ser posteriormente analizados (Fig.6). Cabe mencionar que la obtención de las muestras de hígado se realizó inmediatamente después de la captura para evitar la degradación del ARN.

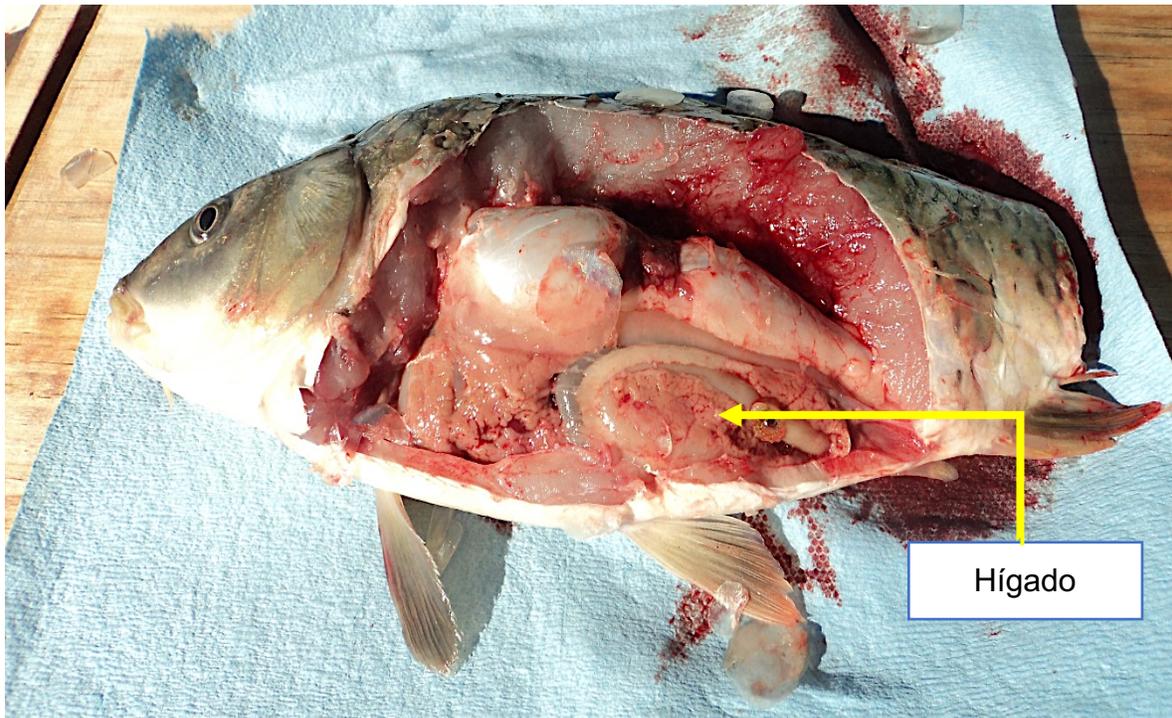


Figura 6. Extracción de muestras de hígado.

Se recolectaron cuatro peces (machos) en un estanque ubicado en el municipio de San Felipe Ixtacuixtla en donde su única fuente de abastecimiento era agua de lluvia, estos peces fueron considerados como peces de sitio de referencia para poder realizar una comparación contra los peces de Atlangatepec.

6.2 TRABAJO DE LABORATORIO

Para realizar las comparaciones de la expresión de los genes en peces de la presa de Atlangatepec se estableció un grupo control (3 hembras y 5 machos) el cual estuvo bajo condiciones de laboratorio. Se utilizaron peces de la especie *Cyprinus carpio* con un peso de 63 g y una longitud de 16.3 cm en promedio respectivamente, provenientes de un criadero del municipio de Tlaxco, los cuales fueron trasladados al Laboratorio de Toxicología y Química ambiental (Fig. 7). Para su aclimatación y desarrollo se mantuvieron en peceras de acrílico de 20 x 10 cm con capacidad de 20 litros, con aireación constante, suministro de alimento de la marca api-aba y con un recambio de agua de 2 veces por semana durante 30 días. Se midieron las

características fisicoquímicas del agua durante el experimento en donde el valor promedio para oxígeno disuelto fue de 3.3 ± 0.6 ppm, pH de 8.6 ± 0.3 y una temperatura de 20.3 ± 0.7 °C.



Figura 7. Grupo control

6.2.1 DETERMINACIÓN DEL FACTOR DE CONDICIÓN DE FULTON (K)

Con los datos morfométricos se determinó la masa relativa a la longitud de cada organismo, la cual se conoce como "condición" de un pez, este parámetro está definido por el factor de condición de Fulton (Cifuentes *et al.*, 2012). El peso o masa relativa de un pez depende de las condiciones climatológicas del sistema acuático donde se desarrolla, la interacción entre los factores bióticos y abióticos durante la temporada de lluvias o secas, la cantidad de alimento disponible y la frecuencia del desove.

Este factor es útil para comparar cambios estacionales de los individuos de una población (Blackwell *et al*, 2000), se basa en la relación hipotética longitud-peso de acuerdo a la ley del cubo (crecimiento isométrico) y se estimó mediante la siguiente fórmula:

$$K = 100 (W|L^3)$$

Donde:

K = factor de condición de Fulton

W = peso corporal húmedo del pez en gramos.

L= longitud del pez en centímetros.

De manera conjunta se analizaron las relaciones de longitud-peso por sitio y sexo, realizando una regresión lineal y calculando los valores de la pendiente y la ordenada al origen (a y b) de la ecuación de Froese (2006), lo cual nos permitirá determinar el tipo de crecimiento que presenta *Cyprinus carpio* en cada sitio de estudio.

$$W = aL^b$$

Donde:

W= peso total del pez en gramos

L= longitud del pez en centímetros

6.2.2 EXTRACCIÓN DE ARN DEL HÍGADO

La extracción de ARN total se realizó a partir de un fragmento de tejido de cada hígado muestreado, los cuales estuvieron congelados en nitrógeno líquido (Fig.8). La técnica utilizada se basa en el protocolo de Trizol de INVITROGEN (Chomczynsky y Sacchi, 1987) en donde se pulveriza 0.1 g el tejido y se homogeniza con trizol para extraer los ácidos nucleicos, posteriormente se realizaron lavados con cloroformo e isopropanol, lo que permite obtener ARN de alta calidad para ser utilizado en la técnica de RT-PCR (Anexo 2). Posteriormente se realizó una limpieza con DNAsa según el protocolo PROMEGA RQ1 RNase-free DNase, para eliminar cualquier residuo de ADN en la muestra (Anexo 3). Para

determinar la integridad del ARN obtenido se realizó una electroforesis en gel de agarosa al 1% en TAE 1X, teñido con 1 μ L de bromuro de Etidio, el cual es reactivo y visible bajo luz UV ya que posee la propiedad de intercalarse en la cadena de ADN. En todos los casos se utilizó un amortiguador de carga y un marcador de peso molecular de 1 Kb Plus DNA ladder con 1000 pb marca Sigma-Aldrich.



Figura 8. Extracción de ARN por el método de Trizol

Finalmente se realizó la cuantificación de la concentración de ARN total mediante la técnica de espectrofotometría donde se utilizó 1 μ l de muestra diluida en 399 μ l de agua destilada en una cubeta de 400 μ l. Se realizó la lectura a tres longitudes de onda a 230, 260 y 280 nm las cuales permiten estimar la pureza del ácido nucleico y se obtuvo la concentración en μ g/ μ l con la fórmula:

A 260 x 40x (FD)

En donde A 260 es la absorbancia de la muestra a una longitud de onda de 260 nm, 40 es el coeficiente aproximado de extinción para ARN a esta longitud de onda usando una cubeta, FD es el factor de dilución (FD = μl muestra en la cubeta/ μl de preparación total en la cubeta).

6.2.3 SÍNTESIS DE ADNc

La síntesis del ADN complementario (ADNc) se realizó de acuerdo al protocolo de PROMEGA en donde mediante la técnica de RT-PCR con la enzima Transcriptasa Reversa, se sintetizó la cadena complementaria de la secuencia de ARN a partir de 3 μg de ARN total (Anexo 4). Una vez terminada la reacción se evaluó la funcionalidad del ADNc mediante la expresión del gen de β -ACTINA con la técnica de RT-PCR, la cual se realizó en el termociclador Applied Biosystem (AB) modelo 4375786 (Anexo 5).

6.2.4 DISEÑO DE CEBADORES PARA LOS GENES: *CYP1A1*, *GST*, *CAT*, *UDPGT*, *VTG*, y *P53*.

El diseño de los cebadores para la amplificación de los genes estuvo basado en secuencias proteicas conocidas de estos genes obtenidos a partir de la búsqueda en el Banco de Genes del Centro Nacional de Información Biotecnológica (NCBI). Se eligieron genes que pertenecieran a especies taxonómicamente cercanas a *Cyprinus carpio*.

Las secuencias encontradas en el banco de genes fueron alineadas mediante el programa Multalin (Multiple sequence alignment) (Corpet F., 1988). El cual permitió realizar el alineamiento para encontrar las zonas conservadas del gen en las cuales se eligieron fragmentos de secuencias cortos entre 20 y 25 nucleótidos (Tabla 1).

El software Primer Premier y Gene Runner fueron utilizados para calificar las propuestas de cebadores de acuerdo a los porcentajes de citosina y guanina (C y G), la temperatura de fusión (T_m) de acuerdo al programa Primer Premier y la

probabilidad de formación de horquillas, dímeros y productos falsos, se obtuvieron del programa Gene Runner. Tomando en cuenta estas características, se seleccionaron secuencias cortas de cebadores específicos para cada gen.

Después de haber realizado la búsqueda en Genbank y de analizarlas con los softwares seleccionados se obtuvieron los pares de cebadores (Tabla 1).

Tabla 1. Cebadores diseñados para evaluar la expresión de los genes de estudio

Gen	Cebador sentido (5'-3')	Cebador antisentido (3'-5')	Pb	Tm	N. Acceso
CYP1A	CTACAGCCACGACGATGAC	ACGACAGCCCAAGACAGAG	375	61	XM_019064204
UDPGT1A	ATGGTGGTCTCGGTTCCCT	AAGGGATCAGTGAGCACAAC	289	61	XM_019077124
GSTA1	AATGATGGAGCCCTGATGT	TTGGGAAAGCGTGAAAGTA	399	61	DQ411310
CAT	GGGCAACTGGGACCTTAC	TTCTCCGCCTGCTCAAA	452	62	GQ376154
VTG1	GTGCCTCAAAGAAAGTTAGC	CATAGGTGGTGACAGTAATCG	405	58	AB331884
TP53	TGCTGGTGGATGTTGCC	TGATTATTGTGAGGATGGGTC	333	63	XM_019097618
BRCA2	CAAATACAGACCCAGTTCG	GAATGTGAGCAATGCCTGA	473	61	XM_019116991
β-Actina	GCTATGTGGCTCTTGA	GTCAGCAATGCCAGGGTA	356	61	M24113

Tm = temperatura media de alineamiento, Pb = pares de bases del cebador

6.2.5 EVALUACIÓN DE LA EXPRESIÓN DE LOS GENES POR RT-PCR

La expresión de los genes de *CAT*, *GST*, *CYP1A1*, *UDPGT*, *VTG* y *P53* se realizó mediante la técnica de RT-PCR, utilizando un termociclador AB en donde se utilizó un programa de gradientes con seis diferentes temperaturas (58, 60, 61, 62, 63 y 64° C) para determinar las condiciones ideales de alineamiento para cada uno de los genes (Anexo 5).

En el caso de genes de β -ACTINA, *CAT*, *UDPGT*, *BRCA2*, *GST* y *CYP1A1* la temperatura de alineamiento utilizada fue de 61 °C, para el gen *P53* fue de 63 °C y para *VTG* fue de 58°C. Posteriormente las muestras fueron analizadas por RT-PCR, utilizando como control de calidad, controles negativos (agua grado biología molecular) y positivos (muestra de ADNc el cual se había amplificado con anterioridad).

Para la visualización de los productos del RT-PCR, éstos se mezclaron con un buffer de carga, inyectándose después en un gel de agarosa al 3 % teñido con bromuro de etidio. En todos los casos se utilizó un marcador de peso molecular de 1 Kb Plus DNA ladder con 1000 pb. La electroforesis fue desarrollada a 90 voltios durante 50 min en una cámara de electroforesis horizontal (Thermo Ec Minicell® Primo TMEC 330). Una vez terminado el tiempo de corrida, los geles se visualizaron en un transiluminador con luz ultravioleta de la marca High performance UVP, equipado con una cámara digital (Cannon) de la cual se obtuvieron las fotos digitales para el análisis de datos.

6.2.6 DENSITOMETRÍA

El análisis densitométrico de las distintas bandas de electroforesis permite la cuantificación de las muestras a nivel relativo (Adreani *et al.*, 2001). Se utilizó el programa de computación ImagenJ (Image Processing and Analysis in Java), este programa permite realizar el procesamiento de imágenes de código abierto, diseñado para imágenes científicas multidimensionales (Fig. 9).

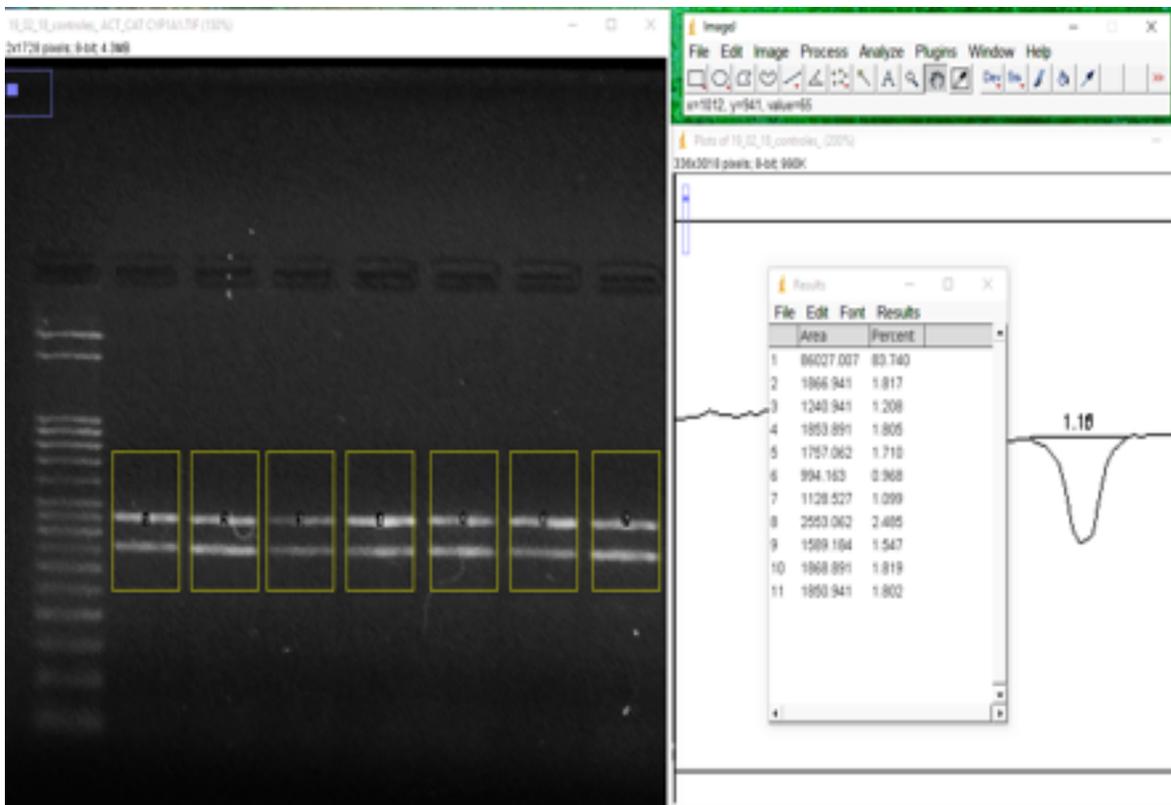


Figura 9. Análisis densitométrico utilizando el programa ImageJ.

6.2.7 ANÁLISIS ESTADÍSTICO

A los resultados de densitometría se les realizó la prueba de normalidad de Shapiro-Wilks (modificado) y la prueba F de homogeneidad de varianza para conocer la naturaleza de los datos. Debido a que los datos no cumplían con las pruebas de normalidad se aplicó una prueba Kruskal-wallis para realizar comparaciones entre machos y la prueba Mann Whitney en hembras. Se efectuaron análisis descriptivos con los datos y elaboraron gráficas de cajas donde se muestra la expresión de cada gen con respecto a los sitios de estudio y el sexo. Finalmente todos los datos fueron agrupados en categorías y se aplicó la prueba de Fisher.

7. RESULTADOS

7.1 DETERMINACIÓN DEL FACTOR DE CONDICIÓN DE FULTON

De acuerdo con los datos de cada grupo de estudio en el sitio de referencia se identificaron cuatro machos cuyas medidas de longitud estuvieron entre 100.1 y 120.4 mm con un promedio de 115.8 ± 10.6 mm. El peso osciló de 20.5 a 30.5 g obteniendo un promedio de 24.7 ± 4.1 g. Con respecto al grupo control, de los ocho individuos tres fueron hembras y cinco machos con medidas entre 135 y 195 mm, en el caso del peso fue de 45 a 85 g. Finalmente, el grupo de peces de la presa de Atlangatepec estuvo conformado por 10 machos y 18 hembras, con un intervalo en la talla de 250 a 430 mm y una variación en el peso entre 310 a 1555 g. Las medidas de distribución media y desviación estándar de los resultados de longitud, peso y factor de condición de los peces de cada sitio de estudio se muestran en la tabla 2.

Tabla 2. Parámetros morfométricos y factor de condición

	Género	n	Longitud (mm)		Peso (g)		Factor de condición	
			Media	DE	Media	DE	Media	DE
Referencia	M	4	115.8	10.6	24.7	4.1	1.61 ^a	0.27
Control	H	3	152.8	14.5	61.3	17.0	1.69 ^a	0.11
	M	5	164.8	19.2	64.2	11.6	1.48 ^a	0.40
	Total	8	160.0	17.7	63.0	13.1	1.56 ^a	0.32
Atlangatepec	H	18	343.0	31.0	804.2	271.9	1.98 ^b	0.48
	M	10	308.8	34.4	620.5	233.9	2.00 ^b	0.32
	Total	28	331.1	35.7	740.9	270.0	2.00 ^b	0.43

U de Mann-Whitney ($p < 0.05$). Letras distintas presentan diferencias significativas.

El factor de condición fue significativamente mayor para los peces de la presa de Atlangatepec al comparar con el grupo Control tanto por género como el total de peces de cada grupo. Los machos del grupo de referencia no mostraron diferencia significativas con los machos del grupo Control pero si con los de Atlangatepec.

Con respecto al coeficiente de crecimiento isométrico (b) si este valor es < 3 nos indica que el tipo de crecimiento es alométrico negativo, es decir, los individuos dentro del ecosistema incrementan preferencialmente su longitud relativa más que su peso, cuando el valor es > 3 tienen un crecimiento alométrico positivo en donde

los individuos de mayor tamaño han incrementado su peso en una mayor proporción que la longitud y cuando el valor de b está entre 2.5 a 3.0 los individuos tienen un crecimiento isométrico.

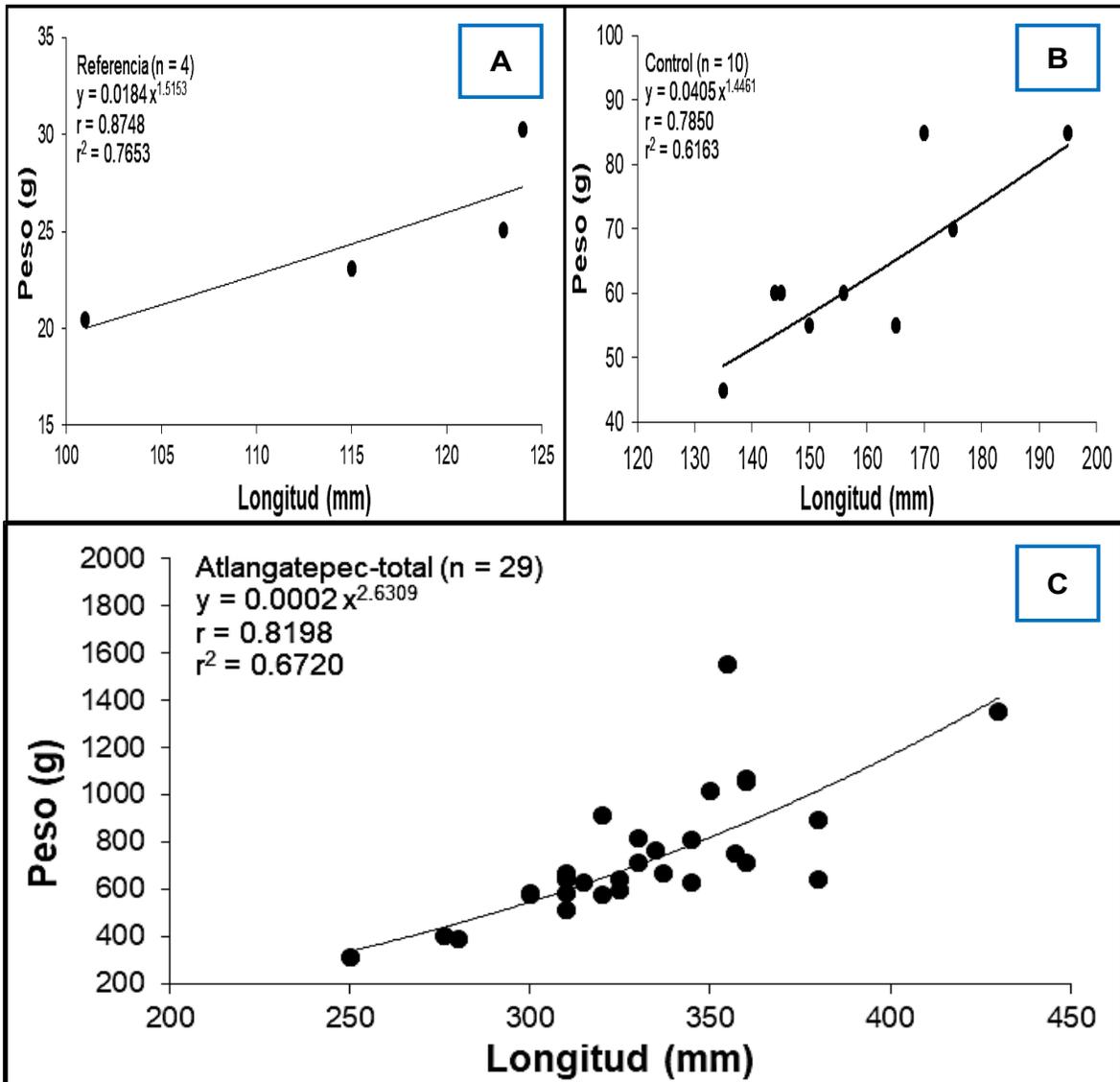


Figura 10. Relación potencial del total de muestras recolectadas. A) Sitio de referencia B) Control C) Atlangatepec (Total de muestras recolectadas).

Los peces del sitio de referencia y del control presentaron un valor de b de 1.51 y 1.44, respectivamente, ambos valores son menores a 3.0 por lo tanto su desarrollo está comprendido dentro del intervalo de crecimiento alométrico negativo, mientras

que los peces de la presa de Atlangatepec mostraron un crecimiento isométrico con un valor de b de 2.63 (Fig.10).

Al realizar el análisis del coeficiente de crecimiento con respecto al género, se observa que en los peces de la presa de Atlangatepec las hembras mostraron un crecimiento alométrico negativo, en el caso de los machos el crecimiento se dio de manera isométrica (Fig. 11).

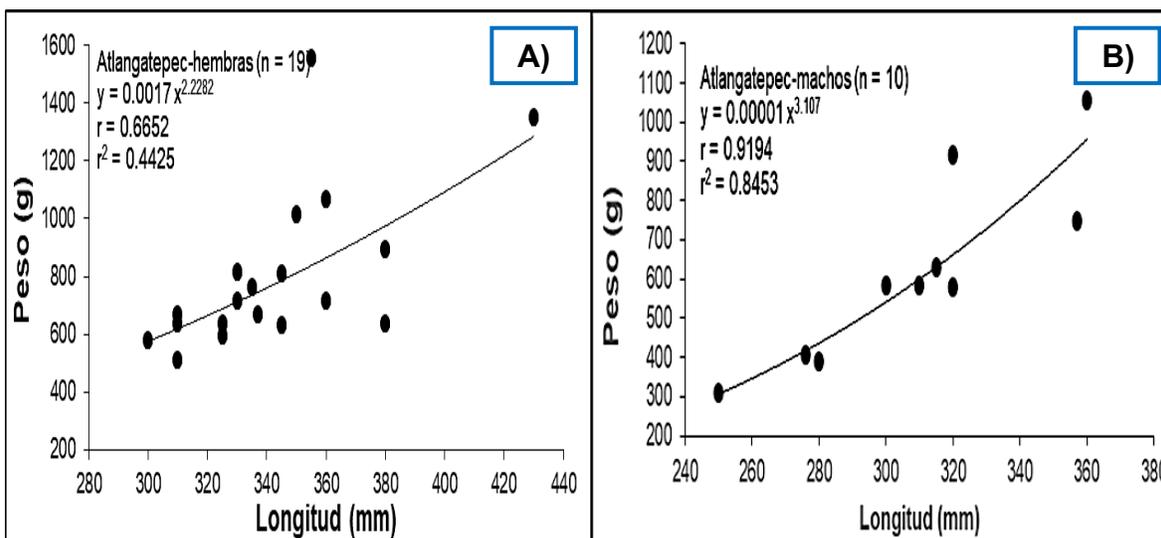


Figura 11. Relación potencial de las muestras de Atlangatepec con respecto al género. A) Hembras B) Machos.

7.2 EXTRACCIÓN DE ARN TOTAL Y SÍNTESIS DE ADNc

En la figura 9 se muestra un ejemplo de los geles de agarosa al 1% teñidos con bromuro de etidio donde se observan los dos fragmentos correspondientes a la extracción del ARN total de las muestras de hígado de *Cyprinus carpio* recolectados en la presa de Atlangatepec.

La presencia de estos fragmentos después del proceso de electroforesis nos indica que la extracción se realizó de manera adecuada ya que se visualizan las dos subunidades que conforman al ARN ribosomal (ARNr) (Fig.12). Entre las

subunidades 28S y 18S se encuentra contenidos los fragmentos de ARN mensajero (ARNm), los cuales son de importancia para este trabajo.

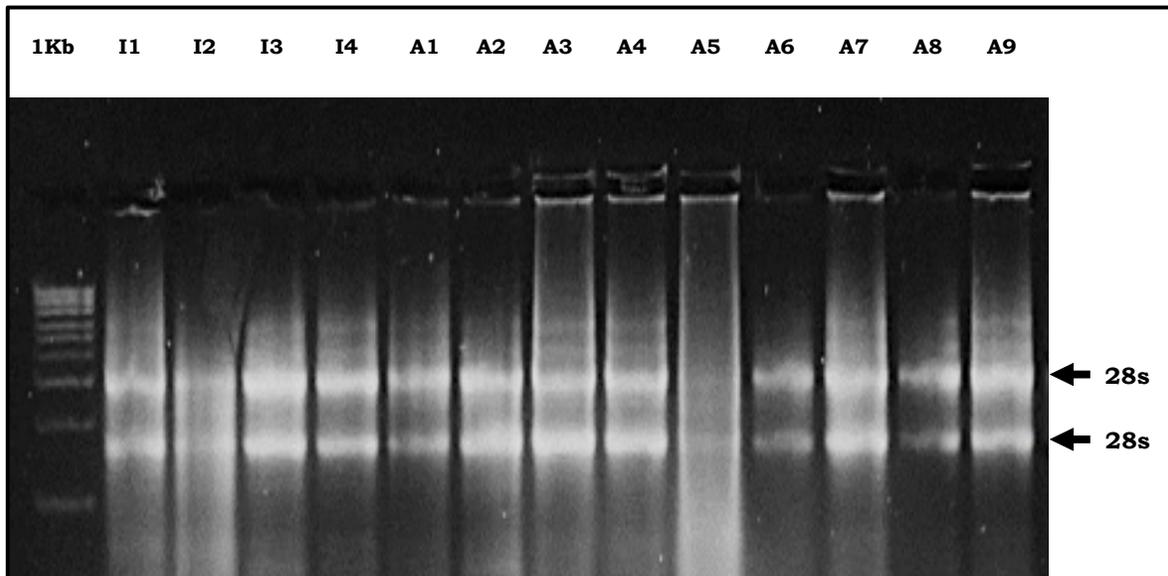


Figura 12. Fragmentos del ARN total en hígado de *Cyprinus carpio*. I = sitio de referencia, A = presa de Atlangatepec.

7.3 SÍNTESIS DE ADNc

La síntesis de ADNc fue verificada mediante un RT-PCR con la finalidad de amplificar un fragmento del gen constitutivo de β -ACTINA que consta de 356 pb (Fig. 13).

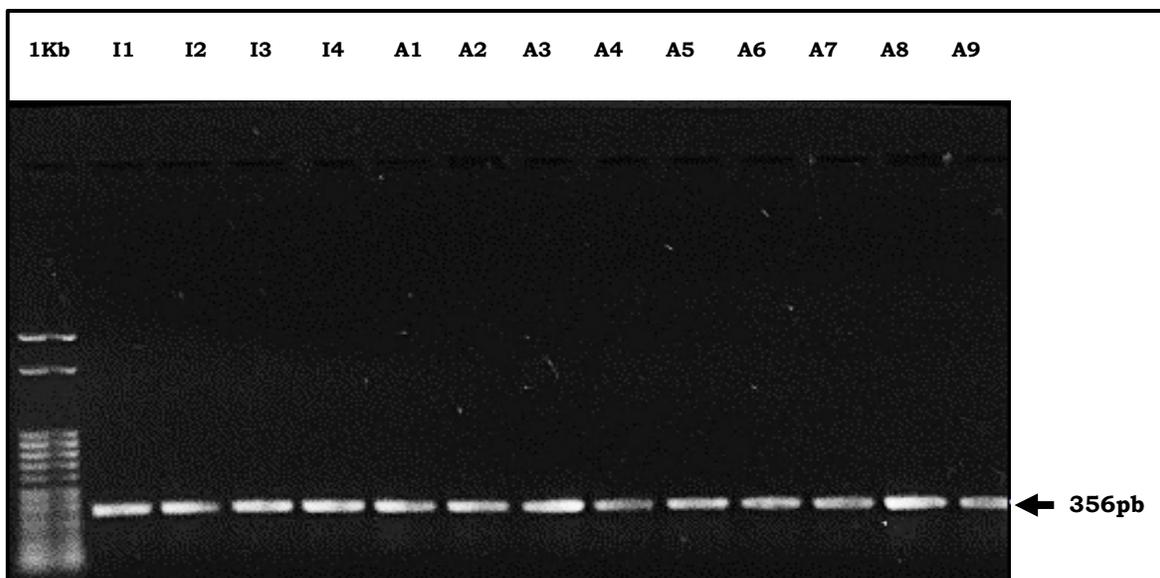


Figura 13. Fragmentos del gen constitutivo de β -ACTINA en hígado de *Cyprinus carpio*. I = sitio de referencia, A = presa de Atlangatepec.

La expresión del gen constitutivo de β -ACTINA se considera un estándar interno que nos ayuda a verificar que la secuencia sintetizada del ADNc sea funcional. Es importante sintetizar la cadena de ADNc a la cadena de ARNm para brindarle una mayor estabilidad.

7.4 EVALUACIÓN DE LA EXPRESIÓN DE LOS GENES POR RT-PCR

A continuación, se presentan los geles de agarosa teñidos con bromuro de etidio al 3% (Fig.14-17) resultantes del análisis por medio de la técnica de RT-PCR de los genes *CAT*, *UDPGT*, β -ACTINA, *GST*, *P53*, *CYP1A1* y *VTG* de las muestras de hígado.

En las figuras 14 a la 17 se pueden observar tanto presencia como ausencia de las bandas características de la expresión de los genes en los peces y diferencias en la intensidad de las bandas, que se analizaron posteriormente en los análisis estadísticos.

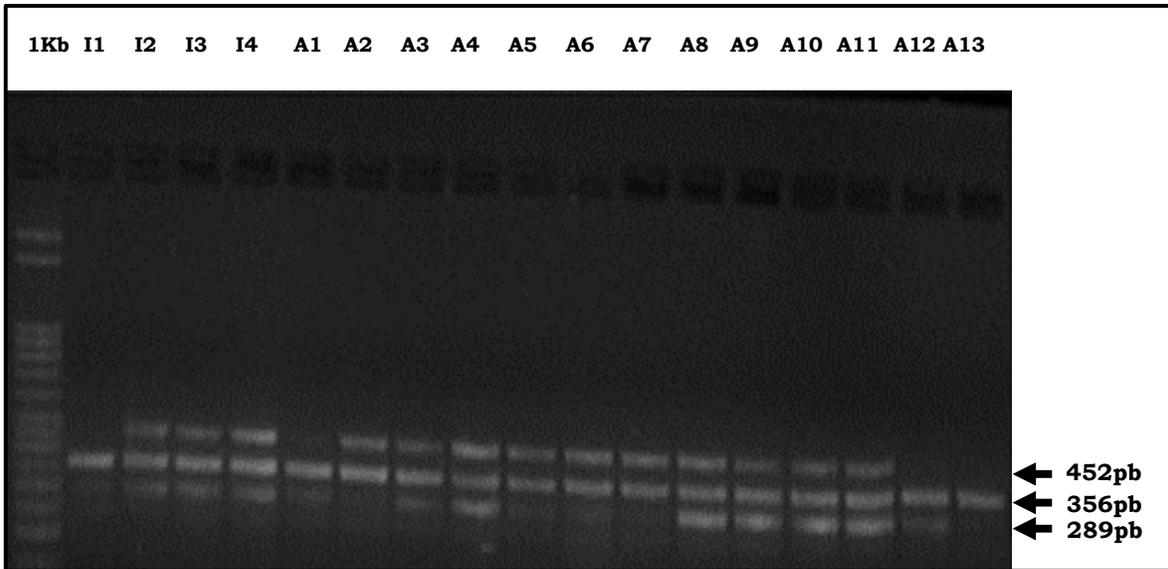


Figura 14. Fragmentos de los genes *CAT* (452 pb), *UDPGT* (289 pb) y el gen β -*ACTINA* (356 pb), en hígado de *Cyprinus carpio*. I = sitio de referencia, A = presa de Atlangatepec.

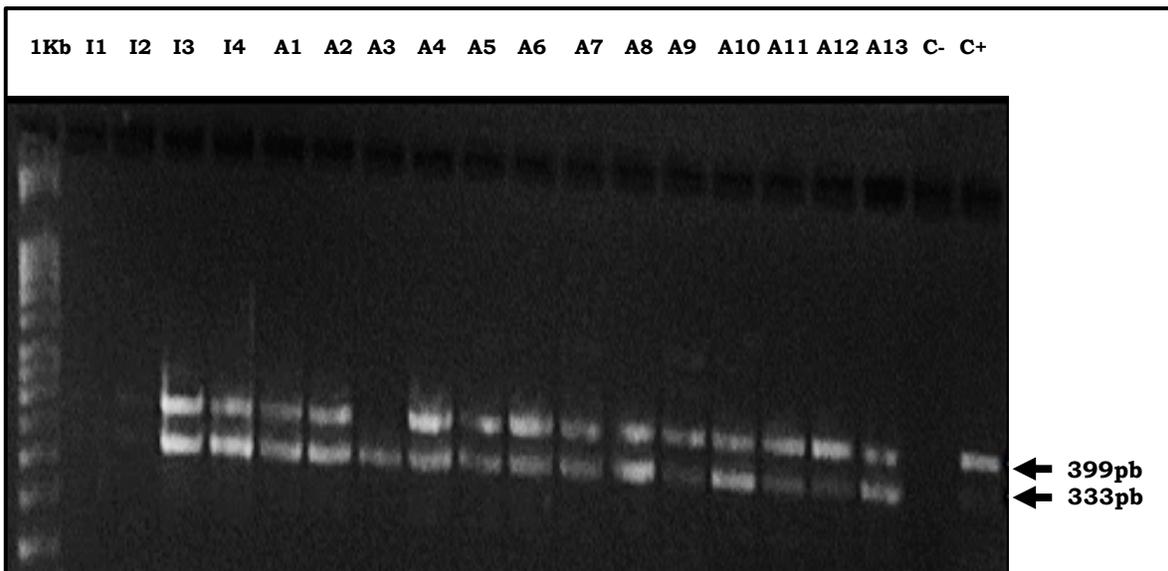


Figura 15. Fragmentos de los genes *GST* (399 pb) y *P53* (333 pb), en hígado de *Cyprinus carpio*. I = sitio de referencia, A = presa de Atlangatepec.

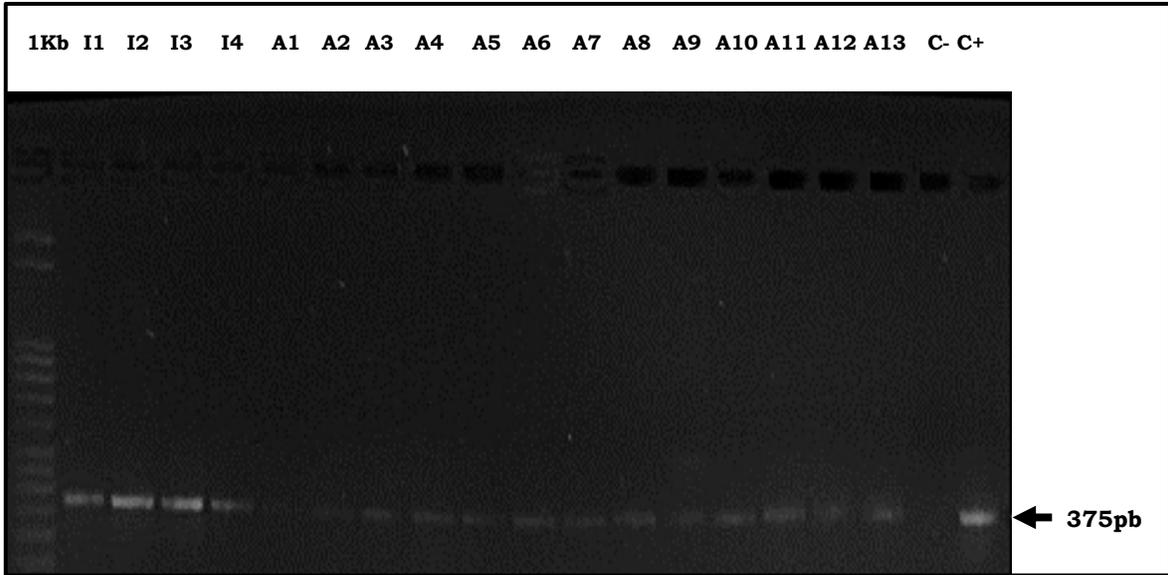


Figura 16. Fragmentos del gen *CYP1A1* (375 pb) en hígado de *Cyprinus carpio*. I = sitio de referencia, A = presa de Atlangatepec

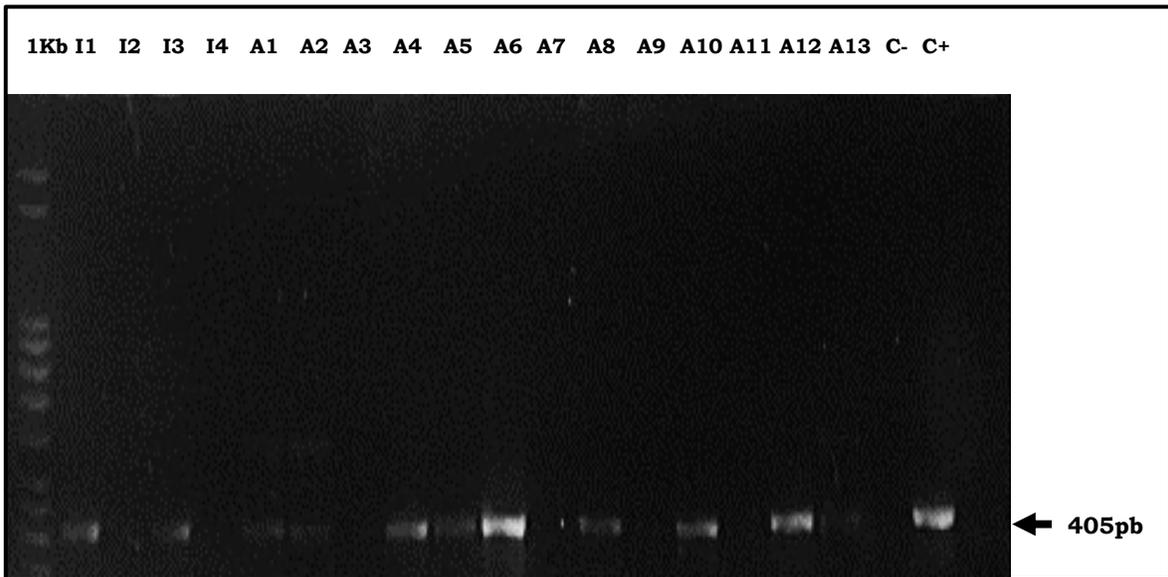


Figura 17. Fragmentos del gen *VTG* (405 pb) en hígado de *Cyprinus carpio*. I = sitio de referencia, A = presa de Atlangatepec.

En la tabla 3 se presentan los resultados de la expresión de los genes en los hígados de los peces recolectados de cada grupo de estudio. El análisis estadístico mostró una distribución no paramétrica, por lo tanto, fueron analizados a través de la mediana y de las medidas de posición no central (percentiles 25 y 75).

Tabla 3. Densitometría de los genes de estudio en *Cyprinus carpio* recolectados en cada sitio de estudio expresados en unidades arbitrarias.

	Género	n	CAT		GST	
			Mediana	P25 – P75	Mediana	P25 – P75
Referencia	M	4	116.4	85.3 - 132.6	71.5	14.3 – 155.8
	H	3	81.5	77.7 - 98.9	85.2	78.1 – 100.3
Control	M	5	102.2	92.2 - 126.2	110.9	105.1 – 116.3
	Total	8	97.2	79.6 - 118.8	108.0	81.7 – 115.6
Atlangatepec	H	18	93.5	61.8 - 123.8	85.1	22.3 – 114.8
	M	10	118.7	79.7 - 138.6	100.0	80.1 – 125.5
	Total	28	96.2	70.3 - 129.4	87.4	55.2 – 124.8
	Género	n	CYP1A1		UDPGT	
			Mediana	P25 – P75	Mediana	P25 – P75
Referencia	M	4	98.7	66.4 – 137.6	132.9	102.2 – 133.5
	H	3	98.6	96.3 – 99.6	79.7	40.3 – 115.0
Control	M	5	104.7	94.5 – 135.5	114.1	4.6 – 128.7
	Total	8	99.6	94.4 – 112.4	96.9	3.7 – 134.1
Atlangatepec	H	18	76.5	58.4 – 106.5	21.4	1.0 – 84.0
	M	10	116.3	57.4 – 154.4	118.0	30.5 – 174.5
	Total	28	85.5	54.4 – 129.2	43.3	2.2 – 125.5
	Género	n	VTG		P53	
			Mediana	P25 – P75	Mediana	P25 – P75
Referencia	M	4	81.4	4.7 – 172.3	94.2	6.7 – 184.1
	H	3	95.1	84.1 – 116.0	30.4	19.4 – 120.6
Control	M	5	101.4	96.7 – 113.1	105.5	94.3 – 116.6
	Total	8	99.0	89.6 – 118.5	99.9	29.4 – 126.2
Atlangatepec	H	18	58.1	7.5 – 133.1	80.8	49.3 – 111.0
	M	10	104.2	4.1 – 173.7	106.1	29.2 – 213.2
	Total	28	64.0	6.8 – 158.0	80.8	37.9 – 154.5

Para analizar los valores de densitometría obtenidos se realizaron diferentes gráficos de cajas para conocer las relaciones de los genes con el género y los grupos de estudio, utilizando además el método estadístico de Kruskal Wallis y las comparaciones entre pares de medianas.

En la figura 18 se muestran los resultados de la comparación de la expresión de los genes en hembras del grupo control y la presa de Atlangatepec, el análisis estadístico con la prueba de U de Mann Whitney no mostró diferencias significativas. No obstante, se observa una tendencia de disminución en la expresión en los genes *CYP1A1*, *UDPGT* y *VTG* en la presa de Atlangatepec con respecto al grupo control, mientras que para el caso del gen *P53* se aprecia una sobreexpresión.

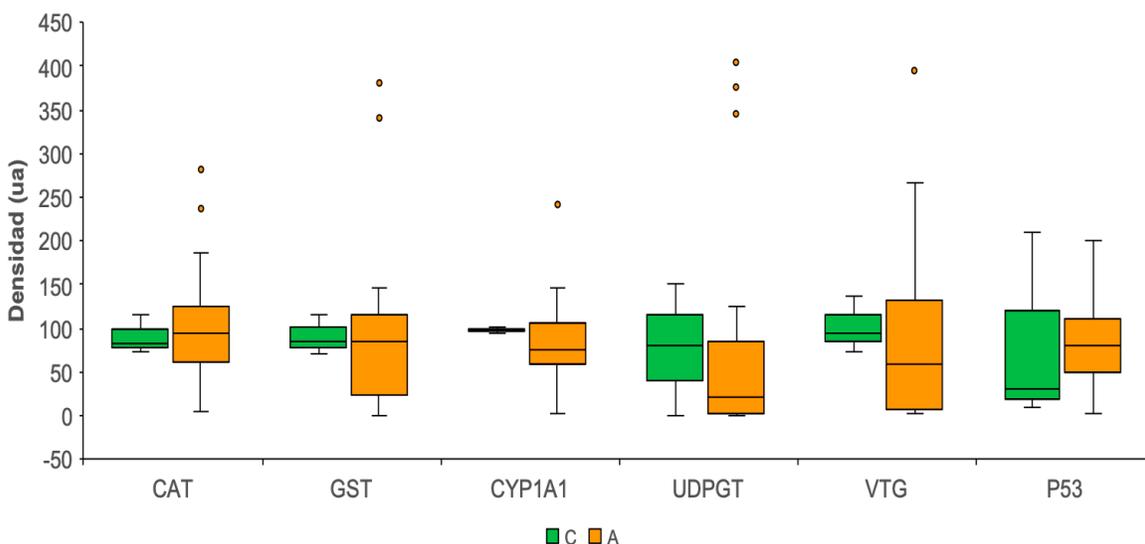


Figura 18. Comparación de la expresión de los genes de estudio en hembras en cada sitio de estudio. Medianas y percentiles, U de Mann Whitney * $p < 0.05$.

En el caso de los machos de acuerdo a los diferentes sitios de estudio los niveles de expresión tienden a comportarse de una manera más uniforme al compararlos con las hembras, a excepción de *GST* y *VTG*, en éstos se observa una disminución de su expresión en el sitio de referencia con respecto a los otros grupos de estudio. Al emplear el análisis estadístico de Kruskal Wallis no mostraron diferencias estadísticas significativas (Fig. 19).

En general, se presentó una gran variabilidad en la expresión de los genes de los tres grupos y el análisis estadístico no muestra diferencias significativas de Atlangatepec o del de referencia con el grupo control.

Los grupos de peces machos de Atlangatepec y de Referencia presentaron la mayor variabilidad en la expresión de *CAT* con un intervalo de 1.8 a 150.2 ua y de 1.8 a 171.5 ua, mientras que el grupo Control osciló de 55.3 a 177.2 ua con medianas muy similares de 118.7, 116.1 y 102.2 ua, respectivamente (Fig. 19).

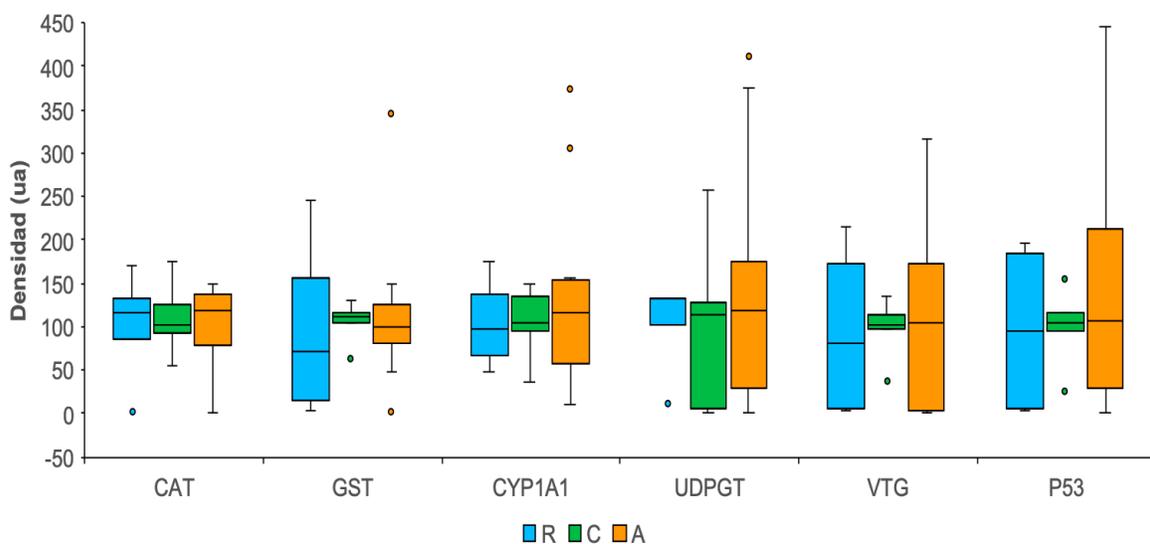


Figura 19. Comparación de la expresión de los genes de estudio en machos en cada sitio de estudio. Medianas y percentiles, Kruskal Wallis * $p < 0.05$.

Se realizó un análisis de frecuencias aplicando la prueba exacta de Fisher para comparar los valores de densitometría agrupados en categorías. Dicho análisis estadístico tampoco denotó diferencias significativas entre grupos, sin embargo, se observa una tendencia en la sub y sobreexpresión de algunos de estos genes. El porcentaje de peces con una expresión por debajo de 75 ua fue mayor en Atlangatepec (Fig. 20 B).

El comportamiento en la expresión de *CAT* en las hembras se aprecia ligeramente disminuido con valores en la mediana de 81.5 y 93.5 ua para el grupo Control y Atlangatepec, respectivamente (Fig. 20 A), la variabilidad es claramente mayor en este último con un 16.7% de la muestra con valores arriba de 150 ua y un 38.9% por debajo de 75 ua (Fig. 20 B).

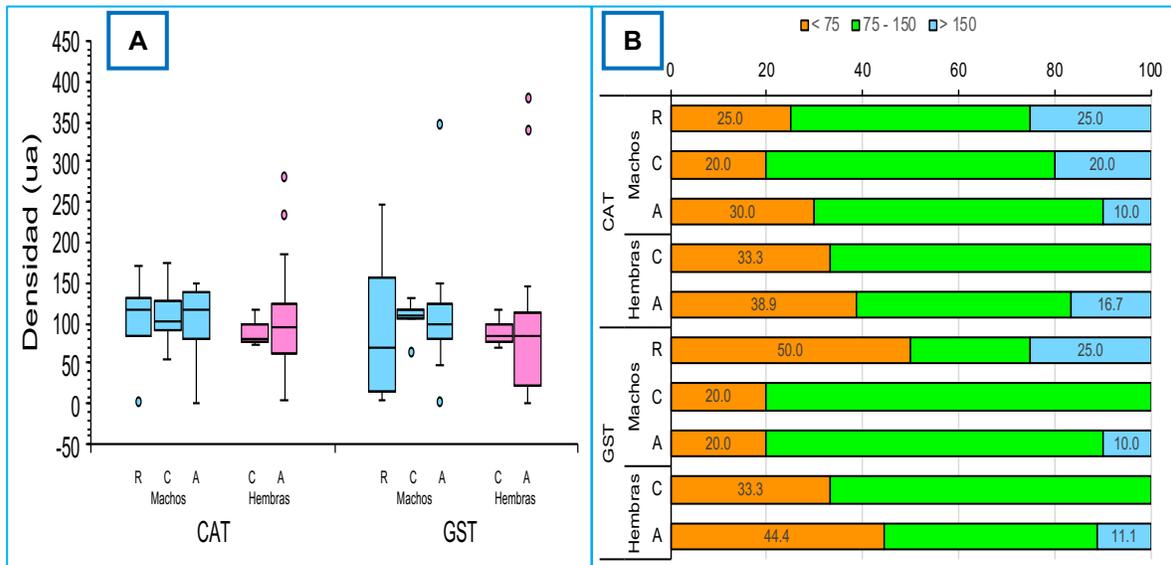


Figura 20. Comparación de la expresión de *CAT* y *GST* entre sitios y género. A) medianas y percentiles, Kruskal Wallis * $p < 0.05$ para machos y U de Mann Whitney * $p < 0.05$ para hembras. B) porcentaje de individuos agrupados en función de la frecuencia de expresión, prueba exacta de Fisher * $p < 0.05$.

El grupo control tanto de machos como de hembras no mostró gran variabilidad en la expresión de *GST* con medianas de 110.9 y 85.2 ua, respectivamente, sin embargo, los grupos de Atlangatepec y de Referencia presentan valores extremos que van desde prácticamente una nula expresión (0.8 ua) hasta arriba de 350 ua en peces de Atlangatepec (Fig. 20 A). En cuanto al porcentaje de individuos agrupados por frecuencia el sitio de referencia (machos) y Atlangatepec (hembras) cerca del 50 % de los individuos tuvieron una expresión menor a 75 ua (Fig. 20 B).

Analizando la expresión del gen *CYP1A1* como se muestra en la figura 21 los machos recolectados en la presa de Atlangatepec tiene el valor más alto de

expresión (116.3 ua) con respecto a los otros dos grupos de estudio con valores extremos que van de 10.2 a 373.8 ua (Fig. 21 A) con porcentajes equivalentes en los tres grupos de frecuencias de densitometría (Fig. 21 B).

Las hembras en este mismo sitio presentan una diferencia notable y disminuida en la expresión (69.1 ua) con respecto al grupo control (102.2 ua), dado quizá por el alto porcentaje de peces hembras (55.6 %) con una expresión por abajo de 75 ua, en comparación con las hembras del control en donde todas presentaban densidades entre 75-150 ua (Fig. 21 A y B).

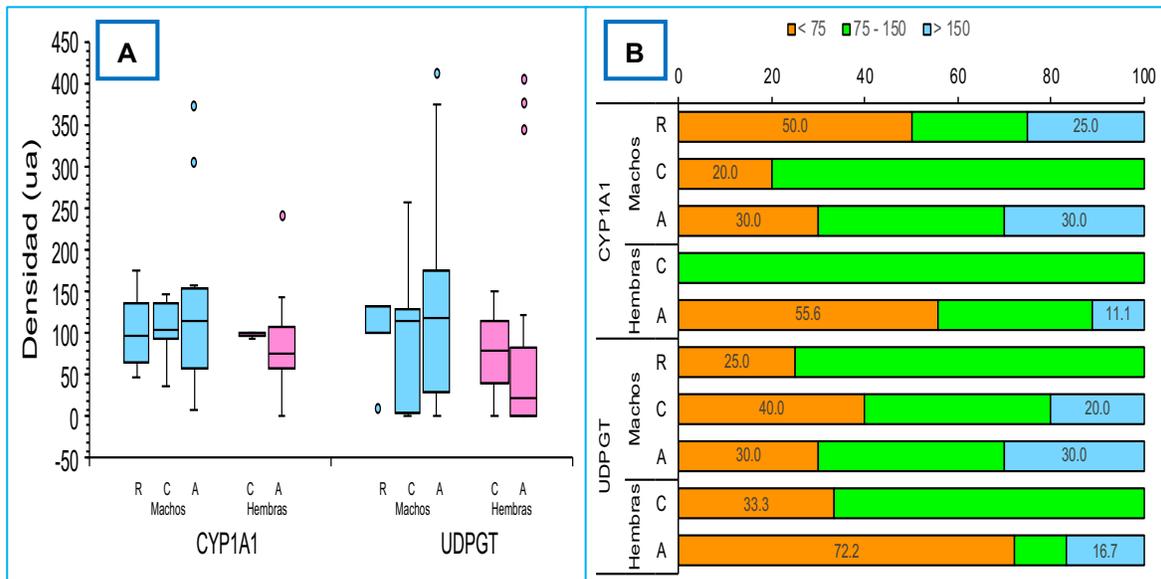


Figura 21. Comparación de la expresión de *CYP1A1* y *UDPGT* entre sitios y género. A) medianas y percentiles, Kruskal Wallis * $p < 0.05$ para machos y U de Mann Whitney * $p < 0.05$ para hembras. B) porcentaje de individuos agrupados en función de la frecuencia de expresión, prueba exacta de Fisher * $p < 0.05$.

Analizando la expresión de *UDPGT* en los machos se aprecia que el sitio de referencia tenía el valor más alto con 132.9 ua en donde el 75% de las muestras tenían densidades entre 75 y 150 ua, seguido de los de Atlangatepec (118 ua) y finalmente el grupo Control (96.9 ua) en donde aproximadamente solo el 25% de peces tenían unidades de densitometría menores a 75, la variabilidad en la

expresión entre el grupo Control y Atlangatepec son muy similares. En las hembras de Atlangatepec con una mediana de 21.4 ua y el 72.2% de los peces con una expresión menor a 75 ua, es notable una disminución en la expresión de 5 veces al compararlas con el grupo Control cuya mediana fue de 105.5 ua y el 66.7% de los individuos presentó valores entre 75 y 150 ua (Fig. 21 A y B).

Realizando el análisis del gen *VTG* en la figura 22 A y B se muestran los resultados en donde los machos de Atlangatepec presentan valores de expresión similares al grupo control con una mediana de 104.2 ua, sin embargo, el comportamiento fue muy diferente pero similar al grupo de Referencia en donde prácticamente la mitad de los individuos mostraron una expresión mayor a 150 ua y la otra mitad menor a 75 ua. Por otro lado en las hembras un alto porcentaje (66.7%) tienen una expresión menor a 75 ua lo que se refleja en la mediana cuyo valor es de 58.1 ua que es mucho menor con relación al grupo Control (100.2 ua).

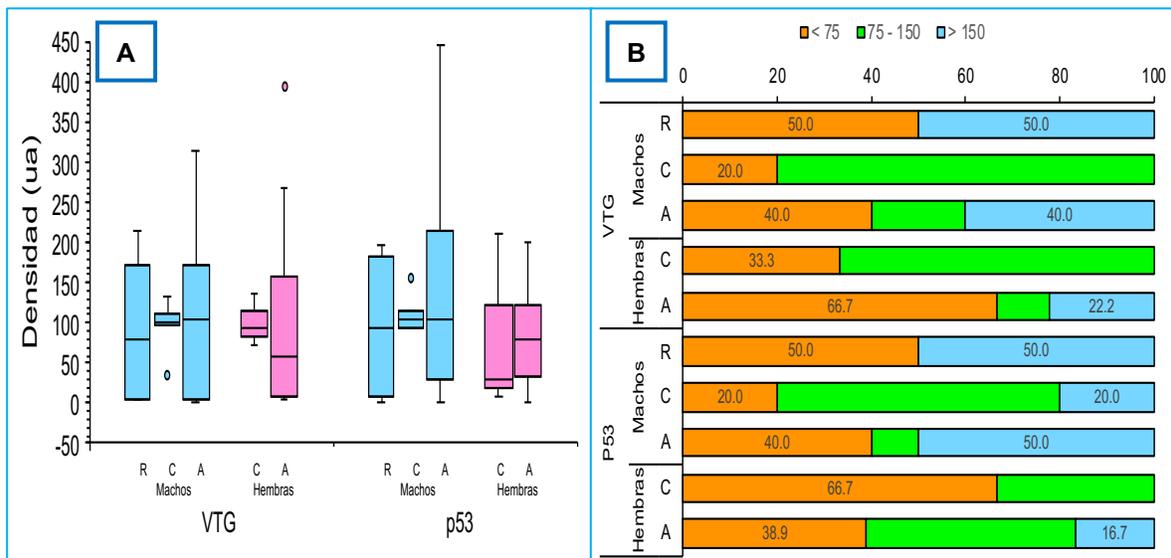


Figura 22. Comparación de la expresión de VTG y P53 entre sitios y género. A) medianas y percentiles, Kruskal Wallis * $p < 0.05$ para machos y U de Mann Whitney * $p < 0.05$ para hembras. B) porcentaje de individuos agrupados en función de la frecuencia de expresión, prueba exacta de Fisher * $p < 0.05$.

Para los peces machos del grupo Control la expresión de *P53* presenta una mediana de 105.5 ua con baja variabilidad entre individuos, y aunque el valor es similar a las medianas que se obtuvieron en los grupos de referencia y de Atlangatepec la variabilidad es enorme con intervalos que oscilan de 0.9 a 444.9 ua para Atlangatepec, en ambos grupos el 50 % de los peces mostraron valores arriba de 150 ua y el otro 50 % por debajo de 75 ua (Fig. 22 A y B). En la hembras la mediana de la expresión de *P53* es notablemente mayor en el grupo de Atlangatepec (80.8 ua) superando por 2.6 veces el valor del grupo control con un 16.7% de los peces con una expresión arriba de 150 ua (Fig. 22 A y B).

8. DISCUSIÓN

En los últimos años, diversos estudios tratan de caracterizar el comportamiento ambiental de la gran diversidad de compuestos tanto de origen antrópico (contaminantes emergentes, DDT, PCB'S) como de origen natural que son descargados en ambientes acuáticos, y evaluar la calidad toxicológica de estos ecosistemas como hábitat de una gran diversidad de organismos (Becerril, 2012; Ramos, 2006; Zuccato *et al*, 2006).

La degradación de la calidad de un ecosistema acuático resulta en alteraciones de sus propiedades fisicoquímicas con repercusiones adversas sobre la biota. La toxicidad de algunas sustancias puede ser muy alta pero puede verse alterada por reacciones antagónicas o sinérgicas con otros componentes, de tal manera que la toxicidad que se presenta en la biota es la mezcla de todas las sustancias y reacciones que se llevan a cabo en dicho ecosistema y de la respuesta biológica de la especie o del individuo ante dicha agresión.

Aunque los parámetros fisicoquímicos del agua nos orientan sobre la calidad del agua, es necesario conocer los efectos que tienen los contaminantes presentes en el agua sobre los organismos expuestos a ella. Debido a cuestiones éticas, los estudios sobre la toxicidad en humanos expuestos a hábitats contaminados son únicamente asociativos o de correlación, por lo que el uso de modelos animales ayuda a evaluar la contaminación en dichos hábitats y a evidenciar los efectos que conlleva esa exposición (Van der Oost *et al.*, 2003; Wolf y Wheeler, 2018).

La caracterización de la calidad toxicológica de un cuerpo de agua puede abordarse ya sea evaluado parámetros fisicoquímicos de muestras ambientales y/o mediante el estudio de organismos acuáticos, empleando biomarcadores de exposición y de efecto (bioquímicos, histológicos, moleculares, entre otros.). Cada una de las técnicas utilizadas proporciona información referente a un aspecto en particular y cuando son aplicadas de manera conjunta se obtiene información integrada de la calidad ecotoxicológica que permiten conocer los cambios en espacio y tiempo del

ecosistema acuático, así como conocer las relaciones causales de las alteraciones que puedan detectarse.

Los peces se consideran excelentes indicadores biológicos para evaluar los contaminantes ambientales, ya que son organismos situados en la parte superior de la cadena alimenticia acuática, de larga vida, fáciles de recolectar y de un tamaño óptimo para el análisis. Los cambios patológicos (moleculares, bioquímicos, histológicos y conductuales) en los peces son indicadores poderosos de la exposición a factores estresantes ambientales (Jiao *et al.*, 2018; Wolf y Wheeler, 2018).

Los peces pueden ser utilizados como indicadores de la calidad del agua y del estado de salud de los ecosistemas acuáticos, proporcionando indicios sobre la perturbación del medio ambiente antes de que esta tenga un efecto negativo sobre la salud, por lo tanto son reconocidos como vector de comunicación para sensibilizar a las personas sobre la necesidad de preservar la calidad de los ríos, lagos, etc. (Whichert y Rapport 1998; McDoWall *et al.*, 2000; Oberdoff *et al.* 2002).

En los peces los efectos provocados por diversos agentes como los metales pesados, plaguicidas u otros disruptores endocrinos pueden perturbar algunas funciones fisiológicas como la acumulación de reservas energéticas, la eliminación de contaminantes, el desarrollo de órganos y tejidos, además de producir alteraciones en los procesos metabólicos, afectando la tasa reproductiva de algunos organismos (Aranzazu *et al.*, 2002).

En México existen pocos estudios de investigación que han evaluado los efectos toxicológicos a nivel de expresión de genes en peces, por consiguiente, los resultados obtenidos en el presente trabajo proporcionan conocimiento básico para entender estos aspectos en *Cyprinus carpio*, especie que habita en el sistema acuático más importante del estado “La presa de Atlangatepec”. Este ecosistema es un reservorio para la pesca de seis especies de carpa, así mismo suministra

agua al centro acuícola del mismo nombre en donde se lleva a cabo la reproducción y crecimiento de *Cyprinus Carpio rubrofuscus* y *Cyprinus Carpio specularis* principalmente, para su distribución al resto del estado (Castilla-Hernández., 2014). La aplicación de biomarcadores de efecto moleculares en peces capturados en el sitio permitirá determinar la calidad toxicológica de este cuerpo de agua.

Factor de Fulton

Existe una relación prácticamente constante entre la longitud y el peso del pez durante su crecimiento. Esta relación queda expresada en la ecuación del factor de condición de Fulton (K), cuando K es mayor a 1 indica que el crecimiento del pez está en perfecto estado de salud y su crecimiento es el adecuado. El crecimiento de un pez depende de varios factores bióticos y abióticos entre ellos: la cantidad y calidad del alimento ingerido, la etapa reproductiva, los cambios estacionales y la temperatura (Blackwell *et al*, 2000). Este factor se considera como un parámetro a largo plazo, el cual integra el bienestar general de los peces en escala de semanas o meses.

El crecimiento del pez se caracteriza por cambios notables en la morfología que impactan directamente en su movilidad, así como en su capacidad de búsqueda del alimento y la facilidad para evitar depredadores (Shuthers, 2000). Se ha evidenciado que este índice tiende a disminuir cuando los organismos se encuentran expuestos a algunos contaminantes como metales pesados entre ellos Pb y Cd en donde al estudiar el contenido de lípidos su agotamiento constituye una respuesta metabólica relacionada con el estrés (Alquezar *et al.*,2006; Kerambrum *et al.*,2013).

En el presente estudio, los peces de la presa de Atlangatepec, tanto hembras como machos, muestran un factor de condición mayor al de los peces de los grupos Control y de Referencia. Sin embargo, en los peces de los tres grupos K es mayor a 1 indicando que todos los peces se encontraban adaptados a las condiciones de su ecosistema desarrollando un crecimiento óptimo.

Aunque el factor de condición de Fulton es ampliamente utilizado para evaluar el crecimiento del pez, que a su vez, está relacionado con diversos factores bióticos y abióticos, no siempre evidencia la alteración del ecosistema en el que se encuentra los peces, ya que estos pueden adaptarse. Esto ha sido reportado en *Cyprinus carpio* expuestos durante 21 días a β -naftoflavona, un hidrocarburo aromático policíclico, donde a pesar de mostrar cambios en la expresión de enzimas de detoxificación (*GST* y *SOD*) no se ve afectado el factor de condición de Fulton (Ascar y de la Torre, 2005). En otras especies de peces (*Platichthys flesus*, *Oncorhynchus mykiss*, *Clarias anguillaris*), también se ha reportado que el factor de condición no se ve afectado por la exposición a PCBs y COPs (Beyer *et al.*, 1997; Otto *et al.*, 1994; Arnold *et al.*, 1995; Gadagbui and Goksøyr, 1996).

Este índice se considera un parámetro útil a largo plazo el cual integra el bienestar general de los peces en la escala de semanas o meses; proporciona información de una forma indirecta sobre el crecimiento, la madurez y la capacidad reproductiva, dando con ello una aproximación del estado de salud a nivel individual y de población. Los valores de *K* aumentan conforme el paso del tiempo en donde el desarrollo de los peces se caracteriza por cambios en la morfología funcional del impacto de la motilidad, la capacidad de búsqueda de alimento y la facilidad para evitar depredadores (Suthers, 2002; Olla y Davis, 1992). Todos estos cambios en el desarrollo pueden dar origen a diferencias en el crecimiento proporcional en términos de longitud-peso y por consecuencia tienden a dar lugar a variaciones en el índice (Pepin, 1995).

En un estudio realizado por Kerambrum *et al.*, 2003, este índice tiende a disminuir con valores de 0.9 a 1.06 cuando los organismo se encuentran expuestos a algunos contaminantes como metales pesados como Cd, Cu, Ni, Pb, V y Zn, Cd y Mn, los cuales fueron encontrados en hígado y branquias de peces de tres estuarios de la costa europea, en donde al correlacionarlo con el contenido de lípidos su agotamiento constituye una respuesta metabólica relacionada con el estrés.

Coefficiente de alometría

Por su parte, también se realizó la caracterización del crecimiento en los peces mediante el coeficiente de alometría (Delgadillo-Calvillo *et al.*, 2012). Este coeficiente permite conocer la evolución y el tipo de crecimiento de los peces en un determinado ecosistema acuático, además con la relación peso-longitud se pueden realizar comparaciones morfométricas intra e inter poblaciones de un mismo cuerpo de agua o de diferentes escenarios acuáticos para evaluar la biomasa y la dinámica de las poblaciones.

Un valor del coeficiente de alometría $b < 3$ nos indica que el tipo de crecimiento es alométrico negativo, es decir, los individuos dentro del ecosistema incrementan preferencialmente su longitud relativa más que su peso; cuando el valor es > 3 tienen un crecimiento alométrico positivo (mayor peso que longitud) y cuando el valor de b está entre 2.5 a 3.0 los individuos tienen un crecimiento isométrico.

Considerando lo anterior, nuestros resultados mostraron esta diferencia tanto por sitios de estudios y entre género de cada uno de los mismos, esto nos dejó ver qué factores abióticos y bióticos como los antes mencionados pueden estar marcando la diferencia entre los peces colectados en Atlangatepec y los de control y/o referencia. El parámetro de alometría mostró valores de crecimiento alométrico negativo en el control y de referencia, es decir, la tasa de incremento en longitud fue mayor que el aumento en el peso, aunque estos resultados fueron similares a los obtenidos en otras especies de importancia económica (Cifuentes, *et al.*, 2012), no puede descartarse que las condiciones de cultivo fueron desfavorables. Los peces de la presa de Atlangatepec muestran que este crecimiento está influenciado por el género, ya que las hembras presentan un crecimiento alométrico negativo, es decir incrementan más su longitud que su peso; mientras que los machos incrementan por igual longitud que peso (crecimiento isométrico). Se ha reportado que un crecimiento alométrico negativo se puede deber a la falta de alimento de calidad, a las características ontogénicas del individuo, y en caso de las hembras, al estatus reproductivo (Bonilla-Flórez *et al.*, 2017; Bonilla-Suárez *et al.*, 2017).

La mayoría de los autores coinciden en que las condiciones ambientales es el principal factor condicionante en el crecimiento de los individuos e inciden en sus caracteres morfológicos independientemente de su origen genético (Rogdakis y cols, 2011). Sin embargo algunos estudios reportan la importancia de factores ontogénicos, Loy y cols. (1999), estudiaron los efectos de diferentes condiciones ambientales sobre los caracteres morfológicos externos y morfoanatómicos en peces adultos de la especie *Sparus aurata*, encontrando que el origen de los individuos sí incide en las características morfológicas expresadas por el adulto.

En este mismo sentido, Jauralde y cols. (2015), destacan que las diferencias en la morfología de *Sparus aurata* en función del proveedor de alevines, podría ser una fuente de errores sistemáticos en la determinación del peso medio cuando éste se estima a partir del tamaño del pez, por lo que los modelos que contemplan la variable peso deberían ser adaptados a las características de cada proveedor.

Extracción de ARN y síntesis de ADN

El ARN es menos estable que el ADN bajo condiciones de laboratorio, por lo que es importante realizar una buena extracción de esta molécula para obtener un ARN de buena calidad para el desarrollo de cualquier técnica molecular y confiabilidad de los resultados. Durante la obtención del ARN se deben evitar o eliminar moléculas contaminantes que puedan degradarlo (ARNsas, proteínas, polisacáridos, ADN genómico). Se ha reportado que la presencia de estos contaminantes puede interferir con el proceso de amplificación de los ácidos nucleicos. En nuestro caso, se logró la estandarización de la extracción y esto se pudo comprobar mediante el análisis a través de espectrofotometría y posteriormente la electroforesis del ARN total, donde se muestra las dos bandas de ARN ribosomal características de ARN no degradado (18S y 28S), y sin la presencia de bandas por arriba de la subunidad 28S, lo cual significa que está libre de contaminación de proteínas, ADN o solventes empleados en la extracción (Sandoval-Pineda *et al.*, 2017). El uso de la β -ACTINA (gen constitutivo) nos ayudó a comprobar que se obtuvo el ADNc y que se logró amplificar correctamente. Los genes que codifican proteínas esenciales para la vida

(genes constitutivos o *housekeeping*) se transcriben de forma estable durante el ciclo celular y en diferentes estados de desarrollo, esta característica es aprovechada para utilizarlos como genes de referencia durante la estandarización de las técnicas de expresión génica (RT-PCR), ya que permiten corregir variaciones en las concentraciones de ARN inicial y mejorar la eficiencia de la transcripción reversa (Sandoval-Pineda *et al.*, 2017).

Expresión relativa de los genes

CYP1A1. De acuerdo a la expresión relativa el gen *CYP1A1* se ha reportado que su inducción en peces silvestres muestra una buena sensibilidad. Se reportó una asociación entre el biomarcador hepático y las concentraciones elevadas del tetracloro dibenzo furano (TCDF) en músculo de carpa (Curtis *et al.*, 1993). También se ha demostrado que los hidrocarburos aromáticos policíclicos (HAPs) inducen la actividad de esta enzima, por lo que se considera un buen biomarcador de efecto en los programas de monitoreo (Willet *et al.*, 1997).

UDPGT. Tanto en mamíferos como en peces, la síntesis de *UDPGT* es la mayor vía de inactivación y subsecuente eliminación de compuestos orgánicos tanto endógenos como xenobióticos. Nuestros resultados muestran que únicamente las hembras de la presa de Atlangatepec presentan una tendencia a disminuir la expresión de *UDPGT*. Esto concuerda con lo reportado por Stegeman *et al.* (1992) donde evidencia que la actividad de la enzima *UDPGT* es influenciada por el género, el pH y la temperatura. Aunque se ha documentado que la exposición de xenobióticos como PAHs, PCBs y COPs pueden incrementar la expresión de *UDPGT*, también se ha reportado que puede disminuir o, incluso, mantenerse sin alteración, tal como se ha visto en *Salmo salar*, *Ameiurus nebulosus*, *Pleuronectes platessa*, *Rutilus rutilus* y *Oncorhynchus mykiss*, expuestos también a COPs y PCBs (Revisado en Van der Oost *et al.*, 2003).

CAT y GST. La expresión de estos genes como biomarcadores de estrés oxidativo por exposición a xenobióticos ha sido ampliamente documentado (Van der Oost *et*

al., 2003; Ochoa y González, 2008; Wolf y Wheeler, 2018). Existen diversos xenobióticos que pueden inducir su expresión, tales como los hidrocarburos aromáticos policíclicos, el pesticida Aroclor 1254, el DDE, etc., pero también hay quienes pueden inhibirla, entre ellos, algunos PCBs, metales como el cadmio y cobre, o el hexaclorobenceno (Van der Oost, 2003). En el presente estudio no se encontraron diferencias significativas en la expresión relativa de *CAT* y *GST* de los peces de la presa Atlangatepec comparados con los del grupo Control. En este caso, el que la expresión sea similar pudiera pensarse que es debido a que no existen xenobióticos en el agua de la presa Atlangatepec, suposición que se descarta debido a la concentración de metales pesados mostrada por el agua y el tejido de los peces expuestos a la presa (datos de nuestro grupo de investigación). Por lo tanto, sugerimos que la expresión similar pudiera deberse a la posible existencia de una mezcla de xenobióticos que, mientras unos inducen la expresión de *CAT* otros la inhiben, contrarrestándose los efectos.

También se ha visto que la inducción o inhibición de la expresión de *CAT* depende de la concentración y tiempo de exposición del xenobiótico (Ochoa y González, 2008). Además, en exposiciones crónicas a xenobióticos las células de diversos organismos, incluidos los peces, pueden adaptarse a la exposición a xenobióticos y mantener normales la biosíntesis de enzimas antioxidantes. Esto a través de la activación del receptor activado por proliferador de peroxisomas ($PPAR\alpha$) que inhibe la formación de H_2O_2 y por lo tanto, la inducción de *CAT* (Klotz y Steinbrenner, 2017).

VTG. La expresión de *VTG* se ha usado comúnmente en peces macho para evaluar disrupción endocrina, ya que está considerado que no debe expresarse o su expresión debe ser mínima (Van der Oost *et al.*, 2003). La expresión de *VTG* en los peces machos de los tres sitios de estudios, sugiere la fuerte presencia de disruptores endocrinos, ya que al comparar su expresión con las hembras no hay diferencia significativa.

En un estudio en la presa Pozuelos los peces muestran valores similares de VTG, que indican que en el agua no existen xenoestrógenos y se correlaciona con los niveles bajos de estradiol; ya que el estradiol es el que induce la síntesis de VTG (Palumbo et al. 2007; Leonardi et al., 2010).

La respuesta de este biomarcador esta mediada a través de la activación del receptor de estrógeno que se utiliza para evaluar la exposición a sustancias químicas estrogénicas (Celander, 2011). Estas respuestas pueden verse directa o indirectamente afectadas por la presencia de otras clases de contaminantes como resultado de una mezcla. Por ejemplo, Las sustancias químicas que inhiben la función de las enzimas metabólicas clave y las bombas transportadoras que participan en la eliminación de xenobióticos produciendo una bioacumulación de hidrocarburos aromáticos y sustancias químicas estrogénicas que aumentan las respuestas de los biomarcadores. El efecto de estas mezclas puede llevar a una sobreestimación de la presión de exposición real. Por el contrario, la inducción de la expresión de enzimas metabólicas clave y las actividades del transportador pueden resultar en una mayor eliminación de los compuestos tóxicos que pueden llevar a una posible subestimación de la exposición.

P53. Este gen juega un papel importante en la prevención de la replicación de ADN dañado al regular la proliferación celular mediante la activación del proceso de apoptosis (Joerger et al., 2008). Las hembras de la presa de Atlangatepec muestran una tendencia a la sobreexpresión de P53, esto sugiere que se encuentra activo un mecanismo apoptótico. La exposición a diversos xenobióticos puede provocar estrés oxidativo en los organismos e inducir apoptosis celular mediante el incremento de la expresión de P53, tal como se ha visto en cultivos celulares, ratas y peces (Park et al., 2015; Zhang et al., 2017; Altun et al., 2017). Otro estudio realizado en *Cyprinus carpio* muestra que la expresión de P53 puede ser inducida por la exposición a clorpirifos, un insecticida organofosforado (Jiao et al., 2018).

9. CONCLUSIONES

Uno de los mayores desafíos actuales de la Toxicología ambiental, es comprender los efectos de la toxicidad del efecto sinérgico de las mezclas de sustancias, comúnmente conocidos como efectos de cóctel, en humanos y en la vida silvestre.

El factor de condición de Fulton (K) aporta información importante relacionada con el estado de salud, su aplicación permite estimar el crecimiento de los individuos y analizar el efecto de los factores ambientales en su desarrollo (Camara *et al.*,2011), en este estudio se obtuvo un valor promedio de 1 lo cual indica que los peces no presentan afecciones en el desarrollo y crecimiento debido a las condiciones ambientales que presenta la Presa.

Aunque no se presentaron diferencias estadísticamente significativas en la expresión de la mayoría de los genes evaluados, los resultados muestran una tendencia en el caso de aquellos que están relacionados en el proceso de detoxificación en la fase de conjugación, los valores fueron menores en la Presa de Atlangatepec en comparación con los grupos de Referencia y Control; lo que sugiere que en el sitio de estudio existen sustancias que pueden estar suprimiendo su expresión. Los factores de estrés pueden cargar o limitar los sistemas fisiológicos, reducir el crecimiento, perjudicar la reproducción, predisponer a los peces a la enfermedad y reducir la capacidad de tolerar factores estresantes adicionales. Los peces se encuentran cerca de la cima de la cadena alimenticia en los ecosistemas acuáticos por lo cual reflejan la salud de los mismos, por lo tanto, los efectos de los contaminantes en estos organismos pueden manifestarse en todos los niveles de organización biológica.

La combinación de parámetros moleculares y fisiológicos ofrece información relevante sobre la determinación del estado de salud de los peces, son de suma importancia como herramientas de “alerta temprana” que muestran estados biológicos alterados en la biota de un ecosistema, lo que justifica llevar a cabo la evaluación de la calidad ambiental con la inclusión de biomarcadores de exposición y estudios de poblaciones, para evaluar la integridad ecológica en un ecosistema.

10. LITERATURA CITADA

- Adreani, P., Gómez, I., Colobran, R., Caro, P., Pelusa, F., Pujol-Borrell, R., Juan, M (2001). Determinación semicuantitativa de la expresión de ARNm de las isoformas de MIP-1 α y MIP-1 β mediante un competidor recombinante y RT-AFLP. *Inmunología*, 20, 184-195.
- CONANP (2015). Humedales de México. <http://ramsar.conanp.gob.mx/sitios.php>.
- Chomczynski, P., Sacchi, N. (1986). Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Analytical Biochemistry*. 162 (1), 156-159.
- Chèvre, N., Gagné, F., Gagnon, P., Blaise, C. (2003). Application of rough sites analysis to identify polluted aquatic sites based on a battery of biomarkers: a comparison with classical methods. *Chemosphere* 51:13–23.
- Cifuentes, R., González, J., Montoya, G., Jara, A., Ortíz, N., Piedra, P., y Habit, E. (2012). Relación longitud-peso y factor de condición de los peces nativos del río SaN Pedro (cuenca del río Valdivia, Chile). *Guayana*, 76, 101-110.
- Corpet, F. (1988). Multalin, Multiple sequence alignment with hierarchical clustering. *Nucl. Acids Res.* 16-22, 10881-1089.
- Da Costa, M.R. and F. Gerson A. (2003): Lengthweight relationship and condition factor of *Micropogonias furnieri* (Desmarest) (Perciformes, Sciaenidae) in the Sepetiba Bay, Rio de Janeiro State, Brazil. *Revista Brasileira de Zoología* 20(4):685-690.
- de la Torre Fernando, R., Ferrari, L., Salibián, A. (2005). Biomarkers of a native fish species (*Cnesterodon decemmaculatus*) application to the water toxicity assessment of a peri-urban polluted river of Argentina. *Chemosphere* 59(4):577–583.
- Eggens, M., Bergman, A., Vethaak, D. Van der Weiden, D., y Boon, J. (1995). Cytochrome CYP1A indices as biomarkers of contaminant exposure: results of a field study with plaice *Pleuronectes platessa* and flounder *Platichthys flesus* from the south North Sea. *Aquatic Toxicology*. 32:211-225.
- Elferink, C.J., Whitlock, J.P. Jr. (1990). 2, 3, 7, 8-Tetrachlorodibenzo-pdioxin- inducible, Ah receptor-mediated bending of enhancer DNA. *J Biol Chem*. 265(10):5718–5721.
- Faria, M., Carrasco, L., Diez, S., Riva, M.C., Bayona, J.M., Barata, C. (2009). Multi-biomarker responses in the freshwater mussel *Dreissena polymorpha* exposed to polychlorobiphenyls and metals. *Comp. Biochem. Physiol. C: Toxicol. Phar-macol*. 149,281–288.
- García-Nieto, E., Carrizales-Yañez, L., Juárez-Santacruz, L., García-Gallegos, E., Hernández-Acosta, E., Briones-Corona, E. and y Vázquez-Cuecuecha, O. G. (2011). Plomo y arsénico en la subcuenca del Alto Atoyac en Tlaxcala, México. *Revista Chapingo Serie Ciencias Forestales y del Ambiente*, 17(1): 7–17.

- George, S.G. (1994). Enzymology and molecular biology of phase II xenobiotic-conjugating enzymes in fish. 37-85 In: D.C. Malins, G.K. Ostrander (Eds.), *Aquatic Toxicology; Molecular, Biochemical and Cellular perspectives*. Lewis Publishers, CRC Press.
- Gilbert, N. (2012). Drug-Pollution law all washed up. *Nature*, 491:503-504.
- Gorinstein, S., Moncheva, S., Katrich, E., Toledo, F., Arancibia, P., Goshev, I., Trakhtenberg, S. (2003). Antioxidants in the black mussel (*Mytilus galloprovincialis*) as an indicator of Black Sea coastal pollution. *Mar Pollut Bull* 46:1317–1325.
- Goksoyr, A., Forlin, L. (1992). The P-450 system in fish, aquatic toxicology and environmental monitoring. *Aquatic Toxicology*, 22:287-312.
- Guzmán B.L., Nava G., Bevilacqua P.D. (2016). Vigilancia de la calidad del agua para consumo humano en Colombia: desafíos para la salud ambiental. *Rev. Fac. Nac. Salud Pública*; 34(2): 175-183.
- Hamada, M., Satsu, H., Natsume, S., *et al.* (2006). TCDD-induced *CYP1A1* expression, an index of dioxin toxicity, is suppressed by flavonoids permeating the human intestinal Caco-2 cell monolayers. *J. Agric. Food Chem.* 54(23):8891–8898.
- Whitlock, J.P. Jr. 1993. Mechanistic aspects of dioxin action. *Chem. Res. Toxicol.* 6(6):754–763.
- INEGI. (2006). Anuario estadístico del estado de Tlaxcala.
- Jobling, S., Casey, T., Rodgers-Gray, J., Oehlmann, U., Schulte-Oehlmann, S., Pawlowski, T., Baunbeck, A.P., Turner, C.R., Tyler, (2004). Comparative responses of molluscs and fish to environmental estrogens and an estrogenic effluent. *Aquat. Toxicol.* 66:207–222.
- Jones, P.D., De Coen, W.M., Tremblay, L., Giesy, J.P. (2000). Vitellogenin as a biomarker for environmental estrogens. *Water Science and Technology.* 42:1-14
- Juárez-Santacruz L, García-Nieto E, Costilla-Salazar R *et al.* (2013). Assessment of the genotoxic potential of sediments contaminated with POPs and agricultural soils using *Vicia faba* micronucleus assay. *Soil Sedim Contam Int J* 22(6):288–300.
- Kerambrun, E. Henry, F., Marechal, A., Sanchez, W., Filipuci, I. *et al.* (2012). A multibiomarker approach in juvenile turbot, *Scophthalmus maximus*, exposed to contaminated sediments. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, Elsevier 80:45–53.
- Kerambrun, E., Sánchez, W., Henry, F., Amara, R. (2011). Are biochemical biomarker responses related to physiological performance of juvenile sea bass (*Dicentrarchus*

labrax) and turbot (*Scophthalmus maximus*) caged in a polluted harbour? *Comp Biochem Phys C* 154:187–195.

Lacroix, C., Coquillé, V., Guyomarch, J., Auffret, M., Moraga, D. (2014). A selection of reference genes and early-warning mRNA biomarkers for environmental monitoring using *Mytilus* spp. Assentinel species. *Mar. Pollut. Bul.* 86:304–313.

Ma, Q., Lu, A. Y. H. (2007). CYP1A induction and human risk assessment: an evolving tale of in vitro and in vivo studies. *Drug Metabolism and Disposition: The Biological Fate of Chemicals*, 35:1009–1016.

Manduzio, H., Monsinjon, T., Rocher, B., Leboulenger, F., Galap, C. (2003). Characterization of an inducible isoform of the Cu/Zn superoxide dismutase in the blue mussel *Mytilus edulis*. *Aquat Toxicol* 64:73–83.

Markert, B. (2007). Definitions and principles for bioindicatios and monitoring of trace metals in the enviroment. *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology*, 21:77-82.

Medina, M., Encina, F. (2004). Incorporación de la Evaluación de Riesgo Ecológico en el Sistema de Evaluación de Impacto Ambiental para ecosistemas acuáticos en Chile. *Revista Ambiente y Desarrollo del CIPMA* 19:3–4.

Monsivais S.E.L. Y Rueda A.E.I. (2012). Impuestos y subsidios ambientales para regular la contaminación de aguas industriales (contaminación de la industria textil en el río Atoyac, municipio de Tepetitla de Lardizabal, Tlaxcala). Tesis de licenciatura. UAM-A. México D.F.

National Acedemy of Sciences (1983). Risk assesment in the federal government: Managing the process. National Academy Press, Whashington D.C.

Navarro, A., Faria, M., Barata, C., Piña, B. (2011). Transcriptional response of stress genes to metal exposure in zebra mussel larvae and adults. *Environ. Pollut.* 159, 100 107.

Nebert, D. W., Dalton, T. P. (2006). The role of cytochrome P450 enzymes in endogenous signaling pathways and environmental carcinogenesis. *Nat. Rev. Cancer* 6:947–960.

Peakall, D.B. (1994) Biomarkers, the way forward in environmental assessment. *Toxicol Ecotoxicol News* 1: 55-60.

Peña, C., Carter, D., Ayala-Fierro, F. (2001). Capítulo 3. Evaluación de riesgos ambientales. *Toxicología ambiental. Evaluación de riesgos y restauración ambiental* 201-136. Arizona: The University of Arizona. Recuperado de: <http://superfund.pharmacy.arizona.edu/toxamb/>.

- Piña, B., Casado, M., Quirós, L. (2007). Analysis of gene expression as a new tool in ecotoxicology and environmental monitoring. *Trends in Analytical Chemistry*. 26: 1145-1154.
- Ramírez-Sánchez, I. M., Martínez-Austria, P., Quiroz-Alfaro, M. A., Bandala, E. R. (2015). Efectos de los estrógenos como contaminantes emergentes en la salud y el ambiente. *Tecnología y ciencias del agua*, 6(5), 31-42.
- Rendón von Osten, J., (2005). Uso de biomarcadores en ecosistemas acuáticos, p. 121-140. In: A. V. Botello, J. Rendón-von Osten, G. Gold-Bouchot y C. Agraz-Hernández (Eds.). *Golfo de México Contaminación e Impacto Ambiental: Diagnóstico y Tendencias*, 2da Edición. Univ. Autón. de Campeche, Univ. Nal. Autón. De México, Instituto Nacional de Ecología. 696.
- Roberts, E. M., P. B. English, J. K. Grether, G. C. Windham, L. Somberg, and C. Wolff. (2007). Maternal residence near agricultural pesticide applications and autism spectrum disorders among children in California Central Valley. *Environ. Health Perspect.* 15: 1482-1489.
- Rose, J., Holbech, H., Lindholm, C., Norum, U., Povlsen, A., Korsgaard, B., Bjerregaard, P. (2002). Vitellogenin induction by 17β -estradiol and 17α -ethinylestradiol in male zebrafish (*Danio rerio*). *Comparative Biochemistry and Physiology*. 131: 531-539.
- Schreiber, E.A., Otter, R.R., Van den Hurk, P. (2006) A biomarker approach to measure biological effects of contaminant exposure in largemouth bass from lake Conestee, South Carolina, USA. *Environ Toxicol Chem* 25(7): 1926-1932.
- Schwaiger, J.R., Negele, D. (1998). Plasma vitellogenin-a blood parameter to evaluate exposure of fish to xenoestrogens. *Acta Vet. Brno*, 67: 257-264.
- Senay, C., Jedlitschky, G., Terrier, N., Burchell, B., Magdalou, J., FournelGigleux, S. (2002). The importance of cysteine 126 in the human liver UDP-glucuronosyltransferase UGT1A6. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Protein Structure and Molecular* 1597 (1): 90 - 96.
- Sendarrubias, R. B. (2016). Efectos subletales de la exposición al vertido tóxico de Aznalcollar en aves de larga vida (Doctoral dissertation, Universidad Autónoma de Madrid).
- Sharma, R. Yang, Y. Sharma, A., Awasthi, S. Awasthi, Y.C. (2004). Antioxidant role of glutathione S-transferases: protection against oxidant toxicity and regulation of stress-mediated apoptosis, *Antiox. Redox Signal*. 6 (2) 289-291.
- Toro-Restrepo, B. (2011). Uso de los biomarcadores en la evaluación de la contaminación. *Revista Luna Azul*, 32, 121-127.

- Torres, S., L. y L. López C. 2007. Efectos a la salud y exposición a p, p'-DDT y p, p'-DDE. El caso México. *Ciênc. Saúde Colect.* 12: 51-60.
- United States Environmental Protection Agency (2001). An overview of risk assesment and RCRA. EPA530-F-00-032: Washington D.C.
- Van der Oost, R., Beyer, J., Vermeulen, NPE. (2003) Fish bioaccumulation and biomarkers in environmental risk assessment: a review. *Environ Toxicol Pharmacol* 13: 57-149.
- Van der Oost, R., Goksoyr, A., Celander, M., Heida, H., Vermeulen NPE (1996). Biomonitoring of aquatic pollution with feral eel (*Anguilla anguilla*). II. Biomarkers: pollution-induced biochemical responses. *Aquat Toxicol* 36: 189-222.
- Wang, R., R. Jain, A. Wolkin, C. Rubin, and L. Needham. (2009). Serum concentrations of selected persistent organic pollutants on a sample of pregnant females and changes in their concentrations during gestation. *Environ. Health Perspec.* 117: 1244-1249.
- Wagner, N., Züghart, W., Mingo, W. y Lötters, S. (2014). Are deformation rates of anuran development stages suitable indicators for environmental pollution? Possibilities and limitations. *Ecological indicators* 45, 394-401.
- Ward, M. H., J. S. Colt, C. Metayer, R. B. Gunier, J. Lubin, V. Crouse, M. G. Nishioka, P. Reynolds, and P. A. Buffler. (2009). Residential exposure to polychlorinated biphenyls and organochlorine pesticides and risk of childhood leukemia. *Environ. Health Perspec.* 117: 1007-10013.

11. ANEXOS

Anexo 1. Datos de los organismos recolectados en campo y factor de condición. AT
 = Atlangatepec H = hembra M = macho

Clave	Género	Longitud (cm)	L/sin aleta caudal (cm)	Ancho (cm)	Peso (g)	Factor de condición de Fulton (k)
AT-1	H	43.0	36.0	13.5	1350	1.70
AT-2	H	35.0	29.0	12.0	1015	2.37
AT-3	H	38.0	32.0	11.0	895	1.63
AT-4	H	35.5	30.6	13.0	1555	3.48
AT-5	H	33.7	28.0	9.8	670	1.75
AT-6	H	36.0	29.5	12.5	1070	2.29
AT-7	H	31.0	26.0	11.5	670	2.25
AT-8	H	32.5	25.5	10.0	595	1.73
AT-9	H	33.5	26.5	11.0	765	2.03
AT-10	M	32.0	26.5	11.5	915	2.79
AT-11	M	28.0	22.0	8.5	390	1.78
AT-12	H	30.0	24.5	10.0	580	2.15
AT-13	M	31.5	26.5	10.5	585	1.87
AT-14	H	31.0	25.0	10.5	640	2.15
AT-15	H	33.0	26.5	10.5	715	1.99
AT-16	M	31.5	25.0	16.5	630	2.02
AT-17	H	32.5	27.0	9.5	640	1.86
AT-18	H	36.0	30.5	10.5	715	1.53
AT-19	H	34.5	28.3	11.9	630	1.53
AT-20	H	38.0	31.5	11.5	640	1.17
AT-21	M	36.0	28.5	12.0	1055	2.26
AT-22	M	30.0	24.6	10.0	585	2.17
AT-23	M	35.7	29.4	10.5	750	1.65
AT-24	M	25.0	20.0	8.7	310	1.98
AT-25	M	27.6	23.0	8.6	405	1.93
AT-26	H	34.5	28.5	10.6	810	1.97
AT-27	H	31.0	25.0	10.0	510	1.71
AT-28	M	32.0	25.7	10.0	580	1.77
AT-29	H	33.0	27.0	12.0	815	2.27

Anexo 1.1 Datos de los organismos recolectados en campo en el jagüey de Ixtacuixtla y factor de condición. IX=Ixtacuixtla H=hembra M=macho

Clave	Género	Longitud (cm)	L/sin aleta caudal (cm)	Ancho (cm)	Peso (g)	Factor de condición de Fulton (k)
IX 1	M	11.5	9.0	3.0	23.1	1.5
IX 2	M	12.4	10.0	3.4	30.3	1.6
IX3	M	10.1	8.0	3.4	20.5	2.0
IX 4	M	12.3	10.0	3.5	25.1	1.3

Anexo 1.2 Datos de los organismos en condiciones de laboratorio y factor de condición. IX=Ixtacuixtla H=hembra M=macho

Clave	Género	Longitud (cm)	L/sin aleta caudal (cm)	Ancho (cm)	Peso (g)	Factor de condición de Fulton (k)
CTRL 1	M	17.5	13.4	5.3	70.0	1.3
CTRL 2	H	13.5	11.3	4.5	45.0	1.8
CTRL 3	H	15.6	12.0	4.5	60.0	1.6
CTRL 4	H	17.0	13.0	5.0	85.0	1.7
CTRL 5	M	16.5	13.0	5.0	55.0	1.2
CTRL 6	M	19.5	15.5	5.5	85.0	1.1
CTRL 7	M	14.5	11.4	5.0	60.0	2.0
CTRL 8	M	16.5	13.5	5.0	55.0	1.2
CTRL 9	H	15.0	12.0	5.5	55.0	1.6
CTRL 10	M	14.4	13.5	4.5	60.0	2.0

Anexo 2. Protocolo de extracción de ARN según el método del TRIZOL de invitrogen

1. Macerar 0.1 gr de tejido con nitrógeno líquido, transferir a un tubo eppendorf y añadir 1 ml del reactivo TRIZOL (5 ml trizol/gr de tejido), disolver el tejido en el tubo y reposar a 4°C por 24 horas.
2. Agitar con vórtex y centrifugar a 13 000 rpm a temperatura ambiente (25 °C) por 10 min.
3. Transferir sobrenadante a un tubo nuevo y adicionar 200 µL de cloroformo/isoamilico (24:1). En su defecto solo cloroformo agitar vigorosamente en vórtex por 15 segundos e incubar de 1 a 3 min a temperatura ambiente.
4. Centrifugar las muestras a 13 000 rpm por 10 min a temperatura ambiente. Repetir el paso 3 y 4.
5. recuperar el sobrenadante en un tubo nuevo y adicionar 500 µL de isopropanol. Agitar por inversión e incubar de 1 a 12 hrs a una temperatura de -20°C
6. Centrifugar a 13 000 rpm durante 10 min a 4 °C. Decantar el sobrenadante y recuperar la pastilla.
7. Lavar la pastilla con etanol al 70 %.
8. Centrifugar a 13 000 rpm por 10 min a 4°C.
9. Repetir el paso
10. Lavar la pastilla con etanol al 100 %
11. Centrifugar a 13 000 rpm por 10 min a 4°C (eliminar el sobrenadante)
12. Dejar secar la pastilla a temperatura ambiente hasta no ver gotas de etanol.
13. Resuspender la pastilla de ARN en 50 µL de agua ultra pura grado Biología Molecular.
14. Almacenar a -20°C, para su posterior uso.

Anexo 3. Tratamiento de DNAsa con RQ1 RNase-free (PROMEGA)

1. las muestras de RNA con Trizol

RNA (H ₂ O)	50 µL
10x reacción buffer RQ1	6 µL
RQ1 enzima	2 µL
H ₂ O	2 µL
Vol. Final	60 µL

2. Incubar a 37°C durante 30 min.

3. limpieza fenol: cloroformo las muestras se llevan a 500 µL con H₂O

4. Adicionar un volumen de fenol: cloroformo (1:1), mezclar vórtex y centrifugar 13 000 rpm por 10 min a 4 °C.

5. transferir el sobrenadante, adicionar un volumen de cloroformo: isoamilico (24:1) mezclar bien y centrifugar a 13 000 rpm por 10 min a 4 °C.

6. tomar el sobrenadante y precipitar con 1.5 volumen de etanol al 100 % y 0.1 volumen de acetato de sodio 3 M con pH 5.2.

Se deja incubar por 1 hr a -20° C

7. centrifugar a 13 000 rpm por 10 min a 4 °C, eliminar el sobrenadante y lavar la pastilla con etanol al 75 % (500 µL)

8. repetir el paso 7

9. centrifugar a 13 000 rpm por 10 min a 4 °C, eliminar el sobrenadante y lavar la pastilla con etanol al 100 % (500 µL)

10. Dejar secar la pastilla a temperatura ambiente hasta no ver gotas de etanol.

11. Resuspender la pastilla de ARN en 30 µL de agua ultra pura grado Biología Molecular (H₂O meq)

12. Almacenar a -20°C, para su posterior uso.

Anexo 4. Protocolo de síntesis de ADNc de acuerdo al protocolo PROMEGA

1. Preparar la siguiente reacción:

RNA	1 – 5 μ l
Primer (oligo dT) 10 mM	1 μ l
H ₂ O meq	- μ l
vol. final	14 μ l

2. Incubar a 70 °C por 5 min, transferir inmediatamente a hielo por 5 min

3. Agregar la siguiente reacción

5X buffer de reacción.	4 μ l
dNTPs	1 μ l
Enzima transcriptasa reversa	1 μ l

4. Volumen total de ADNc por reacción 20 μ l por tubo

5. Incubar a 42°C por 1 hr.

6. Se desactiva la enzima a 70 °C por 15 min.

7. Conservación a -4 °C

Anexo 5. Reacción en cadena de la polimerasa (RT-PCR).

1. Preparar la siguiente mezcla de reacción "Master Mix"

Buffer PCR 10X	100 μ l
MgCl ₂ 25 mM	60 μ l
dNTP's 10 mM	20 μ l
Enzima <i>Taq</i> DNA polimerasa	5 μ l
H ₂ O grado biología molecular	750 μ l
Vol. Final	900 μ l

2. preparar la siguiente mezcla "mix de cebadores"

Ceb forward 1	0.5 μ l
Ceb reverse 2	0.5 μ l
Master mix	9 μ l

3. Preparar tubos de reacción con 10 μ l de Mix con cebadores y 0.5 μ l de ADNc.

4. Iniciar programa específico en termociclador

94 °C	3 min	}	35 ciclos 500 pb (depende del fragmento)
94 °C	30 s		
Tm 55-65 °C	30 s		
72 °C	30 s		
72 °C	10 min		
4 °C	∞		