



**Centro de Investigación en Alimentación y  
Desarrollo, A.C.**

**RELACIÓN ENTRE TERATOGENESIS, CONTAMINANTES Y  
METILACIÓN DEL ADN EN EMBRIONES DE TORTUGA  
GOLFINA (*Lepidochelys olivacea*)**

---

Por:

**Jesús Rodolfo Martín del Campo Flores**

TESIS APROBADA POR LA


COORDINACIÓN DE ACUICULTURA Y MANEJO AMBIENTAL

Como requisito parcial para obtener el grado de

**DOCTOR EN CIENCIAS**

## APROBACIÓN

Los miembros del comité designado para la revisión de la tesis de Jesús Rodolfo Martín del Campo Flores, la han encontrado satisfactoria y recomiendan que sea aceptada como requisito parcial para obtener el grado de Doctor en Ciencias.




---

Dra. Silvia Alejandra García Gasca  
Director de Tesis



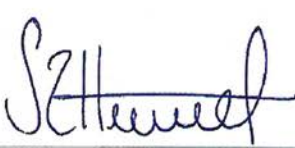
---

Dr. Miguel Betancourt Lozano  
Asesor



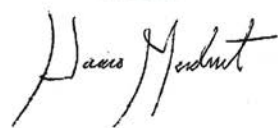
---

Dr. Raúl Antonio Llera Herrera  
Asesor



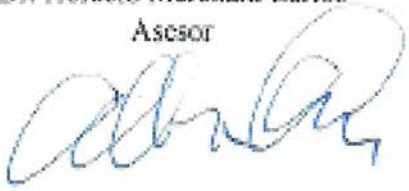
---

Dra. Itzel Sifuentes Romero  
Asesor



---

Dr. Horacio Merchant Larios  
Asesor



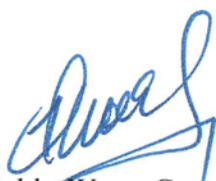
---

Dr. Federico Alberto Abreu Grobois  
Asesor

## DECLARACIÓN INSTITUCIONAL

La información generada en la tesis “Relación Entre Teratogénesis, Contaminantes y Metilación del ADN en Embriones de Tortuga Golfina (*Lepidochelys olivacea*)” es propiedad intelectual del Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, A.C. (CIAD). Se permiten y agradecen las citas breves del material contenido en esta tesis sin permiso especial del autor Jesús Rodolfo Martín del Campo Flores siempre y cuando se dé el crédito correspondiente. Para la reproducción parcial o total de la tesis con fines académicos, se deberá contar con la autorización escrita del Director General del CIAD.

La publicación en comunicaciones científicas o de divulgación popular de los datos contenidos en esta tesis, deberá dar los créditos al CIAD, previa autorización escrita del manuscrito en cuestión del director(a) de tesis.



Dr. Pablo Wong González  
Director General

## AGRADECIMIENTOS

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por el apoyo económico brindado durante los cuatro años del doctorado.

Al Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, A.C. (CIAD) por permitirme realizar esta tesis doctoral como estudiante del programa de posgrado. Así como a la Coordinación de Programas Académicos (CPA) del CIAD, por brindarme el apoyo económico para asistir a dos congresos internacionales y una estancia realizada en el Centro de Investigación y de Estudios Avanzados (CINVESTAV) en Irapuato, Gto.

A mi directora de tesis, la Dra. Alejandra García Gasca, por haberme aceptado en este importante proyecto para mi formación como investigador y como guía para culminar esta tesis doctoral. Así como a Annelisse Bárcenas Ibarra por la colaboración en este proyecto y por la colecta de muestras para esta tesis.

A todos los integrantes de mi Comité por sus aportaciones en esta tesis. A la Dra. Itzel Sifuentes por sus consejos y asesorías, al Dr. Horacio Merchant por su disposición, conocimiento y apoyo brindado, al Dr. Alberto Abreu, Miguel Betancourt y Raúl Llera, que gracias a sus aportaciones se pudo mejorar y finalizar esta tesis.

A la Dra. Gertrud Lund y su auxiliar Dalia Rodríguez Ríos del laboratorio de Epigenética del CINVESTAV, Irapuato por recibirme y capacitarme en su laboratorio. Al Dr. Lenin Yong del LANGEBIO, Irapuato por su colaboración en parte de este proyecto de tesis, sus consejos, experiencia y asesorías sobre análisis epigenéticos. A Jennifer Lynch por sus comentarios constructivos en la parte de ecotoxicología de esta tesis.

A la Dra. Herlinda Soto Valdez del CPA por su apoyo y seguimiento en el programa de Doctorado. Al Coordinador del posgrado de la unidad Mazatlán, Dr. Pablo Almazán, por su trabajo, paciencia y consejos durante todo el programa de Doctorado. Así como a la encargada de biblioteca, M. en C. Elda Izaguirre, por coordinar los seminarios y por su apoyo brindado.

A la M. en C. Rubí Hernández Cornejo por la capacitación en el laboratorio de Biología Molecular. A la Q.F.B. Ma. del Carmen Bolán Mejía por su disposición y ayuda en la parte de clonación. A la M. en C. Karen Enciso Ibarra del laboratorio de Genómica Microbiana por su ayuda y disposición brindada. A las M en C. Irma Eugenia Martínez Rodríguez y la M. en C.

Gabriela Aguilar Zárate por sus aportes en los análisis de ecotoxicología. A la Dra. Luz Vázquez Moreno y la Q.B. María Eugenia Flores Munguía del laboratorio de Residuos Tóxicos del CIAD por los análisis de plaguicidas. Al Lic. Jorge Alberto Durán Niebla por su soporte y apoyo técnico. A mis padres (Vicky y Rodolfo) y hermanas (Normita y Bety), por su inmenso apoyo, comprensión, amor y porque este proyecto es parte de ellos. A mis tíos (Hortencia y Roberto) y primos (Any, Javier y Roberto) por su apoyo y cercanía de toda la vida. Así como a Gabina Chalico, mi abuela materna, porque ha sido un actor muy importante en mi familia y en mi existencia. A mi amiga y mentor, Inge Andersen, porque es parte de mi familia y por su inmenso amor, respeto y buena energía que nos transmite.

A todos mis amigos y compañeros que he conocido durante este camino que se seguirá extendiendo, por todos los gratos momentos que hemos pasado, alegrías, apoyo y porque han dejado su huella en mí: Abril, Alma, Alice, Ana Luisa, Cinthya, Citlalic, Eunice, Julia, Marian, Martha, Alberto Piña, Andrés, Ángel Rojo, Eric Navarro, Fernando Juárez, Luis Terrazas y Mauricio.

A mis colegas y amigos tortugueros por su apoyo y amistad: Alessandra Bielli, Zuleyca, Héctor Contreras, Ingmar Sosa, Joe Pfaller y Fernando Enciso.

A las personas que han formado parte importante durante mi estancia en Mazatlán, a Samuel Gómez por sus comentarios e influencias constructivas. A los amigos que he conocido, por los momentos que hemos compartido y porque han hecho amena mi estancia en Mazatlán: Eva, Tania, Zayra, Enrique Zamora, Fabián, Israel Ascencio, Joksan, José Manuel Tirado, Pablo Orozco y Ramón Camarena.

A mis amigos que aunque físicamente estemos lejos, la amistad nos une, por su apoyo y buenos deseos: Gabina flaca, Leslie, Moni y Vero, Sarahí, Suendy, Ben Guez, Christopher Cernicchiaros, Giovani Mendoza, Iván Zárate, Mike Leverman, Nils Reichstein y Rigoberto Aguayo.

A todos ellos, porque este proyecto también es parte de ellos, gracias a todos!.

## DEDICATORIA

A mis padres (Vicky y Rodolfo),  
hermanas (Normita y Bety)  
y sobrinos (Catherine y Sebastián).

*“No hay un camino a la felicidad: la felicidad es el camino”*

Siddharta Gautama

## CONTENIDO

<b>APROBACIÓN</b> .....	<b>¡Error! Marcador no definido.</b>
<b>AGRADECIMIENTOS</b> .....	<b>4</b>
<b>DEDICATORIA</b> .....	<b>6</b>
<b>CONTENIDO</b> .....	<b>7</b>
<b>LISTA DE FIGURAS</b> .....	<b>10</b>
<b>LISTA DE CUADROS</b> .....	<b>12</b>
<b>RESUMEN</b> .....	<b>13</b>
<b>ABSTRACT</b> .....	<b>14</b>
<b>1. INTRODUCCIÓN</b> .....	<b>15</b>
1.1. Antecedentes.....	17
1.1.1. Generalidades de las Tortugas Marinas .....	17
1.1.2. Tortuga Golfina.....	18
1.1.3. Desarrollo Embrionario en Tortugas Marinas .....	19
1.1.4. Teratogénesis .....	26
1.1.4.1. Definición de teratogénesis.....	26
1.1.4.2. Etiología de la teratogénesis.....	27
1.1.4.3. Teratogénesis en organismos silvestres.....	28
1.1.4.4. Teratogénesis en tortugas marinas.....	29
1.1.5. Medio Ambiente y Desarrollo en Tortugas Marinas .....	30
1.1.5.1. Presencia de contaminantes en tortugas marinas .....	31
1.1.5.2. Transferencia materna de contaminantes.....	32
1.1.5.3. Contaminantes con potencial teratogénico.....	33
1.1.5.3.1. Contaminantes orgánicos persistentes.....	33
1.1.5.3.2. Mercurio.....	34
1.1.6. Mecanismos Epigenéticos y Desarrollo Embrionario .....	35
1.1.6.1. Metilación del ADN.....	37
1.1.6.2. Reprogramación epigenética de la metilación del ADN.....	38
1.1.6.3. Mecanismos de desregulación en la reprogramación epigenética por compuestos disruptores endocrinos.....	42
1.1.6.4. Metilación del ADN en el control transcripcional.....	43
1.1.6.5. Mecanismos epigenéticos en la diferenciación sexual en tortugas.....	43
1.1.7. Modificación de Mecanismos Epigenéticos por Factores Ambientales .....	44
1.2. Justificación .....	46
1.3. Hipótesis .....	46
1.4. Objetivos.....	47
1.4.1. Objetivo General.....	47
1.4.2. Objetivos Específicos .....	47
<b>2. CONTAMINANTES EN EMBRIONES DE TORTUGA GOLFINA</b> .....	<b>48</b>

## CONTENIDO (continuación)

2.1. Plaguicidas Organoclorados en Embriones de Tortuga Golfina .....	48
2.1.1. Introducción.....	48
2.1.2. Metodología.....	49
2.1.3. Resultados.....	51
2.1.4. Discusión .....	52
2.2. Mercurio total (Hg) en Embriones de Tortuga Golfina.....	58
2.2.1. Introducción.....	58
2.2.2. Metodología.....	59
2.2.3. Resultados.....	59
2.2.4. Discusión .....	60
2.3. Conclusiones Generales Sobre la Presencia y Concentración de Plaguicidas Organoclorados y Hg en Embriones de Tortuga Golfina.....	63
<b>3. AISLAMIENTO Y CARACTERIZACIÓN DE LA REGIÓN PROMOTORA DE GENES DE DESARROLLO EMBRIONARIO TEMPRANO EN TORTUGA GOLFINA .....</b>	<b>64</b>
3.1. Introducción.....	64
3.2. Metodología.....	65
3.2.1. Aislamiento de la Región Promotora Putativa de Genes de Desarrollo Embrionario en Tortugas Marinas.....	65
3.2.2. Identificación de Sitios de Unión a Factores de Transcripción y Regiones Reguladoras .....	65
3.3. Resultados.....	67
3.3.1. <i>Nanog</i> .....	67
3.3.2. <i>Sox2</i> .....	69
3.3.3. <i>Bmp5</i> .....	71
3.3.4. <i>Cbx3</i> .....	72
3.3.5. <i>Prrx1</i> .....	75
3.3.6. <i>Pax6</i> .....	77
3.3.7. <i>Mllt1</i> .....	79
3.3.8. <i>Tbx22</i> .....	80
3.3.9. <i>Hoxb9</i> .....	82
3.3.10. <i>Dnmt3b</i> .....	84
3.3.11. Identificación de islas CpG (CGIs).....	88
3.4. Discusión .....	89
<b>4. ANÁLISIS DE METILACIÓN DEL ADN <i>locus</i>-ESPECÍFICO .....</b>	<b>91</b>
4.1. Estatus de Metilación en la Región Promotora Putativa del Gen <i>Pax6</i> en Embriones con Malformaciones Oculares.....	91
4.1.1. Introducción.....	91
4.1.2. Metodología.....	933
4.1.2.1. Colecta de muestras.....	93



4.1.2.2. Secuenciación mediada por bisulfito.....	94
4.1.3. Resultados.....	96
4.1.3.1. Metilación del ADN en la región promotora putativa del gen <i>Pax6</i> .....	96
4.1.3.2. Factores de transcripción y características reguladoras que podrían verse afectados por la metilación de sitios CpG.....	99
4.1.4. Discusión.....	101
4.2. Estatus de Metilación en la Región Promotora Putativa del Gen <i>Hoxb9</i> en Embriones con el Síndrome <i>Schistosomus Reflexus</i> .....	105
4.2.1. Introducción.....	105
4.2.2. Metodología.....	106
4.2.3. Resultados.....	107
4.2.4. Discusión.....	109
<b>5. METILACIÓN GLOBAL DEL ADN Y SU RELACIÓN CON Hg EN EMBRIONES CON SCHISTOSOMUS REFLEXUS Y OTRAS MALFORMACIONES</b> .....	111
5.1. Introducción.....	111
5.2. Metodología.....	114
5.2.1. Elección de Muestras.....	114
5.2.2. Análisis de Metilación Global del ADN.....	114
5.2.3. Análisis Estadístico.....	115
5.3. Resultados.....	115
5.3.1. Concentraciones de Hg.....	115
5.3.2. Metilación Global del ADN.....	116
5.4. Discusión.....	121
<b>6. RELEVANCIA DE LOS RESULTADOS DEL ESTUDIO PARA LA CONSERVACIÓN DE LA TORTUGA GOLFINA Y CONCLUSIONES</b> .....	123
<b>7. BIBLIOGRAFÍA</b> .....	125

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura</b>	<b>Página</b>
1 Principales cambios morfológicos durante las etapas del desarrollo embrionario en testudines con respecto a estadios de desarrollo descritos por Dufaure & Hubert (1961).....	23
2 Factores ambientales que pueden afectar el desarrollo embrionario en tortugas marinas.....	31
3 Dinámica bifásica de desmetilación en PGCs de ratón.....	39
4 Dinámica de desmetilación del ADN durante la pre-implantación embrionaria de ratón.....	41
5 Modificaciones epigenéticas que han demostrado ser alteradas en mamíferos por la exposición a diferentes tipos de compuestos antes del nacimiento.....	45
6 Diagrama de diseño experimental para el análisis de plaguicidas organoclorados en embriones y crías de tortuga golfina.....	50
7 Gráfica de cajas de las comparaciones de la concentración de Hg total entre embriones de tortuga golfina.....	62
8 Caracterización de la región promotora putativa del gen <i>Nanog</i> en tortuga golfina.....	68
9 Caracterización de la región promotora putativa del gen <i>Sox2</i> en tortuga golfina.....	69
10 Caracterización de la región flanqueante 5' del gen <i>Bmp5</i> en tortuga golfina.....	72
11 Caracterización de la región promotora putativa del gen <i>Cbx3</i> en tortuga golfina.....	74
12 Caracterización de la región promotora putativa del gen <i>Prrx1</i> en tortuga golfina.....	76
13 Caracterización de la región promotora putativa del gen <i>Pax6</i> en tortuga golfina.....	78
14 Caracterización de la región promotora putativa del gen <i>Mllt1</i> en tortuga golfina.....	79
15 Caracterización de la región promotora putativa del gen <i>Tbx22</i> en tortuga golfina.....	81
16 Caracterización de la región promotora putativa del gen <i>Hoxb9</i> en tortuga golfina.....	83
17 Caracterización de la región promotora putativa del gen <i>Dnmt3b</i> en tortuga golfina.....	85

## LISTA DE FIGURAS (continuación)

<b>Figura</b>		<b>Página</b>
18	Identificación de islas CpG (azul claro) en la región promotora putativa y 5'UTR de los genes caracterizados para tortuga golfina .....	88
19	Embriones con malformaciones oculares.....	94
20	Estado de metilación en la región promotora putativa del gen <i>Pax6</i> en embriones de tortuga golfina con malformaciones oculares y normales.....	97
21	Estatus de metilación en la región promotora putativa del gen <i>Hoxb9</i> en embriones con SR y normales.....	108
22	Embrión de tortuga golfina que presentó el síndrome schistosomus reflexus.....	113
23	Diagramas de cajas que muestran las concentraciones de Hg y el porcentaje de 5-mC en embriones de tortuga golfina malformados y no malformados.....	118
24	Diagramas de cajas que muestran las desviaciones medias de Hg y del porcentaje de 5-mC en embriones de tortuga golfina malformados y no malformados.....	119
25	Correlación de Pearson entre las concentraciones de Hg y el porcentaje de 5-mC en embriones de tortuga golfina malformados y no malformados.....	120

## LISTA DE CUADROS

Cuadro	Página
1 Estadios basados en cambios en la morfología de embriones de tortugas para cuantificar el patrón temporal de desarrollo, etapas de desarrollo importantes, sistemas de órganos representativos durante estas etapas y porcentaje de incubación.....	21
2 Comparación de Cuadros de desarrollo en testudines de varias especies y autores con respecto a estadios de desarrollo descritos por Dufaure & Hubert (1961) indicados en paréntesis .....	21
3 Mecanismos epigenéticos.....	36
4 Concentraciones promedio $\pm$ desviación estándar de plaguicidas organoclorados en tejido de embriones malformados y crías sin malformaciones de tortuga golfina .....	51
5 Concentraciones de algunos plaguicidas organoclorados en reptiles.....	57
6 Concentraciones promedio de Hg (media $\pm$ SD en peso húmedo) en diferentes tejidos de tortugas marina.....	62
7 Genes que actúan durante el desarrollo embrionario temprano y pudieran estar involucrados con la presencia de malformaciones cráneo-faciales y con el síndrome SR .....	66
8 Función de los factores de transcripción (TF) que pudieran unirse a secuencias reguladoras (sitios de unión de factores de transcripción (TFBS) identificados en la región promotora de los genes caracterizados.....	86
9 Primers utilizados para amplificar islas CpG de la región promotora de los genes <i>Pax6</i> y <i>Hoxb9</i> de ADN de tortuga golfina tratado con bisulfito de sodio.....	95
10 Frecuencia de clones con citosinas metiladas en contextos CpG y CHG dentro de la región promotora putativa del gen <i>Pax6</i> en embriones con malformaciones oculares y normales.....	98
11 Frecuencia de clones con citosinas metiladas en contextos CpG y no-CpG (CHG/CHH) dentro de la región promotora putativa del gen <i>Hoxb9</i> en embriones con SR y normales .....	108
12 Embriones a los que se les midió concentración total de Hg y porcentaje de 5-mC.....	117

## RESUMEN

A pesar de que la tortuga golfina (*Lepidochelys olivacea*) es la tortuga marina más abundante en el mundo, todavía es considerada como una especie en peligro de extinción (según la legislación mexicana) y en estado vulnerable (según la Lista Roja de la IUCN). Reportes en la literatura señalan que en algunos sitios del noroeste del Pacífico mexicano, poblaciones de tortuga golfina presentan una incidencia de malformaciones congénitas del 2%, un valor considerado alto en comparación con otras tortugas marinas. Entre las malformaciones más comunes se encuentran el síndrome schistosomus reflexus (SR) y anomalías craneofaciales. Algunos contaminantes ubicuos, como el mercurio y los plaguicidas organoclorados, pueden estar asociados a malformaciones congénitas, siendo una posible vía de exposición la transferencia materna hacia los huevos y un posible mecanismo las alteraciones en la metilación del ADN durante el desarrollo. Por tanto, el objetivo principal de este estudio fue investigar la relación entre la presencia y concentración de contaminantes (plaguicidas organoclorados y mercurio) y la metilación del ADN (global y *locus*-específica) en embriones de tortuga golfina con malformaciones congénitas de la playa de anidación El Verde Camacho, Sinaloa. Los resultados sugieren que fenotipos aberrantes de tortugas marinas podrían estar (al menos en parte) relacionados con la presencia de plaguicidas organoclorados y mercurio, que el síndrome SR podría estar asociado con niveles elevados de mercurio y metilación del ADN, y que cambios sutiles en la metilación del ADN en los promotores de genes de desarrollo temprano podrían estar relacionados con fenotipos aberrantes en tortugas silvestres.

**Palabras clave:** Plaguicidas organoclorados, Mercurio, Desarrollo embrionario, Metilación del ADN, *Pax6*, *Hoxb9*, Tortuga golfina

## ABSTRACT

Although the olive ridley sea turtle (*Lepidochelys olivacea*) is the most abundant sea turtle in the world, it is still considered an endangered species according to Mexican legislation, and as vulnerable according to the IUCN Red List. In the northwestern Mexican Pacific, the olive ridley shows an incidence of congenital malformations of 2%, a value considered high compared to other sea turtles species. Among the most common malformations are schistosomus reflexus (SR) syndrome and craniofacial anomalies. Ubiquitous contaminants, such as mercury and organochlorine pesticides, may be related to the presence of congenital malformations; maternal transfer to the eggs could be a possible route of exposure, and changes in DNA methylation a possible mechanism for abnormal development. Therefore, the aim of this study was to investigate the relationship between the presence and concentration of pollutants (organochlorine pesticides and mercury) and DNA methylation (global and *locus*-specific) in olive ridley sea turtle embryos with congenital malformations at El Verde Camacho nesting beach, Sinaloa. The results suggest that aberrant sea turtle phenotypes could be (at least in part) related to the presence of organochlorine pesticides and mercury; that the SR syndrome could be associated with high levels of mercury and DNA methylation, and that subtle changes in DNA methylation in promoters of early development genes could be related to aberrant phenotypes in wild turtles.

**Keywords:** Organochlorine pesticides, Mercury, Embryonic development, DNA methylation, *Pax6*, *Hoxb9*, Olive ridley sea turtle

## 1. INTRODUCCIÓN

La teratología es el estudio del desarrollo anormal y malformaciones congénitas, una malformación congénita son todos aquellos defectos estructurales que están presentes al momento del nacimiento e implican la existencia de una alteración intrínseca del tejido afectado (Smith, 1975; Micoló *et al.*, 2000). Las causas de las malformaciones congénitas se pueden dividir en tres categorías: genéticas (25%), ambientales (10%) y desconocidas (65%) (Beckman & Brent, 1984). Actualmente, se considera que la teratogénesis puede tener un origen multifactorial, al interactuar tanto agentes genéticos como ambientales y la complicada interrelación entre éstos (Rojas-Lleonart *et al.*, 2015).

El desarrollo embrionario en tortugas marinas depende ampliamente de las condiciones ambientales (e.g. temperatura, humedad, intercambio de oxígeno, nutrientes, presencia o ausencia de xenobióticos); debido a su condición ovípara, éstas ejercen una gran influencia durante la incubación de los huevos (Spotila, 2004). Las etapas más críticas del desarrollo se presentan durante el desarrollo temprano, cuando se están diferenciando órganos y tejidos (estadios de neurulación y organogénesis) (Needham *et al.*, 2008; Moore *et al.*, 2013). Durante estas etapas, varias hormonas, enzimas, neurotransmisores y citoquinas juegan un papel clave en el desarrollo funcional de los respectivos sistemas fisiológicos; varios factores ambientales pudieran afectar directa o indirectamente los distintos procesos de desarrollo, proliferación y migración celular, desarrollo de neuritas, mielinización, sinaptogénesis o apoptosis (Ujházy *et al.*, 2012).

La tortuga golfina (*Lepidochelys olivacea*) aunque es considerada la tortuga marina más abundante en el mundo está catalogada como una especie “Vulnerable” en la Lista Roja de especies amenazadas de la Unión Internacional por la Conservación de la Naturaleza (Abreu-Grobois & Plotkin, 2008). En el noroeste del Pacífico mexicano, se ha reportado una incidencia de malformaciones congénitas del 2% (Bárcenas-Ibarra & Maldonado-Gasca, 2009; Bárcenas-Ibarra *et al.*, 2015) para esta especie y este índice es considerado alto en comparación con especies de tortugas marinas de otras cuencas oceánicas (Bárcenas-Ibarra *et al.*, 2015).

La presencia de contaminantes químicos pueden afectar la salud, la supervivencia o la reproducción de las tortugas marinas (Hamann *et al.*, 2010). Algunos de estos contaminantes son ubicuos y persistentes, por lo que se conocen como contaminantes orgánicos persistentes (COPs)

y presentan propiedades de biomagnificación y bioacumulación en la cadena trófica (Bernes & Naylor, 1998). Las concentraciones de COPs que se encuentran en los huevos representan la contaminación presente en las zonas de alimentación materna (Alava *et al.*, 2011), esto debido a que los compuestos son transferidos al huevo durante la producción de la yema que se produce meses antes de que las hembras migren a las playas de anidación, frecuentemente alejadas de sus zonas de alimentación.

A partir de bioensayos en organismos modelo se ha identificado que algunos plaguicidas organoclorados y el mercurio (particularmente en su forma orgánica MeHg) presentan potencial teratogénico (Khera, 1973; Weis & Weis, 1977; Hoffman & Moore, 1979; Hoffman & Eastin, 1982; McNutt & Harris, 1994; Colomina *et al.*, 1995; Heinz & Hoffman, 1998; Samson & Shenker, 2000; Bergeron *et al.*, 2010). Estos compuestos, además podrían alterar distintos mecanismos epigenéticos con consecuencias en el desarrollo (Onishchenko *et al.*, 2007; Desaulniers *et al.*, 2009; Bose *et al.*, 2012; Stouder & Paoloni-Giacobino, 2010). Sin embargo, los mecanismos por los que actúan este tipo de compuestos y provocan anomalías en el desarrollo no están bien esclarecidos.

La metilación del ADN es un mecanismo epigenético que tiene un papel fundamental en el control transcripcional (Weber *et al.*, 2007; Meissner *et al.*, 2008; Deaton & Bird, 2011), en el mantenimiento de la estabilidad del genoma (Walsh *et al.* 1998; Consortium, 2001), en la inactivación del cromosoma X (Sado *et al.*, 2000) y en la coordinación de la expresión de la impronta génica (Reik *et al.*, 1987; Davis *et al.*, 1998). Particularmente, durante el desarrollo embrionario este mecanismo guía y restringe la diferenciación celular y evita la regresión a un estado indiferenciado (Messerschmidt *et al.*, 2014). En vertebrados, la metilación de ADN sufre una reprogramación epigenética en la línea germinal y en la pre-implantación del embrión, las cuales son cruciales para que se pueda dar la reproducción sexual y el desarrollo embrionario, respectivamente (Messerschmidt *et al.*, 2014). La exposición a distintos compuestos químicos durante la reprogramación epigenética podría provocar una desregulación de la metilación del ADN, y a su vez producir efectos en los tejidos y órganos en desarrollo (Walker, 2016). Bajo este contexto, en la presente tesis se investigó si había una relación entre la presencia de contaminantes (plaguicidas organoclorados y mercurio) y la metilación del ADN en embriones de tortuga golfina (*Lepidochelys olivacea*) con malformaciones congénitas. Derivado de la revisión de los antecedentes de este proyecto, se publicó un artículo de revisión en la revista *Cytogenetic*



*and Genome Research* (Martín-del-Campo et al., 2018) y otro de difusión en la revista *CiENCiA UANL* (Rodolfo Martín-del-Campo & García-Gasca, 2018).

## 1.1 Antecedentes

### 1.1.1 Generalidades de las Tortugas Marinas

Las tortugas marinas “modernas” aparecieron hace 110 millones de años y son descendientes de un único linaje, en este periodo hubo una alta diversidad de especies, cuando los grandes reptiles como los dinosaurios dominaban el planeta (Spotila, 2004). No obstante, estos se fueron extinguiendo aproximadamente hace 65 millones de años (Paleoceno) cuando un gran asteroide impactó la Tierra cerca de la península de Yucatán en México, evento que desencadenó una serie de cambios climáticos, provocó que muchas especies se extinguieran y a su vez favoreció a aves y mamíferos placentados para dominar el planeta (Spotila, 2004). Sin embargo, las tortugas marinas persistieron a todos esos eventos climáticos y en la actualidad existen siete especies; la más ancestral es la tortuga laúd (*Dermochelys coriacea*) que apareció hace 25 millones de años (Spotila, 2004).

Las tortugas marinas han sufrido una serie de adaptaciones que les han permitido vivir hasta nuestros días. Son organismos poiquiloterms, que dependen de la temperatura del agua y de baños de sol durante el día para regular la temperatura de su propio cuerpo. Su caparazón actúa como protección a sus órganos vitales. Son organismos de respiración pulmonar, que salen a superficie a inhalar oxígeno y posteriormente pueden hacer inmersiones prolongadas y profundas (Plotkin, 2010). Poseen grandes espacios en el cráneo que albergan glándulas encargadas de excretar el exceso de sal, lo que les permite mantener un balance interno de sales y líquidos (Márquez, 1990). Se reproducen de forma sexual con fecundación interna, las hembras pueden anidar de forma anual, bianual o trianual, dependiendo de la especie, de la disponibilidad de energía y de cambios ambientales. Las hembras pueden almacenar esperma por largo tiempo en unos pliegues de la parte media de los oviductos, el cual puede mantener su viabilidad para

fertilizar los óvulos de la siguiente temporada de reproducción (Márquez, 1990). Además, las hembras pueden aceptar el cortejo de varios machos durante una misma temporada de reproducción, por lo que las crías de una misma hembra pueden ser de distintos machos, lo que se conoce como paternidad múltiple (Jensen *et al.*, 2006).

En México, llegan a aguas territoriales y playas de anidación seis de las siete especies de tortugas marinas que existen en el mundo: tortuga laúd (*Dermochelys coriacea*), tortuga carey (*Eretmochelys imbricata*), tortuga caguama (*Caretta caretta*), tortuga verde (*Chelonia mydas*), tortuga lora (*Lepidochelys kempii*) y tortuga golfina (*Lepidochelys olivacea*). Todas consideradas bajo cierto grado de amenaza o en peligro de extinción (IUCN, 2019). La única especie que no llega a México, endémica de Australia, y no considerada bajo amenaza es la tortuga plana (*Natator depressus*) (IUCN, 2019).

### **1.1.2 Tortuga Golfina**

La tortuga golfina es el objeto de estudio de la presente tesis y es considerada la tortuga marina más abundante en el mundo, tiene una distribución circuntropical (excepto en el Golfo de México) y sus principales sitios de anidación ocurren en la costa oriental de la India y el Pacífico nor-oriental, específicamente en Costa Rica y México (Abreu-Grobois & Plotkin, 2008). En el Pacífico mexicano, la tortuga golfina anida desde la punta de la península de Baja California Sur hasta Chiapas (Márquez, 1990) entre los meses de julio y enero en dos modalidades: solitaria y “arribada”, esta última estrategia de anidación es única del género *Lepidochelys* en la que cientos o miles de hembras llegan a anidar de forma sincrónica a algunas playas específicas durante varios días (Márquez, 1990; Pritchard, 2007).

La tortuga golfina es una especie realmente nómada, los movimientos postcopulatorios entre machos y hembras no son muy distintos (Morreale *et al.*, 2007), pueden nadar miles de kilómetros en busca de alimento, no se mueven a través de corredores migratorios aparentes, más bien parecen vagar hacia zonas con disponibilidad de alimento y moverse entre distintas masas de agua en el transcurso del año, usando como principal indicador ambiental la temperatura

superficial del agua, ya que dependen de ésta para regular la temperatura de su propio cuerpo (Spotila, 2004).

En México, la industria de la captura de tortuga golfina inició en los años 60s y se calcula que tan sólo entre 1965 y 1970 se capturaron 2 millones de individuos frente a las costas mexicanas (Peñaflores-Salazar *et al.*, 2000; Spotila, 2004). Esta práctica aunada con la extracción de huevos en las playas de anidación condujo a un descenso gradual en el número de anidaciones y de individuos observados en altamar. Otras actividades humanas como la destrucción de hábitat en zonas de anidación, presencia de contaminación y la captura incidental también han repercutido en dicho descenso (Pritchard 1997). Debido a estas amenazas y al continuo descenso en sus poblaciones, en 1990 fue oficialmente protegida en México (DOF, 1990). Actualmente la legislación mexicana la cataloga como una especie “en peligro de extinción” (SEMARNAT, 2010), permanece como “vulnerable” en la Lista Roja de especies amenazadas de la Unión Internacional por la Conservación de la Naturaleza (Abreu-Grobois & Plotkin, 2008) y está incluida en el apéndice I de la Convención sobre el Comercio Internacional de Especies Amenazadas de Fauna y Flora Silvestres (CITES, 2017).

### **1.1.3 Desarrollo Embrionario en Tortugas Marinas**

Las tortugas marinas forman parte del grupo de los reptiles y pertenecen al grupo monofilético de los amniotas (junto con aves y mamíferos), cuya característica que los distingue de los no-amniotas (peces y anfibios) es que el embrión se encuentra en un ambiente líquido (amnios) y con un complejo sistema de membranas extra embrionarias dentro del huevo (Smithson, 1989). El huevo presenta un recubrimiento protector exterior que no es tan distinto al de los peces y anfibios; las diferencias radican en tres membranas llamadas amnios, alantoides y corion (Colbert, *et al.*, 2001) que tienen la función de rodear al embrión de un líquido (amnios), proporcionar una superficie respiratoria para el embrión y restaurar a la circulación el agua perdida con los desechos (alantoides y corion) (Szarski, 1968). El vitelo es parte del citoplasma del cigoto que contiene elementos nutritivos tales como lípidos y carbohidratos y es aportado en su mayoría por el óvulo, almacena los nutrientes que posteriormente pasarán al organismo a

través de los vasos de su superficie y es absorbido por un saco vitelino, que está situado fuera del embrión y conectado por un tallo (Szarski, 1968).

El desarrollo embrionario implica dos procesos principales, la diferenciación (el origen de los tejidos y los órganos) y el crecimiento; en tortugas marinas se documenta en estadios, los cuales describen las características de los embriones debido a cambios en su morfología, pero no relacionadas con ningún momento particular durante la incubación, ya que el periodo de incubación dependerá de la temperatura (Andrews, 2004). La fertilización es interna y hay un periodo de retención en el oviducto para lo cual se presenta un arresto embrionario durante el estadio de gástrula hasta que ocurre la ovoposición; ésta marca la transición entre el desarrollo embrionario dentro de la madre y en el ambiente (Andrews & Mathies, 2000).

La descripción de la tabla de desarrollo de Miller (1985) para distintas especies de tortugas marinas (*C. mydas*, *C. caretta*, *D. Coriacia*, *E. mbricata*, *N. Depressus*, *L. olivacea*) es la mejor caracterizada, ya que incluye estadios durante la preovoposición. La tabla de desarrollo de *Chelydra serpentina* (Yntema, 1968) también ha sido usada como referencia para estudios en otros testudines. No obstante, debido a que el desarrollo embrionario entre reptiles es muy conservado, Andrews (2004) estandarizó las tablas de desarrollo que se habían propuesto hasta el momento, tomando como referencia el desarrollo embrionario del pollo *Gallus gallus* y la tabla de desarrollo de *Larceta vivipara* (40 estadios; Dufaure & Hubert, 1961), ya que cubre toda la secuencia de desarrollo, desde el estadio 1 con el inicio de la división celular, hasta el 40, cuando se produce la eclosión (Andrews, 2004) y es la tabla que se utiliza con mayor frecuencia para asignar estadios embrionarios a otros reptiles (Cuadro 1). El cuadro 2 muestra la comparación de tablas de desarrollo en testudines de varias especies y autores, con respecto a estadios de desarrollo descritos por Dufaure & Hubert (1961).

La fertilización del huevo ocurre en el oviducto, antes de que la albúmina y la cáscara se secreten sobre él (Gilbert, 2010). Se inicia la segmentación (Fig. 1A), que sólo ocurre en el blastodisco (polo animal) mediante mitosis sucesivas, se forma una masa compacta llamada mórula (cada célula es un blastómero) y una banda sincitial (células unidas sin tabicaciones entre ellas) que está en contacto con el vitelo (Gilbert, 2010). A partir de la mórula se produce una reorganización celular y los blastómeros se colocan en la periferia delimitando una cavidad central o blastocele, se forma la discoblástula.

Cuadro 1. Estadios basados en cambios en la morfología de embriones de tortugas para cuantificar el patrón temporal de desarrollo, etapas de desarrollo importantes, sistemas de órganos representativos durante estas etapas y porcentaje de incubación. En paréntesis estadios de desarrollo descritos por Dufaure & Hubert (1961). Tomada y modificada de Andrews (2004).

Apariencia	Etapas	Eventos	Incubación (%)
Surco neural (10); Somitas (16)	Neurulación (10-20)	Capas embrionarias, diferenciación cerebral, capa amniótica, corazón y vasos sanguíneos.	12
Torsión iniciada, cabeza en el lado izquierdo (21); brote del alantoides (25); torsión completa, embrión en su lado izquierdo (25); brotes de las extremidades (27)	Organogénesis (21-29)	Amnios, corion y saco vitelino completos; todos los principales sistemas de órganos en su lugar (circulatorio, nervioso, digestivo, respiratorio, corporal).	25
Cresta epidérmica apical formada en el brote de las extremidades (30); dígitos visibles en la paleta de los miembros (34)	Crecimiento temprano (30-34)	Membrana corion-alantoidea terminada; extremidades y pies, gónadas y hemi-pene presentes.	38
La mandíbula llega al extremo del hocico (35)	Crecimiento tardío (35-40)	Aumento en masa, pigmentación, párpado.	100

Cuadro 2. Comparación de Cuadros de desarrollo en testudines de varias especies y autores con respecto a estadios de desarrollo descritos por Dufaure & Hubert (1961) indicados en paréntesis. El periodo termosensible (TSP).

	Estadios de desarrollo de Dufaure & Hubert (1961)					TSP	Referencia
	Fertilización-gastrulación	Neurulación (10-20)	Organogénesis (21-29)	Crecimiento temprano (30-34)	Crecimiento tardío (35-40)		
<i>C. serpentina</i>	0	1-10	11-14	15-18	19-27	15-19	Yntema (1968)
<i>T. scripta</i>			11-14	15-18	19-27	15-19	Greenbaum (2002)
<i>P. sinensis</i>		5-10	11-14	15-18	19-27	15-19	Tokita & Kuratani (2001)
<i>C. picta</i>	0	1-9	10-13	14-18	19-23	14-19	Cordero & Janzen (2014); Mahmoud <i>et al.</i> (1973)
Sea turtles	1-6	7-14	15-19	20-25	26-31	20-27	Miller, (1985)
<i>L. olivacea</i>		1-8	9-12	13-18	19-31	13-19	Crastz (1982)

En la segmentación, el embrión no cambia en tamaño, pero sí en número de células e inmediatamente inicia el proceso de **gastrulación** (Schoenwolf & Smith, 2000), que dará origen a las tres capas embrionarias (ectodermo, mesodermo y endodermo). En la gastrulación ocurren movimientos morfogénéticos en los que la forma general del embrión se altera a medida que se reordenan las posiciones celulares, dando como resultado el plano corporal. Estos movimientos morfogénéticos están bajo el control de una región especializada del embrión conocida como el organizador, en tortugas es llamada “el labio del blastoporo” (Yntema, 1968) y da como resultado al plato blastoporal (Fig. 1B), que definirá los ejes del embrión (Stower *et al.*, 2015). Al llegar al estadio de gástrula se presenta un arresto en el desarrollo, hasta que ocurre la ovoposición, siendo el oxígeno fuera del oviducto el que funciona como una señal ambiental para que el desarrollo pueda proseguir (Ewert, 1985; Williamson *et al.*, 2017).

La diferenciación de órganos da inicio mediante un movimiento morfogénético llamado **neurulación** (Andrews, 2004), en el cual se forma el tubo neural (que da origen al sistema nervioso central) y la cresta neural (Estadios 10-20; Cuadro 1). Estos movimientos morfogénéticos son coordinados dentro del plato blastoporal (i.e. la regresión del labio del blastoporo) y en las capas germinales primarias formadas durante la gastrulación (Fig. 1C). La formación del tubo neural se produce en cuatro etapas reconocibles, aunque se superponen espacial y temporalmente: 1) formación de la placa neural, 2) configuración de la placa neural, 3) flexión de la placa neural y 4) cierre de la placa neural. La alteración en eventos críticos durante la neurulación puede dar como resultado defectos en el tubo neural (Colas & Schoenwolf, 2001; Moore *et al.*, 2013).

La placa neural se forma por el engrosamiento del ectodermo (localizado en medio del embrión) debido a un alargamiento apicobasal de las células ectodérmicas, dando lugar a la formación de un placode, que es un rudimento epitelial plano pero engrosado (Colas & Schoenwolf, 2001). Durante la configuración de la placa neural, ésta continúa espesándose apicobasalmente, y sufre un movimiento de extensión convergente, i.e. se estrecha transversalmente y se alarga rostro-caudalmente. La flexión de la placa neural se inicia a medida que su conformación está en curso e implica la formación de los pliegues neurales en los extremos laterales de la placa neural y la posterior elevación y convergencia de estos pliegues hacia la línea media dorsal. La elevación de los pliegues neurales establece un espacio en forma de canal llamado surco neural, que se

convierte en el lumen del tubo neural primitivo después del cierre del surco neural (Colas & Schoenwolf, 2001).

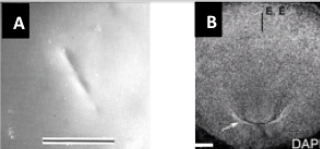
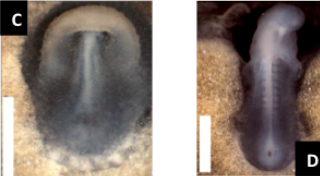
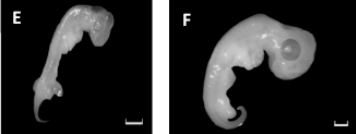
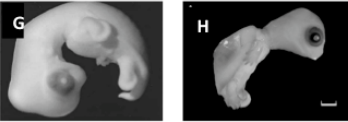

Etapa de desarrollo (Andrews, 2004)	Morfología en tortugas	Eventos	Referencia
Escisión- Gastrulación		Formación del plato blastoporal	Miller, 1985; Stower et al., 2015
Neurulación		Capas embrionarias, diferenciación cerebral, capa amniótica, corazón y vasos sanguíneos	Cordero y Janzen, 2014
Organogénesis		Membranas extraembrionarias completas, todos los principales sistemas de órganos en su lugar	Greenbaum, 2002
Crecimiento temprano		Membrana corion- alantoidea terminada, extremidades y dígitos, gónadas	Tokita y Kuratani, 2001; Greenbaum, 2002
Crecimiento tardío		Aumento en masa, pigmentación, párpado	Cordero y Janzen, 2014

Figura 1. Principales cambios morfológicos durante las etapas del desarrollo embrionario en testudines con respecto a estadios de desarrollo descritos por Dufaure & Hubert (1961). (A) Primera escisión del óvulo fertilizado (barra de escala = 1 mm); (B) gastrulación media, la flecha indica la apertura blastoporal en el epiblasto (Barra de escala = 800  $\mu$ m); (C) inicio de la neurulación mediante el movimiento morfogenético del plato blastoporal (barra de escala = 100  $\mu$ m); (D) presencia de varios pares de somitas y cierre del tubo neural (barra de escala = 1 mm); (E) el embrión se encuentra completamente sobre su lado izquierdo y la mayoría de los órganos se encuentran en su lugar (barra de escala = 1 mm); (F) inicio del brote de las extremidades (barra de escala = 1 mm); (G) cresta epidérmica apical formada en el brote de las extremidades; (H) presencia de dígitos visibles (barra de escala = 1 mm); (I) crecimiento exponencial en masa; (J) eclosión: la mandíbula llega al extremo del hocico, hay pigmentación y párpados completos.

Finalmente, ocurre el cierre del tubo neural (Fig. 1D); la flexión hace que las puntas de los pliegues neurales entren en estrecho contacto en el sitio de la línea media dorsal del embrión. Durante el cierre, las dos puntas se unen y se funden. Cada componente de la punta debe fundirse correctamente, de manera que el epitelio no neuronal forme una lámina continua que recubre la placa superior recién formada del tubo neural y la cresta neural asociada (Colas & Schoenwolf, 2001; Le Douarin *et al.*, 2004).

Durante el cierre del tubo neural, aparece la cresta neural (NC, por sus siglas en inglés), que es una estructura intermedia creada por la interacción entre el ectodermo superficial y la parte más dorsal del tubo neural (Gilbert, 2010). La NC constituye una población de células embrionarias pluripotentes, que migrarán en tiempos precisos del desarrollo para alcanzar sitios embrionarios objetivo, donde finalmente se establecerán y diferenciarán (Le Douarin & Kalcheim, 1999). Para que pueda ocurrir esta migración, las células de la cresta neural (NCC por sus siglas en inglés) adoptarán un patrón morfológico de célula mesenquimatosas (transición epitelio-mesenquimal) que las individualizará tras la pérdida de moléculas de adhesión y las preparará para migrar dentro de los tejidos embrionarios, cuya matriz extracelular será permisiva para la migración celular. Las NCC inician su migración una vez que interactúan con señales entre la NC, el mesodermo adyacente y el ectodermo epidérmico, y darán lugar a neuronas, glía, melanocitos, células endocrinas y a diversos derivados mesenquimales (Le Douarin *et al.*, 2004).

Las células derivadas de la NC craneal migrarán hacia los arcos branquiales y la cara para formar los huesos y el cartílago de la cara y el cuello, así como pigmentos y nervios craneales. La NC vagal y la NC sacra formarán los ganglios entéricos. Las células de la NC del rombo-encéfalo darán origen a las NCC cardíacas. Las NCC del tronco formarán los ganglios simpáticos y un subconjunto de ellas formarán la porción medular de la glándula suprarrenal (Le Douarin *et al.*, 2004; Gilbert, 2010).

Durante el proceso de la formación del tubo neural, simultáneamente ocurre el periodo de **somitogénesis**, en el cual el mesodermo se fragmenta y da lugar a las somitas, que posteriormente formarán las vértebras (Fig. 1D) (Gilbert, 2010). Durante la somitogénesis, el mesodermo presomítico (PSM por sus siglas en inglés) primero aumenta de tamaño y se encoge gradualmente hasta su agotamiento, dando lugar a la formación de las somitas (Tam, 1981). La regulación genética de la somitogénesis se puede describir mediante el modelo 'reloj de segmentación' (Cooke & Zeeman, 1976; Gomez *et al.*, 2008). Este mecanismo impulsa la



activación periódica de las vías señalización de Notch, Wnt y Fgf en el PSM para formar cada una de las somitas (Cooke & Zeeman, 1976). La señal periódica del reloj de segmentación se convierte en una serie repetitiva de somitas formadas por un gradiente de señalización Wnt/Fgf que retrocede caudalmente en el PSM de acuerdo con el alargamiento del eje (Cooke & Zeeman, 1976). La somitogénesis se extiende un poco más durante la organogénesis.

Durante la **organogénesis**, el saco vitelino, el amnios y el corion están completamente formados (Cuadro 1; estadios 21-29; Andrews, 2004). Se inicia la torsión, y una vez completa, el amnios rodea completamente al embrión. El embrión está completamente sobre su lado izquierdo (Fig. 1E). El saco vitelino es vascularizado y por lo tanto puede servir para proporcionar oxígeno al embrión temprano en el desarrollo. Inicia el brote de extremidades, la alantoides es la última membrana extra-embriónica que se forma, emerge como una proliferación del intestino posterior (endodermo y mesodermo) al mismo tiempo o poco después de la terminación del amnios y antes o durante la formación del brote de las extremidades. El alantoides se expande, entra en contacto y se fusiona con el corion, para iniciar la formación de la membrana corion-alantoidea (CAM por sus siglas en inglés) vascularizada que recubre la superficie interna de la cáscara. En este momento la mayor parte del sistema de órganos están en su lugar (circulatorio, digestivo, respiratorio) e inicia el brote de las extremidades (Cuadro 1; Fig. 1F).

Una vez que el embrión y sus estructuras de soporte están en su lugar, el crecimiento se convierte en la característica más visible del desarrollo (Andrews, 2004). Durante el **crecimiento temprano** se observa un aumento en el tamaño del embrión que se acompaña de cambios en el tamaño y la configuración de las membranas extra-embriónicas (Estadios 30-34; Cuadro 1) y la formación de la cresta epidérmica apical en el brote de las extremidades (Fig. 1G) (Deeming & Ferguson, 2004). La CAM está totalmente completa y proporciona una superficie grande para el intercambio gaseoso a través de la cáscara superpuesta y suplanta el saco vitelino como una superficie respiratoria. Extremidades y gónadas han sido formados, los dígitos son visibles en la paleta de los miembros (Fig. 1H), aparece la carúncula (brote córneo en la línea media de la mandíbula superior).

Durante el **crecimiento tardío** se experimenta un crecimiento exponencial en masa del embrión (Estadios 35-40; Cuadro 1; Fig. 1I). La mandíbula inferior alcanza el extremo del hocico, hay pigmentación y formación del párpado. El volumen del líquido amniótico y alantoides aumenta y luego disminuye hacia el final de la incubación, presumiblemente el agua se transfiere al embrión

(Andrews, 2004). La última acción embrionaria es la eclosión; la carúncula en la punta de la mandíbula facilita la ruptura de las membranas embrionarias y de la cáscara (Fig. 1J).

#### **1.1.4 Teratogénesis**

1.1.4.1 Definición de teratogénesis. La teratogénesis es una alteración biológica, bioquímica o funcional inducida durante la gestación por agentes genéticos y ambientales (Smith, 1975; Beckman & Brent, 1984; Micoló et al., 2000; Ujházy et al., 2012; Rojas-Lleonart et al., 2015); mientras que la teratología se encarga del estudio del desarrollo anormal y malformaciones congénitas. Smith (1975) propuso una nomenclatura que desde entonces ha sido aceptada universalmente, separando la malformación de la deformación y de la disrupción (revisado en Micoló et al., 2000). Estos términos cuando se aplican correctamente implican diferencias entre si y orientan sobre el origen en el desarrollo embrionario, están estrechamente relacionados, ya que una malformación puede ocasionar una deformación secundaria, o también una disrupción o viceversa:

I. Malformación congénita: son todos aquellos defectos estructurales que están presentes al momento del nacimiento, e implican la existencia de una alteración intrínseca del tejido afectado y presenta tres variantes:

- a. Aislada: su manifestación es exclusivamente estructural en un solo sitio (por ejemplo microtia).
- b. Malformación como complejo malformativo: dos o más malformaciones vecinas provenientes del mismo origen embrionario (por ejemplo microsomnia hemifacial).
- c. Síndrome polimalformativo: pueden coexistir malformaciones en áreas distantes que no están relacionadas embriológicamente entre sí. Para definirlo como tal, es necesario que se presente un defecto pleiotrópico embrionario (es decir, de un gen que tiene más de un efecto y que afecta múltiples características del fenotipo) que supone diversas manifestaciones del mismo agente etiológico (por ejemplo el síndrome polimalformativo de Goldenhar).

II. Deformación: alteración en la forma o posición de un órgano o región anatómica causada por fuerzas mecánicas externas. El tejido afectado es intrínsecamente normal. Deformación por tanto

se refiere al efecto causado por un factor externo (no embrionario) que no actúa sobre la embriogénesis (por ejemplo asimetrías craneofaciales secundarias producidas por la presión ejercida por las masas ocupantes en la matriz).

III. Disrupción: se habla de disrupción cuando existe falta de continuidad anatómica en uno o varios tejidos, independientemente de la causa que lo originó (por ejemplo la fisura palatina aislada, donde la disrupción se presenta entre las conchas palatinas).

1.1.4.2 Etiología de la teratogénesis. Las causas de las malformaciones congénitas han sido divididas en tres categorías: genéticas (25%), ambientales (10%) y desconocidas (65%) (Beckman & Brent, 1984). Actualmente, se considera que la etiología de la teratogénesis puede tener un origen multifactorial, al actuar agentes genéticos y ambientales, y la complicada interrelación entre éstos (Rojas-Lleonart et al., 2015). Wilson (1973) formuló el concepto de los seis principios de teratología, que son aceptados actualmente: 1) la susceptibilidad del genotipo e interacción con el medio ambiente, 2) el estadio de desarrollo, 3) los agentes teratogénicos que actúan en mecanismos específicos, 4) la naturaleza del agente teratogénico, 5) las cuatro manifestaciones de desarrollo desviado que son letalidad, malformaciones, retraso del crecimiento y deterioro fisiológico, y 6) las anormalidades aumentan conforme aumenta la dosis de un agente teratogénico.

Las etapas más críticas del desarrollo son durante el desarrollo temprano, cuando se están diferenciando órganos y tejidos (estadios de neurulación y organogénesis) (Moore *et al.*, 2013; Needham *et al.*, 2008). Durante estas etapas, varias hormonas, enzimas, neurotransmisores y citoquinas juegan un papel clave en el desarrollo funcional de los respectivos sistemas fisiológicos; varios factores ambientales pueden afectar directa o indirectamente los distintos procesos de desarrollo, proliferación y migración celular, desarrollo de neuritas, mielinización, sinaptogénesis o apoptosis (Ujházy *et al.*, 2012). Algunos agentes teratogénicos que interactúan con el embrión durante el período de desarrollo son los medicamentos, radiación UV, hipertermia, contaminantes, defectos nutricionales, infecciones virales, entre otros (Beckman & Brent, 1984).

Los reportes e investigaciones sobre teratogénesis se han realizado principalmente en el humano y las presuntas causas de defectos de nacimiento son las enfermedades genéticas autosómicas (20%), citogenéticas (5%), ambientales (10%) y desconocidas (65%) (Ujházy *et al.*, 2012). En

medicina humana se han identificado distintos agentes teratogénicos tales como drogas, metales pesados, productos químicos, radiación UV, infecciones intrauterinas, condiciones maternas (desnutrición, abuso de alcohol y cigarro), procedimientos clínicos (inyección intracitoplasmática del esperma –ICSI- o amniocentesis), entre otros (Holmes, 2011).

El episodio de talidomida en la década de 1960 fue un parte aguas en el conocimiento sobre teratogénos ambientales (Ujházy *et al.*, 2012), este fármaco se comercializaba como sedante y como calmante de las náuseas durante los tres primeros meses de embarazo (hiperémesis gravídica), el cual causó miles de casos de malformaciones congénitas (Lenz, 1988). Otra droga que es usada para el tratamiento de epilepsia y con potencial teratogénico es el ácido valproico (VPA), el cual es un inhibidor de la desacetilación de histonas y gracias a bioensayos con organismos modelo se ha establecido que provoca defectos en el tubo neural en organismos expuestos *in utero* durante la gestación temprana; principalmente espina bífida (Nau *et al.*, 1981). Por su parte, Liu *et al.* (2009) reportan que la exposición al alcohol durante la neurulación temprana en ratones provoca retardo general del crecimiento acompañado por alteraciones significativas en el desarrollo del corazón, el tubo neural, las vesículas cerebrales, el sistema óptico y los brotes de las extremidades.

Los contaminantes ambientales pueden causar gran variedad de anormalidades del desarrollo y los bioensayos en organismos modelo han sido una herramienta crucial para identificar compuestos químicos con potencial teratogénico. A partir de un bioensayo con huevos fertilizados provenientes de hembras de gallinas que fueron alimentadas con bifenilos policlorados (PCBs), Cecil *et al.* (1974) reportan el potencial embriotóxico y teratogénico de estos compuestos. Otros contaminantes ambientales han sido identificados como teratogénos a partir de bioensayos por la exposición *in utero* en ratas y ratones, entre los que destacan los plaguicidas organoclorados y cloruro de metilmercurio (Fuyuta *et al.*, 1978; McNutt & Harris, 1994).

1.1.4.3 Teratogénesis en organismos silvestres. Los reportes y estudios en organismos silvestres son menos comunes en comparación con estudios en el humano y organismos modelo debido en parte a que no son compatibles con la vida y al difícil acceso en algunas especies. Algunos estudios son reportes de caso de fenotipos aberrantes identificados en la naturaleza y que suelen ser muy similares a los identificados en humanos o los reproducidos en laboratorio por distintos

agentes teratogénicos (Van Meter et al., 2006). Por ejemplo, se ha identificado tanto polidactilia como ausencia de dígitos en algunas especies de lagartijas (Pelegrin, 2007; Bauer et al., 2009; Minoli et al., 2009; Lazić & Crnobrnja-Isailović, 2012; Adam, 2012), ectromelia en el cocodrilo de Morelet (*Crocodylus moreletii*) o polimelia en la iguana verde (*Iguana iguana*) (Cupul-Magaña et al., 2014). Un caso atípico fue un reporte en camaleón pantera (*Furcifer pardalis*) del norte de Madagascar; el espécimen tenía la columna vertebral frontocaudalmente muy deformada con una protuberancia en el extremo del tórax y una torcedura en la columna lumbar y la pelvis, los miembros posteriores eran anormales y con movilidad limitada; a pesar de las severas malformaciones físicas que presentaba el camaleón, parecía tener buena condición y sobrevivía (Gehring, 2009).

Por otra parte, estudios en ecosistemas altamente afectados por presencia de contaminantes y sus efectos en el desarrollo han sido foco de atención en organismos silvestres que presentan disminución en sus poblaciones y presencia de anomalías en el desarrollo (Hamlin & Guillette, 2010). Por ejemplo, se identificaron anomalías congénitas genitales en una población del lagarto americano (*Alligator mississippiensis*) en lago Apopka, Florida, cuyo habitat presentaba estrogénos xenobioticos (DDT y metabolitos) (Guillette *et al.*, 1994; Guillette *et al.*, 1996), y en la tortuga mordedora (*Chelydra serpentina*) se ha identificado la incidencia de anomalías en el desarrollo (e.g. caparazón, cola, craneofaciales, uñas) asociadas a presencia de contaminantes (PCBs, PCDDs y PCDFs) en los Grandes Lagos y el río San Lorenzo en Norteamérica (Bishop *et al.*, 1998).

1.1.4.4 Teratogénesis en tortugas marinas. En tortugas marinas los estudios sistemáticos que describen y cuantifican las anomalías embrionarias en áreas de anidación naturales son escasos y frecuentemente archivados como reportes internos. Drennen (1990) examinó anomalías embrionarias en la tortuga caguama (*Caretta caretta*) durante 1987 y 1988 en el Refugio Nacional de Vida Silvestre Hobe Sound, Florida, E.U. e identificó una incidencia de malformaciones congénitas del 0.17%; el albinismo fue la malformación más frecuente observada (24.35%), seguido de paladar hendido (15.7%) y anomalías del apéndice (11.4%); la mayoría de las anomalías del cuerpo y de la cabeza (prognatia, anoftalmía, caparazón comprimido, micrognatia, encefalocele) ocurrieron en individuos albinos.

En tortuga golfina de una playa de anidación en Nuevo Vallarta, Nayarit se reporta una prevalencia de anomalías congénitas del 1.8%; las anomalías más frecuentes fueron albinismo,

cráneo-faciales, en extremidades y en la columna vertebral (Bárcenas-Ibarra & Maldonado-Gasca, 2009). Más recientemente, Bárcenas-Ibarra *et al.* (2015) realizaron un extenso estudio sobre la incidencia de malformaciones congénitas en tortuga golfina del noroeste de México, así como de la tortuga verde y carey de la península de Yucatán. Los autores reportaron 63 tipos de malformaciones congénitas (31 para tortuga carey, 23 para tortuga verde y 59 para tortuga golfina). Las tres especies presentaron mayor incidencia de malformaciones en la región cráneo-facial, seguida por el caparazón y las aletas. El índice de malformaciones fue 2% para tortuga carey, 0.2% para tortuga verde y 2% para tortuga golfina. En tortuga golfina los organismos con malformaciones múltiples fueron los más abundantes (74%). Además, Bárcenas-Ibarra *et al.* (2016) reportan para tortuga golfina la presencia del síndrome malformativo schistosomus reflexus, que se caracteriza por presentar alteraciones en la pared abdominal y en la columna vertebral; 31% de los organismos con malformaciones presentó este síndrome; éste fue el primer reporte para quelonios, previamente reportado en otros reptiles (Mulder, 1995; Ianni *et al.*, 2004; Sant'Anna *et al.*, 2013).

### **1.1.5 Medio Ambiente y Desarrollo en Tortugas Marinas**

El desarrollo embrionario en tortugas marinas depende ampliamente de las condiciones ambientales, éstas ejercen una gran influencia durante la incubación de los huevos (Fig. 2). Distintos factores ambientales pueden afectar el desarrollo en tortugas marinas siendo la temperatura un factor importante y limitante (Steyermark & Spotila, 2001). También los cambios en la humedad durante ciertas etapas (Lynn & Ullrich, 1950) y el intercambio de O<sub>2</sub> y CO<sub>2</sub> a través del corion juegan un papel importante durante el desarrollo (Spotila, 2004). Por otro lado, la presencia de contaminantes en sitios de anidación podría afectar el desarrollo (Bishop *et al.*, 1998), sin embargo, un factor de gran importancia es la transferencia materna de nutrientes, hormonas y otros compuestos (incluidos los xenobióticos) a través de la yema (Lynch, 2013; Spotila, 2004), de los cuales depende en gran medida el desarrollo (Fig. 2).

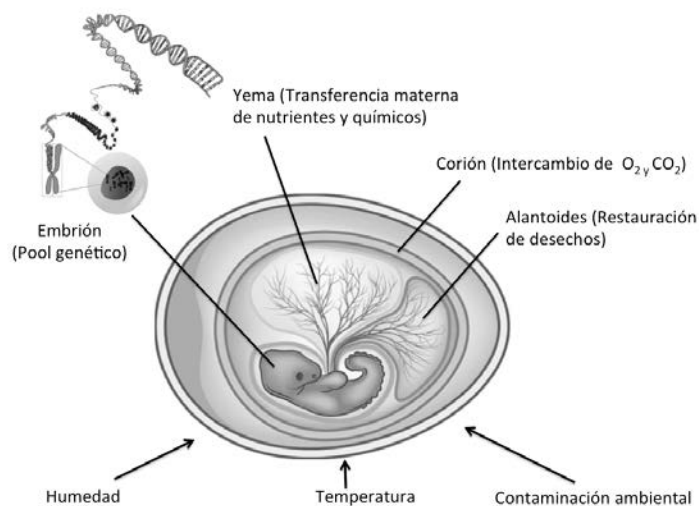


Figura 2. Factores ambientales que pueden afectar el desarrollo embrionario en tortugas marinas.

1.1.5.1 Presencia de contaminantes en tortugas marinas. La presencia de contaminantes químicos pueden afectar la salud, la supervivencia o la reproducción de las tortugas marinas (van de Merve et al., 2010). Algunos de estos contaminantes son ubicuos y persistentes, por lo que se conocen como contaminantes orgánicos persistentes (COPs) y presentan propiedades de biomagnificación y bioacumulación en la cadena trófica (Bernes & Naylor, 1998). En tortugas marinas, la presencia de COPs en concentraciones de mayor a menor es la siguiente:  $\Sigma$ PCBs,  $\Sigma$ DDTs, otros plaguicidas organoclorados ( $\Sigma$ chlordanes,  $\Sigma$ toxaphenes, mirex, dieldrin) y  $\Sigma$ PBDEs (Lynch, 2013).

La mayoría de los COPs se distribuyen en los tejidos con más alto contenido de lípidos; el tejido adiposo (30% -80% de lípidos), el hígado (5% -15% de lípidos) y huevos (5% -10% de lípidos) presentan una mayor concentración de COPs con respecto a otros tejidos corporales (Lynch, 2013). Debido a que la sangre tiene bajo contenido de lípidos (<1%), los niveles de COPs en la sangre son muy inferiores a las concentraciones en grasa, hígado o huevos. Las especies de tortugas con niveles tróficos más altos tienden a acumular mayores concentraciones de COPs, los niveles más altos se han detectado en las tortugas marinas Carey y Lora, seguido de Caguama, laúd y la tortuga verde (Lynch, 2013). La tortuga golfinia es una especie marina omnívora y oportunista (Pritchard, 2007), por lo que sus concentraciones estarían situadas en niveles intermedios entre la tortuga Lora y Caguama (Gardner *et al.*, 2003; Richardson *et al.*, 2010). Algunos estudios que muestran correlaciones entre las concentraciones de COPs y parámetros de

salud o biomarcadores toxicológicos sugieren que la exposición ambiental crónica a los COPs podría estar causando efectos subletales sobre las poblaciones de tortugas marinas (van de Merve *et al.*, 2010).

1.1.5.2 Transferencia materna de contaminantes. Las concentraciones de COPs en los huevos provienen de la contaminación presente en las zonas de alimentación materna (Alava *et al.*, 2011), debido a que los compuestos son transferidos al huevo durante la producción de la yema que se produce meses antes que las hembras migren a las playas de anidación, localizadas frecuentemente lejos de sus zonas de alimentación. La evidencia de la transferencia materna proviene de las correlaciones encontradas entre las concentraciones de COPs en la sangre materna y de huevos de tortugas marinas verde y laúd (Guirlet *et al.*, 2010; van de Merve *et al.*, 2010; Stewart *et al.*, 2011). Algunos bioensayos en reptiles indican que cerca del 90% del contaminante es retenido por la cáscara del huevo y menos del 10% llega al embrión (Crews *et al.*, 1991; Podreka *et al.*, 1998; Portelli *et al.*, 1999; Gale *et al.*, 2002). Además, Basile (2010) demostró que cantidades insignificantes de COPs pueden ser transferidos a huevos de tortuga espalda de diamante (*Malaclemys terrapin*) por sedimentos altamente contaminados y que >98% se transfiere por vía materna.

Las hembras pueden descargar una parte significativa de COPs a sus crías, esta transferencia de la madre se conoce tanto en ovíparos como vivíparos y al parecer es una estrategia de detoxificación (Lynch, 2013). Guirlet *et al.* (2010) demostraron que las concentraciones de COPs disminuyen con puestas posteriores dentro de una misma temporada de anidación y esta disminución a su vez se relacionó con una disminución en el contenido lipídico en los huevos. En tortugas laúd que pueden desovar cada dos o tres años, se ha reportado que las concentraciones de COPs son mayores en huevos de hembras que ponen cada tres años con respecto a los de las hembras que ponen cada dos años (Guirlet *et al.*, 2010).



1.1.5.3 Contaminantes con potencial teratogénico. La presencia de contaminantes en los distintos ecosistemas puede provocar efectos agudos o crónicos en los organismos vivos. Los efectos agudos incluyen reacciones inmediatas como el vómito, náuseas, irritación de los pulmones, erupciones cutáneas, mareos, entre otras; mientras que los efectos crónicos pueden provocar cáncer, teratogénesis, daños en órganos, desórdenes en el sistema nervioso y daños potenciales en el sistema inmune (Maynard, 2000). Se han reportado distintos COPs con potencial teratogénico, tales como plaguicidas (principalmente DDT), bifenilos policlorados (PCBs), dioxinas, furanos e hidrocarburos aromáticos policíclicos (HAP) (Ritter, 1995). También, algunos metales pesados pueden presentar potencial teratogénico, como el cadmio (Cd), plomo (Pb), cromo (Cr) o mercurio (Hg); éste último, es el metal pesado con potencial teratogénico mejor documentado (Eto, 1997). Algunos otros metales como el arsénico, boro o selenio también pueden presentar potencial teratogénico (Léonard & Lauwerys, 1980; Fort *et al.*, 2000; Rudolph *et al.*, 2008).

1.1.5.3.1 Contaminantes orgánicos persistentes. Los contaminantes orgánicos persistentes (COPs) presentan propiedades de biomagnificación y bioacumulación en la cadena trófica (Bernes & Naylor, 1998). Entre estos contaminantes se encuentran los compuestos organoclorados de origen industrial como los bifenilos policlorados (PCBs), biocidas de aplicación agrícolas como el hexaclorociclohexano (HCH) y el dicloro difenil tricloroetano (DDT), otras sustancias cuyo origen está en los procesos de combustión, natural y/o antropogénica, tales como dioxinas, furanos e hidrocarburos aromáticos policíclicos (HAP), o el mercurio en su forma orgánica (metil mercurio; MeHg), ya sea de origen natural o antropogénico, entre otros (Ritter *et al.*, 1995; Boening, 2000).

Los COPs se encuentran en la mayoría de los ecosistemas que tienen interacción con las poblaciones humanas, donde se pueden presentar concentraciones detectables. Se han encontrado prácticamente en cualquier parte del planeta, incluso en los casquetes polares, o en islas remotas del Pacífico (Ritter *et al.*, 1995). Su naturaleza es lipofílica y poseen una capacidad de biodegradación muy baja, lo que los hace muy persistentes en el medio ambiente (Ritter *et al.*, 1995).

Los plaguicidas organoclorados son una clase de COPs que están constituidos de un esqueleto de carbono y algunos átomos de hidrógeno han sido sustituidos por cloro. Según la cantidad y posición de los cloros será la toxicidad del compuesto. Los plaguicidas organoclorados pueden

provocar efectos agudos en concentraciones variables, dependiendo del tipo de plaguicida, así como del tiempo de exposición. Estos compuestos han tomado relevancia por sus efectos a largo plazo; su toxicidad puede provocar carcinogénesis o desórdenes reproductivos e inmunológicos tanto en el humano como organismos silvestres; algunos de estos plaguicidas fueron prohibidos en la década de 1970 (Sanpera *et al.*, 2003).

La mayoría de los plaguicidas organoclorados presentan potencial neurotóxico y son considerados compuestos disruptores endocrinos (EDCs), ya que pueden mimetizar estrógenos al actuar como antiandrogénicos, estrogénicos o antiestrogénicos (Turusov *et al.*, 2002; Schulz, 2004). La exposición a EDCs durante el desarrollo puede provocar alteraciones en la metilación del ADN y la modificación post-traducciona l de histonas (Walker, 2016). Para ver más detalladamente alteraciones de mecanismos epigenéticos ocasionados por plaguicidas organoclorados revisar capítulo 2, sección 2.1.4.

Algunos bioensayos de exposición a plaguicidas organoclorados en organismos modelo han probado que pueden causar malformaciones congénitas; en ratas pueden provocar rotación axial anormal, acumulación de sangre en las superficie cefálica, edema cefálico y desarrollo anormal del arco branquial (McNutt & Harris, 1994); mientras que en aves (*Anas platyrhynchos*) se ha reportado anancefalia y exencefalia (Hoffman & Eastin, 1982). Los mecanismos por los que actúan este tipo de compuestos y provocan anormalidades en el desarrollo aún no están bien esclarecidos.

1.1.5.3.2 Mercurio. El mercurio (Hg) es un elemento químico de origen natural y antropogénico, se distribuye ampliamente en el medio ambiente, y aunque está presente de forma natural en sistemas acuáticos en concentraciones bajas, se puede encontrar en altas concentraciones en la cadena alimenticia debido al fenómeno de bioacumulación (Ullrich *et al.*, 2001). El mercurio se presenta en el ambiente en forma orgánica e inorgánica, y ésta última puede ser biotransformada por bacterias a la forma orgánica, metilmercurio (MeHg), que es la fracción del mercurio total que se transfiere más eficientemente a la cadena alimenticia a niveles tróficos más altos y a su vez es más tóxica (Boening, 2000).

El metilmercurio (MeHg) es causante de la enfermedad de Minamata, identificada en humanos por ingerir productos marinos contaminados (Eto, 1997). En pacientes con la enfermedad de Minamata se han identificado malformaciones congénitas como polidactilia, anormalidades en el

paladar, microcórnea y protrusión del coxis (Harada, 1995). Algunos bioensayos de exposición al MeHg en peces, aves y mamíferos indican que este contaminante provoca principalmente malformaciones esqueléticas, aunque también podría provocar malformaciones ópticas, cardiovasculares, en las extremidades y cráneo-faciales (Khera, 1973; Weis & Weis, 1977; Colomina *et al.*, 1995; Heinz & Hoffman, 1998; Samson & Shenker, 2000); en aves, además puede ser causante de gastroschisis (Hoffman & Moore, 1979). En anfibios, la exposición a Hg total también puede causar principalmente malformaciones axiales (Bergeron *et al.*, 2011), tales como curvatura de la columna vertebral (Unrine *et al.*, 2004). En tortugas marinas se ha sugerido que el Hg contribuye a problemas de salud y prevalencia de enfermedades (Innis *et al.*, 2008) y se ha comprobado la transferencia materna de este contaminante a los huevos (Guirlet *et al.*, 2008; Páez-Osuna *et al.*, 2011).

#### **1.1.6 Mecanismos Epigenéticos y Desarrollo Embrionario**

Los mecanismos epigenéticos son el conjunto de procesos químicos que modifican la actividad del ADN sin alterar su secuencia (Holliday 2006; Berger *et al.*, 2009). Estos mecanismos incluyen la metilación del ADN, las modificaciones post-traduccionales de histonas, la metilación del ARN, el silenciamiento génico mediado por ARNs no codificantes, los complejos de remodelado de cromatina basados en adenosin trifosfato (ATP) y los complejos proteicos Polycomb y Trithorax, entre otros (Cuadro 3) (Bell & Spector, 2011; Yue *et al.*, 2015). Estos mecanismos trabajan en conjunto a diferentes niveles para controlar la regulación de genes y la morfología celular (Barber & Rastegar, 2010).

Cuadro 3. Mecanismos epigenéticos.

Mecanismos epigenéticos	Efectos	Referencias	
Metilación del ADN	Inactivación del cromosoma X	Riggs (2002)	
	Silenciador de la transcripción	Saha <i>et al.</i> (2006)	
	Impronta génica	Stouder & Paoloni-Giacobino (2010)	
	Regulación del ciclo celular, apoptosis, interacción célula-célula	Esteller (2007)	
Metilación del ARN	Regulación de la expresión génica postranscripcional	Yue <i>et al.</i> (2015)	
Modificación post-traducciona de histonas	Acetilación	Cambios en la densidad de la cromatina (activación de la transcripción, replicación y reparación del ADN)	Glaser (2007)
	Metilación	Regulador de la transcripción, reparación del ADN	Shilatifard (2006)
	Fosforilación	Activación de la transcripción, reparación del ADN	Kouzarides (2007)
	Ubiquitinación	Activación de la transcripción	Kouzarides (2007)
	Sumoilación	Silenciador de la transcripción	Kouzarides (2007)
	ADP-ribosilación	Efectos en la transcripción	Kouzarides (2007)
	Deiminación	Silenciador de la transcripción	Kouzarides (2007)
	Isomerización de prolina	Silenciador de la transcripción	Kouzarides (2007)
Remodelado de la cromatina por factores dependientes de ATP	Cambios en la estructura de la composición y posición de los nucleosomas	Saha <i>et al.</i> (2006)	
ARNs no codificantes	Activación y silenciamiento de genes	Pillai <i>et al.</i> (2007)	
Complejos proteicos Polycomb-Trithorax	Activación y silenciamiento de genes	Ringrose & Paro (2007)	

1.1.6.1 Metilación del ADN. La metilación del ADN es un mecanismo epigenético que consiste en la unión covalente de un grupo metilo (-CH<sub>3</sub>) en la posición 5 de una citosina (5-mC), se encuentra con frecuencia en un contexto CpG, aunque también se puede encontrar en un contexto no-CpG, cuya función es poco clara (Lister *et al.*, 2009). Las enzimas DNA metiltransferasas (DNMTs) catalizan la transferencia de un grupo metilo de la S-adenosilmetionina a la quinta posición de una citosina en el ADN (Chen & Li, 2006) e implican dos formas distintas de actividad enzimática: la metilación de mantenimiento (DNMT1) y la metilación de novo (DNMT3A, DNMT3B y DNMT3L) (Bestor, 2000; Bourc'his *et al.*, 2001). Al mismo tiempo, existen dos formas de desmetilación del ADN, la desmetilación pasiva y activa (Wu & Zhang, 2010; Kagiwada *et al.*, 2012).

La metilación del ADN tiene un papel fundamental en el control transcripcional (Weber *et al.*, 2007; Meissner *et al.*, 2008; Deaton & Bird, 2011), en el mantenimiento de la estabilidad del genoma (por ejemplo represión de elementos transponibles) (Walsh *et al.*, 1998), en la inactivación del cromosoma X (Sado *et al.*, 2000), y en la coordinación de la expresión de la impronta génica (Reik *et al.*, 1987; Davis *et al.*, 1998). Este mecanismo es común en eucariotas, desde los hongos hasta los vertebrados, aunque su significado y función varía mucho; en vertebrados, la metilación de ADN sufre una reprogramación epigenética en la línea germinal y en la pre-implantación del embrión (en caso de mamíferos), las cuales son cruciales para que se pueda dar la reproducción sexual y el desarrollo embrionario, respectivamente (Messerschmidt *et al.*, 2014). Particularmente, durante el desarrollo embrionario, cuando las células se están diferenciando, este mecanismo guía y restringe la diferenciación celular y evita la regresión a un estado indiferenciado (Messerschmidt *et al.*, 2014).

1.1.6.2 Reprogramación epigenética de la metilación del ADN. Durante el desarrollo, las células pasan por un proceso de diferenciación que está acompañado de cambios epigenéticos para asegurar que la especificación del tipo de célula sea en sentido único (Messerschmidt *et al.*, 2014). Tales modificaciones epigenéticas son estables y heredables a través de la mitosis, lo que permite un proceso de diferenciación fiel y dirigido a la propagación de los perfiles de transcripción de linaje específicos durante muchas divisiones celulares (Santos *et al.*, 2002). Sin embargo, estas barreras epigenéticas también representan un desafío importante para la reproducción sexual, ya que la preparación para la próxima generación requiere un reseteo del epigenoma a un estado básico totipotente (Hayashi & Surani, 2009).

La preparación para la reproducción sexual es un proceso de tres pasos que consiste en 1) la cancelación de firmas somáticas en los precursores de células germinales (PGCs por sus siglas en inglés) a través de un proceso de reprogramación integral, 2) establecimiento de firmas epigenéticas de sexo-específico y de células-específicas germinales, y el establecimiento de perfiles de transcripción que permiten los procesos de maduración meiótica y fertilización, y 3) la eliminación post-fertilización de estas firmas epigenéticas para activar el programa de desarrollo embrionario y comienzo de un nuevo ciclo de vida (Messerschmidt *et al.*, 2014).

En ratones, organismos en los que la reprogramación epigenética está bien documentada, un pequeño grupo de PGCs se origina a partir del ectodermo embrionario proximal; durante esta fase, las PGCs muestran niveles altos (somáticos) de 5-mC y bajos de 5-hmC (una forma de 5-mC hidroxilada durante la desmetilación activa) (Fig. 3); posteriormente las células migran a lo largo del intestino posterior a las crestas genitales disminuyendo los niveles de 5-mC y aumentando los niveles de 5-hmC (Fig. 3). Finalmente, las PGCs post-migratorias entran en una fase de desmetilación activa (una forma de desmetilación del ADN, Wu & Zhang, 2010) resultando en una casi completa pérdida de 5-mC y un enriquecimiento transitorio de 5-hmC; después del día E11.5, los niveles de 5-mC y 5-hmC son sumamente bajos (Fig. 3); en esta fase, la desmetilación es casi absoluta, con la excepción de unos pocos retroelementos resistentes (Messerschmidt *et al.*, 2014).

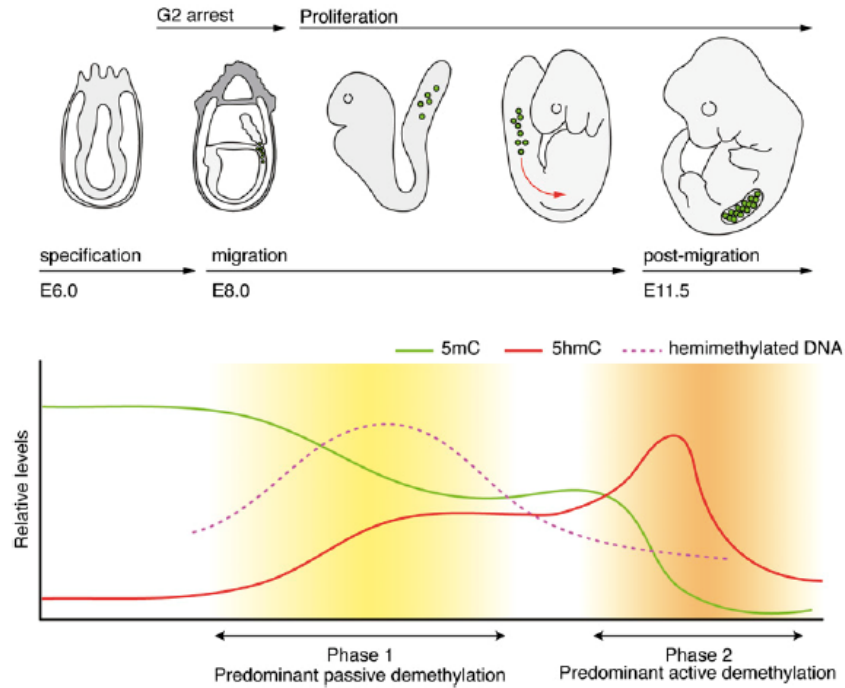


Figura 3. Dinámica bifásica de desmetilación en PGCs de ratón. Las PGCs se derivan del ectodermo embrionario del embrión (E6.5) y muestran niveles altos de 5-mC (línea verde) y niveles bajos de 5-hmC (línea roja). Durante la migración, las PGC proliferan, disminuyen los niveles de 5-mC y aumentan los niveles de 5-hmC. Al mismo tiempo, las hebras de ADN hemimetiladas se acumulan de forma transitoria y posteriormente se pierden (línea discontinua de color púrpura). Las PGCs posmigratorias presentan una pérdida casi completa de 5-mC y un enriquecimiento transitorio de 5-hmC. Tomado de Messerschmidt *et al.* (2014).

El establecimiento de marcas de metilación sexo-específico después de la reprogramación epigenética en PGCs ocurre en diferentes momentos y en diferentes entornos celulares, lo que conduce a patrones de metilación específicos en espermatozoides y ovocitos (Sasaki & Matsui, 2008; Saitou & Yamaji, 2012). Los patrones de metilación en las células germinales masculinas están completamente establecidos en el nacimiento y después se mantienen a lo largo de muchos ciclos de divisiones mitóticas antes de que las células entren en meiosis (Davis *et al.*, 2000). En las hembras, la remetilación de gametos se inicia hasta el nacimiento durante la fase de crecimiento de los ovocitos cuando se encuentran en arresto durante la profase de meiosis I (Kota & Feil, 2010).

La segunda oleada de la reprogramación epigenética global ocurre durante la embriogénesis temprana y es crucial para el establecimiento de pluripotencia (Santos *et al.*, 2002; Santos &

Dean, 2004). El embrión recién formado se somete a desmetilación global del ADN y en el momento en que alcanza la fase de blastocisto temprano (32-64 células) la metilación del ADN está en su punto más bajo (Fig. 4). La reprogramación epigenética durante la pre-implantación del embrión difiere de la de las PGCs en que el genoma del cigoto (que contiene contribuciones haploides de genoma de ovocitos y esperma, cada uno con sus propias propiedades específicas de cromatina) seguirá diferentes cinéticas de desmetilación del ADN después de la fecundación (Fig. 4); además la metilación del ADN de las regiones de genes improntados se conserva, lo que permite la expresión de genes específicos según el origen parental en los tejidos posteriores y la inactivación del cromosoma X paterno improntado se revertirá hasta la etapa de epiblasto tardío (Santos *et al.*, 2002; Santos & Dean, 2004).

El genoma de los espermatozoides maduros muestra de un 80%-90% de metilación global, el nivel más alto de metilación global del ADN de cualquier célula en ratón (Popp *et al.*, 2010); sin embargo, el genoma paterno se encuentra aparentemente desmetilado poco después de la formación del cigoto (Fig. 4; Mayer *et al.*, 2000; Oswald *et al.*, 2000). Esta pérdida puede ser debida a un mecanismo de desmetilación activa, ya que se completa antes del inicio de la replicación del ADN en la etapa pronuclear 3 (PN3). Por el contrario, el genoma materno muestra niveles de metilación global inferiores (40%) y sufre desmetilación pasiva (dependiente de la replicación) (Fig. 4), estableciendo así una asimetría epigenética significativa en el embrión temprano (Fig. 4; Mayer *et al.*, 2000; Oswald *et al.*, 2000; Santos *et al.*, 2002). En la etapa de blastocisto tanto el genoma materno como paterno vuelven a experimentar una remetilación gradual hasta la implantación del embrión (Fig. 4; Messerschmidt *et al.*, 2014).



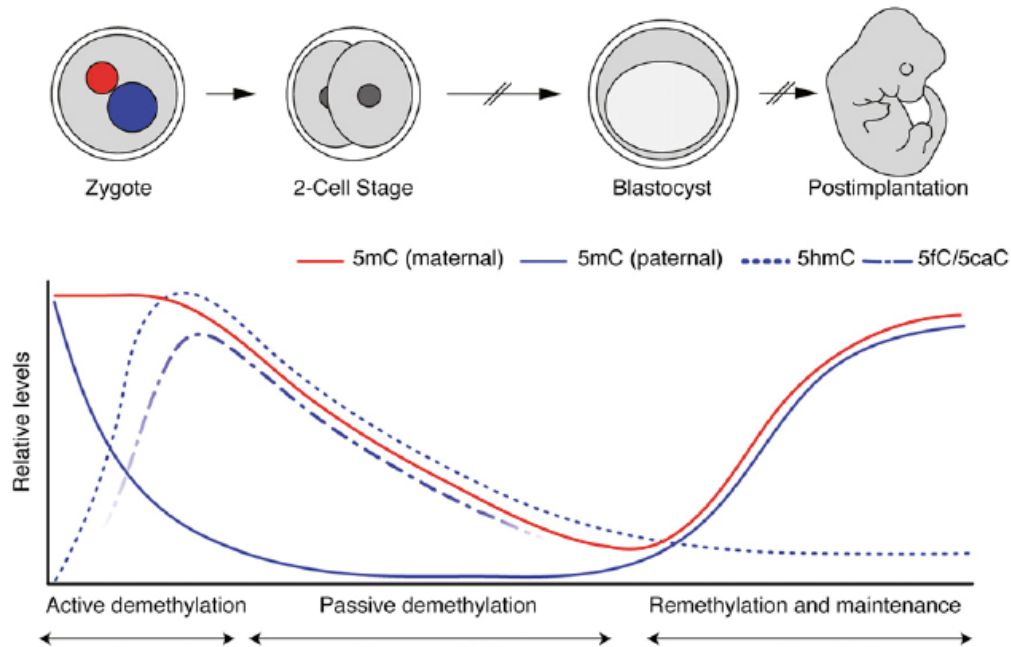


Figura 4. Dinámica de desmetilación del ADN durante la pre-implantación embrionaria de ratón. Las características distintivas de los genomas maternos y paternos imponen una asimetría epigenética en el cigoto. El genoma materno (pronúcleo rojo; línea roja) sufre una dinámica de desmetilación del ADN durante la pre-implantación embrionaria. Las características distintivas de los genomas maternos y paternos imponen una asimetría epigenética en el cigoto. El genoma materno sufre una desmetilación pasiva del ADN durante varias rondas de replicación del ADN. El genoma paterno (pronúcleo azul; líneas azules) experimenta una desmetilación activa antes de que se produzca la replicación del ADN en el cigoto. Al mismo tiempo que sucede la pérdida global de 5-mC paterno, los niveles de 5hmC (línea punteada azul) y los derivados de oxidación adicionales (5fC y 5caC; línea discontinua azul) se enriquecen. Tomado de Messerschmidt *et al.* (2014).

1.1.6.3 Mecanismos de desregulación en la reprogramación epigenética por compuestos disruptores endocrinos. La exposición a compuestos disruptores endocrinos (EDCs por sus siglas en inglés) durante la reprogramación epigenética podría provocar una desregulación de la misma y a su vez producir efectos en los tejidos en desarrollo (Walker, 2016). La metilación del ADN y la modificación post-traducciona de histonas son vulnerables a la disrupción por exposición a EDCs, estos mecanismos pueden ser alterados por diferentes vías, por ejemplo, la disponibilidad alterada de donantes de metilo (pueden modular los niveles de S-adenosil metionina –SAM-, y la actividad de DNA metiltransferasas –DNMTs- e histonas metiltransferasas –HMTs-), la pérdida de la impronta génica, la inhibición de dioxigenasas, la expresión alterada de RNAs no codificantes (ncRNAs) y la activación de las vías de señalización celular que pueden activar o inhibir HMTs (Walker, 2016). Las modificaciones epigenéticas no sólo se heredan durante la mitosis, sino que también podrían transmitirse transgeneracionalmente (Rakyan *et al.*, 2002).

Algunos EDCs podrían alterar la disposición del donante de metilo, mediante la alteración de la vía metionina. La S-adenosil metionina (SAM), que se produce a partir de folato, es el donante de metilo tanto para DNMT como para HMT y la alteración de los niveles de SAM pueden provocar cambios en la metilación del ADN (Walker, 2016). Por ejemplo, en ratones Avy, la exposición materna a bisfenol A (BPA) reduce la metilación del elemento de repetición terminal larga (LTR) presente en un retrotransposón del gen Agouti, promoviendo la expresión ectópica de este gen (Dolinoy, 2008). Esta expresión provoca descendencia con un fenotipo de pelaje amarillo y propensa a obesidad y cáncer. Sin embargo, la afectación a este mecanismo epigenético puede revertirse mediante la suplementación nutricional materna con ácido fólico (donante de metilo), que aumenta los niveles de SAM, incrementa la metilación de LTR y devuelve la expresión de Agouti a niveles normales (Dolinoy, 2008).

La desmetilación activa por la familia dioxigenasas Ten Eleven Translocation (*TET*), que cataliza la reacción 5mC a 5hmC (Chen & Li, 2006; He *et al.*, 2011), también podría verse afectada por EDCs. Jefferson *et al.* (2013) reportan que la exposición neonatal de ratas hembras a dietilestilbestrol (DES) causa alteraciones permanentes en la expresión génica del tracto reproductivo femenino, así como infertilidad y cáncer; estos fenotipos están relacionados con alteraciones en mecanismos epigenéticos. Después del tratamiento con DES, los autores observaron una reducción significativa en la expresión de *TET1* en el útero de las hembras (con

respecto al control), que se correlacionó con la disminución de los niveles globales de 5hmC en el útero adulto (Jefferson *et al.*, 2013).

1.1.6.4 Metilación del ADN en el control transcripcional. El papel de la Metilación del ADN como regulador transcripcional ha sido asociado con promotores de genes que presentan regiones ricas en sitios CpG, llamadas islas CpG (CGIs por sus siglas en inglés), particularmente en genes de desarrollo o de mantenimiento, los cuales permanecen hipometilados incluso si el locus es transcripcionalmente silencioso (Weber *et al.*, 2007; Meissner *et al.*, 2008; Deaton & Bird, 2011). Las CGIs son regiones de aproximadamente 200 pb de longitud, con un contenido de G+C del 50% y una frecuencia de CpG (observada/esperada) de 0.6 (Gardiner-Garden & Frommer, 1987; Illingworth & Bird, 2009). Se considera que la mayoría de las CGIs no están metiladas cuando se encuentran cerca del sitio de inicio de la transcripción (TSS) y cuando se encuentran metiladas están asociadas con el silenciamiento a largo plazo (Jones, 2012). La metilación del ADN del promotor está involucrada en el silenciamiento génico, evitando la unión de factores de transcripción o atrayendo proteínas de unión al ADN metilado (Bird, 2002).

1.1.6.5 Mecanismos epigenéticos en la diferenciación sexual en tortugas. Las tortugas presentan determinación sexual dependiente de la temperatura (TSD por sus siglas en inglés) (Janzen & Paukstis, 1991; Rhen & Schroeder, 2010); en la cual una gónada bipotencial se convertirá en ovario o testículo dependiendo de la temperatura de incubación de los huevos durante un período crítico de desarrollo embrionario, conocido como periodo termosensible (TSP por sus siglas en inglés). Se ha propuesto que ciertos genes transducen la temperatura en una señal biológica para la determinación del sexo y durante este proceso mecanismos epigenéticos, como la metilación del ADN y la modificación post-traducciona de histonas juegan un papel muy importante (Rhen & Schroeder, 2010; Navarro-Martín *et al.*, 2011; Ge *et al.*, 2017).

Venegas *et al.* (2016) analizaron la metilación global y la desmetilación activa del ADN en gónadas de embriones de tortuga golfina antes y después del TSP, y concluyeron que los procesos de metilación y desmetilación están involucrados en el establecimiento de los patrones de metilación del ADN de los ovarios y de los testículos durante el TSP, e indican que los cambios en la metilación del ADN pueden ser necesarios para la estabilización de las redes de expresión génica que impulsan la diferenciación de una gónada bipotencial para formar un ovario

o un testículo. Posteriormente, Ge *et al.* (2017) demostraron que el gen *Dmrt1* es necesario y suficiente para la diferenciación testicular en la tortuga pintada (*T. scripta*). Los autores reportan que la metilación del ADN en el promotor *Dmrt1* responde rápidamente a los cambios de temperatura, lo que podría explicar la expresión dimórfica dependiente de la temperatura de *Dmrt1* (Ge *et al.*, 2017). Posteriormente, corroboraron que la histona desmetilasa KDM6B promueve directamente la transcripción del gen masculino dominante *Dmrt1* al eliminar la trimetilación de H3K27 cerca de su promotor a una temperatura de 26°C (temperatura promotora de machos), lo que provoca la activación del desarrollo masculino en *T. scripta* (Ge *et al.*, 2018).

### **1.1.7 Modificación de Mecanismos Epigenéticos por Factores Ambientales**

El desarrollo es susceptible a factores ambientales, que a su vez pueden afectar mecanismos epigenéticos e interferir en la reprogramación del epigenoma, lo que puede conducir a anomalías en el desarrollo o susceptibilidad a enfermedades en la vida adulta (Lo & Zhou, 2014). A partir de bioensayos en organismos modelo se ha identificado que los bifenilos policlorados (PCBs), algunos plaguicidas organoclorados y el MeHg presentan potencial embriotóxico y teratogénico (Khera, 1973; Cecil *et al.*, 1974; Weis & Weis, 1977; Hoffman & Eastin, 1982; McNutt & Harris, 1994; Colomina *et al.*, 1995; Heinz & Hoffman, 1998; Samson & Shenker, 2000), y aunque el mecanismo (o mecanismos) por el que actúan aún no ha sido esclarecido, algunos de estos compuestos tienen la capacidad de alterar distintos mecanismos epigenéticos. Por ejemplo, Desaulniers *et al.* (2009) sugieren que la metilación del ADN podría verse afectada por la exposición tanto a bifenilos policlorados como a MeHg. La administración del plaguicida metoxicloro a ratas hembras preñadas tiene efectos en el control de la impronta génica, induciendo alteraciones en el patrón de metilación de cinco genes paternal y maternalmente improntados en el esperma de la progenie, que son transgeneracionales, pero desaparecen en F3 (Stouder & Paoloni-Giacobino, 2010).

La mayoría de las investigaciones sobre la exposición a distintos factores ambientales durante la gestación se han enfocado en la medicina humana y se han reportado las modificaciones epigenéticas que distintos factores ambientales pueden provocar (Fig. 5). Por ejemplo, el alcohol está reportado que altera la vía de la metionina (Pal-Bhadra *et al.*, 2007), la modificación post-

traduccional de histonas (Pandey *et al.*, 2008) o la expresión de miRNAs (Fineberg *et al.*, 2009) (Fig. 5). Contaminantes ambientales, como el mercurio también podrían alterar la metilación del ADN o la modificación post-traduccional de histonas (Fig. 5) (Onishchenko *et al.*, 2007; Bose *et al.*, 2012). Existen muchos otros agentes ambientales y nutricionales que podrían provocar cambios en el epigenoma, sin embargo las consecuencias dependerán del estadio en desarrollo, dosis, tiempo de exposición, así como de factores genéticos (Wilson, 1973; Beckman & Brent, 1984; Lo & Zhou, 2014).

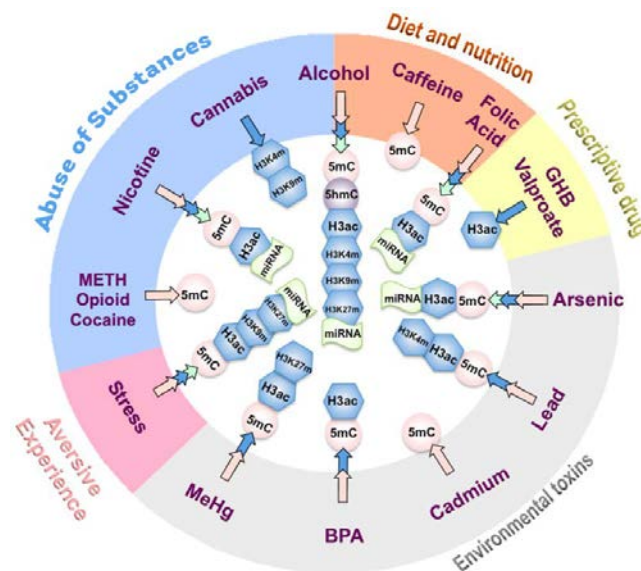


Figura 5. Modificaciones epigenéticas que han demostrado ser alteradas en mamíferos por la exposición a diferentes tipos de compuestos antes del nacimiento. Estos factores se dividen en cinco categorías dependiendo de su naturaleza y formas de acceso (dieta y nutrición, medicamentos, toxinas ambientales, experiencia adversa, abuso de drogas). Tomado de Lo & Zhou (2014).

## 1.2 Justificación

El desarrollo embrionario en tortugas marinas depende ampliamente de las condiciones ambientales. En tortuga golfina del noroeste del Pacífico mexicano se ha reportado una prevalencia de malformaciones congénitas del 2%, un índice considerado alto en comparación con especies de tortugas marinas de otras cuencas oceánicas (Bárceñas-Ibarra *et al.*, 2015). La presencia de contaminantes como plaguicidas organoclorados y Hg es ubicua, ambos son reportados como agentes teratógenicos y en tortugas puede haber transferencia materna a los huevos. Además, estos contaminantes también pueden alterar algunos mecanismos epigenéticos (como la metilación del ADN) que juegan un papel central en el desarrollo. Por lo anteriormente expuesto, el presente estudio investigó la compleja relación entre teratogénesis, contaminantes (plaguicidas organoclorados y Hg) y metilación del ADN en embriones de tortuga golfina.

## 1.3 Hipótesis

- La presencia de malformaciones congénitas en embriones de tortuga golfina está asociada a la presencia y concentración de contaminantes como son los plaguicidas organoclorados y Hg.
- La presencia de malformaciones congénitas en embriones de tortuga golfina está relacionada a las alteraciones en la metilación de promotores de genes clave en el desarrollo embrionario temprano y en la metilación global del ADN.

## 1.4 Objetivos

### 1.4.1 Objetivo General

Establecer una posible asociación entre la concentración de contaminantes (plaguicidas organoclorados y Hg total) y los niveles de metilación del ADN (tanto global como *locus*-específico) en embriones de tortuga golfina con malformaciones congénitas.

### 1.4.2 Objetivos Específicos

1. Cuantificar las concentraciones de plaguicidas organoclorados y Hg en embriones malformados y embriones no malformados.
2. Aislar y caracterizar promotores de algunos genes de desarrollo embrionario temprano en la tortuga golfina.
3. Determinar el estatus de metilación *locus*-específico de genes de desarrollo temprano en embriones malformados y comparar con embriones no malformados.
4. Determinar el estatus de metilación global en embriones malformados y comparar con embriones no malformados.

## 2. CONTAMINANTES EN EMBRIONES DE TORTUGA GOLFINA

Se cuantificó la concentración de plaguicidas organoclorados y Hg en embriones malformados y no malformados. El presente capítulo se separa en dos secciones: plaguicidas organoclorados y Hg, ya que para el análisis de plaguicidas organoclorados se hicieron pools de los embriones y para el de Hg el análisis se realizó de manera individual.

### 2.1 Plaguicidas Organoclorados en Embriones de Tortuga Golfina

#### 2.1.1 Introducción

Los plaguicidas organoclorados son ubicuos y se consideran contaminantes orgánicos persistentes cuyo proceso de degradación es muy lento y presentan potencial de transporte ambiental (Ritter *et al.*, 1995). Estos compuestos han tomado relevancia por sus efectos a largo plazo; su toxicidad puede provocar desórdenes reproductivos e inmunológicos tanto en el humano como en organismos silvestres; algunos de estos plaguicidas fueron prohibidos en la década de 1970 (Sanpera *et al.*, 2003). Bioensayos en organismos modelo han demostrado que algunos plaguicidas organoclorados pueden provocar malformaciones congénitas (Hoffman & Eastin, 1982; McNutt & Harris, 1994).

Los plaguicidas organoclorados pueden ser transferidos a los huevos (Alava *et al.*, 2011) y son los compuestos orgánicos persistentes que más se han identificado en estudios de tortugas marinas, únicamente superados por los PCBs (Lynch, 2013). Algunos estudios sugieren que los plaguicidas organoclorados pueden contribuir a problemas de salud, prevalencia de enfermedades, teratogénesis, mortalidad o bajo éxito de eclosión en tortugas marinas (Aguirre *et al.*, 1994; Lynch, *et al.*, 2004; van de Merve *et al.*, 2010).

En la presente sección se reportan y comparan la presencia y concentración de plaguicidas organoclorados en embriones normales y aquellos que presentaron malformaciones congénitas en



la playa de anidación El Verde Camacho, Sinaloa durante la temporada de anidación 2012. Estos resultados conforman un capítulo en el libro “El uso del conocimiento de las tortugas marinas como herramienta para la restauración ecológica” editado por la Universidad Autónoma del Carmen (en prensa).

### **2.1.2 Metodología**

En un estudio previo realizado en la playa de anidación El Verde Camacho en México (23°44'22"N, 106°58'27"W), se generó durante la temporada de anidación del 2012 un catálogo de malformaciones congénitas (Bárcenas-Ibarra *et al.*, 2015). Se identificaron ocho nidos con incidencias bajas (~1-6%) de embriones malformados y tres nidos sin embriones malformados, cuya recaptura fue posible de 13 a 17 días después de la primera anidación (Fig. 6). Así mismo se identificó un solo nido con una alta incidencia (~25%) de embriones malformados, pero del cual no se obtuvo recaptura. Los embriones malformados y dos crías muertas sin malformaciones aparentes provenientes de nidos sin embriones malformados se colectaron en papel aluminio (previamente limpiado con acetona y hexano) y se preservaron a -20°C para el análisis posterior de plaguicidas organoclorados.

El análisis de plaguicidas se llevó a cabo en el Laboratorio de Residuos Tóxicos del CIAD. Los embriones se separaron en grupos según la incidencia de embriones malformados por nidos de la siguiente manera (Fig. 6):

1. Embriones malformados de un nido que presentó alta incidencia (~25%) de embriones malformados (n=15 embriones).
2. Embriones malformados provenientes de 16 nidos (y 8 hembras distintas) que presentaron baja incidencia (~1-6%) de embriones malformados, separados en cuatro grupos (n = 11, 9, 10 y 13 embriones por grupo respectivamente).
3. Crías sin malformaciones externas de seis nidos (y tres hembras distintas) que no presentaron malformaciones aparentes, estas crías llegaron a término y eclosionaron, pero no emergieron por lo que murieron dentro del nido, se separaron en dos grupos (n = 6 crías por grupo).

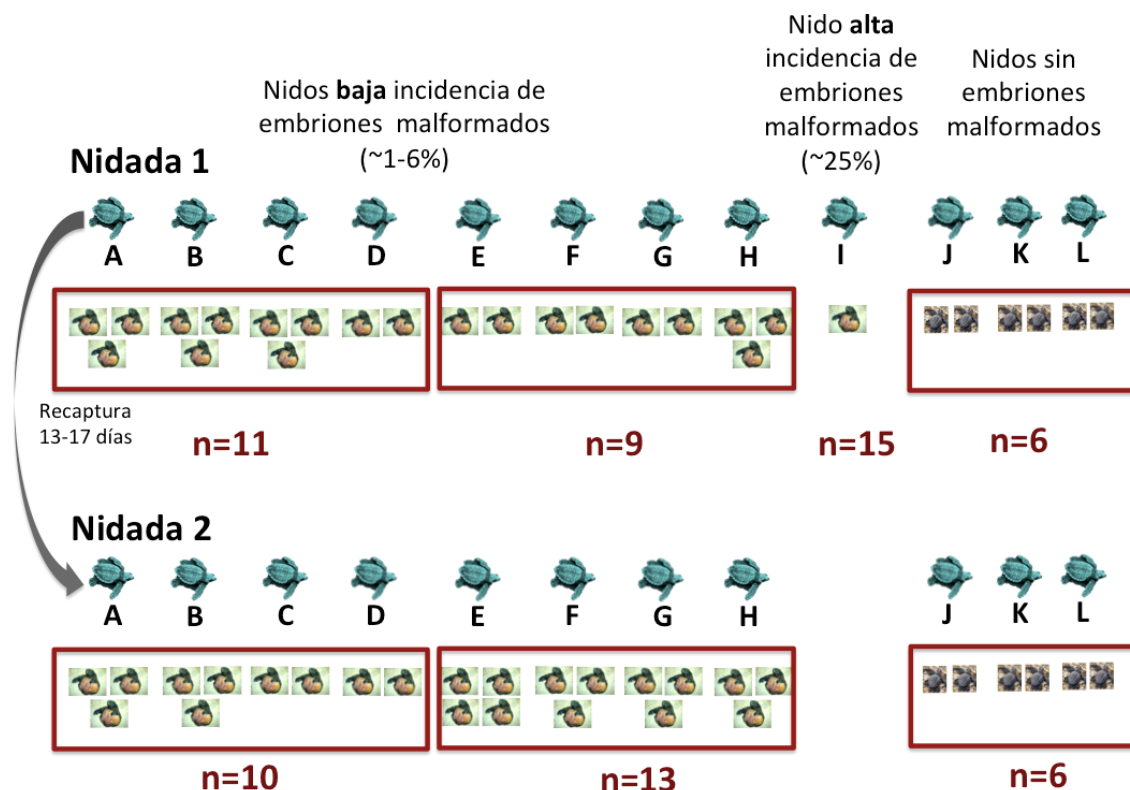


Figura 6. Diagrama de diseño experimental para el análisis de plaguicidas organoclorados en embriones y crías de tortuga golfin. Las muestras se separaron en siete pools según la procedencia de nidos: con alta o baja incidencia de embriones malformados o de nidos sin embriones malformados. Cada una de las letras mayúsculas indica una hembra distinta; n: número de embriones por pool.

La extracción de plaguicidas de tejidos de embriones y crías se realizó mediante extracción líquido-sólido de acuerdo al método 3545A (USEPA, 1998). Los tejidos se pesaron, se liofilizaron y se volvieron a pesar para obtener el porcentaje de humedad. Posteriormente, se molieron y se mezclaron en un mezclador de rodillos a velocidad constante. Se pesó  $1.0 \pm 0.02$  g de la muestra, se agregaron 5 ml de hexano, se agitó y centrifugó. Los extractos se concentraron hasta un volumen final de 0.5 ml en baño de vapor a  $40^{\circ}\text{C}$ . La detección y cuantificación de plaguicidas de los tejidos de embriones se realizó por cromatografía de gases con detector de microcaptura de electrones (Agilent Technologies, modelo 6890N) de acuerdo al método 8081B (USEPA, 2007). Se preparó la columna cromatográfica, DB35-MS, y se inyectó 1.0  $\mu\text{l}$  de extracto. Para la cuantificación de plaguicidas organoclorados se utilizó una solución estándar de

48858-U (SUPELCO Analytical ®). Para la extracción y cuantificación de lípidos se usó la metodología propuesta por Gallina *et al.* (2003). Las concentraciones de plaguicidas organoclorados identificadas en los tejidos embrionarios se presentan en peso húmedo, peso seco, y peso basado en lípidos para poder realizar comparaciones futuras. No se realizaron análisis estadísticos ya que las muestras fueron analizadas en pools que no permitieron hacer dichos análisis y solamente se reporta la presencia de los plaguicidas identificados.

### 2.1.3 Resultados

Se identificó la presencia de tres compuestos clorados: heptacloro, endosulfán y DDE (Cuadro 4). El heptacloro y el DDE fueron identificados en todos los grupos, mientras que el endosulfán sólo se identificó en embriones malformados provenientes del nido con alta incidencia de malformaciones. El porcentaje de recuperación de los analitos detectados fue  $\geq 85\%$  (heptacloro: 97%, endosulfán: 85% y DDE: 87%).

Cuadro 4. Concentraciones promedio  $\pm$  desviación estándar de plaguicidas organoclorados en tejido de embriones malformados y crías sin malformaciones de tortuga golfina. Límite de detección en peso seco para heptacloro y endosulfán:  $3.2 \text{ ng g}^{-1}$ ; para DDE:  $0.5 \text{ ng g}^{-1}$ .

	Compuestos organoclorados	Nido con alta incidencia de embriones malformados	Nidos con baja incidencia de embriones malformados	Nidos sin embriones malformados
Peso húmedo ( $\text{ng g}^{-1}$ )	Heptacloro	5.35	$3.17 \pm 0.04$	$5.03 \pm 2.84$
	Endosulfán	2.40	-	-
	DDE	1.75	$1.96 \pm 0.18$	$1.79 \pm 0.02$
Peso seco ( $\text{ng g}^{-1}$ )	Heptacloro	11.60	$6.93 \pm 0.49$	$14.25 \pm 8.13$
	Endosulfán	5.20	-	-
	DDE	3.80	$4.49 \pm 0.15$	$5.08 \pm 0.04$
Peso basado en lípidos ( $\text{ng g}^{-1}$ )	Heptacloro	33.07	$26.19 \pm 3.20$	$55.51 \pm 18.43$
	Endosulfán	14.82	-	-
	DDE	10.83	$17.19 \pm 1.82$	$21.4 \pm 5.78$

#### 2.1.4 Discusión

Mientras que en embriones no malformados se identificaron niveles de heptacloro y DDE, en embriones malformados de tortuga golfina también se se identificó endosulfán. Los tres compuestos han sido reportados como teratogénicos (Le Marchand *et al.*, 1986; Slama & Cordier, 2010). El endosulfán sólo se encontró en los embriones malformados provenientes del nido con alta incidencia de malformaciones.

Se han realizado pocos estudios de contaminantes organoclorados en huevos de tortugas marinas (Cuadro 5; Aguirre *et al.*, 1994; Mckenzie *et al.*, 1999; van de Merwe *et al.*, 2010), sin embargo, se ha reportado la transferencia materna de este tipo de contaminantes (van de Merwe *et al.*, 2010; Stewart *et al.*, 2011). Las concentraciones identificadas de heptacloro y DDE, que fueron los contaminantes presentes en embriones malformados y no malformados, son similares a los reportes en otras especies; mientras que los reportes de endosulfán son escasos para tortugas marinas.

Comparaciones generales apoyan la conclusión de que tortugas marinas con mayor nivel trófico presentan concentraciones de organoclorados más elevados: niveles más altos en las tortugas marinas Carey y Lora, seguido de Caguama, laúd y la tortuga verde finalmente (Lynch, 2013). La tortuga golfina es una especie marina omnívora y oportunista (Plotkin, 2010) y sus concentraciones estarían situadas en niveles intermedios entre la tortuga Lora y Caguama (Gardner *et al.*, 2003; Richardson *et al.*, 2010). En comparación con otros animales marinos costeros, las concentraciones de organoclorados en tortugas marinas son órdenes de magnitud inferiores a los de los tiburones, cocodrilos, aves marinas y mamíferos marinos de lugares similares (Lynch, 2013).

El heptacloro es un plaguicida organoclorado que pertenece a la familia de los ciclodienos. Fue utilizado ampliamente como insecticida y forma parte de la primera lista de eliminación de COPs en el Convenio de Estocolmo (UNEP, 2008). Aunque su uso ha sido restringido en muchos países desde la década de 1980 todavía se detecta en los ecosistemas. El heptacloro liberado en el medio ambiente en presencia de agua se transforma en heptacloro-epóxido, que es uno de sus metabolitos y el más persistente de ellos; ambos presentan propiedades de bioacumulación.

El heptacloro y heptacloro-epóxido son contaminantes ubicuos, presentes en aire, agua, suelo; así como en plantas, peces, aves, mamíferos y reptiles (WHO, 2006). Tienen potencial de transporte ambiental a largo plazo (Gregor & Gummer, 1989). Debido a su afinidad lipofílica tienden a acumularse en los tejidos adiposos y pueden pasar a través de la cadena alimenticia. Estudios en organismos modelo y en el humano indican que durante la gestación puede haber una transferencia materna de estos contaminantes.

La toxicidad aguda del heptacloro-epóxido es mayor que la del heptacloro, en animales se asocia con trastornos del sistema nervioso central (WHO, 2006). El heptacloro puede provocar alteraciones en el neurotransmisor GABA. También se ha reportado como inmunosupresor químico, ya que en ovejas interrumpe la interacción de tres tipos de células inmunitarias principales: macrófagos, célula T auxiliares y células B (Luster *et al.*, 1992).

El heptacloro muestra características promotoras de tumores y regula negativamente el gen supresor tumoral p53 y la proteína del retinoblastoma RB (Rought *et al.*, 1998; Rought *et al.*, 1999). También se reporta que la activación de las proteínas de cascada MAPK puede ser una de las vías utilizadas por el heptacloro para ejercer su acción mitogénica, promoviendo el cáncer (Chuang & Chuang, 1998). Además puede alterar la progresión del ciclo celular, ya que puede desregular la expresión de la proteína antiapoptótica Bcl-2 (Chuang *et al.*, 1999).

Ito *et al.* (1988) reportan que el heptacloro podría estar relacionado con malformaciones en los monos japoneses (*Macaca fuscata*) que se han presentado desde 1955, ya que las concentraciones de heptacloro epóxido en monos malformados fueron significativamente mayores (riñón,  $p < 0.05$ ) que las de monos normales y, además, los niveles de heptacloro-epóxido en riñón de hembras adultas que habían tenido crías malformadas también fueron significativamente más altos ( $p < 0.05$ ) que los de hembras que tuvieron crías normales.

El DDT (diclorodifeniltricloroetano) es un plaguicida usado extensamente en el pasado (1940-1960) como insecticida en cosechas agrícolas y para combatir insectos portadores de enfermedades tales como la malaria y el tifus (WHO, 1989). Una vez introducido en el medio ambiente, el DDT se difunde por el suelo, el agua y el aire y procesos de biodegradación por decoloración reductiva forman los metabolitos DDE y DDD. En los sistemas animales el DDT es lentamente degradado a sus metabolitos (DDD y DDE) y puede ser fácilmente almacenado en tejidos grasos (WHO, 1989).

El DDT y sus metabolitos tienen una presencia global en el planeta, ya que pueden migrar largas distancias en la atmósfera desde suelos y superficies de agua, de regiones más cálidas a regiones más frías donde se depositan. Al igual que el heptacloro, el DDT y sus metabolitos son lipofílicos, lo que provoca que se bioacumulen en los organismos y se biomagnifiquen a través de las redes tróficas. Además, puede haber una transferencia materna de estos compuestos durante la gestación (Longnecker *et al.*, 2001).

En la actualidad se conocen las características tóxicas del DDT y sus metabolitos, pero fue en 1962, cuando la bióloga Rachel Carson, a través del libro *Primavera Silenciosa*, publica la primera denuncia del impacto ambiental de compuestos organoclorados como el DDT (Carson, 2002). Posteriormente, en 1972, Estados Unidos prohibió la producción y uso de este plaguicida y otros países fueron adoptando esta medida. El DDT forma parte de la primera lista de eliminación de COPs en el Convenio de Estocolmo y actualmente se usa solamente en unos pocos países para controlar la malaria (UNEP, 2008).

El DDT puede provocar efectos agudos y crónicos, se absorbe fácilmente a través del tracto gastrointestinal, con una mayor absorción en presencia de grasas (WHO, 1989). Los efectos agudos en el humano pueden incluir náuseas, diarrea, actividad enzimática hepática aumentada o irritación (en ojos, nariz o garganta), hasta convulsiones (Longnecker *et al.*, 1997). Ensayos experimentales en organismos modelo indican que el DDT y sus metabolitos pueden causar efectos crónicos en el sistema nervioso, el hígado, los riñones y el sistema inmunológico (WHO, 1989). En aves, la exposición crónica al DDT tienen efectos sobre la reproducción, principalmente en el adelgazamiento de la cáscara del huevo y muerte embrionaria provocada por su metabolito principal DDE (WHO, 1989).

El DDT está involucrado en la progresión de distintos tipos de cáncer, principalmente el de hígado. Estudios recientes indican que la exposición a dosis bajas de DDT promueven el crecimiento del carcinoma hepatocelular vía Wnt/ $\beta$ -catenina, que se activa por estrés oxidativo, ya que inhibe las actividades de  $\gamma$ -glutamylcisteína sintetasa ( $\gamma$ -GCS) y superóxido dismutasa (SOD) (Jin *et al.*, 2014). Los autores reportan una desregulación en los niveles de  $\beta$ -catenina y sus genes objetivo (c-Myc y CyclinD1) provocada por el DDT (Jin *et al.*, 2014).

Estudios recientes han asociado al DDT con efectos en mecanismos epigenéticos, tales como la metilación del ADN y con el cáncer. Lee *et al.* (2017) identificaron una asociación entre el DDT y la hipometilación global del ADN en el ensayo Alu en adultos hombres. Por otra parte, Song *et*

*al.* (2014) reportan que tras la exposición *in utero* en ratas al DDE, la generación de F1 machos mostró alteración de la fertilidad masculina; identificaron hipometilación del gen con impronta *Igf2*, así como alteraciones en su expresión génica. Estos defectos fueron transferidos a la generación F3 a través de la línea germinal masculina (Song *et al.*, 2014).

El endosulfán es un plaguicida organoclorado (insecticida y acaricida) catalogado como uno de los plaguicidas más peligrosos y está prohibido en 75 países, aunque todavía se utiliza en muchos países para cultivos como algodón, soya, café y vegetales (González-Bejarano, 2018). Su composición es una mezcla de dos isómeros, el endosulfán- $\alpha$  (64-67%) y el endosulfán- $\beta$  (29-32%). Hay evidencias de que el endosulfán tiene potencial de transporte ambiental a largo plazo, ya que se ha identificado en lugares muy lejanos de donde se ha liberado, tanto en biota y hielo del ártico y el antártico, en el aire y lluvia en prácticamente todo el planeta (Vorkamp *et al.*, 2004; Pozo *et al.*, 2006; Kumari *et al.*, 2007). El endosulfán es semi-volátil, se evapora de la superficie del suelo y de las plantas después de la aplicación; se considera que aproximadamente el 70% ingresa a la atmósfera por volatilización (Sutherland *et al.*, 2004).

En el 2011, el endosulfán se incluyó en el Anexo A del Convenio de Estocolmo para su eliminación, ya que están demostradas sus características como COP. Tal acuerdo fue ratificado por México (UNEP, 2011), y desde enero de 2013 COFEPRIS dejó de autorizar la importación de este compuesto; diciembre de 2014 fue la fecha límite para su comercialización y a partir de enero de 2015 se revocaron los registros sanitarios de los productos que contengan endosulfán. Esto indica que hasta hace pocos años el endosulfán aún era utilizado en México. De acuerdo a varios autores y al diagnóstico de la acción del endosulfán en México, este compuesto produce efectos neurotóxicos, hematotóxicos y nefrotóxicos agudos en mamíferos, además de efectos embriotóxicos y teratogénicos en mamíferos, peces e invertebrados (Schulz, 2004; Singh *et al.*, 2007; INE, 2011).

El endosulfán puede tener distintos efectos adversos tanto agudos como crónicos. Los efectos primarios agudos se presentan sobre el sistema nervioso, causando hiperexcitación y convulsiones, y puede provocar la muerte por envenenamiento (Wesseling *et al.*, 2005). Algunos de los efectos crónicos reportados en humanos incluyen defectos de nacimiento, trastornos reproductivos congénitos, daño cerebral a largo plazo, convulsiones recurrentes, epilepsia, autismo, madurez sexual retrasada, endometriosis, trastornos menstruales, menarquia precoz, aumento mamario masculino, diversos cánceres, discapacidad intelectual congénita, parálisis,

alteraciones psiquiátricas y deterioro y pérdida de la visión (NIOH, 2002; Saiyed *et al.*, 2003; Roberts *et al.*, 2007). En organismos silvestres y animales domésticos se ha identificado letalidad, aborto espontáneo, malformaciones congénitas, infertilidad, y con potencial de disruptor endocrino (NIOH, 2002; Schulz, 2004).

El endosulfán tiene una afinidad con los receptores GABA (ácido gamma-aminobutírico) en el cerebro y actúa como un antagonista no competitivo de GABA. La unión de GABA a sus receptores induce la absorción de iones cloruro por las neuronas y el bloqueo de esta absorción por el endosulfán da lugar a un estado de excitación incontrolada (Ratra & Casida, 2001). El endosulfán causa estrés oxidativo (Omurtag *et al.*, 2008), el cual está implicado en sus efectos neurotóxicos (Jia & Misra, 2007), daños en la glándula suprarrenal (Dorval *et al.*, 2003) y cáncer (Antherieu *et al.*, 2007). Se ha reportado que en peces es altamente inmunotóxico, causando la supresión de la función fagocítica de las células inmunes del riñón (Harford *et al.*, 2005). La exposición al endosulfán *in utero* y a través de la lactancia posnatal provoca efectos inmunosupresores en ratas adultas, siendo las ratas hembras más susceptibles que los machos (Lafuente *et al.*, 2006).

El endosulfán es un disruptor endocrino en especies de mamíferos, peces, aves y anfibios, que afecta tanto a las hormonas reproductivas masculinas como femeninas; presenta capacidad antiandrogénica y puede mimetizar estrógenos (Andersen *et al.*, 2002). En ratas se han reportado efectos embriotóxicos y teratogénicos, tales como acumulación de líquido cefalorraquídeo en el cerebro, cerebro subdesarrollado, osificación incompleta de los huesos del cráneo y malformaciones en el hígado, riñones, costillas y la pelvis renal (Singh *et al.*, 2007).

Milesi *et al.* (2017) reportan en ratas que el endosulfán induce hipometilación en algunas regiones reguladoras del gen del receptor de estrógeno  $ER\alpha$ , lo que provoca una expresión uterina de  $ER\alpha$  aberrante y a su vez inhibe la pre-implantación del embrión durante la gestación. Una de las causas por las que el endosulfán puede provocar efectos teratogénicos es porque puede interrumpir la vía de señalización de los retinoides en las células y los retinoides desempeñan un papel esencial en la proliferación, el desarrollo y la diferenciación de las células. Lemaire *et al.* (2005) proponen que el endosulfán es agonista del receptor de ácido retinoico (RAR) $\beta$  y (RAR) $\gamma$  e induce la expresión de P450RAI1, el cual metaboliza el ácido retinoico y tal disrupción puede conducir a malformaciones en el ojo, cerebro, corazón y extremidades (Lemaire *et al.*, 2005).



Cuadro 5. Concentraciones de algunos plaguicidas organoclorados en reptiles. Media (SD) y/o mediana (rango) en ng/g en peso húmedo, LOD: por debajo del límite de detección.

Especie	Sitio de muestreo	Año	Tejido	ΣDDTs	DDE	Heptacloro	Endosulfán	Referencia
<i>C. caretta</i>	Northwest Florida, Gulf of Mexico	1992	huevo	<LOD-178				Alam & Brim (2000)
<i>C. caretta</i>	Cape Lookout, North Carolina	2002	yema	53.2 (57.1)		4.37 (5.34)		Alava <i>et al.</i> (2011)
<i>C. caretta</i>	South Carolina-Georgia	NR	huevo	(58-305)				Hillestad <i>et al.</i> (1974)
<i>C. caretta</i>	Merritt Island, eastern Florida	1979	huevo		99 (56-150)			Clark & Krynitsky (1980)
<i>C. caretta</i>	Merritt Island, eastern Florida	1976	huevo		18-200	(<LOD-6)		Clark & Krynitsky (1980)
<i>C. caretta</i>	Cyprus	1995	crías	36.5 (5.3-113)				Mckenzie <i>et al.</i> (1999)
<i>C. caretta</i>	Eastern Florida	2002	yema	2.95 (0.0493-108)		0.705 (<0.048-8.84)		Alava <i>et al.</i> (2011)
<i>C. caretta</i>	Sarasota, Florida, Gulf of Mexico	2002	yema	1.05 (0.168-7.95)		0.256 (<0.048-1.81)		Alava <i>et al.</i> (2011)
<i>D. coriacea</i>	Juno Beach, Florida	2003	Yema + albúmina	1.53 (0.683-3.49)	22.7 (4.8-185)	0.183 (0.096-0.362)		Stewart <i>et al.</i> (2011)
<i>D. coriacea</i>	French Guiana	2006	Yema + albúmina	(0.08-5.82)				Guirlet <i>et al.</i> (2010)
<i>C. mydas</i>	Cyprus	1995	huevo	4.3				Mckenzie <i>et al.</i> (1999)
<i>C. mydas</i>	Heron Island, Queensland, Australia	1995			1.6 (1.5-2.0)			Podreka <i>et al.</i> (1998)
<i>C. mydas</i>	Heron Island, Australia	1998	Yema + albúmina			0.01974		van de Merwe <i>et al.</i> (2009)
<i>L. olivacea</i>	Ceuta, Sinaloa	2010	Yema + albúmina		30		170 (820)	García-Solorio <i>et al.</i> (2014)
<i>C. serpentina</i>	Canada		huevo			<LOD-3.5		de Solla <i>et al.</i> (1998)
<i>L. olivacea</i>	El Verde Camacho, Sinaloa	2012	Embriones y crías		<b>1.5-2.6</b>	<b>2.2-7.0</b>	<b>2.4</b>	Este trabajo

## 2.2 Mercurio total (Hg) en Embriones de Tortuga Golfina

### 2.2.1 Introducción

El mercurio (Hg) es un elemento químico de origen natural y antropogénico, se distribuye ampliamente en el medio ambiente y, aunque está presente de forma natural en sistemas acuáticos en concentraciones bajas, se puede encontrar en altas concentraciones en la cadena alimenticia por bioacumulación (Ullrich *et al.*, 2001). El mercurio se presenta en el ambiente en forma orgánica e inorgánica, ésta última puede ser biotransformada por bacterias a la forma orgánica, metilmercurio (MeHg), que es la fracción del mercurio total que se transfiere más eficientemente a la cadena alimenticia a niveles tróficos más altos y a su vez es más tóxica (Boening, 2000).

El metilmercurio (MeHg) es causante de la enfermedad de Minamata, identificada en humanos por ingerir productos marinos contaminados con MeHg (Eto, 1997). En pacientes con la enfermedad congénita de Minamata se ha identificado la presencia de malformaciones congénitas (Harada, 1995). Además, bioensayos de exposición al MeHg en peces, anfibios, aves y mamíferos indican que este contaminante es una agente teratogénico ( Khera, 1973; Weis & Weis, 1977; Hoffman & Moore, 1979; Colomina *et al.*, 1995; Heinz & Hoffman, 1998; Samson & Shenker, 2000; Unrine *et al.*, 2004; Bergeron *et al.*, 2011). En tortugas marinas se ha sugerido que el Hg contribuye a problemas de salud y prevalencia de enfermedades (Innis *et al.*, 2008) y se ha comprobado la transferencia materna de este contaminante a los huevos (Guirlet *et al.*, 2008; Páez-Osuna *et al.*, 2011).

En el presente capítulo se reporta y compara la presencia y concentración de Hg en embriones no malformados y aquellos que presentaron malformaciones congénitas en la playa de anidación El Verde Camacho, Sinaloa durante la temporada de anidación 2012.

### **2.2.2 Metodología**

El análisis de Hg se llevó a cabo en el Laboratorio de Ciencias ambientales del CIAD y se eligieron embriones de los mismos nidos a los que se les analizó plaguicidas organoclorados, pero el análisis se hizo de manera individual: embriones malformados de un nido que presentó alta incidencia (~25%) de malformaciones (n=11 embriones), embriones malformados provenientes de 16 nidos que presentaron incidencias bajas (~1-6%) de malformaciones (n= 38) y crías muertas sin malformaciones externas de seis nidos donde no hubo embriones malformados (n=12).

Se digirió 1 g de tejido homogeneizado (masa húmeda) con 5 ml de HNO<sub>3</sub> al 50% y posteriormente con 3 ml de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en un sistema de digestión por microondas (CEM MARSX) según el método EPA 3052 (EPA, 1996). Una vez que las muestras fueron digeridas, se analizaron con un espectrofotómetro de absorción atómica (Perkin Elmer 1100-B); la cuantificación del Hg total se llevó a cabo utilizando el accesorio generador de hidruro (MHS-20); el límite de detección fue de 0.0002 µg/g. El porcentaje de recuperación promedio fue de 91.3% (n = 5).

Las concentraciones de Hg entre embriones malformados y normales se compararon mediante ANOVA de una vía Mann-Whitney. Se reporta el coeficiente de variación (CV) de las concentraciones presentes de Hg para una mejor interpretación del grado de variabilidad. Adicionalmente, se generaron diagramas de cajas para visualizar la dispersión y simetría de los datos por medio de cuartiles (Qs): identificación de los valores mínimos y máximos de los datos, la distribución de 25, 50 y 75% de los datos (Q1, Q2 y Q3, respectivamente), e identificación de datos extremos.

### **2.2.3 Resultados**

Se observó un incremento en los niveles promedio de Hg de embriones malformados (provenientes de nidos con alta y baja incidencia de malformaciones) dos veces mayor con

respecto a embriones no malformados ( $0.0250 \pm 0.0223$  -CV: 89.2%- y  $0.0132 \pm 0.00909$  -CV: 68.8%-  $\mu\text{g/g}$  de Hg en embriones malformados y no malformados, respectivamente;  $P=0.041$ ) (Fig. 7). Sin embargo, las concentraciones de Hg en embriones malformados provenientes del nido con alta incidencia de malformaciones no difirieron significativamente de los embriones malformados provenientes de nidos con baja incidencia de malformaciones ( $0.0244 \pm 0.0267$  -CV: 109.4%- y  $0.0252 \pm 0.0213$  -CV: 84.5%-  $\mu\text{g/g}$  de Hg, respectivamente  $P=0.363$ ) (Fig. 7).

#### **2.2.4 Discusión**

Los niveles de Hg fueron en general mayores en los embriones malformados (sin importar la procedencia del nido) con respecto a los no malformados. Sin embargo, dada la variabilidad individual en las concentraciones de mercurio en embriones malformados, no se detectaron diferencias significativas entre embriones malformados provenientes de nidos con baja y alta incidencia de malformaciones. Se ha reportado que las concentraciones de contaminantes son similares entre embriones del mismo nido, pero existe variabilidad entre nidos (Lynch, 2013). Sin embargo, en el caso de los embriones malformados provenientes del nido con alta incidencia de malformaciones sí presentaron una alta variabilidad (CV: 109.4%), a pesar de ser del mismo nido. En este contexto, se destaca que cada organismo presentó fenotipos particulares y algunos con múltiples malformaciones.

En la tortuga golfina se ha corroborado la transferencia materna de Hg a los huevos, presentándose mayores concentraciones en la yema con respecto a la clara y a la cáscara (Páez-Osuna *et al.*, 2011), así como en tortuga verde y caguama, cuyos valores reportados aparentemente no representan un riesgo relacionado con el desarrollo (Sakai *et al.*, 1995; Lam *et al.*, 2006). Sin embargo, los reportes de concentraciones de Hg en tejidos de embriones son escasos (Cuadro 6). Las concentraciones de Hg identificadas en el presente estudio son mayores en un orden de magnitud con respecto a la tortuga verde (Cuadro 6), cuyo análisis fue realizado en la yema; esto, tomando en cuenta de que el Hg es un contaminante lipofílico y que además las concentraciones de Hg entre especies pueden variar según sus hábitos alimenticios y las zonas de alimentación (Lynch, 2013). Esto concuerda con los reportes para reptiles con un mayor nivel trófico, como los cocodrilos o lagartos, cuyos niveles de Hg son mayores en varias órdenes de

magnitud con respecto a otras especies de tortugas y cuya matriz analizada también fue la yema (Cuadro 6).

El Hg es uno de los contaminantes teratogénicos que mejor está documentado (Eto, 1997). Por ejemplo, se ha reportado que concentraciones presentes de  $0.286 \pm 0.038$  de Hg (en peso seco) en huevos del sapo americano (*Anaxyrus americanus*) pueden provocar distintas malformaciones axiales y craneofaciales (Bergeron *et al.*, 2011). En aves, a partir de bioensayos en huevos de 25 especies, a las cuales se les inyectó cloruro de metilmercurio a distintas dosis (0.05, 0.1, 0.2, 0.4, 0.8, 1.6, 3.2 y 6.4  $\mu\text{g/g}$  de Hg en peso húmedo), se ha reportado que el metilmercurio provoca un incremento de malformaciones que está relacionado con el aumento en la dosis suministrada (Heinz *et al.*, 2011); algunas de las malformaciones que fueron atribuidas al metilmercurio se presentaron en la región craneofacial, el cuello, la columna vertebral y las alas (Heinz *et al.*, 2011). En tortugas marinas es necesario corroborar mediante bioensayos similares el potencial teratogénico del Hg en sus distintas formas presentes.

Por otra parte, el Hg no es el único compuesto teratogénico presente en el ambiente y puede presentar sinergia con otros compuestos y con otros factores ambientales (Fernández & Beiras, 2001; Heinz *et al.*, 2011). Se ha reportado que el selenio reduce la disponibilidad biológica del mercurio (revisado en Raymond & Ralston, 2004); sin embargo, bajo distintas condiciones, el Hg y el selenio pueden ser antagonistas o actuar en sinergia (Heinz & Hoffman, 1998). En el pato real (*Anas platyrhynchos*) se ha reportado que los efectos teratogénicos del Hg aumentan por su sinergia con el selenio (Heinz & Hoffman, 1998). En el erizo de mar (*Paracentrotus lividus*) se ha reportado embriotoxicidad por sinergia del mercurio combinado con el plomo (Fernández & Beiras, 2001). A su vez, los metales, como el mercurio, pueden interactuar con otros factores ambientales (e.g. pH, salinidad o materia orgánica disuelta) afectando su especiación (Fernández & Beiras, 2001).

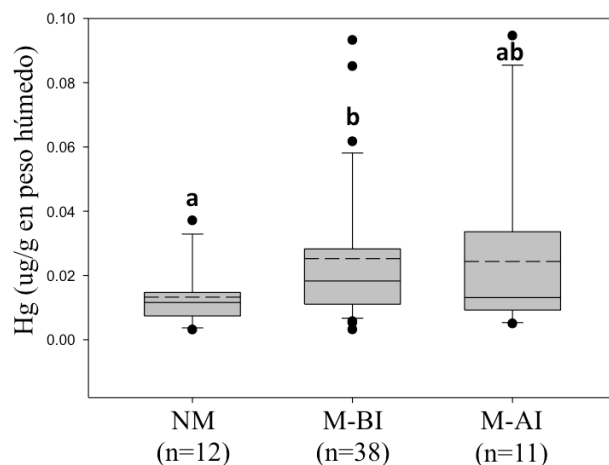


Figura 7. Gráfica de cajas de las comparaciones de la concentración de Hg total entre embriones de tortuga golfina. Embriones de nidos sin embriones malformados (NM), embriones malformados procedentes de nidos con baja incidencia de malformaciones (M-BI) y embriones malformados procedentes del nido con alta incidencia de malformaciones (M-AI). La línea discontinua representa la media; n=número de muestras. Letras diferentes indican diferencias significativas entre grupos ( $p < 0.05$ )

Cuadro 6. Concentraciones promedio de Hg (media  $\pm$  SD en peso húmedo) en diferentes tejidos de tortugas marina. \* Indica concentraciones de Hg reportadas en peso seco.

	<b>Especie</b>	<b>Hg (<math>\mu\text{g/g}</math>)</b>	<b>Sitio</b>	<b>Referencia</b>
Yema + clara	<i>A. mississippiensis</i>	0.054 $\pm$ 0.060	Florida, E. U.	Ogden <i>et al.</i> (1974)
	<i>C. acutus</i>	0.090 $\pm$ 0.010	Florida, E. U.	Ogden <i>et al.</i> (1974)
	<i>C. moreletii</i>	0.070 $\pm$ 0.010	Belice	Rainwater <i>et al.</i> (2002)
	<i>A. Sinensis</i>	0.111 $\pm$ 0.010	Changxing County, China	Xu <i>et al.</i> (2006)
	<i>T. Scripta</i>	0.040 $\pm$ 0.015	Carolina del Sur, E. U.	Burger & Gibbons (1998)
Yema	<i>C. caretta</i>	0.012 $\pm$ 0.0034	Haha-Jima, Japón	Sakai <i>et al.</i> (1995)
	<i>C. mydas</i>	0.0015 $\pm$ 0.00013	Hong Kong, China	Lam <i>et al.</i> (2006)
	<i>L. olivacea</i>	0.028 $\pm$ 0.010*	Oaxaca, México	Páez-Osuna <i>et al.</i> (2011)
Clara	<i>C. caretta</i>	0.00050 $\pm$ 0.00020	Haha-Jima, Japón	Sakai <i>et al.</i> (1995)
	<i>C. mydas</i>	0.000090 $\pm$ 0.0000030	Hong Kong, China	Lam <i>et al.</i> (2006)
	<i>L. olivacea</i>	0.0010 $\pm$ 0.00090*	Oaxaca, México	Páez-Osuna <i>et al.</i> (2011)
Cáscara	<i>C. caretta</i>	0.0040 $\pm$ 0.0013	Haha-Jima, Japón	Sakai <i>et al.</i> (1995)
	<i>C. mydas</i>	0.00061 $\pm$ 0.00016	Hong Kong, China	Lam <i>et al.</i> (2006)
	<i>L. olivacea</i>	0.0087 $\pm$ 0.00030*	Oaxaca, México	Páez-Osuna <i>et al.</i> (2011)
Crías	<i>L. olivacea</i>			
	Malformados	0.025 $\pm$ 0.022	Sinaloa, México	Este estudio
	Normales	0.013 $\pm$ 0.0090	Sinaloa, México	Este estudio

### 2.3 Conclusiones Generales Sobre la Presencia y Concentración de Plaguicidas Organoclorados y Hg en Embriones de Tortuga Golfina

Se identificó la presencia de plaguicidas organoclorados y Hg en embriones de tortuga golfina, lo que corrobora la transferencia materna de este tipo de contaminantes de las hembras a los huevos durante la producción de la yema y su ubicuidad en los ecosistemas marinos. En el caso de los plaguicidas organoclorados debido al diseño experimental no se pudieron realizar análisis estadísticos, por lo que únicamente se reporta la presencia y concentración de los plaguicidas identificados; no obstante, el endosulfán fue el único plaguicida organoclorado identificado en embriones malformados y proveniente de un nido con una alta incidencia de embriones malformados. Este plaguicida es altamente teratogénico y pone en relieve los efectos que este tipo de contaminante puede tener no sólo en las tortugas marinas sino en general en los ecosistemas marinos; así como otros contaminantes, que también se encuentran presentes en el mar, con efectos aun no evaluados.

En el caso del Hg, el análisis se realizó de manera individual y se identificó una variabilidad muy alta de este compuesto, identificándose heterogeneidad en los datos. También, cada organismo presentó fenotipos muy particulares y con múltiples malformaciones. Los resultados muestran que los embriones que presentaron malformaciones congénitas presentaron también una mayor concentración de Hg, lo que podría sugerir que este contaminante podría estar participando, por lo menos en parte, en los fenotipos aberrantes observados; sin embargo son necesarios bioensayos de exposición en tortugas marinas para corroborar esta hipótesis.

### 3. AISLAMIENTO Y CARACTERIZACIÓN DE LA REGIÓN PROMOTORA DE GENES DE DESARROLLO EMBRIONARIO TEMPRANO EN TORTUGA GOLFINA

#### 3.1 Introducción

La tortuga golfina parece ser más propensa al desarrollo de malformaciones congénitas con respecto a otras especies como la tortuga carey (*E. imbricata*) o la verde (*C. mydas*) (Bárcenas-Ibarra *et al.*, 2015). A partir del muestreo realizado por Bárcenas-Ibarra *et al.* (2015) en la playa de anidación El Verde Camacho, Sinaloa, durante la temporada de anidación 2012, se identificó una incidencia de malformaciones congénitas del 2% para tortuga golfina; de estos organismos, el 74% presentó malformaciones múltiples y el 49% presentó malformaciones en la región cráneo-facial. Se identificó una prevalencia de malformaciones congénitas en la mandíbula del 61%, en ojos del 12.6% y el síndrome malformativo schistosomus reflexus (SR; ver Bárcenas-Ibarra *et al.*, 2016) se presentó en el 31% de los organismos malformados.

Para tratar de entender la etiología de dichas malformaciones, se realizó una búsqueda bibliográfica de genes reguladores que pudieran estar involucrados con el desarrollo de malformaciones congénitas, particularmente craneofaciales y el síndrome SR por la incidencia que presentaron. Se identificaron genes que actúan durante el desarrollo embrionario temprano y confieren pluripotencia a las células madre embrionarias (*Nanog*, *Sox2*); genes que son necesarios para el desarrollo del ojo (*Pax6*, *Sox2*); genes que están asociados a malformaciones en el paladar y la mandíbula (*Prrx1*, *Tbx22*); genes que son necesarios para el desarrollo de vértebras (*Bmp5*, *Hoxb9*); genes del complejo Polycomb-Trithorax, los cuales modulan la expresión de genes *Hox* (*Cbx3*, *Mllt1*), y un gen que codifica para una ADN metiltransferasa *de novo* y está asociado a la presencia de anomalías faciales (*Dnmt3b*) (Cuadro 7). En total se eligieron diez genes de desarrollo embrionario temprano para aislar su región promotora (Cuadro 7).



## 3.2 Metodología

### 3.2.1 Aislamiento de la Región Promotora Putativa de Genes de Desarrollo Embrionario en Tortugas Marinas

Se identificó la región codificante de los genes seleccionados (Cuadro 7) y que están reportados para la tortuga china de caparazón blando (*Pelodiscus sinensis*) en la base de datos de Ensembl genome browser 93 (Zerbino *et al.*, 2018). Se buscó el primer exón en el genoma en draft de la tortuga verde (*C. mydas*) en la base de datos de National Center for Biotechnology Information (NCBI; Benson *et al.*, 2005), se compararon las secuencias de ambas especies y se diseñaron primers 5' a partir del inicio de la región codificante reportada. A partir de DNA genómico de tortuga golfina (*L. olivacea*) se obtuvieron fragmentos de 400-800 pb, a los cuales se les realizó un BLAST (Basic Local Alignment Search Tool; Altschul *et al.*, 1997) con el genoma de *C. mydas*, encontrando >90% de identidad (Cuadro 7).

### 3.2.2 Identificación de Sitios de Unión a Factores de Transcripción y Regiones Reguladoras

Una vez aislado el promotor putativo de los genes seleccionados, se procedió a caracterizarlos. El sitio de inicio de la transcripción (TSS, por sus siglas en inglés) se identificó mediante el software TSSG (Solovyev *et al.*, 2010) y el software NNPP (Reese, 2001) y se consideró como la posición +1 para la caracterización del promotor. Los sitios de unión a factores de transcripción, así como regiones reguladoras (TATA box, CCAAT box y GC box) se identificaron mediante el software GPMiner (Lee *et al.*, 2012). La presencia de islas CpG se identificaron mediante el software Methprimer (Li & Dahiya, 2002).

Cuadro 7. Genes que actúan durante el desarrollo embrionario temprano y pudieran estar involucrados con la presencia de malformaciones cráneo-faciales y con el síndrome SR.

Genes que actúan durante el desarrollo embrionario temprano								
Gen	Función	Tamaño del fragmento (pb)	Tamaño del promotor identificado (pb)	Diseño de primers forward 5'-3'	Diseño de primers reverse 5'-3'	No. Acceso NCBI para <i>C. Mydas</i>	No. Acceso ensembl.org para <i>P. Sinensis</i>	Referencia
<i>Nanog</i>	Confiere pluripotencia a las células madre embrionarias.	843	577	GCCTCCCA TGCTTCCAA A	TGCCAGGT GGGCACTC AT	KB5181 84.1	ENSPSIT00 000013795.1	Mitsui <i>et al.</i> (2003)
<i>Sox2</i>	Asociado a anoftalmia.	376	126	TCCATCAGC CAAGAGGA AGAGG	GTGCATTTT GGGGTTCTC TTGG	XM_00 7059069 .1	ENSPSIT00 000000545.1	Wang <i>et al.</i> (2012)
<i>Bmp5</i>	Participa en la osificación del caparazón,	704	-	TGCCGGGTT CAAATTACA ATGAG	GCAATTCCA AAGTAAGC CCAGGA	NW_00 6615559 .1	ENSPSIT00 000014468.1	Kaplinsky <i>et al.</i> (2013)
<i>Cbx3</i>	Modula la estructura de la cromatina.	793	785	TTGGCTACA ATACCACCG CTCTG	TGGAGGCC ATTTTTATT GCAGAC	NW_00 6590010 .1	ENSPSIT00 000002745.1	Kwon & Workman (2008)
<i>Prrx1</i>	Tienen un papel importante durante el modelado del primer arco faríngeo.	799	364	TCTGGCAA CAGAGACT AGGGACAC	GAACTCTGG CTTCAGTGA GGTTGAC	NW_00 6633405 .1	ENSPSIT00 000013635.1	Çelik <i>et al.</i> (2012)
<i>Pax6</i>	Gen selector de ojos y de diferenciación neuronal.	770	497	GCCAAGCG AATTGTATT TGTGAGG	CTGGTTGAA TCTGGCAGT GGTCTAC	NW_00 6666723 .1	ENSPSIT00 000014440.1	Kozmik (2005)
<i>Mllt1</i>	Actúa a nivel de la cromatina para sostener la expresión de genes Hox.	560	329	GCTAGGTCC CTATAGTGC TGGGTGT	CTCCACAAA GTGCTGGAT GTCG	NW_00 6636959 .1	ENSPSIT00 000004635.1	Milne <i>et al.</i> (2002)
<i>Tbx22</i>	Asociado a paladar hendido.	879	855	ACTGCAAG GCTCTGAAC TCTGGA	CAGACCCTT CACTTTCAC CCTGA	NW_00 6616191 .1	ENSPSIT00 000005726.1	Pauws <i>et al.</i> (2009)
<i>Hoxb9</i>	Se expresa en la caja torácica, desarrollo del tubo neural.	760	362	GGGTTACAC TGGTGAAGT ACCGAGA	ACTGGAGG TTTTGGCTG GAAACTAC	NW_00 6636514 .1	ENSPSIT00 000007772.1	Nagel <i>et al.</i> (2007)
<i>Dnmt3b</i>	Asociado al síndrome inmunodeficiencia, inestabilidad de la región centromérica y anomalías faciales.	533	518	CACACCTCA TCTAAACGC ACACAC	TGACTCTGT AGGAGACG ATGATTGC	NW_00 6637958 .1	ENSPSIT00 000007510.1	Hu <i>et al.</i> (2014)

### 3.3 Resultados

#### 3.3.1 *Nanog*

En tortuga golfina se caracterizó la región promotora putativa del gen *Nanog*, un fragmento de 577 pb (Fig. 8). Se identificaron tres sitios CpG con potencial de metilación en la región promotora y uno en la región 5' UTR. También se identificó la TATA box, CCAAT box; así como algunos sitios de unión a factores de transcripción (TFBS por sus siglas en inglés) (Fig. 8). La función de los factores de transcripción se resume en el cuadro 8.

El gen *Nanog* es un miembro de la familia de factores de transcripción con homeobox, los cuales poseen una región conservada de unión al ADN que es traducida a una porción proteica (llamada homeodominio) que al unirse al ADN de genes diana regulan la expresión génica durante el desarrollo embrionario. En mamíferos, *Nanog* juega un papel clave en la auto renovación y el mantenimiento de la pluripotencia en células madre embrionarias no diferenciadas (Chambers *et al.*, 2003; Mitsui *et al.*, 2003). La eliminación de *Nanog* en el desarrollo embrionario temprano es letal (Chambers *et al.*, 2003). El gen *Nanog* se expresa en la masa celular interna del blastocisto, así como en el epiblasto en la etapa posterior a la implantación y es detectable en células germinales de ratón (Chambers *et al.*, 2003; Mitsui *et al.*, 2003). Se ha propuesto que el complejo *Oct4/Nanog/Sox2* forman circuitos transcripcionales para activar su propia expresión de manera retroalimentada y a su vez promueve la expresión de los genes necesarios para la renovación de células madre, pero reprime genes de desarrollo que sólo se activarán tras la diferenciación celular (Loh *et al.*, 2006; Fouse *et al.*, 2008).

*Nanog* está altamente expresado en células germinales primordiales de ratón, momento en el que se presenta la reprogramación epigenética (Yamaguchi *et al.*, 2005) y se ha demostrado también en ratón que durante la diferenciación de células embrionarias la metilación del promotor de *Nanog* se lleva a cabo sinérgicamente por las dos DNA metiltransferasas *de novo* (*Dnmt3a* y *Dnmt3b*) (Li *et al.*, 2007). Se ha propuesto que en células madre embrionarias, *Nanog* está hipermetilado en la región flanqueante 5' y a su vez está regulado por la modificación de histonas (acetilación y metilación) en este *locus* (Hattori *et al.*, 2007). En el humano, *Nanog* está regulado

por la metilación del ADN de un elemento promotor en la región 5' del primer exón (llamada región reguladora *Nanog*), que también depende de la transactivación por *Oct3/4* y *Sox2* y se ha sugerido que la región proximal al sitio de inicio de la transcripción en el promotor *Nanog* está sujeta a la regulación epigenética en muchas especies (Nettersheim *et al.*, 2011).

```

-577 TGAAGTCAAGAGGGGGAGGTACCATGACTTATTAGTGGAAATAATGCAA
-527 GGCCTACTACCCATTGCTAAAGTGAGAAGGAAATTATGTAGTTACCCCTC
-477 CTTGAATAGTAACATATTTCCACTACTGCATAAGAGGTGCCTACAATTTG
                                     SF1_Q6
-427 GCTATCCTTCTGCCAATCTGAGCAAGCCTGTTGCTGAGTGTGGCCATTT
      CCAAT BOX
-377 AGTGCTGAGTGTGGCCACTTGTCTACCTCACCTTTATTTAATAATACAT
      HFH3_01      GATA2_01/GATA3_01      AREB6_02
-327 TACACATCAGAGGAAAGGGAATCAATAATTGTTTATCTCATTAATTATCT
      GATA1_03      TBP_Q6      SRY_01/
-277 GTCTTAGTTATCCATCCATGTAACATCTGCTGTTGATATAAATATTGTG
      HNF3_Q6      CEBP_Q3
-227 AACATACCTAGGTTGTATACATACAGCTCTGTATCTCTAGCAGTGGATC
      TATA BOX
-177 ATAGATCTCTGAATCATAGCGACCATACCCCTTACAGCTCAGACACACCG
-127 GGGGAGAACAGACTTTTGGGTATCCCTTTTACAATTAATTTTGCAAAT
-77  GGTGTTTGTAAACTATCCAAATTGAGCTCTCATTTTTTCACTCCCCCCC
      TSS
-27  CCATCCCCCTCGCCCTTCTATCCTCTCCTCCTCCTCCCCCAATCCA
      ↑
+24  TAGCCACTCCCCTCCAATCAACTTACTTTTAACATGACAATGGCCTTGAA
+74  AATTCTCTCTAATCAAGGCAAAGTTAGGAAGGACATAAATCTACCCCCAC
+124 GCTATAGGCATCTGTTTGTATGTTTGTCTGATAGAGTCTGCCCTGTCCA
+174 TCTCCACCTTGTCTTTTCTGAGATTAGGGTTTTATTTTGGGGTAAGGTCC
+224 CCCAAACACAAACATCCATGAGTGCCCACTTGGCAATGCCCC

```

Figura 8. Caracterización de la región promotora putativa del gen *Nanog* en tortuga golfina. Se indican los sitios CpG con potencial de metilación (amarillo), los posibles sitios de unión a factores de transcripción (subrayados en negro), el sitio de inicio de la transcripción (TSS por sus siglas en inglés; flecha negra), la TATA box (rectángulo verde) y la CCAAT box (rectángulo naranja). Factor esteroideogénico 1 (SF1), forkhead box II (HFH3), factor de unión a GATA 2 (GATA2), factor de unión a GATA 3 (GATA3), proteína dedos de zinc AREB6 (AREB6), factor de unión a GATA 1 (GATA1), proteína de unión a TATA (TBP), proteína SRY (SRY), factor 3 nuclear de hepatocitos (HNF3), proteína de unión potenciadora CEBP (CEBP). Las regiones reguladoras y los sitios de unión a factores de transcripción fueron identificadas mediante el software GPMiner (Lee *et al.*, 2012).

### 3.3.2 Sox2

En tortuga golfina se caracterizó la región promotora putativa del gen *Sox2*, un fragmento de 126 pb (Fig. 9). Se identificaron 16 sitios CpG con potencial de metilación, dos en la región promotora y 14 en la región 5' UTR. También se identificaron secuencias GC box (Fig. 9).

```
-126 TCCATCAGCCAAGAGGAAGAGGAAGACCGCTAATCCTGAGCCAAGTGTGTG
-76 TTTTGGGGAGTCCCCCTCCCCCTTCCACACCCCTCCCTAGGGGAAAAA
      TSS
-26 AAAAGTCCAGCTTGGGACTTTGTGGCGGCTGCTGCTTCTCGCTTCTCTGC
      GC BOX ↑
+25 CGAAGGCTTGTTCCAGGCAAGAGCTGTTTGAATGTACAACATGATGGAAA
+75 CCGAGCTGAAGCCTCCCGCCCCCCAGCAAACTCGGGGGGAGGCACCGGGC
      GC BOX
+125 AACTCCAACTCGGCCGCCAACAACCAGAAAAACAGCCCGGACCGGGTCAA
      GC BOX
+175 GAGACCCATGAACGCTTTCATGGTGTGGTCCCGGGGCCAGCGGCGAAGA
      GC BOX
+225 TGGCCCAAGAGAACCCCAAATGCAC
```

Figura 9. Caracterización de la región promotora putativa del gen *Sox2* en tortuga golfina. Se indican los sitios CpG con potencial de metilación (amarillo), posibles GC box (rectángulo rojo), el sitio de inicio de la transcripción (TSS por sus siglas en inglés; flecha negra). Las regiones reguladoras fueron identificadas mediante el software GPMiner (Lee *et al.*, 2012).

El gen *Sox2* es miembro de la familia de factores de transcripción Sox, los cuales juegan un papel importante en el desarrollo. Estas proteínas comparten un dominio de unión al ADN altamente conservado, llamado grupo de alta movilidad (HMG, por sus siglas en inglés). El gen *Sox2* presenta un solo exón, que se encuentra dentro de un intrón de un gen conservado llamado *Sox2OT*, el cual produce un ARN largo no codificante y puede modular la expresión génica a través de la regulación de la estructura de la cromatina, la transcripción, el procesamiento del ARNm y la traducción (Fantes *et al.*, 2003).

*Sox2* es indispensable para la formación de células embrionarias pluripotentes en estadios tempranos (revisado en Zhang & Cui, 2014). La expresión de *Sox2* ha sido detectada en células durante el estadio de mórula, específicamente en la masa celular interna del blastocisto y epiblasto, y su delección provoca mortalidad embrionaria en ratón (Avilion *et al.*, 2003). En células madre embrionarias de ratón y humano, *Sox2/Oct4/Nanog* forman circuitos transcripcionales para mantener la pluripotencia y autorenovación celular (Loh *et al.*, 2006; Fouse *et al.*, 2008), pero además, este circuito (*Sox2/Oct4/Nanog*) también regula la diferenciación de células madre a linajes específicos (Wang *et al.*, 2012). Específicamente, *Sox2* es un regulador importante en la iniciación y diferenciación neuronal, ya que dirige la especificación celular hacia el neuroectodermo (Thomson *et al.*, 2011).

Además de cumplir funciones de pluripotencia, renovación celular y de diferenciación neuronal, *Sox2* cumple un papel importante en la formación del ojo (Kamachi *et al.*, 2001). Se ha demostrado la actividad concentración-dependiente de *Sox2* en la regulación de la vía de señalización Notch1 en las células progenitoras de la retina (Taranova *et al.*, 2006). En humanos, se ha reportado que es necesaria una regulación precisa de la proporción de *Sox2* y *Pax6* para la generación de las células progenitoras de la copa óptica; una haploinsuficiencia de *Sox2* o *Pax6* está asociada con microftalmia, anoftalmia o aniridia (Matsushima *et al.*, 2011). Fantes *et al.* (2003) reportaron mutaciones heterocigóticas de *Sox2* en 12 pacientes y todos presentaron afectaciones oculares bilaterales.

Se ha reportado que el gen *Sox2* está regulado epigenéticamente (Ferreira *et al.*, 2015; Bouzas *et al.*, 2016). De interés particular, Zenteno *et al.* (2006) reportaron que hermanos gemelos monocigóticos presentaron una mutación heterocigótica del gen *Sox2* subyacente al síndrome de anoftalmia/microftalmia-atresia esofágica, pero presentaron fenotipos marcadamente distintos, uno de ellos con un defecto ocular unilateral. Los autores sugieren que la metilación diferencial *locus*-específica (i.e. *Sox2*) en gemelos monocigóticos podría explicar la diferencia de los fenotipos identificados (Zenteno *et al.*, 2006). También, se ha propuesto que la histona desmetilasa JMJD2A interactúa directamente con las regiones reguladoras durante la activación temprana de *Sox2* mediante la desmetilación de la marca represiva H3K9me3 en células progenitoras neurales (Bouzas *et al.*, 2016). Por otra parte, se ha identificado hipermetilación en la región promotora de *Sox2* en tumores primarios del sistema nervioso central (Ferreira *et al.*, 2015).

### 3.3.3 *Bmp5*

En tortuga golfina se caracterizó la región flanqueante 5' de gen *Bmp5*, se identificaron posibles sitios de unión a factores de transcripción, y únicamente dos sitios CpG con potencial de metilación presentes en la región 5' UTR (Fig. 10).

La proteína morfogenética ósea *Bmp5* es un potente factor de crecimiento que pertenece a la superfamilia de factor de crecimiento transformante beta (TGF- $\beta$ ), y está implicada en el desarrollo embrionario y la diferenciación tisular (Hahn *et al.*, 1992). En ratón, *Bmp5* y *Bmp7* se co-expresan desde el inicio de la gastrulación y parte de la neurulación y se expresan en el corazón, el alantoide, el neurectodermo rostral y mesénquima subyacente, la placa lateral del mesodermo y los arcos branquiales (Solloway & Robertson, 1999). Además, ratones doble mutantes de *Bmp5;Bmp7* generan letalidad embrionaria temprana (Solloway & Robertson, 1999). En humano se ha reportado que el promotor de *BMP5* presenta dos sitios de inicio de la transcripción (Sakaue *et al.*, 1996) y este gen participa en el desarrollo de extremidades, morfogénesis de hueso y cartílago, y tejido blando conectivo (Hahn *et al.*, 1992). En aves y mamíferos, la expresión de *Bmp5* está asociada con el desarrollo de las vértebras y es importante para determinar la curvatura de las costillas (Darnell *et al.*, 2007). En la tortuga de orejas rojas (*Trachemys scripta*), *Bmp5* se expresa en la cresta ectodérmica apical de las yemas embrionarias de las extremidades y en el margen mesodermo que las rodea (Kaplinsky *et al.*, 2013).

En ratón, se ha reportado que el gen *Bmp5* está controlado por un gran número de elementos reguladores distantes en *cis*, muchos de ellos ubicados en la región flanqueante 3' (DiLeone *et al.*, 1998); además, se ha reportado que diferentes potenciadores en el gen *Bmp5* pueden controlar la expresión en huesos individuales (Guenther *et al.*, 2008). *Bmp5* parece estar regulado epigenéticamente, ya que se ha reportado metilación diferencial en una isla CpG en la región 3' del gen *Bmp5* causada por la dieta (Leclerc *et al.*, 2013). Por otra parte, también se ha propuesto que *Bmp5* está regulado por el complejo Poliycomb represivo 2 (*PRC2*), el cual media la trimetilación de la lisina 27 en la histona H3 (H3K27me3) (Natsume *et al.*, 2013).

TSS  
↑

-28 TTGTGCTTACATTAGTCTTTAGATCTCTGTTGAAGAGAGCTGTTATATTT  
MYB\_Q5/Q6

+23 GTGCCTGCTAGAGTTGGAATAACAGTTAAGAAGCTGACAGGGGTTGAAT

+73 GGATTTACAGAAGTTTTTTCAAGTAAATTCAGGGAAACATATGAATTAGA

+123 TTAGTACATTCTTTAGAATTAGTTTATACTAAGGTGATTCAAAAGATGTT  
GR\_Q6

+173 AAAGTTATCACCAGGCTGCTGGACAAATATAAATTATACTACCAAGGTAC

+223 AGATCAAGACAAATCTGTGACTCAGGACTTTATCTTTGAAAGAGTGCAAG

+273 GTGTGAGAAGAAGCTCAGAATAACAAGAGAAGATAACTCTGGGAACTACAG

+323 TGTATCAGAAGATCAGCTCTTGCTAACACAACCCTGAACTAAAGACCTGG

+373 TTATCTAAGGTTTTTAATAGGAATGCCTAGGTCAGCTGACAAAATACTGG

+423 TCTTCTGCTCCATAAATGCAGAAAAA**CG**AATAACAACAGTGGAATAATTGG

+473 AAGTCTGAATTTTCAGCTTTCTTAGAAATAACTGCAACCTGACACATTCCA

+523 TAATATTTAA**ACGG**AGGGTGGGTGAGAATCACCAAAGATGTTATGTTTAG

+573 AGATGACATTGACATGAAGAATAGGTAAATTTTGTTTTTCAGCCACTGGT

+623 AAAGCAGATCTCATAGGAGCTCAGAATAAGCAGGAGAAATATTTTTGTTC

+673 TTTT

Figura 10. Caracterización de la región flanqueante 5' del gen *Bmp5* en tortuga golfina. Se indican los sitios CpG con potencial de metilación (amarillo), posibles sitios de unión a factores de transcripción y el sitio de inicio de la transcripción (TSS por sus siglas en inglés; flecha negra). Receptor de glucocorticoides (GR); activador transcriptional MYB (MYB). Los sitios de unión a factores de transcripción fueron identificados mediante el software GPMiner (Lee *et al.*, 2012).

### 3.3.4 *Cbx3*

En tortuga golfina se caracterizó la región promotora putativa del gen *Cbx3*, un fragmento de 785 pb (Fig. 11). Se identificaron cuatro sitios CpG con potencial de metilación en la región



promotora. También se identificó la TATA box, así como algunos TFBS (Fig. 11). La función de los factores de transcripción se resume en el cuadro 8.

El gen *Cbx3* pertenece a la familia de proteínas de heterocromatina 1 (*HP1*), estas proteínas juegan un papel importante en el empaquetamiento de la heterocromatina en los centrómeros y en los telómeros de los cromosomas en eucariotas (Kwon & Workman, 2008). Las proteínas *HP1* pueden participar en la represión de la transcripción tanto en la heterocromatina como en la eucromatina (Kwon & Workman, 2008). La eucromatina permanece descondensada durante la interfase, mientras que la heterocromatina permanece condensada a lo largo del ciclo celular; ambas estructuras se pueden distinguir por modificaciones post-traduccionales únicas en las histonas (i.e. acetilación y metilación de histonas) (Richards & Elgin, 2002).

La heterocromatina y la eucromatina presentan diferentes componentes cromosómicos no histónicos, como las proteínas HP1, las cuales se caracterizan por tener dos dominios prominentes conservados: el cromodominio (CHD) y el cromodominio sombra (CSD); CHD es responsable de la unión de HP1 a la lisina 9 di- y trimetilada de la histona H3, que son marcas epigenéticas para el silenciamiento génico; mientras que el CSD se une a proteínas cromosómicas no histónicas (por ejemplo al co-represor universal transcripcional KAP-1) (Lechner *et al.*, 2000).

*Cbx3* es un gen de mantenimiento que posee elementos ubicuos de apertura de la cromatina (UCOE, por sus siglas en inglés) y que a su vez también se encuentra regulado epigenéticamente (Williams *et al.*, 2005). Se ha propuesto que la metilación del ADN en combinación con distintos patrones de modificación de histonas (como acetilación y metilación) permiten la función de UCOE en *Cbx3* (Lindahl Allen & Antoniou, 2007). En humanos se ha identificado que la región UCOE de *Cbx3* es de aproximadamente ~3 kb, abarca la región promotora y se encuentra libre de metilación más allá de la isla CpG que se encuentra en esta región (Lindahl Allen & Antoniou, 2007).



### 3.3.5 *Prrx1*

En tortuga golfina se caracterizó la región promotora putativa del gen *Prrx1*, un fragmento de 364 pb (Fig. 12). No se identificaron sitios CpG con potencial de metilación en la región promotora. Se identificó la TATA box, CCAAT box; así como algunos TFBS (Fig. 12). La función de los factores de transcripción se resume en el cuadro 8.

*Prrx1* es un gen homeobox, que funciona como coactivador de la transcripción y se expresa en el mesodermo durante el desarrollo embrionario con patrones temporales y espaciales específicos (Kern *et al.*, 1994). El gen *Prrx1* se expresa en células de la cresta neural craneal embrionaria humanas no diferenciadas y juega un papel importante en el diseño del primer arco faríngeo y el desarrollo mandibulo-facial (Çelik *et al.*, 2012). Martin *et al.* (1995) demostraron que en ratones una pérdida en la función de este gen provoca letalidad, malformación de estructuras esqueléticas craneofaciales, de extremidades y vertebrales. En humanos con el complejo agnatia-otocefalia se ha identificado una mutación heterocigótica de pérdida de función en este gen (Sergi & Kamnasaran, 2011).

Se ha demostrado el control epigenético para el patrón esquelético normal y la formación ósea por la histona metiltransferasa *Ezh2*, que es la subunidad activa del complejo represivo Polycomb 2 (PRC2) y cataliza la metilación de H3K27 (Dudakovic *et al.*, 2015). La pérdida genética condicional de *Ezh2* en células mesenquimales no comprometidas que expresan *Prrx1* produce múltiples defectos en el patrón esquelético y la formación ósea (Dudakovic *et al.*, 2015). También, se ha sugerido que *Prrx1* es regulado epigenéticamente por metilación del ADN (Lee *et al.*, 2015).



### 3.3.6 *Pax6*

En tortuga golfina se caracterizó la región promotora putativa del gen *Pax6*, un fragmento de 497 pb (Fig. 13). Se identificaron 24 sitios CpG con potencial de metilación en la región promotora y 25 en la región 5' UTR. Se identificó la TATA box, potenciales GC box; así como algunos TFBS (Fig. 13). La función de los factores de transcripción se resume en el cuadro 8.

*Pax6* es un gen homeobox regulador de la transcripción, que al traducirse a proteína presenta dos dominios de unión a ADN altamente conservados, un dominio pareado y un homeodominio (Ton *et al.*, 1991). El gen *Pax6* (junto con *Rax*, *Six3* y *Lhx2*) forma parte de un conjunto de factores de transcripción del campo del ojo que están altamente conservados entre vertebrados (Zuber *et al.*, 2003) se considera un gen selector de ojos (Kozmik, 2005), ya que es suficiente para iniciar la cascada reguladora para el desarrollo del cristalino y los ojos (Chow *et al.*, 1999; Ashery-Padan *et al.*, 2000; Kozmik, 2005).

El gen *Pax6* se expresa durante el desarrollo embrionario temprano no sólo en todas las estructuras del ojo en desarrollo, sino también en regiones específicas del cerebro, del tubo neural ventral, del bulbo olfatorio y del páncreas (Walther & Gruss, 1991). *Pax6* también actúa como un intermediario esencial en la señalización gradual de *Shh* en el tubo neural caudal, controlando la identidad de las células progenitoras ventrales y el destino de las neuronas motoras e interneuronas ventrales (Ericson *et al.*, 1997).

Se ha propuesto que *Pax6* está sujeto a regulación epigenética mediante el complejo represivo Polycomb por la histona metiltransferasa Ezh2, mediante la marca H3K27me3 (Taberlay *et al.*, 2011). También, se ha reportado que *Pax6* está regulado por la metilación del ADN donde hay presencia de islas CpG, específicamente en el exón 5 (Jones, 1999).

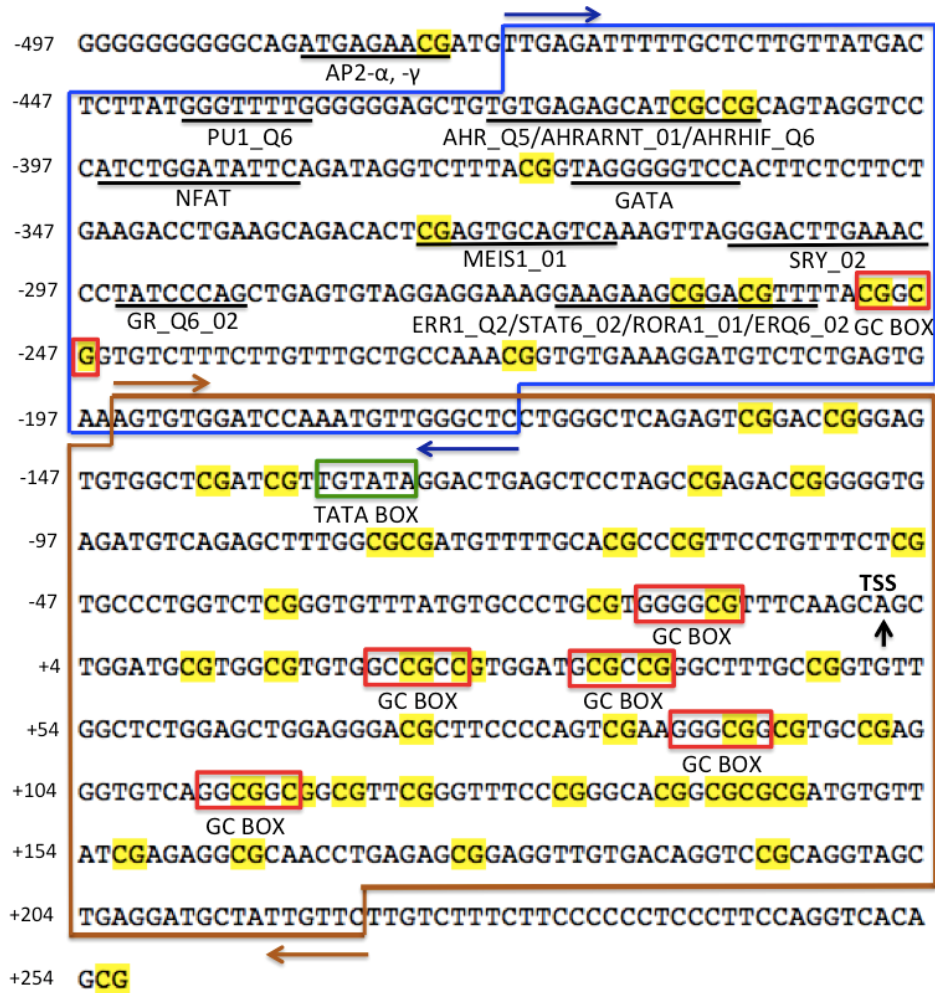


Figura 13. Caracterización de la región promotora putativa del gen *Pax6* en tortuga golfinia. Se indican los sitios CpG con potencial de metilación (amarillo), los posibles sitios de unión a factores de transcripción (subrayados en negro), el sitio de inicio de la transcripción (TSS por sus siglas en inglés; flecha negra), la TATA box (rectángulo verde) y potenciales GC box (rectángulos rojos). Proteínas AP2 (AP2), factor de transcripción PU1 (PU1), receptor de hidrocarburo de arilo (AHR), complejo receptor de hidrocarburo de arilo (AHRARNT), factor de inducción de hipoxia (HIF), factor nuclear de proteínas de células T activadas (NFAT), factores de transcripción GATA (GATA), proteína homeótica MEIS1 (MEIS1), proteína SRY (SRY), receptor de glucocorticoides (GR), receptor relacionado a estrógenos 1 (ERR1), proteína de la señal de transducción y activación de transcripción 6 (STAT6), receptor de hormonas esteroides RORA1 (RORA1), receptor de estrógenos (ERQ6). El recuadro azul indica un fragmento de 301 pb que incluye una secuencia ascendente (nt -472 a -308), la isla CpG-1 ( nt -307 a -202) y una secuencia descendente que se superpone 24 nt (nt -201 a -172) con un fragmento de 415 pb indicado con recuadro café, el cual incluye la isla CpG-2 (nt -195 a +194), y una secuencia descendente en la región 5' UTR (nt +195 a +220). Ambos recuadros (azul y café) indican fragmentos analizados por secuenciación con bisulfito (ver siguiente capítulo). Las regiones reguladoras y los sitios de unión a factores de transcripción fueron identificadas mediante el software GPMiner (Lee *et al.*, 2012).

### 3.3.7 *Mllt1*

En tortuga golfina se caracterizó la región promotora putativa del gen *Mllt1*, un fragmento de 329 pb (Fig. 14). Se identificaron cuatro sitios CpG con potencial de metilación, uno en la región promotora y 3 en la región 5' UTR (Fig. 14). Se identificó la TATA box, y dos TFBS (Fig. 14). La función de los factores de transcripción se resume en el cuadro 8.

```
-329 TTTTGTGGGCTTTCATAATGGTCTAACCAGTGAGCAAATGCCTAATAC
      ELK1_Q2/NFAT_Q6
-279 TCTTTTAAAGATTATTTTACTATCTGCAAATGCTGTAAACAATTTGGATC
-229 TGAGATTCCAGTTGTTCTGCTTTGTCTTCCTGAATGATAAAGATGGTGGA
      TATA BOX
-179 GTCAGAACTTAGCTTACAGCTTAGTTGATGTATCTGTCTTCTATAGCTGT
-129 ATTGACTCTGCAGAGTAAGGTGTGACTCAGGCACACAGAATAGATTTATG
-79 ATGTTAGAAACCATTTTACAATCACTTTTCTGACTGACCACAATTTAGT
      TSS
-29 TTTAAAGAATCGCCATGATCTTCTGTGGCAACTTAGTTTCATTGTGATAA
      ↑
+22 ACACTTGATTTGATTCTTGTCTTCTGATACTTAGTATCTTCTGTCTGTA
+72 GATCTCAAAGCTCTGTAAACAATGTCATCTGGCCTGTATTGACTAGTGT
+122 CCCACATCTCTCTCCCTTTCCAGTGACGGTGCAAGTGAAGCTAGAGCTG
+172 GGGCACCGAGCCCAACTCCGGAAAAAGCCCACCACCGAAGGGTTTACTCA
+222 TGACTGGATG
```

Figura 14. Caracterización de la región promotora putativa del gen *Mllt1* en tortuga golfina. Se indican los sitios CpG con potencial de metilación (amarillo), posibles sitios de unión a factores de transcripción (subrayados en negro), el sitio de inicio de la transcripción (TSS por sus siglas en inglés; flecha negra), y la TATA box (rectángulo verde). Factor de transcripción ELK1 (ELK1), factor nuclear de proteínas de células T activadas (NFAT). Los sitios de unión a factores de transcripción fueron identificados mediante el software GPMiner (Lee *et al.*, 2012).

*Mllt1* es un gen translocado, homólogo al gen *Mll* que pertenece a la familia del grupo Trithorax (TrxG), cuyas proteínas funcionan como activadoras de la transcripción en genes *Hox* (Milne *et al.*, 2002). Particularmente, *Mll* cataliza la trimetilación de H3K4 en genes *Hox* a través de su dominio conservado SET, y esta metilación es una característica de los genes activos (Barber & Rastegar, 2010; Schuettengruber *et al.*, 2011). Se ha reportado que este gen cumple un papel esencial en el desarrollo embrionario temprano; en ratones una interrupción dirigida en este gen conduce a letalidad embrionaria (Doty *et al.*, 2002). También, se ha sugerido que la función de esta proteína no es necesariamente iniciar la expresión de genes *Hox*, sino mantener la expresión génica en los segmentos corporales apropiados posteriormente en el desarrollo (Schuettengruber *et al.*, 2011). La actividad de regulación transcripcional de *Mllt1* podría implicar la alteración de la estructura de la cromatina de los genes diana (Doty *et al.*, 2002).

Se han identificado algunos mecanismos epigenéticos que están directamente asociados a la regulación de *Mllt1*, incluida la metilación del ADN, la acetilación y la metilación de histonas (Zhang *et al.*, 2012). Doty *et al.* (2002) reportaron una región reguladora 5' putativa altamente conservada de este gen en ratón y humano, la cual es rica en GC y contiene varios sitios potenciales de unión a *Sp1*. Se ha reportado su silenciamiento génico como resultado de la hipermetilación en la región promotora (Stumpel *et al.*, 2009). También, se ha propuesto que la histona metiltransferasa DOT1L (disruptor of telomeric silencing 1 like) que cataliza la dimetilación de la histona H3K79 (H3K79me2) en *Mll* puede desempeñar un papel activo en el mantenimiento de la expresión génica de este gen. La eliminación del dominio SET conservado de este gen por recombinación homóloga en células madre en ratones provoca la reducción en la monometilación de H3K4 y defectos de metilación del ADN en los mismos loci *Hox*, lo que induce la represión génica (Terranova *et al.*, 2006).

### **3.3.8 *Tbx22***

En tortuga golfina se caracterizó la región promotora putativa del gen *Tbx22*, un fragmento de 855 pb (Fig. 15). Se identificaron 30 sitios CpG con potencial de metilación, 28 en la región promotora y dos en la región 5' UTR (Fig. 15). Se identificó la TATA box, la CCAAT box, una



posible GC box y varios TFBS (Fig. 15). La función de los factores de transcripción se resume en el cuadro 8.

```

-855 TGATTATTACCAAAGCCGGCAGGTATGGCAGAGCCAGGCCGCCTTGGGT
                                STAT3_02/STAT1_03
-805 GCTGTGTGGTTGTATATAAATCATGGGTGATAGCCACAGGGTGTCTTCTG
                                TBP_Q6          ETS_Q6/PEA3_Q6
-755 GCCCAAGAAAAACCCAGGTTCTTAAATACATGTGTTGTGCTTTCGATTGC
                                E2F1DP1_01
-705 TCGTGCTAACGATTCAAAACTACGGGCAGCTCTGGAGAGCGTTGTAAAA
                                STAT4_01/STAT6_01
-655 TATGAAACTTTCACTGAATCCCTGCAGCAAATCCCTTTGTCAAAGATTTG
                                AREB6_04
-605 GCAAGTGGGACCAAAAGCAAACCATTCGGCAAGCGTTCAAAAACGTGTAG
                                CCAAT BOX          PAX2_02/T3R_Q6
-555 TATGCATTTATGCATGTTAACTGGAATGGTAGCCTATACAATCTTCATAC
                                NFAT_Q6/HMGIY_Q6/NFAT_Q4_01
-505 TTAATGTTCCAATATATCTCTACAGACGATATATTTGGTGTATGTTTTTC
-455 TCTTCAATATTTTAATCAACTCGAATCGTATTAATATCTATATGAACAAC
-405 ATTACAAAGGAGGGTATGTAACCTAATGTTAGAAACCACGATCAGTGGAA
-355 TTCTGTTTTACTATAGCCATCATTTTTTTCATGCATATACTTTAATATTTTC
-305 CCATATAGTAGATCTTACGGCAACTCTTTATATACAGCTAAATGTAACTT
                                TATA BOX
-255 CTTGTCTCTGCGATCACCCACGCATAACAGATCGGTTCCCGCTCACCGTT
-205 CTGTGTAGCGTTTTGTGCTAAGAGCGACAACCACCCAGAGGATTTACACC
-155 CGAATATTTTTCGGTACAATCCCGTTTCCAGTCCCCGAAAGTGATTATTT
-105 AAAAAAAAAAATAATCGTTGTCGACTTTTAAAGTGGGAGCTTTGTCCTGAA
-55 ACTTTTTTACTCCCGCCTTACAAGCTTCAAAAGGAAAGAGGGAAAATAACG
                                TSS
                                GC BOX
-5 GGCTCCTTTCTGCATCCTGCAGGAGAATG

```

Figura 15. Caracterización de la región promotora putativa del gen *Tbx22* en tortuga golfina. Se indican los sitios CpG con potencial de metilación (amarillo), los posibles sitios de unión a factores de transcripción (subrayados en negro), el sitio de inicio de la transcripción (TSS por sus siglas en inglés; flecha negra), la TATA box (rectángulo verde), la CCAAT box (rectángulo naranja) y GC box (rectángulo rojo). Proteínas de la señal de transducción y activación de la transcripción (STAT1-6), proteína de unión a TATA (TBP), factor de transcripción ETS, polyoma enhancer activator 3 (PEA3), complejo de los factores de transcripción E2F1 y DP1 (E2F1DP1), proteína dedos de zinc AREB6 (AREB6), paired box gene 2 (Pax2), receptor nuclear 3 (T3R), factor nuclear de proteínas de células T activadas (NFAT), proteínas del grupo de alta movilidad (HMGIY). Las regiones reguladoras y los sitios de unión a factores de transcripción fueron identificadas mediante el software GPMiner (Lee *et al.*, 2012).

*Tbx22* es miembro de una familia de genes conservados filogenéticamente que comparten un dominio de unión al ADN común, llamado T-box, los cuales codifican factores de transcripción implicados en la regulación de procesos del desarrollo en vertebrados, específicamente en el mesodermo (Papaioannou, 2014). El gen *Tbx22* es clave en el desarrollo cráneo-facial ya que juega un papel importante en la formación ósea del paladar duro posterior; mutaciones en el dominio T-box provocan la pérdida de su función, y dan como resultado fenotipos como paladar hendido y anquiloglosia (Pauws *et al.*, 2009).

En humano, se ha propuesto que *Tbx22* es capaz de autorregular su expresión a través de un promotor distal y que presenta al menos dos sitios putativos de sitio de inicio de la transcripción (Andreou *et al.*, 2007). Cortese *et al.*, (2008) analizaron el perfil de metilación del ADN en la región 5' UTR en distintos tejidos de humano, y aunque no observaron metilación tejido-específica, sí observaron metilación sexo-específica; hipermetilación en muestras femeninas e hipometilación en muestras masculinas. También se ha reportado que la modificación post-traducciona por sumoilación en la región 5' del dominio T-box provoca actividad represiva de *Tbx22* (Andreou *et al.*, 2007).

### **3.3.9 *Hoxb9***

En tortuga golfinia se caracterizó la región promotora putativa del gen *Hoxb9*, un fragmento de 362 pb (Fig. 16). Se identificaron 29 sitios CpG con potencial de metilación, 15 en la región promotora, 12 en la región 5' UTR y dos en la región codificante (Fig. 16). Se identificó la TATA box, putativas GC box y varios TFBS (Fig. 16). La función de los factores de transcripción se resume en el cuadro 8.

El gen *Hoxb9* es un factor de transcripción que presenta dominio homeobox y está involucrado en la regulación del desarrollo embrionario, principalmente durante el desarrollo del tubo neural (Nagel *et al.*, 2007). En ratones, se ha demostrado que la eliminación homocigótica de *Hoxb9* causa anomalías en la columna vertebral cervico-torácica y defectos en la morfogénesis del esternón (Medina-Martínez *et al.*, 2000). En humano, se ha identificado que deleciones en la región cromosómica que abarca los genes *Hoxb1* a *Hoxb9* está asociado con defectos del

desarrollo, incluyendo anomalías traqueo-esofágicas (Pajusalu *et al.*, 2015). También en humano, se ha reportado la translocación *de novo* con un punto de ruptura cerca del extremo 5' del grupo de genes *Hoxb* en un paciente con retraso del desarrollo y malformaciones esqueléticas (Yue *et al.*, 2007).



Figura 16. Caracterización de la región promotora putativa del gen *Hoxb9* en tortuga golfinia. Se indican los sitios CpG con potencial de metilación (amarillo), los posibles sitios de unión a factores de transcripción (subrayados en negro), el sitio de inicio de la transcripción (TSS por sus siglas en inglés; flecha negra), la TATA box (rectángulo verde), y potenciales GC box (rectángulo rojo). Proteína E2F (E2F), pre-B-cell leukemia transcription factor 1 (PBX1), proteína FAC1(FAC1), activador transcriptional MYB (MYB), proteína del factor nuclear 1 (NF1), receptor nuclear 3 (T3R), proteínas de la señal de transducción y activación de la transcripción (STAT1-6), proteína YY1 (YY1), proteína activadora 1 (AP1), factor de transcripción 11 (TCF11), proteína homeótica MEIS1 (MEIS1). El recuadro azul indica un fragmento de 334 pb que incluye dos islas CpG (isla CpG-1 en la región promotora: nt -20 a -12 e isla CpG-2 en la región 5' UTR: nt +57 a +183) analizado por secuenciación con bisulfito (ver siguiente capítulo). Las regiones reguladoras y los sitios de unión a factores de transcripción fueron identificadas mediante el software GPMiner (Lee *et al.*, 2012).

Se ha propuesto que la metilación del ADN podría corresponder a un mecanismo de regulación de la expresión génica particular de la red de genes *Hox*, ya que en el caso del cluster *Hoxb* se ha observado una relación entre la metilación del ADN y la expresión génica, y la desmetilación del ADN y la ausencia de expresión génica; y se postula que los patrones de metilación de estos genes reflejan señales establecidas durante el desarrollo, y que posiblemente pueden ser modificadas en tejidos adultos con progresión tumoral (Flagiello *et al.*, 1996). Esto coincide con lo reportado más recientemente por Wu & Zhang (2010), quienes proponen que la metilación del DNA en las regiones no promotoras de células madre neurales postnatales promueven la transcripción de genes neurogénicos (e.g. *Hoxb9*) al antagonizar genes del grupo Polycomb, los cuales reprimen la expresión génica. También se ha sugerido, que la regulación transcripcional de *Hoxb9* está mediada por las metilasas de histonas Mll1 y Mll3 y por estrógenos (Ansari *et al.*, 2011).

### 3.3.10 *Dnmt3b*

En tortuga golfina se caracterizó la región promotora putativa del gen *Dnmt3b*, un fragmento de 518 pb (Fig. 17). Se identificaron ocho sitios CpG con potencial de metilación en la región promotora, la TATA box y la CCAAT box (Fig. 17). No se identificaron TFBS (Fig.17).

El gen *Dnmt3b* codifica una enzima DNA metiltransferasa *de novo*, que establece patrones de metilación del ADN durante el desarrollo (Okano *et al.*, 1998). *Dnmt3b* se expresa predominantemente en células embrionarias tempranas y células progenitoras neurales, especialmente en células precursoras neurales en proliferación dentro de la corteza cerebral, células retinianas, epitelio olfativo embrionario y la médula espinal (Feng *et al.*, 2005; Watanabe *et al.*, 2006). En humano, se ha identificado que mutaciones en *Dnmt3b* causan el síndrome de inmunodeficiencia autosómica recesiva rara, inestabilidad centromérica y el síndrome de anomalías faciales (ICF) (Hansen *et al.*, 1999; Xu *et al.*, 1999). También, en embriones de ratón y pez cebra se ha demostrado que la ausencia de *Dnmt3b* provoca defectos en la estructuras cráneo-faciales (Jin *et al.*, 2008; Rai *et al.*, 2010).

Recientemente, se ha demostrado que mutaciones en *Dnmt3b* dan lugar a anomalías faciales y defectos neurológicos en humanos, ya que este gen actúa metilando directamente la región promotora del gen *Sox10* de la cresta neural en los progenitores del tubo neural e inhibiendo su transcripción, lo que provoca sobreproducción de células de la cresta neural y malformaciones cráneo-faciales (Hu *et al.*, 2014). Además, se ha reportado que la desactivación de *Dnmt3b* durante la neurulación provoca pérdida de H3K27me3 y de la proteína Ezh2 del complejo represor Polycomb en promotores de los genes de especificación de la cresta neural (Martins-Taylor *et al.*, 2012). También, se ha propuesto que *Dnmt3b* es regulado por metilación del ADN en islas CpG de la región promotora, ya que se ha identificado metilación diferencial de estas regiones en células neuronales normales con respecto a células tumorales (Rajendran *et al.*, 2011).

```

-518 GGGTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTGCATAGTGCAAGCCAGGACACAAGCAGGA
-468 GGGGGCATGCTCGTTGCGTGAGTGCAGGAGGAGGCATGCACTGTATGTTA
-418 GTGCCCAGGAGGCATAGCTGCGTGTGAAGTTGCCAACAGAAAAAGCTGTC
-368 CCTCATTCTTCTGAAAATCTTACAATACTTCTATAGACAGTAGCTTAGA
                                     TATA BOX
-318 ACCAAAATTCCTGTTCCCTGGTGACTTAGGGCCTGAGCCTGGTCTCATT
-268 GACATCAAGGGCAGTTTTGTCATTCATCTGGGAGGGAGTAGGAGCTAGCT
-218 TTCAGGGCCCAATCCTGTAAATGCTTACACACATGAGTAGCTTGACTCAT
                                     CCAAT BOX
-168 GTGCGTCTGTAAAGGTGAGAGAGGTGCAAACAGAAATGCTTTGTGTACAC
-118 ATTGCAGCTGGGCAATTTCACGATCACTCGAGGGCGCTTGTATTATTGGCT
-68 TCTCTGTGGGCTCCTCCTCCAATGTCTGGCTGGTGTTCCTGCTGCTGAT
-18 TTGCATTGCCCTGGTTTTTTTTCAGGATGGGAAA
                                     TSS
                                     ↑

```

Figura 17. Caracterización de la región promotora putativa del gen *Dnmt3b* en tortuga golfin. Se indican los sitios CpG con potencial de metilación (amarillo), el sitio de inicio de la transcripción (TSS por sus siglas en inglés; flecha negra), la TATA box (rectángulo verde), y CCAAT box (rectángulo naranja). Las regiones reguladoras fueron identificadas mediante el software GPMiner (Lee *et al.*, 2012).

Cuadro 8. Función de los factores de transcripción (TF) que pudieran unirse a secuencias reguladoras (sitios de unión de factores de transcripción (TFBS) identificados en la región promotora de los genes caracterizados.

<b>Factor de transcripción</b>	<b>Función</b>	<b>Referencia</b>
AHR	El receptor de hidrocarburo de arilo (AHR) es un factor de transcripción activado por ligando que detecta toxinas ambientales y ligandos endógenos.	Mandal (2005)
AHR-ARNT	El complejo receptor de hidrocarburo de arilo (AHR-ARNT) está asociado a la respuesta de un organismo a contaminantes ambientales o xenobióticos.	Beischlag et al. (2008)
AHR-HIF	AHR junto con el factor de inducción de hipoxia (HIF) tienen un papel clave en la respuesta celular a la hipoxia, incluida la regulación de genes implicados en el metabolismo energético, la angiogénesis y la apoptosis.	Semenza (2000)
AP1	La proteína activadora 1 (AP1) regula la expresión génica en respuesta a estímulos fisiológicos y patológicos, tales como citoquinas, factores de crecimiento, señales de estrés, infecciones bacterianas y virales.	Hess et al. (2004)
AP2 $\alpha$ , - $\gamma$	La familia de factores de transcripción AP2 se expresa en las células emergentes de la cresta neural de vertebrados; deficiencias de AP2 $\alpha$ pueden provocar anomalías faciales.	Eckert et al. (2005)
AP3	El complejo AP3 facilita la gemación de vesículas en una vía de transporte especializada en células neuronales.	Odorizzi et al. (1998)
AP4	La proteína de unión potenciadora 4 (AP4) se une a la secuencia E-box en los promotores de sus genes diana, y puede actuar como un represor o activador para diferentes genes.	Egawa & Littman (2011)
AREB6	AREB6 es un factor de transcripción homeótico con dedos de zinc que regula la expresión génica positiva o negativamente a través de la unión a la secuencia E-box en los promotores de sus genes diana.	Ikeda & Kawakami (1995)
CEBP	CCAAT/enhancer binding proteins (CEBP) pertenecen a la familia de proteínas cremallera de leucina y tienen funciones clave en la regulación de la proliferación celular; su intervención a nivel de los factores de transcripción está relacionada con el control de la respuesta inmune.	Nerlov (2007)
E2A	El factor de transcripción 3 (E2A) activa la transcripción de sus genes diana uniéndose a secuencias reguladoras E-box, se ha identificado que regulan la diferenciación de linfocitos B.	O'Riordan & Grosschedl (1999)
E2F1DP1	El factor de transcripción DP1 en cooperación con E2F1 controla la expresión de varios genes específicos del ciclo celular en la fase S.	Martin et al. (1995)
ELK1	ELK1 es un Factor de transcripción con dominio ETS, esta proteína es una diana nuclear para la cascada de señalización RAS-RAF-MAPK	Yang et al. (1998)
ERQ6	ERQ6 es un receptor de estrógenos activado por ligandos, importante en la fisiología de la lente.	Davis et al. (2002)
ERR1	ERR1 es un receptor relacionado a estrógenos y forma parte un subgrupo de la familia de receptores de esteroides/tiroides/retinoides.	Sladek et al. (1997)
ETS	ETS es una familia de factores de transcripción, que presentan un dominio conservado de unión al ADN (ETS-DBD), funcionan como integradores nucleares críticos de cascadas de señalización Ras-MAPK	Wasylyk et al. (1998)
FAC1	FAC1 es un factor transcripcional esencial en el linaje extraembrionario para el correcto desarrollo del cono ectoplacentario y las interacciones fetomaternas, y se expresa en neuronas del cerebro en desarrollo y del tubo neural.	Goller et al. (2008)
GATA family	La familia de factores de transcripción GATA consta de seis proteínas (GATA1-6). GATA1, 2 y 3 son reguladores importantes de las células madre hematopoyéticas y sus derivados, mientras que los genes GATA4, 5 y 6 se expresan en diversos tejidos derivados del mesodermo y endodermo.	Pikkarainen et al. (2004)
GR	El receptor de glucocorticoides (GR) se expresa en casi todas las células del cuerpo y regula genes que controlan el desarrollo, el metabolismo y la respuesta inmune.	Kumar & Thompson (2005)
HNF3/HFH3	El factor 3 nuclear de hepatocitos (HNF-3), proteínas homólogas HFH, son una familia de transcripción que han sido implicados en la determinación del destino celular durante la organogénesis y en la expresión génica tipo celular específica.	Overdier et al. (1997)
HMG1Y	High-mobility group proteins (HMG-Y) son un grupo de proteínas no histónicas que inducen cambios estructurales en sustratos de cromatina y la formación de complejos estereoespecíficos llamados "enhanceosomas" en las regiones promotoras/potenciadoras de sus genes diana.	Reeves & Beckerbauer (2001)

Cuadro 8 (continuación)

<b>Factor de transcripción</b>	<b>Función</b>	<b>Referencia</b>
MEIS1	La proteína homeótica MEIS1 regula la expresión de genes implicados en el patrón, proliferación y diferenciación de la retina neural.	Marcos <i>et al.</i> (2015)
MYB	El activador transcripcional MYB juega un papel esencial en la regulación de la hematopoyesis.	Chen <i>et al.</i> , 2007
MYOD	La proteína 1 de diferenciación miogénica (MYOD) pertenece a una familia de proteínas conocidas como factores reguladores miogénicos; durante el desarrollo tiene la función destinar células del mesodermo para diferenciarse en una línea de células esqueléticas	Berkes & Tapscott (2005)
NCX	El intercambiador Na <sup>+</sup> /Ca <sup>2+</sup> (NCX) es una proteína de membrana antiportadora que remueve el calcio de las células.	Dipolo & Beaugé (2006)
NFAT	La familia de proteínas Nuclear Factor of Activated T cell (NFAT) regula el sistema inmune, la respuesta inflamatoria, la angiogénesis, la formación de válvulas cardíacas, el desarrollo del miocardio, el desarrollo del músculo esquelético y la homeostasis ósea.	Pan <i>et al.</i> (2013)
NFY	El factor de transcripción nuclear Y (NFY) promueve una conformación de cromatina permisiva para la unión de factores de transcripción maestros en células tipo-específico.	Oldfield <i>et al.</i> (2014)
NF1	Las proteínas del factor nuclear 1 (NF1) se clasifican dentro de los factores de transcripción constitutivos, y están involucrados en la remodelación de nucleosomas y el mantenimiento de una estructura de cromatina abierta específica en regiones reguladoras de sus genes diana.	Chikhirzhina <i>et al.</i> (2008)
NKX62	NKX6-2 es un factor de transcripción involucrado en la génesis y desarrollo de oligodendrocitos.	Chelban <i>et al.</i> (2017)
PAX2	Paired box gene 2 (Pax2) es un factor de transcripción importante durante el desarrollo embrionario de la formación del ojo, oído, sistema nervioso central, riñón y tracto genital.	Eccles <i>et al.</i> (2002)
PBX1	PBX1 (pre-B-cell leukemia transcription factor 1) es una proteína de homeodominio de clase TALE involucrada en la regulación de la osteogénesis.	Gordon <i>et al.</i> (2011)
PEA3	Polyoma enhancer activator 3 (PEA3) pertenece a la familia de factores de transcripción ETS (E26 transformation-specific) y tiene un papel importante en la regulación de la morfogénesis de ramificación de los túbulos epiteliales durante la embriogénesis.	Chotteau-Lelievre <i>et al.</i> (2003)
PR	El receptor de progesterona (PR) es un miembro de la superfamilia de receptores nucleares/intracelulares de factores de transcripción dependientes de ligandos que media los efectos fisiológicos de la progesterona.	Lydon <i>et al.</i> (1995)
PU1	PU1 es un factor de transcripción que se expresa en células del linaje hematopoyético incluyendo macrófagos, granulocitos y linfocitos B.	Scott <i>et al.</i> (1994)
RORA1	RORA pertenece a la superfamilia de receptores de hormonas esteroides, y está involucrado en respuesta al estrés celular.	Zhu <i>et al.</i> (2006)
SF1	El factor esteroideogénico 1 (SF-1) es un factor de transcripción involucrado en la determinación del sexo mediante el control de la actividad de genes relacionados con las glándulas reproductivas y suprarrenales.	Morohashi & Omura (1996)
SMAD family	SMADs comprenden una familia de proteínas que funcionan como transductores de señal para los receptores de la superfamilia del factor de crecimiento transformante beta (TGF-B), y son sumamente importantes para regular el crecimiento y el desarrollo celular.	Massague <i>et al.</i> (2005)
SRY	La proteína SRY es responsable del inicio de la determinación del sexo masculino en mamíferos, promueve el desarrollo de gónadas masculinas e inhibe el desarrollo de estructuras reproductivas femeninas.	Berta <i>et al.</i> (1990)
STAT family	STAT comprenden una familia de proteínas que actúan como transductores de señal y activadores de la transcripción que regulan la proliferación, la apoptosis y la diferenciación celular.	Lim & Cao (2006)
TBP	La proteína de unión a TATA (TBP) es un factor de transcripción general que se une específicamente a una secuencia de ADN llamada TATA box.	Veenstra <i>et al.</i> (2000)
TCF11	TCF11 participa en la protección celular contra el estrés oxidativo a través de la inducción de genes antioxidantes.	Koch <i>et al.</i> (2011)
T3R	T3R son receptores nucleares que regulan la función de la hormona tiroidea	Fraichard <i>et al.</i> (1997)
YY1	YY1 es una proteína participa en la represión y la activación de diversos promotores a partir de la modificación de histonas, ya sea dirigiendo histonas desacetilasas o histonas acetiltransferasas hacia el promotor objetivo.	Yao <i>et al.</i> (2001)

### 3.3.11 Identificación de islas CpG (CGIs)

Las islas CpG (CGIs) son regiones cortas ricas en sitios CpG de aproximadamente 200 pb de longitud, con un contenido de G + C del 50% y una frecuencia de CpG (observada / esperada) de 0.6 (Gardiner-Garden & Frommer, 1987; Illingworth & Bird, 2009). Se considera que la mayoría de las islas CpG no están metiladas cuando se encuentran cerca del TSS y cuando se encuentran metiladas están asociadas con el silenciamiento a largo plazo (Jones, 2012). Se identificaron CGIs en tres de los diez promotores de genes caracterizados: *Pax6*, *Sox2* y *Hoxb9*. Para el gen *Pax6* se identificaron dos CGIs: 1) 106 pb en la región promotora (nt -307 a -202) y 2) 389 pb en la región promotora y parte de la región 5' UTR (nt -195 a +194) (Fig. 18A). Para el gen *Hoxb9*, también se identificaron dos islas CGIs: 1) 109 pb en la región promotora (nt -120 a -12) y 2) 127 pb en la región 5' UTR (nt +57 a +183) (Fig. 18B). Para el gen *Sox2* se identificó una isla CpG de 113 pb en la región 5' UTR (nt +81 a +193) (Fig. 18C).

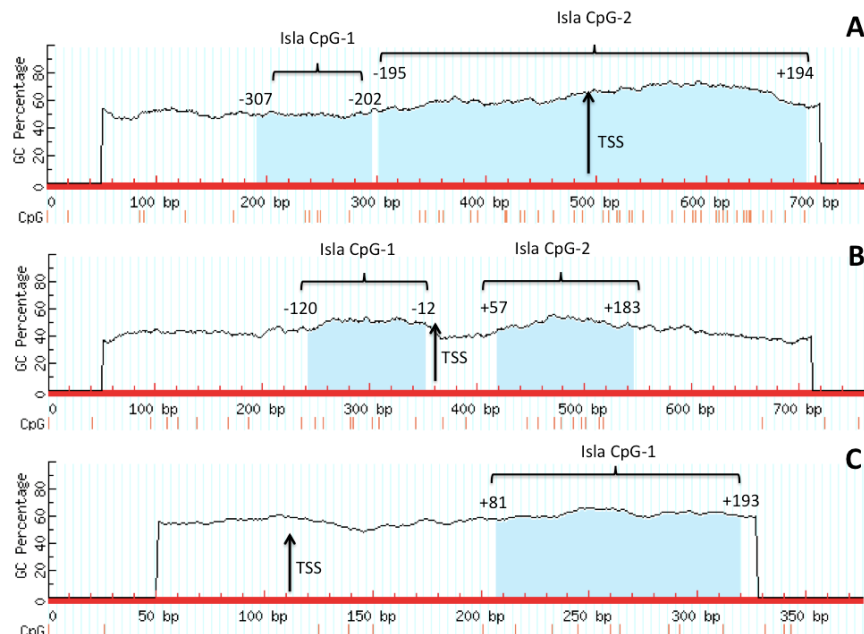


Figura 18. Identificación de islas CpG (azul claro) en la región promotora putativa y 5'UTR de los genes caracterizados para tortuga golfina. Gen *Pax6* (A), gen *Hoxb9* (B) y gen *Sox2* (C). Se indica el sitio de inicio de la transcripción (TSS por sus siglas en inglés) en flecha negra. Las islas CpG se identificaron mediante el software Methprimer (Li & Dahiya, 2002).



### 3.4 Discusión

Se obtuvo la región flanqueante 5' de diez genes de desarrollo embrionario temprano para la tortuga golfina a partir de secuencias conocidas de *C. mydas* y *P. sinensis*. Los segmentos obtenidos de la región flanqueante 5' en cada uno de los genes fueron muy variables en longitudes (126-855 pb; ver Cuadro 7) y en el caso del gen *Bmp5* sólo se pudo aislar parte de la región 5' UTR sin llegar a la región promotora putativa. Para todos los genes se diseñaron primers dentro del primer exón de la región codificante reportada para especies cercanas. La presencia de TATA box, que es una secuencia consenso de la maquinaria básica de transcripción, no fue identificada en todos los genes, ni tampoco la secuencia consenso del CCAAT box. De los diez genes caracterizados, el 80% presentó TATA box, el 50% GC box, 40% CCAAT box y el 30% CGIs. En este contexto, Suzuki *et al.* (2001) reportaron en un estudio sobre regiones promotoras potenciales para 1031 genes en humanos de los cuales 32% presentaron TATA box, 97% presentaron GC box, 64% presentaron CCAAT box y en 48% se identificaron CGIs. Estos datos permiten demostrar que, al igual que en este estudio, las secuencias reguladoras no siempre son identificadas en promotores putativos independientemente del número de genes analizados.

Se identificó la presencia de CGIs en tres genes (*Pax6*, *Sox2* y *Hoxb9*) y aunque existe discusión respecto a la definición de islas CpG (Jones, 2012) es un hecho que estas regiones contienen una frecuencia alta de sitios CpG en el genoma (Illingworth & Bird, 2009). Los criterios para designar una secuencia como isla CpG son de naturaleza exclusivamente bioinformática, basándose en las diferencias en la composición de las bases y las frecuencias de CpG (observadas/esperadas) entre el ADN genómico en masa y las islas CpG (Takai & Jones, 2003). En el presente estudio se usó el software Methprimer para la identificación de islas CpG (Li & Dahiya, 2002). Es importante destacar que la presencia de CGIs en la región 5'UTR se identificó en los tres genes (Fig. 18). La presencia de islas CpG en la región 5' UTR podría estar relacionada a sitios de splicing alternativo (Nagata *et al.*, 1994; Mironov *et al.*, 1999; Turner *et al.*, 2010). En humanos, Illingworth & Bird (2009) reportaron que la mitad de las islas CpG se producen cerca de la región promotora, mientras que el resto ocurre dentro o entre los genes.

La presencia de sitios CpG en las regiones promotoras caracterizadas también fue muy variable: presencia de alto contenido de sitios CpG (CGIs) en tres de los genes (*Pax6*, *Sox2* y *Hoxb9*),

presencia de CpG aislados en cinco de los genes (*Nanog*, *Cbx3*, *Mllt1*, *Tbx22* y *Dnmt3b*), y ausencia de sitios CpG en el gen *Prrx1* (para el gen *Bmp5* sólo se obtuvo parte de la región 5'UTR). De forma general los promotores de genes se han clasificado por su densidad de sitios CpG en alto contenido de sitios CpG (rara vez metilados), contenido intermedio de sitios CpG (inactivos cuando están metilados) y bajo contenido de sitios CpG (generalmente hipermetilados) (Meissner *et al.*, 2008; Weber *et al.*, 2007). Esto concuerda con otros estudios de metilación global que indican que los CpG singles son generalmente hipermetilados (60 al 90%) según el tipo de célula y las CGIs permanecen predominantemente hipometiladas (Deaton & Bird, 2011). A pesar de que algunos genes presenten una densidad baja o intermedia de sitios CpG, éstos podrían tener un papel importante en el control transcripcional. Por ejemplo, se ha sugerido que la región proximal al sitio de inicio de la transcripción en el promotor *Nanog* está sujeta a regulación epigenética en varias especies (Nettersheim *et al.*, 2011) y aunque para este gen sólo se identificaron tres sitios CpG en 577 pb, estos sitios podrían tener un papel importante en la regulación transcripcional o podría presentarse una mayor densidad CpG en regiones promotoras más distales. En el caso del gen *Prrx1* en el cual no se identificaron sitios CpG en la región promotora aislada, sitios potenciales de metilación podrían presentarse en regiones promotoras distales o intragénicas.

## 4. ANÁLISIS DE METILACIÓN DEL ADN *locus*-ESPECÍFICO

A partir de los promotores de genes aislados y caracterizados se eligieron dos que mostraron un alto contenido de sitios CpG (CGIs): el gen *Pax6* y el gen *Hoxb9*. Para el gen *Pax6* se analizó el estado de metilación en embriones de tortuga golfina con anoftalmia y ciclopía, y para el gen *Hoxb9* se analizaron embriones con el síndrome schistosomus reflexus (dada la inversión espinal que presentan estos embriones). Parte de los resultados de este capítulo ya fueron publicados en el artículo “Methylation status of the putative *Pax6* promoter in olive ridley sea turtle embryos with eye defects: An initial approach” (Martín-del-Campo *et al.*, 2018).

### 4.1 Estatus de Metilación en la Región Promotora Putativa del Gen *Pax6* en Embriones con Malformaciones Oculares

#### 4.1.1 Introducción

El desarrollo del ojo en vertebrados se compone de una serie de estructuras que tiene sus orígenes en la interacción de tres tipos de tejidos (el ectodermo neural, el ectodermo superficial y el mesénquima periocular) (Adelmann, 1929; Wilson & Houart, 2004; Heavner & Pevny, 2012). En reptiles, al igual que en otros vertebrados, ambos ojos surgen de un sólo campo ocular que se divide en hemisferios bilaterales y se forman como una extensión del prosencéfalo (Wyneken, 2012). Durante este proceso morfogénético, el gen sonic hedgehog (*Shh*) juega un papel primordial para que ocurra tal división; se expresa en el cerebro anterior ventral y en el mesodermo precordial y una interrupción de *Shh* da como resultado una falla en el campo de la división ocular, provocando ciclopía y una vesícula óptica única (Chiang *et al.*, 1996; Wilson & Houart, 2004).

El gen *Pax6* (junto con *Rax*, *Six3* y *Lhx2*) forma parte de un conjunto de factores de transcripción que actúan en el campo del ojo y que están altamente conservados entre vertebrados (Zuber *et al.*,

2003); se considera un *gen selector de ojos* (Kozmik, 2005), ya que es suficiente para iniciar la cascada reguladora para el desarrollo del cristalino y los ojos (Chow *et al.*, 1999; Ashery-Padan *et al.*, 2000; Kozmik, 2005) *Pax6* también actúa como un intermediario esencial en la señalización gradual de *Shh* en el tubo neural caudal, controlando la identidad de las células progenitoras ventrales y el destino de las neuronas motoras e interneuronas ventrales (Ericson *et al.*, 1997). Se ha propuesto que la supresión de *Pax6* por *Shh* en la placa precordal provoca que el campo del ojo se divida en dos y mutaciones en *Shh* dan lugar al fenotipo de ciclopía (Roessler & Muenke, 2010). Además, la pérdida homocigótica de la función de *Pax6* en humanos y ratones causa anoftalmia (Glaser *et al.*, 1994).

El gen *Pax6* se expresa durante el desarrollo embrionario temprano, no sólo en todas las estructuras del ojo en desarrollo, sino también en regiones específicas del cerebro, del tubo neural ventral, del bulbo olfatorio y del páncreas (Walther & Gruss, 1991). Más recientemente, se ha demostrado que *Pax6* se expresa en el cerebro posterior, desempeñando un papel nuevo en la organización segmentaria en las primeras etapas de desarrollo (Kayam *et al.*, 2013), por lo que la función de *Pax6* no se limita al desarrollo del ojo.

En tortuga golfina se ha reportado una incidencia de malformaciones congénitas del 2%, de las cuales las malformaciones oculares representan del 12 al 15% (la anoftalmía representa el 8%, la microftalmía al 1% y la ciclopía al 0.3%) (Bárcenas-Ibarra *et al.*, 2015; Bárcenas-Ibarra & Maldonado-Gasca, 2009). La identificación de malformaciones oculares congénitas es común en humanos y animales domésticos, ya que regularmente no representan una limitante para la supervivencia (Priester, 1972; Campbell *et al.*, 2002). Por el contrario, en animales silvestres fenotipos oculares aberrantes si suelen ser una limitante para la vida (Sabater & Pérez, 2013). Particularmente, una de las malformaciones oculares más comunes es la anoftalmía, que se caracteriza por la ausencia de tejido ocular en la órbita como resultado de una falla en el desarrollo del tubo neural anterior para formar las vesículas ópticas (Verma & Fitzpatrick, 2007). Otro fenotipo, aunque difícilmente se puede ver en la naturaleza por su incompatibilidad con la vida, pero es considerado la anomalía estructural más común del prosencéfalo en desarrollo en humanos es la holoprosencefalia (Muenke & Beachy, 2000). La holoprosencefalia implica la falla completa de la división del prosencéfalo en los hemisferios derecho e izquierdo y se asocia característicamente con anomalías faciales incluyendo ciclopía y una estructura nasal primitiva (Roessler *et al.*, 1996)

En tortugas marinas, el desarrollo embrionario depende ampliamente de las condiciones ambientales, y es probable que los mecanismos epigenéticos estén involucrados en la regulación del desarrollo. La metilación del ADN en la región promotora es un mecanismo epigenético involucrado en el silenciamiento génico, ya sea evitando la unión de factores de transcripción o atrayendo proteínas de unión al ADN metilado (Jones, 2012). En vertebrados este mecanismo ocurre en el carbono 5 de las citosinas (5mC) en el contexto de la secuencia CpG, y se considera que más de la mitad de los genes contienen CGIs, las cuales se encuentran cerca del TSS y cuando se encuentran metiladas están asociadas con el silenciamiento a largo plazo (Jones, 2012). La metilación en vertebrados también puede ocurrir en el contexto no-CpG (mCHG y mCHH, donde H=A, C o T), aunque las implicaciones biológicas no están claras (Lister *et al.*, 2009). Como una primera aproximación para estudiar la metilación del ADN *locus*-específico en embriones de tortugas marinas con malformaciones congénitas, se seleccionó el gen *Pax6* en tres embriones con defectos oculares (uno con anoftalmía izquierda, uno con anoftalmía izquierda y microftalmía derecha y otro con ciclopía) (Fig. 19) de un grupo de embriones que presentaron múltiples malformaciones identificadas y descritas en un estudio previo (Bárcenas-Ibarra *et al.*, 2015). Se aisló la región flanqueante 5' (denominada región promotora putativa) del gen *Pax6* (ver capítulo 3), y se comparó el estado de metilación de las islas CpG identificadas en esta región en embriones malformados con respecto a embriones normales mediante secuenciación con bisulfito.

#### **4.1.2 Metodología**

4.1.2.1 Colecta de muestras. Previamente, se realizó un estudio en la playa de anidación El Verde Camacho en México (23° 44' 22" N, 106° 58' 27" W), a partir del cual se generó un catálogo de malformaciones congénitas en tortugas marinas (Bárcenas-Ibarra *et al.*, 2015). Se tomaron muestras de tejido de la parte posterior del cuello y se conservaron en etanol absoluto a -20°C para realizar análisis genéticos. Debido a que no se tenía contemplado analizar el estado de metilación y/o la expresión génica en relación a las malformaciones encontradas, no se tomaron muestras del área ocular para aislar ADN o ARN. A pesar de

estas limitaciones, se decidió estudiar el estado de metilación del promotor del gen *Pax6* en embriones con malformaciones oculares, ya que *Pax6* está directamente involucrado en el desarrollo del ojo. Se seleccionaron tres embriones: 1) embrión etiquetado como EV2029-2M, que fue la única muestra que presentó ciclopía (Fig. 19A), 2) embrión etiquetado como EV1846-1M, que presentó anoftalmía izquierda (Fig. 19B) y 3) embrión etiquetado como EV2031-I-E2M que presentó anoftalmía izquierda y microftalmía derecha (Fig. 19C). Los tres embriones presentaron otras malformaciones (Fig. 19) y, por lo tanto, fenotipos muy diferentes. Además, se seleccionaron tres embriones normales. El ADN genómico se extrajo mediante el método de extracción por precipitación salina (Miller et al., 1988) y se conservó a  $-20^{\circ}\text{C}$  hasta su análisis.



Figura 19. Embriones con malformaciones oculares. (A) Embrión etiquetado como EV2029-2M que presentó ciclopía, leucismo, rinocefalia, microcefalia, agnatia superior y prognatia inferior. (B) Embrión etiquetado como EV1846-I-1M, que presentó anoftalmía izquierda, schistosomus reflexus, leucismo parcial, anura, gnatosquisis, focomelia anterior izquierda, sindactilia anterior izquierda y cuello corto. (C) Embrión etiquetado como EV2031-I-E2M que presentó anoftalmía izquierda, microftalmía derecha, laterognatia, falta de pigmentación en la aleta derecha y disostosis craneal. Fotografías de Annelisse Bárcenas-Ibarra.

4.1.2.2 Secuenciación mediada por bisulfito. El ADN de los embriones malformados y normales se trató con bisulfito de sodio mediante el kit de metilación EZ DNA Methylation Gold Kit™ (Zymo Research) siguiendo las instrucciones del fabricante. A partir del aislamiento y caracterización de la región promotora putativa del gen *Pax6* (ver capítulo 3) se diseñaron primers para cada isla CpG mediante el software Methprimer para amplificar un fragmento de aproximadamente 300 pb del ADN convertido (Cuadro 9). Los productos de PCR se purificaron de gel de agarosa al 2% con Wizard® SV Gel and PCR Clean-up System (Promega). Los productos de la PCR purificados se ligaron a un vector de clonación pGEM-T (Promega). La

transformación se realizó mediante choque térmico utilizando células competentes JM109 de *Escherichia coli* (Promega) y la extracción del plásmido se realizó mediante lisis alcalina. Se secuenciaron de cinco a diez clonas por embrión por isla CpG mediante el primer universal T7 y el servicio de "difficult sequencing" proporcionado por MacroGen Inc (Corea). La frecuencia de los sitios CpG metilados se llevó a cabo utilizando el software QUMA (Quantification Tool for Methylation Analysis) (<http://quma.cdb.riken.jp>).

Cuadro 9. Primers utilizados para amplificar islas CpG de la región promotora de los genes *Pax6* y *Hoxb9* de ADN de tortuga golfina tratado con bisulfito de sodio.

Gen	Región objetivo	Primer	Tm (°C)	Tamaño (bp)	Secuencia 5'-3'
<i>Pax6</i>	Isla CpG-1	Pax6-1-F1	59.6	301	TTG AGA TTT TTG TTT TTG TTA TGA TTT T
		Pax6-1-R1	59.9		AAA CCC AAC ATT TAA ATC CAC ACT
	Isla CpG-2	Pax6-2-F2	59.9	414	AGT GTG GAT TTA AAT GTT GGG TTT
		Pax6-2-R2	56.3		AAA CAA TAA CAT CCT CAA CTA CCT AC
<i>Hoxb9</i>	Isla CpG-1 y -2	Hoxb9-F1	55.5	334	TAATTGAATGGTAAAGATTTGTTTT
		Hoxb9-R1	52.3		AAC AAA ATA ATT AAT CAA ACT TTT T

### 4.1.3 Resultados

4.1.3.1 Metilación del ADN en la región promotora putativa del gen *Pax6*. Se compararon las secuencias del ADN tratado con bisulfito de embriones con malformaciones oculares y normales. La eficiencia de conversión fue del 96-100% (Fig. 20). Debido a que el ADN se aisló de la parte posterior del cuello en todos los embriones (que incluye derivados de ectodermo y mesodermo) se presentó mosaicismo en la metilación del ADN en la mayoría de los casos (Cuadro 10). Para el fragmento que contenía la isla CpG-1 se analizó una secuencia de 270 pb, en el cual se presentaron nueve sitios CpG (Fig. 20). En el cílope se identificó un sitio metilado en la posición -409, al cual se le pueden unir tres posibles factores de transcripción: 1) AHRARNT\_01, 2) AHR\_Q5 y 3) AHRHIF\_Q6 (Fig. 13 del capítulo 3). Este único sitio metilado e identificado en el cílope fue evidente en el análisis de las secuencias del 50% de los productos clonados después del tratamiento con bisulfito (Cuadro 10). En el organismo con anoftalmía izquierda se identificaron dos sitios CpG metilados, uno en la posición -262, al cual se le podrían unir cuatro posibles factores de transcripción: 1) ERR1\_Q2, 2) STAT6\_02, 3) RORA1\_01, 4) ERQ6\_02; y otro en la posición -248 que se encuentra dentro de una posible GC box (Fig. 13; Fig 20A). Ambos sitios CpG metilados estuvieron presentes en el 20% de las clonas secuenciadas (Cuadro 10). El otro embrión, que presentó anoftalmía izquierda y microftalmía derecha, curiosamente no mostró ningún sitio metilado en el fragmento de la isla CpG-1 (Fig. 20A). Con respecto a los embriones normales, no se detectaron sitios CpG metilados en el fragmento de la isla CpG-1 (Fig. 20A).





Cuadro 10. Frecuencia de clones con citosinas metiladas en contextos CpG y CHG dentro de la región promotora putativa del gen *Pax6* en embriones con malformaciones oculares y normales. Anoftalmia-1 se refiere al embrión que presentó anoftalmía izquierda; anoftalmia-2 se refiere al embrión que presentó anoftalmía izquierda y microftalmía derecha.

Contexto	Fragmento que incluye isla CpG-1					Fragmento que incluye isla CpG-2					
	CpG			CHG		CpG			CHG		
Sitio metilado	-262	-248	-409	-230	-335	+37	+100	+123	-124	-112	+99
Ciclopía	-	-	50% (4/8)	-	-	-	-	-	100% (5/5)	-	-
Anoftalmía-1	20% (1/5)	20% (1/5)	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Anoftalmía-2	-	-	-	17% (1/6)	-	14% (1/7)	28% (2/7)	-	-	-	-
Normal-1	-	-	-	-	50% (4/8)	-	-	-	-	-	-
Normal-2	-	-	-	-	-	-	-	50% (5/10)	-	-	-
Normal-3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	20% (1/5)	20% (1/5)

Para el fragmento de la isla CpG-2, también se comparó el ADN tratado de los organismos con malformaciones oculares y normales, una longitud de secuencia de 371 pb y 39 sitios CpG (Fig. 20B). Se identificaron dos sitios CpG metilados en el embrión con anoftalmía izquierda y microftalmía derecha (Fig. 20B), uno en la posición +37 en el 14% de los clones secuenciados, que afectan a una GC box dentro de la región 5' UTR, y el otro en la posición +100 en el 28% de los clones (Cuadro 10), que no parece ser un sitio de unión para algún factor de transcripción, pero está cerca de una secuencia putativa potenciadora de splicing de intrones (ISE por sus siglas en inglés) dentro de la región 5' UTR. Además, se identificó un sitio CpG metilado en el 50% de los clones secuenciados de uno de los embriones normales en la posición +123 (Cuadro 10), este sitio no pareció afectar la unión de algún factor de transcripción y no parece estar cerca de cualquier otra secuencia reguladora dentro de la región 5' UTR.

También se identificaron citosinas metiladas en el contexto no CpG (CHG), tanto en embriones con malformaciones oculares como normales (Cuadro 10). Se ha reportado la metilación *de novo* de citosinas en el contexto no CpG mediada por *Dnmt3a* en células madre embrionarias

(Ramsahoye et al., 2000), y esto podría estar relacionado con la tasa de división celular en células pluripotentes (Shirane *et al.*, 2013). El papel de la metilación en el contexto no CpG en vertebrados no mamíferos con malformaciones congénitas aún no está bien esclarecido (Jones, 2012).

4.1.3.2 Factores de transcripción y características reguladoras que podrían verse afectados por la metilación de sitios CpG. Entre los sitios de unión a factores de transcripción (TFBS) y las regiones reguladoras identificadas en el promotor *Pax6*, siete de ellos presentaron metilación diferencial en embriones normales y malformados, posiblemente afectando la unión de los TF involucrados y funciones relacionadas como se describe a continuación:

1. Ciclopía, posición -409: AhR, AhRARNT y AhRHIF. En el embrión con ciclopía se detectó una citosina metilada en la posición -409 de la región promotora putativa del gen *Pax6*, a la cual se le pueden unir tres posibles factores de transcripción: el receptor de hidrocarburos arilo (AhR), el translocador nuclear del receptor de hidrocarburo de arilo (ARNT), que, junto con *AhR*, forman el complejo receptor de hidrocarburo de arilo (AhR-ARNT), y el complejo de factor de inducción de hipoxia (AhR-HIF). El receptor de hidrocarburo de arilo (*AhR*) es un factor de transcripción activado por ligando altamente conservado que detecta toxinas ambientales y ligandos endógenos; induce enzimas desintoxicantes y modula la diferenciación y respuesta de las células inmunes (Mandal, 2005). El complejo AhR-ARNT se ha asociado con la respuesta a contaminantes ambientales (Beischlag *et al.*, 2008). El heterodímero AhR-ARNT se puede asociar directamente con los receptores de estrógeno ER- $\alpha$  y ER- $\beta$ , provocando acciones adversas relacionadas con estrógenos ambientales (Ohtake *et al.*, 2003). HIF juega un papel clave en la respuesta celular a la hipoxia, incluida la regulación de genes implicados en el metabolismo energético, la angiogénesis y la apoptosis (Semenza, 2000). Si estos TFBS son funcionales, la regulación de *Pax6* estaría modulada ambientalmente; la metilación del ADN reduciría o inhibiría la unión de los factores de transcripción implicados, alterando la expresión génica (ver discusión).

2. Anoftalmía izquierda, posición -262: ERR1\_Q2, STAT6\_Q2, RORA1\_Q1, ERQ6\_Q2.

El embrión con anoftalmía izquierda presentó dos citosinas metiladas, una en la posición -262, que posiblemente puede afectar la unión de ERR1, STAT6, RORA y ER. La segunda metilcitosina se ubicó en la posición -248, dentro de un posible sitio de unión a GC box.

ERR1 forma parte un subgrupo de la familia de receptores esteroides/tiroides/retinoides. Es homólogo al receptor de estrógenos y se une a ADN objetivos similares; sin embargo, no puede activar la transcripción génica en respuesta a estrógenos (Sladek *et al.*, 1997). STAT6 es una proteína que forma parte de la familia STAT de factores de transcripción. En respuesta a citocinas y factores de crecimiento, los miembros de la familia STAT son fosforilados por las cinasas asociadas al receptor, y luego forman homodímeros o heterodímeros que se desplazan al núcleo celular donde actúan como activadores de la transcripción. Esta proteína juega un papel central en ejercer respuestas biológicas mediadas por IL4 (Quelle *et al.*, 1995). RORA pertenece a la superfamilia de receptores de hormonas esteroides. Este gen produce cuatro isoformas (RORA1-RORA4), que sólo difieren en sus regiones N-terminal y demuestran distintas propiedades de unión al ADN y de transactivación (Matysiak-Scholze & Nehls, 1997). ER es un factor de transcripción compuesto por varios dominios importantes para la unión de hormonas, la unión al ADN y la activación de la transcripción (Issa *et al.*, 1994). La funcionalidad de estos TFBS sugeriría que *Pax6* responde a la regulación hormonal; por lo tanto, la metilación del ADN interferiría con la unión de estos factores de transcripción, alterando la expresión de *Pax6* (ver discusión).

3. Anoftalmía izquierda, posición -248: GC box. GC box actúa de manera similar a una secuencia potenciadora, uniendo proteínas llamadas *Sp1* que estabilizan aún más el complejo de preiniciación en el promotor de un gen y, por lo tanto promueven la velocidad de transcripción (Blake *et al.*, 1990). Las GC box son un tipo de elemento promotor proximal y generalmente están ubicadas alrededor de 110 pb en la región 5' del TSS. En este caso, la metilación del ADN podría reducir la tasa de transcripción de *Pax6*.

4. Anoftalmía izquierda, microftalmía, posición +37: GC box dentro de la región 5'UTR.

En el embrión con anoftalmía izquierda y microftalmía, la metilcitosina se localizó en una GC box dentro de la región 5' UTR, lo que probablemente podría afectar la tasa de transcripción o actuar a nivel post-transcripcional. La otra metilcitosina se ubicó en la posición +100, cerca de una secuencia putativa potenciadora de splicing de intrones (ISE por sus siglas en inglés) dentro de la región 5' UTR en el nt +103, que podría o no ser relevante para la transcripción de *Pax6*. Es importante destacar que las citosinas metiladas también pueden afectar la expresión génica y la función biológica a través de proteínas específicas de unión al ADN metilado, como las que contienen un dominio de unión a metil CpG (MBD, por sus siglas en inglés), dominio SET,

dominio asociado con el dedo (SRA, por sus siglas en inglés) o dominio de dedos de zinc (Buck-Koehntop & Defossez, 2013).

#### 4.1.4 Discusión

Hasta la fecha, la secuenciación por bisulfito es la herramienta más utilizada para el análisis de metilación alelo-específico en los sitios CpG (Simpson *et al.*, 2017). El tratamiento con bisulfito es un proceso severo, que da como resultado la fragmentación del ADN (Miura *et al.*, 2012), lo que conduce a la amplificación de fragmentos cortos. A partir de los resultados presentes, el análisis de metilación del ADN *locus*-específico con bisulfito parece ser factible en fragmentos cortos de ~300 pb, incluso un poco mayores, lo que coincide con lo expuesto por Warnecke *et al.* (2002).

La eficiencia de conversión de ADN con bisulfito fue alta (96 a 100%), pero el mosaicismo fue evidente. Los resultados sugieren que los embriones normales fueron más estables con respecto a la metilación del ADN en comparación con los embriones malformados. Weber *et al.* (2007) proponen que en el humano, la mayoría de las islas CpG permanecen hipometiladas en células diferenciadas terminalmente y que sólo un pequeño porcentaje se metila durante el desarrollo normal. Posteriormente, Illingworth & Bird (2009) observaron metilación de islas CpG en la región 5' del promotor del gen *Pax6* en células musculares y cerebrales diferenciadas terminalmente en humano. Estas observaciones sugieren que islas CpG en células diferenciadas terminalmente durante el desarrollo normal están en general hipometiladas, pero si es posible que exista metilación, lo que es consistente con los resultados en embriones normales.

Está bien establecido que la metilación en el contexto CpG en los promotores da como resultado una represión transcripcional estable (Bird, 2002), a diferencia de la metilación en el contexto no CpG, que no está bien esclarecida su función (Lister *et al.*, 2009). En el presente estudio se identificó metilación en el contexto no CpG cerca de TSS del gen *Pax6*. Se considera que en tortugas marinas este tipo de metilación es poco frecuente, pero también puede ocurrir, lo que coincide con lo expuesto por Lister *et al.* (2009). Ellos reportan sobre el metiloma del DNA humano, que la densidad de metilación en el contexto no CpG es significativamente baja cerca

del TSS y que casi un cuarto de toda la metilación identificada en células madre embrionarias se encontró en este contexto.

La predicción para TFBS dentro de la región flanqueante 5' del gen *Pax6* reveló mecanismos potenciales reguladores en *cis* para la expresión de *Pax6*. Si la metilación del ADN en los fragmentos analizados es un mecanismo epigenético involucrado en los fenotipos estudiados (ciclopía y anoftalmía), es probable que las citosinas metiladas presentes en los TFBS jueguen un papel importante en la expresión génica del gen *Pax6*. En el caso del cíclope, aunque el gen *Shh* es el responsable de la división del campo ocular en hemisferios bilaterales (Chiang *et al.*, 1996), el gen *Pax6* es esencial para el desarrollo del ojo. El único sitio CpG metilado presente en la región 5' de la isla CpG-1 (nt -409) se identificó como un posible TFBS al que se le puede unir el receptor de hidrocarburo de arilo (AhR), el complejo translocador nuclear del receptor de hidrocarburo de arilo (AhR-ARNT) y el factor de inducción de hipoxia del receptor de hidrocarburo de arilo (AhR-HIF). La presencia de estos TFBS sugiere que los factores ambientales modulan la transcripción de *Pax6*, y que la metilación del ADN reduciría la unión de éstos factores de transcripción alterando la expresión normal de *Pax6*.

La mayor parte del esfuerzo experimental invertido en comprender la función del AhR se ha centrado en su activación por una amplia variedad de compuestos exógenos. La proteína codificada por AhR se puede unir al inductor TCDD (2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin) (Ema *et al.*, 1994), el cual es un hidrocarburo aromático halogenado, considerado como contaminante ambiental que se produce por reacciones secundarias menores en los procesos de fabricación de productos químicos y por la combustión de materiales de desecho. Estos productos químicos pueden causar toxicidad potente y pleiotrópica, así como teratogénesis. Según Ema *et al.* (1994), a nivel molecular, distintos efectos biológicos inducidos por productos químicos están mediados por un AhR intracelular; por ejemplo, en pez cebra, se ha reportado que la exposición al fenantreno (un hidrocarburo aromático) causa defectos en el desarrollo mediados por AhR y disfunción de los ojos a través de la reducción de *Pax6* (Huang *et al.*, 2013). Además, se ha reportado que ratones knockout (*AhR*-KO) presentan una arteria hialoide persistente en los ojos (Lahvis *et al.*, 2000). AhR también puede estar involucrado en la homeostasis de los retinoides, específicamente en el catabolismo del ácido retinoico (Andreola *et al.*, 1997), que se requiere para la morfogénesis ocular (Campo-Paysaa *et al.*, 2008).

ARNT, junto con AhR, forman el complejo receptor de hidrocarburo arilo (AhR-ARNT), que durante mucho tiempo se ha asociado con la respuesta a contaminantes ambientales (Beischlag *et al.*, 2008). La ausencia de ARNT (*ARNT-KO* en embriones de ratón) puede causar defectos angiogénicos en el saco vitelino y en los arcos branquiales; así como desarrollo atrofiado y muerte embrionaria (Maltepe *et al.*, 1997). En ratones, la ausencia de HIF-1 $\alpha$  puede causar muerte celular mesenquimatosas cefálica, malformaciones cardíacas y vasculares, y letalidad embrionaria (Kotch *et al.*, 1999). Dado que HIF puede unirse a ARNT y también a AhR (Gradin *et al.*, 1996), se ha propuesto que puede haber una conversación cruzada entre las vías de transcripción mediadas por AhR y HIF (Nie *et al.*, 2001). Aunque la asociación entre *Pax6* y ciclopía no está clara, el fenotipo de ciclopía en el embrión estudiado podría estar asociado a la expresión incorrecta de *Pax6* en respuesta a compuestos ambientales y condiciones hipóxicas durante el desarrollo del ojo. Esto es importante, ya que sugiere que la transcripción de *Pax6* podría estar modulada por vías de detección ambiental, por lo tanto, la metilación del ADN conduciría a una desregulación de *Pax6* y provocar malformaciones en los ojos.

En el caso del organismo con anoftalmia izquierda se identificaron dos citosinas metiladas, ambas en la isla CpG-1; el transductor de señal y activador de la transcripción 6 (STAT6), que desempeña un papel central en ejercer respuestas biológicas mediadas por IL4 e IL13 (Quelle *et al.*, 1995), lo que indica que potencialmente *Pax6* estaría implicado en la regulación del sistema inmunológico. Sin embargo, diferentes miembros de la familia STAT pueden modular la transcripción de genes durante el desarrollo y el mantenimiento ocular en mamíferos. Zhang *et al.* (2003) analizaron la expresión y activación de las proteínas STAT en la retina del ratón en desarrollo y observaron que todas las proteínas STAT se expresaban en la retina neuronal en diferentes poblaciones celulares en diferentes etapas embrionarias. Particularmente, observaron la presencia de *STAT6* en el epitelio pigmentario de la retina.

El Receptor huérfano relacionado a Rar A1 (RORA1) parece ser crucial para muchos procesos fisiológicos celulares que ocurren en tejidos como el cerebelo, tejido adiposo, músculo y hueso; sin embargo, aún no se ha dilucidado el papel preciso que desempeña RORA *in vivo* (Zhu *et al.*, 2006). Se ha reportado que la isoforma RORA1 se expresa en el cerebelo murino y humano (Matysiak-Scholze & Nehls, 1997), así como en el tálamo, hipotálamo y retina (Steinmayr *et al.*, 1998). Se han identificado elementos de respuesta a ROR (ROREs) en la región promotora de genes relacionados con el ciclo celular, tales como en inhibidores de cinasa dependiente de

ciclina (CDK) *p21*<sup>WAF1/CIP1</sup> (Schröder, *et al.*, 1996) y de *ciclina A*, así como en el promotor de *N-myc* (Nau *et al.*, 1986). Por lo tanto, RORA podría participar en la regulación de la proliferación celular dependiente de *Pax6* durante el desarrollo del sistema nervioso y la retina.

Otros factores de transcripción que podrían estar potencialmente afectados a la unión del promotor *Pax6* de embriones con anoftalmía izquierda son el receptor relacionado con el estrógeno 1 (ERR1) y el Receptor del estrógeno (ER). ERR1 se expresa durante el desarrollo embrionario medio o tardío de una forma tejido-específico (Sladek *et al.*, 1997), mientras que ER se ha detectado en el epitelio de varios tejidos oculares como la retina y el cristalino en el ojo humano. Ogueta *et al.* (1999) sugieren que ER podría regular la expresión transcripcional de diferentes genes diana en los ojos. Esto sugiere que la expresión de *Pax6* responde a la regulación hormonal (esto incluye hormonas endógenas y estrógenos ambientales). La metilación del ADN durante el desarrollo del ojo podría reducir la unión del receptor hormonal a las secuencias de respuesta, lo que probablemente lleve a una expresión incorrecta de *Pax6*.

La otra citosina metilada en el embrión con anoftalmía izquierda se identificó en la posición -248 y, aunque no corresponde a un TFBS, podría ser parte de una GC box, que actúa de forma similar a una secuencia potenciadora, a la que se le unen proteínas de unión llamadas Sp1 que estabilizan aún más el complejo de preiniciación en el promotor y, por lo tanto, aumentan la velocidad de transcripción (Blake *et al.*, 1990)

Finalmente, el embrión con anoftalmía izquierda y microftalmía derecha presentó dos metilcitosinas en la isla CpG-2 ubicadas dentro de la región 5' UTR, que afectan sólo a una GC box. Sin embargo, la metilación del ADN funciona de diferentes maneras; además de afectar la unión a TF, también hay proteínas de unión a ADN metilado que se unen a las metilcitosinas y regulan funciones biológicas (Buck-Koehntop & Defossez, 2013). Además, la metilación del ADN no es el único mecanismo involucrado en la regulación génica, hay otros mecanismos epigenéticos que pueden estar alterando el desarrollo normal del ojo a través de *Pax6* u otros genes reguladores.



## 4.2 Estatus de Metilación en la Región Promotora Putativa del Gen *Hoxb9* en Embriones con el Síndrome Schistosomus Reflexus

### 4.2.1 Introducción

El síndrome malformativo Schistosomus Reflexus (SR) es una malformación congénita rara y letal, cuyas características principales son la exposición de las vísceras abdominales y torácicas (schistosomus), debido a una fisura de la pared abdominal ventral, y la inversión espinal (reflexus) con distintos niveles de severidad (Laughton *et al.*, 2005). Algunas otras características menores incluyen anquilosis en las extremidades, posicionamiento de las extremidades adyacentes al cráneo, hipoplasia de pulmón y del diafragma (Laughton *et al.*, 2005). SR ha sido reportado por primera vez en la tortuga golfina del noroeste de México (Bárcenas-Ibarra *et al.*, 2016); se identificó en el 31% de los embriones que presentaron malformaciones congénitas y entre los fenotipos identificados destacan la falta de cierre en la pared abdominal, ectopia de órganos internos, alteraciones en columna vertebral y costillas, malformaciones en las aletas y en la cola y algunas malformaciones cráneo-faciales (ver Bárcenas-Ibarra *et al.*, 2016).

Aunque no se han reportado genes directamente causantes de SR, estudios en ratones mutantes sugieren dos familias de genes, las moléculas de señalización de *Tgfb* y la familia de factores de transcripción *AP-2*, que están asociadas a defectos del cierre de la pared del cuerpo ventral, defectos en la columna vertebral, entre múltiples anomalías (Sanford *et al.*, 1997; Nottoli *et al.*, 1998; Mateo & Camón, 2008). Por otra parte, los genes *Hox* son reguladores maestros del desarrollo embrionario, codifican factores de transcripción importantes en la especificación de planes corporales a lo largo del eje antero-posterior en animales (Lewis, 1978). En ratones, se ha demostrado que la eliminación homocigótica de *Hoxb1-Hoxb9* causa anomalías en la columna vertebral cervico-torácica y defectos en la morfogénesis del esternón (Medina-Martínez *et al.*, 2000). En humanos, deleciones en la región cromosómica que abarcan los genes *Hoxb1-Hoxb9* están asociadas con defectos del desarrollo, incluyendo anomalías traqueo-esofágicas (Pajusalu *et al.*, 2015). También, en humano se ha reportado la translocación *de novo* con un punto de ruptura

cerca del extremo 5' del grupo de genes *Hoxb* en un paciente con retraso del desarrollo y malformaciones esqueléticas (Yue *et al.*, 2007).

En genes *Hox*, se ha propuesto que islas CpG en promotores potenciales dentro de los *loci* de genes *Hox* pueden contribuir a la regulación génica en *Cis* (Weber *et al.*, 2007). Por otra parte, las islas CpG inter o intragénicas son más susceptibles a la metilación y presentan metilación tejido-específico en estos mismos *loci* (Weber *et al.*, 2007).

Como una primera aproximación para estudiar la metilación del ADN *locus*-específico de la región promotora en embriones de tortugas marinas con SR, se seleccionó el gen *Hoxb9* en cuatro embriones con este síndrome de un grupo de embriones que presentaron múltiples malformaciones identificadas y descritas en un estudio previo (Bárcenas-Ibarra *et al.*, 2015).

#### **4.2.2 Metodología**

Se seleccionaron cuatro embriones del mismo estudio previo (Bárcenas-Ibarra *et al.*, 2015) indicado en el apartado 4.1.2.1 que presentaron SR y otras malformaciones: 1) SR-18-11-IE39M (disostosis caudal y dismelia anterior izquierda), 2) SR-2029-E4M (leucismo ventral, gnatoquisis y deformación de la mandíbula inferior), 3) SR-2029-E1M (leucismo, gnatoquisis, anura y cuello corto), 4) SR-1257-1E9M (anura y anasarca) y tres embriones normales. A partir del aislamiento y caracterización de la región promotora putativa del gen *Hoxb9* (ver capítulo 3) se diseñaron primers, que incluían las dos CGIs identificadas, mediante el software Methprimer para amplificar un fragmento de aproximadamente 334 pb del ADN convertido (Cuadro 9). El tratamiento de ADN con bisulfito de sodio, amplificación, clonación y análisis de sitios CpG metilados se hizo de la misma forma que para el análisis del gen *Pax6* (ver apartado 4.1.2.2).

### 4.2.3 Resultados

En este caso, se analizó una secuencia de 319 pb que contenía diecinueve sitios CpG (Fig. 21) para comparar los patrones de metilación en embriones malformados y normales. La eficiencia de conversión fue del 97-100% (Fig. 21). Se observó mosaicismo de la metilación en la mayoría de los casos (Cuadro 11). Debido a que la mayoría de los TFBS se identificaron 5' respecto a ambas CGI, no se identificaron sitios CpG metilados en secuencias de TFBS. Cada uno de los organismos analizados (con SR y normal) mostró un perfil de metilación particular (Fig. 21). Sin embargo, debe observarse que hubo un patrón que se repitió en la mayoría de los embriones, los sitios +128 y +136 (Fig. 21 y Fig. 16 del capítulo 3), ubicados en la región 5' UTR, mostraron metilación en la mayoría de los organismos, independientemente de si presentaron SR o no. Las citosinas metiladas también se identificaron en el contexto no CpG (CHG/CHH) tanto en embriones normales como en SR (Cuadro 11).

group	No.	order	exclude <a href="#">select all</a> <a href="#">unselect all</a>	Sequence name	mismatch (gap) / alignment length (% identity)	Me-CpG (%)	unconverted (% converted)	Methylation pattern (or reason for the exclusion)
1	<a href="#">1</a>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	SR-1811-IE39M	0 (0) / 319 (100.0)	1 ( 5.3)	2/67 ( 97.0)	○○○○○○○○○○○○○○○○●○○○
	<a href="#">2</a>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	SR-2029-E4M	0 (0) / 319 (100.0)	2 ( 10.5)	2/67 ( 97.0)	○○○○○○○○○○○○○○○○●●○○○
	<a href="#">3</a>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	SR-2029-E1M	0 (0) / 319 (100.0)	3 ( 15.8)	0/67 (100.0)	○○○○○○○○●●●○○○○●○○○
	<a href="#">4</a>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	SR-1257-IE9M	0 (0) / 319 (100.0)	5 ( 26.3)	1/67 ( 98.5)	○○●○○○●○○●○○○○●●○○○
2	<a href="#">5</a>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	Normal1-1846-1CM4C	0 (0) / 319 (100.0)	3 ( 15.8)	3/67 ( 95.5)	○○○○○○○○●○○○○○○●○○○
	<a href="#">6</a>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	Normal2-1818-II4C	0 (0) / 319 (100.0)	2 ( 10.5)	1/67 ( 98.5)	○○○○○○○○○○○○○○○○●○○○
	<a href="#">7</a>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	Normal3-1257-IE7C	0 (0) / 319 (100.0)	3 ( 15.8)	1/67 ( 98.5)	●●●●○○○○○○○○○○○○○○○○

Figura 21. Estatus de metilación en la región promotora putativa del gen *Hoxb9* en embriones con SR y normales. Los círculos negros indican las citosinas metiladas en el contexto CpG

Cuadro 11. Frecuencia de clones con citosinas metiladas en contextos CpG y no-CpG (CHG/CHH) dentro de la región promotora putativa del gen *Hoxb9* en embriones con SR y normales.

	Contexto	CpG										CHG/CHH							No. de clones
		-113	-106	-78	-80	-53	-19	+7	+28	+128	+136	-54	-9	+16	+60	+65	+134	+148	
<b>Embriones malformados</b>	SR-1811-IE39M	-	-	-	-	-	-	-	-	16% (1/6)	-	-	-	-	16% (1/6)	-	-	16% (1/6)	6
	SR-2029-IE4M	-	-	-	-	-	-	-	-	33% (2/6)	33% (2/6)	-	-	33% (2/6)	-	33% (2/6)	-	-	6
	SR-2029-E1M	-	-	-	-	-	16% (1/6)	-	16% (1/6)	16% (1/6)	-	-	-	-	-	-	-	-	6
	SR-1257-IE9M	-	33% (2/6)	-	-	16% (1/6)	-	-	16% (1/6)	16% (1/6)	16% (1/6)	-	-	-	-	16% (1/6)	-	-	6
<b>Embriones normales</b>	Normal 1-1846-ICM4C	-	-	-	-	-	40% (2/5)	-	16% (1/6)	16% (1/6)	16% (1/6)	16% (1/6)	-	-	-	-	33% (2/6)	-	6
	Normal 2-1818-II4C	-	-	-	-	-	-	-	-	66% (4/6)	66% (4/6)	-	-	-	-	83% (5/6)	-	-	6
	Normal 3-1257-IE7C	28% (2/7)	-	42% (3/7)	14% (1/7)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	28% (2/7)	-	7

#### 4.2.4 Discusión

Para el análisis de metilación del ADN *locus*-específico en la región promotora putativa del gen *Hoxb9* la eficiencia de conversión del ADN con bisulfito fue alta (97 a 100%), pero el mosaicismo fue evidente. En ambas CGIs evaluadas la metilación fue heterogénea tanto en embriones normales como en SR. Se ha propuesto que los genes del desarrollo permanecen regularmente hipometilados incluso si el *locus* es transcripcionalmente silencioso, pero puede existir cierta metilación (Weber *et al.*, 2007) y esto es consistente con los resultados en embriones normales.

Aunque se observa un perfil de metilación heterogéneo en la región promotora putativa del gen *Hoxb9* en embriones malformados y normales, sí se identificó un patrón de metilación en dos sitios CpG que se repiten en embriones tanto normales como malformados: citosinas +128 y +136 (Fig. 21 y Fig. 16 del capítulo 3). Estos *loci* se encuentran en la región 5' UTR de *Hoxb9* y este patrón identificado podría deberse a una regulación particular de los genes *Hox* durante el desarrollo (Flagiello *et al.*, 1996) y estar relacionado con sitios de splicing alternativo (Mironov *et al.*, 1999). En genes *Hox*, se ha identificado que las CGIs que muestran metilación tejido-específico son esenciales para el desarrollo (Weber *et al.*, 2007); se ha propuesto que la metilación del ADN podría corresponder a un mecanismo de regulación de la expresión génica particular de la red de genes *Hox*, ya que en el caso del grupo *Hoxb* se ha observado una relación entre la metilación del ADN y la expresión génica y se ha postulado que los patrones de metilación de estos genes reflejan señales establecidas durante el desarrollo y que posiblemente puedan modificarse en tejidos adultos con progresión tumoral (Flagiello *et al.*, 1996). De hecho, está bien establecido que las proteínas del grupo polycomb modulan la expresión de los genes *Hox* por medio de marcas de histonas, e.g. la metilación de la histona 3 en la lisina 27-H3K27me- (Cao *et al.*, 2002), por lo que la metilación del ADN podría promover la transcripción al antagonizar los genes del grupo Polycomb (Wu *et al.*, 2010) que reprimen la expresión génica.

Es importante mencionar que no existe ninguna evidencia que relacione *Hoxb9* con SR, sin embargo *Hoxb9* regula el desarrollo de la columna vertebral en la región torácico-lumbar la cual se encuentra malformada en organismos con SR. Si bien los resultados de este trabajo no aportan evidencia de que *Hoxb9* participe en el desarrollo de SR, también es importante considerar que

los genes *Hox* actúan de manera combinatoria, es decir, varios genes *Hox* participan en la formación de cada vértebra y estructura axial, además de presentar el fenómeno de compensación funcional a través de genes *Hox* parálogos (Greer *et al.*, 2000; revisado en Holland, 2013); por lo tanto, los efectos regulatorios de los genes *Hox* deben estudiarse en conjunto (de acuerdo al código *Hox* y fórmula axial de cada especie) y no como genes aislados.

En resumen, en este estudio se encontró que cambios sutiles en la metilación del ADN en promotores de genes de desarrollo como *Pax6* coinciden con fenotipos aberrantes en tortugas silvestres, lo que sugiere que estas marcas epigenéticas podrían estar vinculadas a los fenotipos observados. No se pretende simplificar un proceso complejo en el que las redes reguladoras de genes están bajo el control de mecanismos genéticos y epigenéticos; para este tipo de estudios se requiere de una muestra más grande y los ácidos nucleicos (tanto el ADN como el ARN) deben obtenerse del área afectada para generar evidencia más sólida sobre la relación entre las malformaciones, la expresión de genes y la metilación *locus*-específica. Se necesitan análisis adicionales (como ChiP-Seq o metilación global) y ensayos funcionales. Sin embargo, los estudios de este tipo con especies silvestres y amenazadas, aunque complicados, pueden proporcionar información importante sobre las causas y mecanismos asociados con el desarrollo anormal.

## 5. METILACIÓN GLOBAL DEL ADN Y SU RELACIÓN CON Hg EN EMBRIONES CON SCHISTOSOMUS REFLEXUS Y OTRAS MALFORMACIONES

### 5.1 Introducción

*Schistosomus reflexus* (SR) fue reportado por primera vez en la tortuga golfina del noroeste de México y ha sido identificado en el 31% de los embriones que presentaron malformaciones congénitas (Fig. 22; Bárcenas-Ibarra *et al.*, 2016). Este síndrome no ha sido identificado en alguna otra especie de tortuga marina (Bárcenas-Ibarra *et al.*, 2016), pero sí en otros reptiles: en la víbora de Wagner (*Vipera wagneri*), en el dragón barbudo (*Pogona vitticeps*) y en la serpiente jararacá (*Bothrops jararaca*) (Mulder, 1995; Ianni *et al.*, 2004; Sant'Anna *et al.*, 2013). SR ha sido reportado frecuentemente en rumiantes, principalmente en ganado bovino (Knight, 1996; Rajani & Raghavan, 2010), aunque también ha sido reportado en ovejas y cabras (Dennis & Meyer, 1965; Gutierrez *et al.*, 1999; Suthar *et al.*, 2011), mamíferos domésticos y no domésticos (Gabra, 1993; Mateo & Camón, 2008; Molina *et al.*, 2012; Lankton *et al.*, 2014).

El síndrome SR es una anomalía que tiene sus orígenes antes o durante la diferenciación del mesodermo primitivo intraembrionario (Cantrell *et al.*, 1958) y aunque su etiología no es clara, existe la hipótesis que factores genéticos están relacionados con la prevalencia de este síndrome (Gutierrez *et al.*, 1999; Laughton *et al.*, 2005; Jana & Jana, 2013); de ser así, la consanguinidad puede ser un factor de predisposición (Gutierrez *et al.*, 1999; Čítek *et al.*, 2009). Investigaciones citogenéticas han asociado aberraciones cromosómicas (tales como roturas cromosómicas, apareamiento no homólogo de cromosomas, pulverizaciones y fragmentos dicéntricos) con la presencia de SR (Ozalp *et al.*, 2011). También se ha propuesto que la superfetación podría estar relacionada con la presencia de este síndrome (Kawata & Tiba, 1961). Por otra parte, se ha propuesto que anomalías similares a SR podrían involucrar factores ambientales y muy probablemente tener un origen multifactorial (combinación de factores genéticos y ambientales) (Noakes *et al.*, 2001). De hecho, las causas genéticas y/o ambientales pueden producir patrones de malformación relativamente similares en humanos (Mateo & Camón, 2008).

Un ejemplo relevante entre los factores ambientales es la exposición a mercurio (Hg), elemento químico de origen natural y antropogénico que se distribuye ampliamente en el medio ambiente. Hg se presenta en el ambiente en forma orgánica e inorgánica, y ésta última puede ser biotransformada por bacterias a la forma orgánica, metilmercurio (MeHg), que es la fracción del mercurio total que se transfiere más eficientemente a la cadena alimenticia a niveles tróficos más altos y a su vez es más tóxica (Boening, 2000). Aunque Hg está presente de forma natural en sistemas acuáticos en concentraciones bajas, se puede encontrar en altas concentraciones en la cadena alimenticia por bioacumulación (Ullrich *et al.*, 2001).

Las concentraciones de Hg en las diferentes especies de tortugas marinas dependen de los hábitos de alimentación y las áreas de alimentación; la tortuga verde es predominantemente herbívora, la tortuga caguama es omnívora, mientras que la tortuga golfina es omnívora y oportunista (Márquez, 1990; Morreale *et al.*, 2007). En ésta última se ha reportado la transferencia materna del Hg a los huevos (Páez-Osuna *et al.*, 2011). La presencia de Hg en hígado de la tortuga verde se ha asociado con diferentes problemas de salud (van de Merwe *et al.*, 2010). Además, en organismos modelo como los anfibios, la transferencia materna de Hg provoca una disminución en el éxito reproductivo, así como malformaciones congénitas, incluyendo malformaciones esqueléticas (Unrine *et al.*, 2004; Bergeron *et al.*, 2011). En las tortugas marinas *C. mydas* y *C. caretta* también se han reportado concentraciones de Hg en la yema, la albúmina de huevo y la cáscara, sin efectos aparentes en el éxito reproductivo (Sakai *et al.*, 1995; Lam *et al.*, 2006).

Se ha reportado que la exposición a MeHg durante el desarrollo puede alterar mecanismos epigenéticos (como la metilación del ADN y las modificaciones de histonas) en ratones y ratas (Onishchenko *et al.*, 2007; Bose *et al.*, 2012). La metilación del ADN tiene un papel fundamental en el control transcripcional (Weber *et al.*, 2007; Meissner *et al.*, 2008; Deaton & Bird, 2011), en el mantenimiento de la estabilidad del genoma, (por ejemplo represión de elementos transponibles) (Walsh *et al.*, 1998), en la inactivación del cromosoma X (Sado *et al.*, 2000) y en la coordinación de la expresión de la impronta génica (Reik *et al.*, 1987; Davis *et al.*, 1998). Distintas anomalías en el desarrollo han sido asociado con alteraciones en la metilación del ADN (Yin *et al.*, 2012). Por ejemplo, está bien establecido que mutaciones en la metiltransferasa de novo *DNMT3B* provoca hipometilación del ADN, y qua a su vez son causantes del síndrome ICF (Inmunodeficiencia, inestabilidad de la región centromérica, anomalías faciales) que se caracteriza por hipometilación de repeticiones satelitales pericentroméricas (Hansen *et al.*, 1999;



Xu *et al.*, 1999). Igualmente, embriones de ratón mutantes *DNMT3B* *-/-* muestran múltiples defectos de desarrollo, incluidos problemas de crecimiento, defectos del tubo neural rostral e hipometilación de repeticiones satelitales menores (Okano *et al.*, 1999).

Debido a los efectos de la exposición a Hg en las anomalías del desarrollo y la metilación del ADN, se preguntó si un síndrome tan complejo con una alta incidencia (31%) entre los embriones malformados de tortuga golfina presentan alteraciones en los niveles tanto de Hg como de metilación global del ADN en comparación con embriones que muestran otras malformaciones congénitas (no SR) o sus contrapartes normales. Este capítulo ha sido sometido a la revista *Veterinary Pathology* y ya se cuenta con los comentarios de los revisores de la primera revisión.



Figura 22. Embrión de tortuga golfina que presentó el síndrome schistosomus reflexus. El embrión presentó exposición de las vísceras, inversión espinal (flecha blanca) y múltiples malformaciones cráneo-faciales (tomada de Bárcenas-Ibarra *et al.*, 2016).

## 5.2 Metodología

### 5.2.1 Elección de Muestras

A partir de las muestras a las que se les midió concentraciones de Hg (Capítulo 2, sección 2.2) se eligieron 12 muestras de embriones malformados (5 que presentaron SR y 7 que presentaron otras malformaciones, pero no SR) y 12 muestras de crías sin malformaciones (Cuadro 12). El criterio para seleccionar los embriones que serían utilizados para este análisis se basó en la calidad del ADN (concentración adecuada, pureza  $\sim 1.8$  con base en la relación de absorbancia 260/280) y la correcta amplificación del gen constitutivo beta-Actina.

### 5.2.2 Análisis de Metilación Global del ADN

Se cuantificó el ADN mediante SYBR Green I Dye (DNA Genotek Inc) y un espectrofluorómetro (The Infinite® M1000-Tecan) para poder usar 160 ng de ADN genómico para cada muestra. Para cuantificar la proporción de ADN metilado se usó el MethylFlash™ Methylated DNA Quantification Kit Colorimetric (Epigentek); mediante este kit, la fracción metilada del ADN se detecta utilizando anticuerpos de captura y detección y luego se cuantifica colorimétricamente por lectura de absorbancia (450 nm) en un espectrofotómetro. La cantidad de ADN metilado es proporcional a la intensidad de densidad óptica (DO) medida; para esto fue necesario generar una curva estándar de ADN metilado y determinar su pendiente (OD/ng) mediante una regresión lineal. Se realizaron réplicas de todas las muestras y los controles positivos (curva estándar) y negativos.

### 5.2.3 Análisis Estadístico

Las concentraciones de Hg y los porcentajes de metilación global del ADN entre embriones malformados y normales, y entre embriones con SR y embriones con otras malformaciones se compararon mediante una prueba t de Student cuando se cumplieron los criterios de normalidad y homocedasticidad; y cuando no se cumplieron estos criterios se realizó un ANOVA de una vía U de Mann-Whitney en rangos. Este mismo criterio se usó para comparar las desviaciones medias entre los distintos grupos analizados e identificar en cuales había una mayor variación de los datos. Además, se realizó un análisis de correlación de Pearson para encontrar asociaciones entre estos mismos parámetros. Todos los análisis estadísticos se realizaron con el software SigmaPlot v11.

## 5.3 Resultados

### 5.3.1 Concentraciones de Hg

Las concentraciones de Hg en los embriones de tortuga golfinia seleccionados se muestran en el cuadro 12. Se observó que los niveles promedio de Hg se duplicaron en los embriones malformados ( $0.0289 \pm 0.0168 \mu\text{g/g}$  de Hg -CV: 58%-) en comparación a los normales ( $0.0156 \pm 0.00585 \mu\text{g/g}$  de Hg -CV: 37.5%-;  $P=0.026$ ) (Fig. 22A). Sin embargo, las concentraciones de Hg en embriones con SR ( $0.0304 \pm 0.0219 \mu\text{g/g}$  de Hg -CV: 72%-) no difirieron significativamente ( $P>0.05$ ) de aquellos con otras malformaciones ( $0.0278 \pm 0.0140 \mu\text{g/g}$  de Hg -CV: 50%-) o normales ( $P>0.05$ ) (Fig. 23B y C, respectivamente). El análisis de la desviación media entre grupos indicó que todos los embriones malformados y en particular los embriones con SR presentaron una mayor variabilidad en las concentraciones de Hg con respecto a los embriones normales (Fig. 24A y C, respectivamente;  $P<0.05$ ).

### 5.3.2 Metilación Global del ADN

Se muestra el porcentaje de metilación global del ADN (5-mC) en embriones de tortuga golfina en el cuadro 12. No se encontraron diferencias significativas en porcentaje de 5-mC entre embriones normales ( $0.106 \pm 0.0606$  -CV: 57%-) y malformados ( $0.111 \pm 0.0891$  -CV: 80%-) (Fig. 23D). Sin embargo, el contenido promedio de 5-mC se incrementó dos veces en los embriones con SR ( $0.187 \pm 0.0859$  -CV: 45%-) en relación con aquellos con otras malformaciones ( $0.0574 \pm 0.0381$  -CV: 66%) o ninguna ( $P=0.005$  y  $P=0.042$ , respectivamente) (Fig. 23E y F, respectivamente). No se identificaron diferencias en la desviación media de los niveles de 5-mC en los embriones malformados con respecto a los embriones normales (Fig. 24D, E y F)

Posteriormente, se probaron las correlaciones entre las concentraciones de Hg y los porcentajes de metilación de ADN en los grupos experimentales (Fig. 25, A-E). Sólo los embriones con SR mostraron una correlación positiva y significativa entre las concentraciones de Hg y la metilación del ADN ( $r=0.923$ ,  $P=0.025$ ) (Fig. 25D).

Cuadro 12. Embriones a los que se les midió concentración total de Hg y porcentaje de 5-mC. SR indica embriones con schistosomus reflexus (también se indican otras malformaciones observadas en estos embriones); OM indica embriones con otras malformaciones.

	Etiqueta	Malformaciones	Hg (ug/g peso húmedo)	5-mC (%)
Embriones malformados	SR-1811-IE39M	SR, disostosis caudal, dismelia anterior izquierda (sindactilia: II-III)	0.0143	0.1566
	SR-2029-E4M	SR, leucismo ventral, gnatoquisis, deformación de la mandíbula inferior	0.0109	0.0656
	SR-1257-IE9M	SR, anura, anasarca	0.0617	0.2903
	SR-1811-IE38M	SR, cuello corto	0.0205	0.1809
	SR-1846-IE5M	SR	0.0447	0.2428
	OM-1477-IE2M	Deformación de escudos lateral-vertebrales, anura, agenesia de los huesos dorsales	0.0548	0.0306
	OM-1477-IE3M	Gnatoquisis, anura, escudos inframarginales subnumerarios	0.0258	0.1216
	OM-1477-IE4M	Gnatoquisis	0.0237	0.0258
	OM-1477-IE5M	Gnatoquisis	0.0188	0.0181
	OM-1846-IE2M	Prognatismo inferior	0.0102	0.0869
	OM-2029-E12M	Hidrocefalia	0.0336	0.0744
	OM-1954-IE13M	Disostosis craneal	0.0277	0.0442
Embriones normales	1846-ICM4C		0.0118	0.1286
	1818-II4C		0.025	0.0136
	1257-IE7C		0.0197	0.0917
	1081-IE2C		0.0129	0.2222
	1081-ICM4C		0.0108	0.084
	1943-IE4C		0.0231	0.0799
	1811-IE34C		0.0149	0.1838
	1811-IE36C		0.0171	0.1035
	1257-IE8C		0.0202	0.0803
	1818-IE12C		0.0054	0.0984
	1846-ICM3C		0.0094	0.0254
	1477-IE1C		0.0175	0.1632

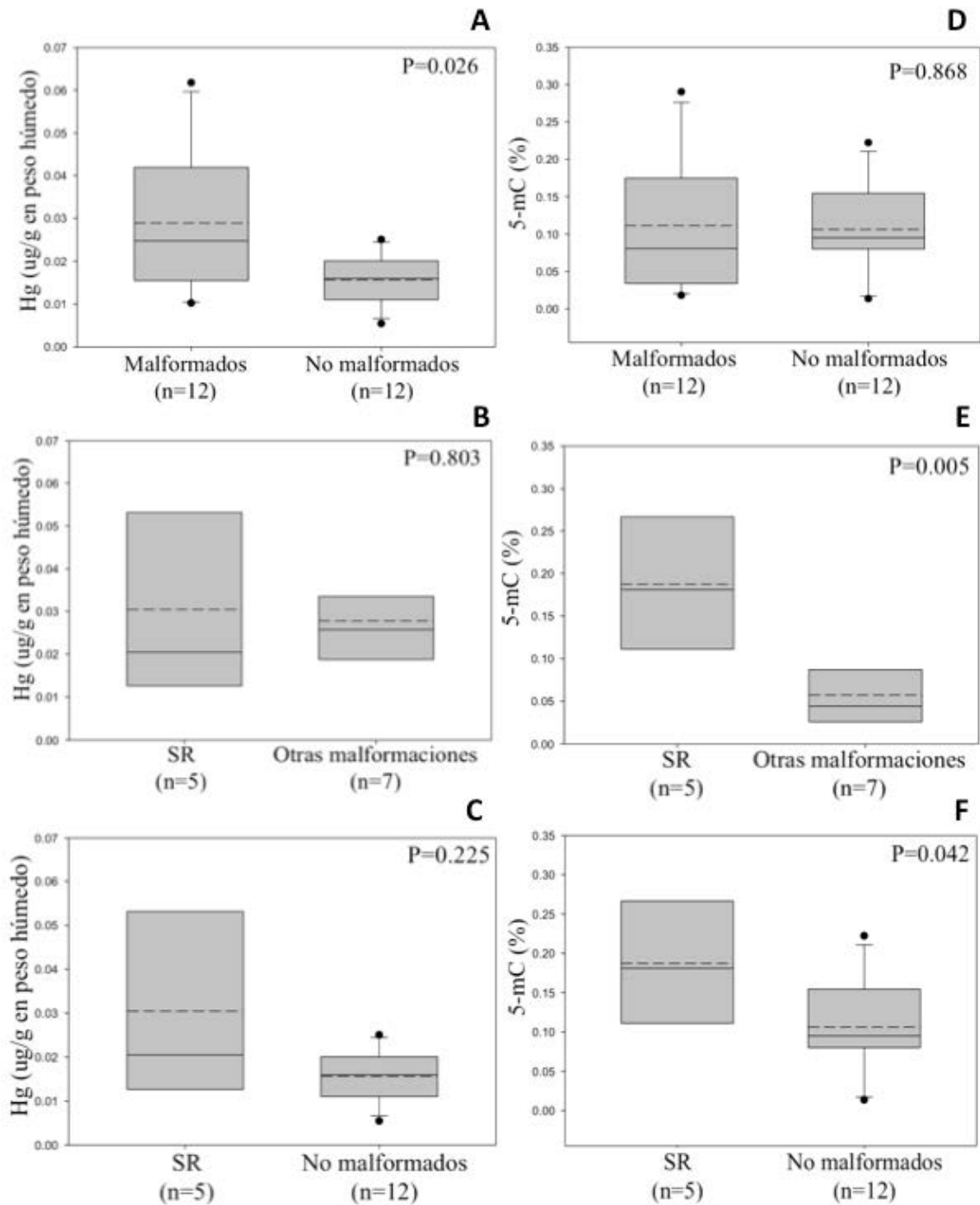


Figura 23. Diagramas de cajas que muestran las concentraciones de Hg y el porcentaje de 5-mC en embriones de tortuga golfinia malformados y no malformados. Concentraciones de Hg en embriones malformados y no malformados (A), embriones malformados SR y no-SR (B) y embriones SR y no malformados (C). Porcentaje de 5-mC en embriones malformados y no malformados (D), embriones malformados SR y no-SR (E) y embriones SR y normales (F). La línea discontinua representa la media; n=tamaño de la muestra.

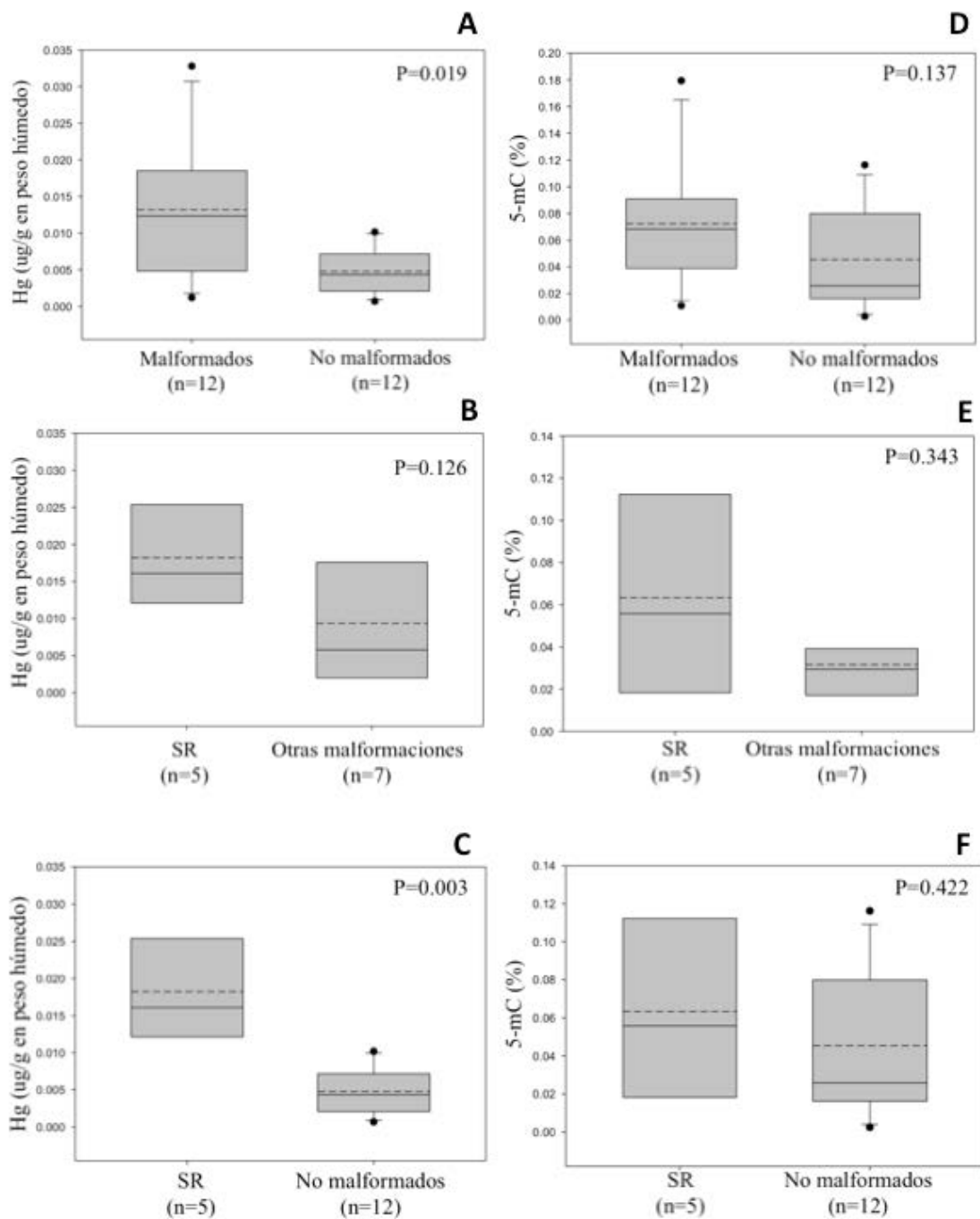


Figura 24. Diagramas de cajas que muestran las desviaciones medias de Hg y del porcentaje de 5-mC en embriones de tortuga golfina malformados y no malformados. Concentraciones de Hg en embriones malformados y no malformados (A), embriones malformados SR y no-SR (B) y embriones SR y no malformados (C). Porcentaje de 5-mC en embriones malformados y no malformados (D), embriones malformados SR y no-SR (E) y embriones SR y no malformados (F). La línea discontinua representa la media; n=tamaño de la muestra.

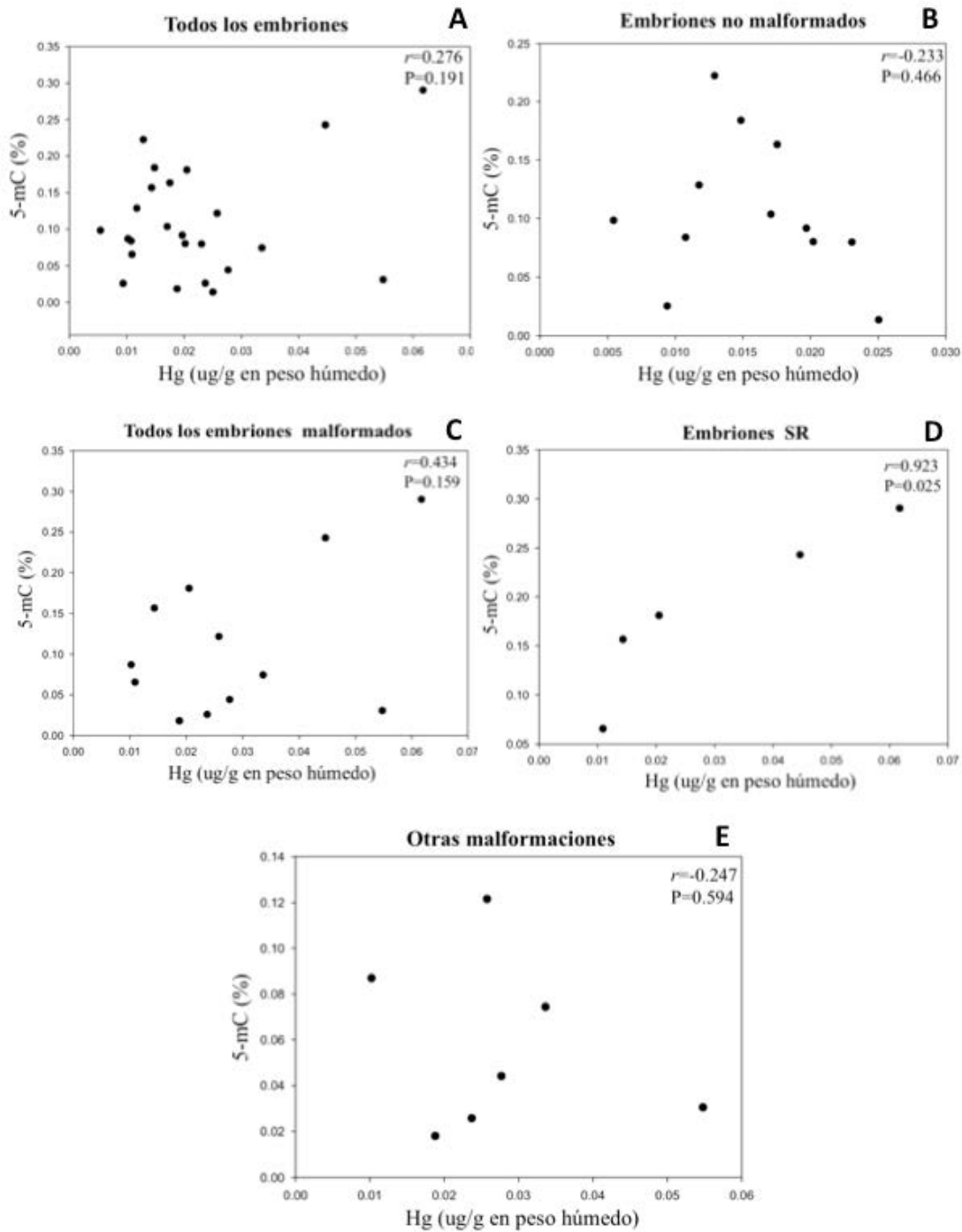


Figura 25. Correlación de Pearson entre las concentraciones de Hg y el porcentaje de 5-mC en embriones de tortuga golfina malformados y no malformados. Todos los embriones (A), embriones normales (B), todos los embriones malformados (C), embriones SR (D), embriones malformados no-SR (E).  $r$ =coeficiente de correlación de Pearson.



## 5.4 Discusión

Los resultados obtenidos de este estudio muestran que los niveles de Hg total fueron mayores en los embriones malformados (SR y otras malformaciones) con respecto a los normales. Se han reportado efectos teratogénicos de Hg en humanos, como la enfermedad de Minamata relacionada con la ingestión de productos marinos contaminados con MeHg. Esta enfermedad se caracteriza por provocar daños neurológicos, tales como alteraciones sensoriales, ataxia, disartria, constricción del campo visual, alteraciones auditivas, entre otras (Eto, 1997), además de malformaciones congénitas como polidactilia, paladar alto, conducto acústico externo defectuoso, microcórnea y protrusión del coxis (Harada, 1995). Además, los resultados de exposición a MeHg en peces, anfibios, aves y mamíferos indican que este contaminante provoca principalmente malformaciones esqueléticas, aunque también podría provocar gastroschisis, malformaciones ópticas, cardiovasculares, en las extremidades y cráneo-faciales (Khera, 1973; Weis & Weis, 1977; Hoffman & Moore, 1979; Colomina *et al.*, 1995; Heinz & Hoffman, 1998; Samson & Shenker, 2000; Unrine *et al.*, 2004; Bergeron *et al.*, 2011).

Al separar los organismos que presentaron SR (n=5) de los que presentaron otras malformaciones (n=7), no se detectaron diferencias en las concentraciones de Hg, ni comparándolas con los normales (n=12). Estos resultados se deben tomar con cautela, ya que al disminuir el número de muestras, la potencia de la prueba baja y podrían no detectarse diferencias cuando sí las hay. Se debe tomar en cuenta que los embriones utilizados en este estudio se tomaron de diferentes nidos, y las variaciones de nido a nido pueden contribuir a la variabilidad observada (Lynch, 2013). Además, el Hg no es el único compuesto teratogénico presente en el ambiente y puede entrar en sinergia con otros compuestos y con otros factores ambientales (Fernández & Beiras, 2001).

Como se observaron niveles más altos de metilación global del ADN en embriones de tortuga golfina que presentaron SR con respecto a embriones con desarrollo normal, y con respecto a embriones con otras malformaciones, es posible que la hipermetilación global del ADN sea causa o consecuencia de SR. En *Drosophila melanogaster*, la hipermetilación del ADN inducida por la sobreexpresión de la metiltransferasa *de novo Dnmt3a* está asociada con defectos del desarrollo debido a la reducción de las tasas de progresión del ciclo celular y la condensación desigual cromosomal (Weissmann *et al.*, 2003). De interés particular, los embriones de tortuga golfina con

SR también mostraron una correlación positiva entre las concentraciones de Hg y la metilación global del ADN. La interpretación de estos resultados como una asociación positiva entre Hg y niveles de 5-mC también se debe tomar con cautela debido al tamaño de muestra (n=5) y aunque esta asociación positiva (P=0.025) difícilmente puede deberse al azar, todavía existe la probabilidad de incurrir en error tipo I.

Otros estudios con respecto a la exposición de Hg y la metilación del ADN en mamíferos y no mamíferos reportan una asociación negativa (Nilsen *et al.*, 2016; Cardenas *et al.*, 2017), y se sabe poco sobre los mecanismos subyacentes de cómo la exposición a Hg conduce a alteraciones en dichos perfiles de metilación del ADN (Zefferino *et al.*, 2017). En el lagarto americano (*Alligator mississippiensis*) de distintos sitios contaminados en Florida se identificó una asociación negativa entre niveles de Hg y metilación global; siendo más fuerte la correlación en sitios con mayor contaminación de Hg al realizar los análisis por cada sitio muestreado (Nilsen *et al.*, 2016). En un estudio en sangre de cordón umbilical en humanos se ha reportado una asociación negativa entre exposición prenatal al Hg y niveles de 5-hmC y un incremento en la razón de 5-mC a 5-hmC; en este mismo estudio en infantes, los análisis de asociación entre variables se realizaron por separado debido a la presencia de distintas edades en los infantes y otras características como el origen étnico (Cardenas *et al.*, 2017).

Tanto en las concentraciones de Hg como en los niveles de 5-mC se presentó heterogeneidad en los datos, esta variabilidad identificada nos puede proporcionar información importante en términos biológicos, aun en los casos en los que no se hayan identificado diferencias significativas, ya que los contaminantes pueden inducir un aumento en la variabilidad de respuestas biológicas (Forbes & Depledge, 1996), lo que puede indicar estrés ambiental. Particularmente, se identificó una variabilidad más alta de las concentraciones de Hg en todos los organismos con malformaciones y los que presentaron SR con respecto a los normales lo que podría inducir a distintas respuestas a nivel biológico.

Este trabajo representa una primera aproximación a la comprensión de la etiología del síndrome de malformación rara SR en tortugas marinas, particularmente sobre el papel de Hg y la metilación del ADN. Si bien es un tamaño de muestra pequeño, los resultados dan indicios que el síndrome de SR en la tortuga golfina está asociado con un alto contenido de metilación del ADN y de Hg. Estos hallazgos subrayan la importancia del medio ambiente en el desarrollo de SR en tortugas.

## **6. RELEVANCIA DE LOS RESULTADOS DEL ESTUDIO PARA LA CONSERVACIÓN DE LA TORTUGA GOLFINA Y CONCLUSIONES**

La tortuga golfina es una especie en peligro de extinción según la legislación mexicana, aunque al mismo tiempo es la tortuga marina que ha presentado mayor recuperación en sus poblaciones. Se han realizado pocos estudios sobre la incidencia de malformaciones congénitas en ésta y otras especies de tortugas marinas, así como su relación con la salud de sus poblaciones. Los resultados de la presente tesis son seguimiento de un proyecto que se inició hace más de cinco años en el cual se identificó la incidencia de malformaciones congénitas en la tortuga golfina que anida en el noroeste de Pacífico mexicano. Posteriormente, en el presente estudio, se analizó la relación que podían tener las malformaciones identificadas con la presencia de algunos contaminantes ubicuos, como el Hg y plaguicidas organoclorados, y la alteración de mecanismos epigenéticos como la metilación del ADN, cuyo proceso químico puede ser alterado por factores ambientales.

Actualmente, se considera que las malformaciones congénitas pueden tener un origen multifactorial, en el cual múltiples factores genéticos y ambientales pueden incidir en la presencia de malformaciones. Los resultados del presente estudio resaltan la importancia del componente ambiental que en combinación con factores genéticos y epigenéticos puede causar malformaciones congénitas en especies silvestres y que escasamente han sido estudiadas.

La metilación del ADN y otros mecanismos epigenéticos (e.g. la modificación post-traducciona l de histonas) son vulnerables al medio ambiente, y la relación entre factores ambientales y mecanismos epigenéticos en poblaciones de especies silvestres son un área de oportunidad para la investigación y la identificación de amenazas a las que se pueden enfrentar, en este caso, las tortugas marinas. Con la información adecuada se pueden tomar acciones para el uso y prohibición de distintos contaminantes químicos que eventualmente llegan al mar, no sólo en México, sino también en aguas internacionales compartidas con otros países.

El presente estudio representa un inicio en la investigación de factores ambientales como agentes causales de malformaciones congénitas en las tortugas marinas. Son necesarios más estudios sobre 1) incidencia de malformaciones en tortuga golfina en la región de estudio y de su distribución en el Pacífico mexicano, 2) factores ambientales que puedan representar una posible

amenaza para el desarrollo en tortugas marinas, 3) bioensayos de exposición en laboratorio con compuestos químicos de origen antropogénico que son acarreados al mar y aun no se han evaluado sus efectos en el desarrollo de tortugas marinas.

La relación entre contaminantes, malformaciones y mecanismos epigenéticos es muy compleja, sobre todo en animales silvestres dada la diversidad de factores ambientales a los cuales están expuestos, aunado a la variabilidad genética, por lo que este trabajo es sólo una primera aproximación. Las principales conclusiones derivadas de la presente tesis son las siguientes:

- De los contaminantes estudiados, el endosulfán fue el plaguicida organoclorado que se identificó sólo en embriones con malformaciones congénitas y no en organismos normales.
- Las concentraciones de Hg fueron más altas y presentaron mayor variabilidad en los embriones con malformaciones congénitas en comparación con los normales.
- Se pudo aislar la región promotora de genes de desarrollo embrionario temprano en tortuga golfinia a partir del genoma de especies cercanas.
- Cambios sutiles y aparentemente aleatorios en la metilación del ADN de la región promotora del gen *Pax6* coincidieron con fenotipos de embriones con malformaciones oculares.
- Tanto en embriones con SR como en los normales se observaron perfiles singulares y heterogéneos en la metilación del promotor del gen *Hoxb9* por lo que no fue posible relacionarlo con el desarrollo de SR.
- El síndrome SR presentó una asociación positiva entre niveles de Hg y metilación del ADN. Este resultado se maneja con reserva debido al tamaño de muestra pequeño.
- A pesar de las limitaciones debidas al tamaño de muestra, se pudo observar que en embriones de tortuga golfinia estuvieron presentes contaminantes ambientales como plaguicidas organoclorados y Hg; de igual manera, se observaron alteraciones en la metilación del ADN, lo que pone en relieve el componente ambiental en la teratogénesis de tortugas silvestres.

## 7. BIBLIOGRAFÍA

- Abreu-Grobois, A., & Plotkin, P. (2008). *Lepidochelys olivacea*. Retrieved January 25, 2019, from <https://www.iucnredlist.org/species/11534/3292503>
- Adam, S. (2012). Limb Abnormalities in Two Species of *Lerista* (Scincidae, Squamata). *Current Herpetology*, 31(1), 1–8. <https://doi.org/10.5358/hsj.31.1>
- Adelmann, H. (1929). Experimental studies on the development of the eye. I. The effect of the removal of median and lateral areas of the anterior end of the urodelan neural plate on the development of the eyes (*Triton teniatus* and *Amblystoma punctatum*). *Journal of Experimental Zoology*, 54(2), 249–290. <https://doi.org/10.1002/jez.1400540204>
- Aguirre, A., Balazs, G., Zimmerman, B., & Galey, F. (1994). Organic contaminants and trace metals in the tissues of green turtles (*Chelonia mydas*) afflicted with fibropapillomas in the Hawaiian islands. *Marine Pollution Bulletin*, 28(2), 109–114. [https://doi.org/10.1016/0025-326X\(94\)90547-9](https://doi.org/10.1016/0025-326X(94)90547-9)
- Alam, S., & Brim, M. (2000). Organochlorine, PCB, PAH, and metal concentrations in eggs of loggerhead sea turtles (*Caretta caretta*) from northwest Florida, USA. *Journal of Environmental Science and Health, Part B*, 35(6), 705–724. <https://doi.org/10.1080/03601230009373303>
- Alava, J. J., Keller, J. M., Wyneken, J., Crowder, L., Scott, G., & Kucklick, J. R. (2011). Geographical variation of persistent organic pollutants in eggs of threatened loggerhead sea turtles (*Caretta caretta*) from southeastern United States. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 30(7), 1677–1688. <https://doi.org/10.1002/etc.553>
- Altschul, S., Madden, T., Schäffer, A., Zhang, J., Zhang, Z., Miller, W., & Lipman, D. (1997). Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Research*, 25(17), 3389–3402. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9254694>
- Andersen, H., Vinggaard, A., Rasmussen, T., Gjermansen, I., & Bonefeld-Jørgensen, E. (2002). Effects of Currently Used Pesticides in Assays for Estrogenicity, Androgenicity, and Aromatase Activity in Vitro. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 179(1), 1–12. <https://doi.org/10.1006/taap.2001.9347>
- Andreou, A., Pauws, E., Jones, M., Singh, M., Bussen, M., Doudney, K., ... Stanier, P. (2007). TBX22 missense mutations found in patients with X-Linked cleft palate affect DNA binding, sumoylation, and transcriptional repression. *The American Journal of Human Genetics*, 81(4), 700–712. <https://doi.org/10.1086/521033>
- Andrews, R. (2004). Patterns of embryonic development. In C. Deeming (Ed.), *Reptilian incubation: environment, evolution and behaviour* (pp. 75–102). Nottingham: Nottingham University Press. Retrieved from <https://pdfs.semanticscholar.org/5bba/4ca82902c281de47776f7db83e2506e473f1.pdf>
- Andrews, R., & Mathies, T. (2000). Natural History of Reptilian Development: Constraints on the Evolution of Viviparity. *BioScience*, 50(3), 227–238. [125](https://doi.org/10.1641/0006-</a></p></div><div data-bbox=)

3568(2000)050[0227:nhorc]2.3.co;2

- Ansari, K., Shrestha, B., Hussain, I., Kasiri, S., & Mandal, S. (2011). Histone methylases MLL1 and MLL3 coordinate with estrogen receptors in estrogen-mediated HOXB9 expression. *Biochemistry*, *50*(17), 3517–3527. <https://doi.org/10.1021/bi102037t>
- Antherieu, S., Ledirac, N., Luzy, A.-P., Lenormand, P., Caron, J.-C., & Rahmani, R. (2007). Endosulfan decreases cell growth and apoptosis in human HaCaT keratinocytes: partial ROS-dependent ERK1/2 mechanism. *Journal of Cellular Physiology*, *213*(1), 177–186. <https://doi.org/10.1002/jcp.21108>
- Ashery-Padan, R., Marquardt, T., Zhou, X., & Gruss, P. (2000). Pax6 activity in the lens primordium is required for lens formation and for correct placement of a single retina in the eye. *Genes & Development*, *14*(21), 2701–2711. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11069887>
- Avilion, A., Nicolis, S., Pevny, L., Perez, L., Vivian, N., & Lovell-Badge, R. (2003). Multipotent cell lineages in early mouse development depend on SOX2 function. *Genes & Development*, *17*(1), 126–140. <https://doi.org/10.1101/gad.224503>
- Barber, B. A., & Rastegar, M. (2010). Epigenetic control of Hox genes during neurogenesis, development, and disease. *Annals of Anatomy*, *192*(5), 261–274. <https://doi.org/10.1016/j.aanat.2010.07.009>
- Bárcenas-Ibarra, A., de la Cueva, H., Rojas-Lleonart, I., Abreu-Grobois, F. A., Lozano-Guzmán, R. I., Cuevas, E., & García-Gasca, A. (2015). First approximation to congenital malformation rates in embryos and hatchlings of sea turtles. *Birth Defects Research Part A: Clinical and Molecular Teratology*, *103*(3), 203–224. <https://doi.org/10.1002/bdra.23342>
- Bárcenas-Ibarra, A., & Maldonado-Gasca, A. (2009). Malformaciones en embriones y neonatos de tortuga golfina (*Lepidochelys olivacea*) en Nuevo Vallarta, Nayarit, México. *Veterinaria México*, *40*(4), 371–380. Retrieved from [http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0301-50922009000400003](http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0301-50922009000400003)
- Bárcenas-Ibarra, A., Rojas-Lleonart, I., Lozano-Guzmán, R., & García-Gasca, A. (2016). Schistosomus Reflexus Syndrome in Olive Ridley Sea Turtles (*Lepidochelys olivacea*). *Veterinary Pathology*, *54*(1), 171–177. <https://doi.org/10.1177/0300985816651682>
- Basile, E. R. (2010). *Persistent Organic Pollutants in Diamondback Terrapin (Malaclemys terrapin) Tissues and Eggs, and Sediments in Barnegat Bay, New Jersey*. PhD dissertation, Drexel University, Philadelphia, PA. Retrieved from [http://www.dtwg.org/Bibliography/Theses/Basile\\_2010.pdf](http://www.dtwg.org/Bibliography/Theses/Basile_2010.pdf)
- Bauer, A., Hathaway, S., & Fisher, R. (2009). Polydactyly in the Central Pacific Gecko, *Lepidodactylus* sp. (Squamata: Gekkonidae). *Herpetology Notes*, *2*, 243–246. Retrieved from [http://herpetologynotes.seh-herpetology.org/Volume2\\_PDFs/Bauer\\_Herpetology\\_Notes\\_Volume2\\_pages243-246.pdf](http://herpetologynotes.seh-herpetology.org/Volume2_PDFs/Bauer_Herpetology_Notes_Volume2_pages243-246.pdf)
- Beckman, D. A., & Brent, R. L. (1984). Mechanisms of Teratogenesis. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology*, *24*(1), 483–500. <https://doi.org/10.1146/annurev.pa.24.040184.002411>
- Beischlag, T., Luis Morales, J., Hollingshead, B., & Perdew, G. (2008). The aryl hydrocarbon

receptor complex and the control of gene expression. *Critical Reviews in Eukaryotic Gene Expression*, 18(3), 207–250. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18540824>

- Bell, J. T., & Spector, T. D. (2011). A twin approach to unraveling epigenetics. *Trends in Genetics*, 27(3), 116–125. <https://doi.org/10.1016/j.tig.2010.12.005>
- Benson, D., Karsch-Mizrachi, I., Lipman, D., Ostell, J., & Wheeler, D. (2005). GenBank. <https://doi.org/10.1093/nar/gki063>
- Berger, S. L., Kouzarides, T., Shiekhattar, R., & Shilatifard, A. (2009). An operational definition of epigenetics. *DNA Sequence*, 23–25. <https://doi.org/10.1101/gad.1787609>. Copyright
- Bergeron, C., Hopkins, W., Bodinof, C. M., Budischak, S. A., Wada, H., & Unrine, J. M. (2011). Counterbalancing effects of maternal mercury exposure during different stages of early ontogeny in American toads. *Science of The Total Environment*, 409(22), 4746–4752. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2011.07.036>
- Bergeron, C. M., Bodinof, C. M., Unrine, J. M., & Hopkins, W. A. (2010). Bioaccumulation and maternal transfer of mercury and selenium in amphibians. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 29(4), 989–997. <https://doi.org/10.1002/etc.125>
- Bergeron, C. M., Hopkins, W. A., Todd, B. D., Hepner, M. J., & Unrine, J. M. (2011). Interactive effects of maternal and dietary mercury exposure have latent and lethal consequences for amphibian larvae. *Environmental Science & Technology*, 45(8), 3781–3787. <https://doi.org/10.1021/es104210a>
- Berkes, C., & Tapscott, S. (2005). MyoD and the transcriptional control of myogenesis. *Seminars in Cell & Developmental Biology*, 16(4–5), 585–595. <https://doi.org/10.1016/j.semcdb.2005.07.006>
- Bernes, C., & Naylor, M. (1998). *Persistent organic pollutants : a Swedish view of an international problem*. Swedish Environmental Protection Agency.
- Berta, P., Hawkins, J., Sinclair, A., Taylor, A., Griffiths, B., Goodfellow, P., & Fellous, M. (1990). Genetic evidence equating SRY and the testis-determining factor. *Nature*, 348(6300), 448–450. <https://doi.org/10.1038/348448A0>
- Bestor, T. H. (2000). The DNA methyltransferases of mammals. *Human Molecular Genetics*, 9(16), 2395–2402. <https://doi.org/10.1093/hmg/9.16.2395>
- Bird, A. (2002). DNA methylation patterns and epigenetic memory. *Genes & Development*, 16(1), 6–21. <https://doi.org/10.1101/gad.947102>
- Bishop, C. A., Ng, P., Pettit, K., Kennedy, S., Stegeman, J., Norstrom, R., & Brooks, R. (1998). Environmental contamination and developmental abnormalities in eggs and hatchlings of the common snapping turtle (*Chelydra serpentina serpentina*) from the Great Lakes—St Lawrence River basin (1989–1991). *Environmental Pollution*, 101(1), 143–156. [https://doi.org/10.1016/S0269-7491\(98\)00005-0](https://doi.org/10.1016/S0269-7491(98)00005-0)
- Blake, M., Jambou, R., Swick, A., Kahn, J., & Azizkhan, J. (1990). Transcriptional initiation is controlled by upstream GC-box interactions in a TATAA-less promoter. *Molecular and Cellular Biology*, 10(12), 6632–6641. <https://doi.org/10.1128/MCB.10.12.6632>

- Boening, D. (2000). Ecological effects, transport, and fate of mercury: a general review. *Chemosphere*, 40(12), 1335–1351. [https://doi.org/10.1016/S0045-6535\(99\)00283-0](https://doi.org/10.1016/S0045-6535(99)00283-0)
- Bose, R., Onishchenko, N., Edoff, K., Janson Lang, A. M., & Ceccatelli, S. (2012). Inherited effects of low-dose exposure to methylmercury in neural stem cells. *Toxicological Sciences*, 130(2), 383–390. <https://doi.org/10.1093/toxsci/kfs257>
- Bourc'his, D., Xu, G.-L., Lin, C.-S., Bollman, B., & Bestor, T. H. (2001). Dnmt3L and the Establishment of Maternal Genomic Imprints. *Science*, 294, 2536–2539. Retrieved from [www.sciencemag.org](http://www.sciencemag.org)
- Bouzas, S., Marini, M., Torres Zelada, E., Buzzi, A., Morales Vicente, D., & Strobl-Mazzulla, P. (2016). Epigenetic activation of Sox2 gene in the developing vertebrate neural plate. *Molecular Biology of the Cell*, 27(12), 1921–1927. <https://doi.org/10.1091/mbc.E16-01-0042>
- Buck-Koehntop, B., & Defossez, P. (2013). On how mammalian transcription factors recognize methylated DNA. *Epigenetics*, 8(2), 131–137. <https://doi.org/10.4161/epi.23632>
- Burger, J., & Gibbons, J. (1998). Trace Elements in Egg Contents and Egg Shells of Slider Turtles ( *Trachemys scripta* ) from the Savannah River Site. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, 34(4), 382–386. <https://doi.org/10.1007/s002449900334>
- Campbell, H., Holmes, E., MacDonald, S., Morrison, D., & Jones, I. (2002). A capture-recapture model to estimate prevalence of children born in Scotland with developmental eye defects. *Journal of Cancer Epidemiology and Prevention*, 7(1), 21–28. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12369602>
- Campo-Paysaa, F., Marlétaz, F., Laudet, V., & Schubert, M. (2008). Retinoic acid signaling in development: tissue-specific functions and evolutionary origins. *Genesis*, 46(11), 640–656. <https://doi.org/10.1002/dvg.20444>
- Cantrell, J., Haller, J., & Ravitch, M. (1958). A syndrome of congenital defects involving the abdominal wall, sternum, diaphragm, pericardium, and heart. *Surgery, Gynecology & Obstetrics*, 107(5), 602–614. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/13592660>
- Cao, R., Wang, L., Wang, H., Xia, L., Erdjument-Bromage, H., Tempst, P., ... Zhang, Y. (2002). Role of histone H3 lysine 27 methylation in Polycomb-group silencing. *Science*, 298(5595), 1039–1043. <https://doi.org/10.1126/science.1076997>
- Cardenas, A., Rifas-Shiman, S., Agha, G., Hivert, M.-F., Litonjua, A., DeMeo, D., ... Baccarelli, A. (2017). Persistent DNA methylation changes associated with prenatal mercury exposure and cognitive performance during childhood. *Scientific Reports*, 7(1), 288. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-00384-5>
- Carson, R. (2002). *Silent spring*. New York, USA: Houghton Mifflin.
- Cecil, H. C., Bitman, J., Lillie, R., Fries, G., & Verrett, J. (1974). Embryotoxic and teratogenic effects in unhatched fertile eggs from hens fed polychlorinated biphenyls (PCBs). *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 11(6), 489–495. <https://doi.org/10.1007/BF01685002>
- Çelik, T., Simsek, P., Sozen, T., Ozyuncu, O., Utine, G., Talim, B., ... Kamnasaran, D. (2012).



- PRRX1 is mutated in an otocephalic newborn infant conceived by consanguineous parents. *Clinical Genetics*, 81(3), 294–297. <https://doi.org/10.1111/j.1399-0004.2011.01730.x>
- Chambers, I., Colby, D., Robertson, M., Nichols, J., Lee, S., Tweedie, S., & Smith, A. (2003). Functional Expression Cloning of Nanog, a Pluripotency Sustaining Factor in Embryonic Stem Cells. *Cell*, 113(5), 643–655. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(03\)00392-1](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(03)00392-1)
- Chelban, V., Patel, N., Vandrovцова, J., Zanetti, M., Lynch, D., Ryten, M., ... Houlden, H. (2017). Mutations in NKX6-2 Cause Progressive Spastic Ataxia and Hypomyelination. *The American Journal of Human Genetics*, 100(6), 969–977. <https://doi.org/10.1016/j.ajhg.2017.05.009>
- Chen, T., & Li, E. (2006). Establishment and Maintenance of DNA Methylation Patterns in Mammals. In W. Doerfler & P. Böhm (Eds.), *DNA Methylation: Basic Mechanisms* (pp. 179–201). Berlin, Heidelberg: Springer-Verlag. [https://doi.org/10.1007/3-540-31390-7\\_6](https://doi.org/10.1007/3-540-31390-7_6)
- Chiang, C., Litingtung, Y., Lee, E., Young, K., Corden, J., Westphal, H., & Beachy, P. (1996). Cyclopia and defective axial patterning in mice lacking Sonic hedgehog gene function. *Nature*, 383(6599), 407–413. <https://doi.org/10.1038/383407a0>
- Chikhirzhina, G., Al-Shekhadat, R., & Chikhirzhina, E. (2008). Transcription factors of the NF1 family: Role in chromatin remodeling. *Molecular Biology*, 42(3), 342–356. <https://doi.org/10.1134/S0026893308030023>
- Chotteau-Lelievre, A., Montesano, R., Soriano, J., Soulie, P., Desbiens, X., & de Launoit, Y. (2003). PEA3 transcription factors are expressed in tissues undergoing branching morphogenesis and promote formation of duct-like structures by mammary epithelial cells in vitro. *Developmental Biology*, 259(2), 241–257. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12871699>
- Chow, R., Altmann, C., Lang, R., & Hemmati-Brivanlou, A. (1999). Pax6 induces ectopic eyes in a vertebrate. *Development*, 126(19), 4213–4222. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10477290>
- Chuang, L., & Chuang, R. (1998). Heptachlor and the mitogen-activated protein kinase module in human lymphocytes. *Toxicology*, 128(1), 17–23. [https://doi.org/10.1016/S0300-483X\(98\)00042-0](https://doi.org/10.1016/S0300-483X(98)00042-0)
- Chuang, L., Rought, S., & Chuang, R. (1999). Differential regulation of the major cyclin-dependent kinases, cdk2 and cdc2, during cell cycle progression in human lymphocytes exposed to heptachlor. *In Vivo*, 13(6), 455–461. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10757037>
- Čítek, J., Řehout, V., & Hájková, J. (2009). Congenital disorders in the cattle population of the Czech Republic. *Czech Journal of Animal Science*, 54(2), 55–64. Retrieved from <https://www.agriculturejournals.cz/publicFiles/03931.pdf>
- CITES. (2017). Appendices I, II y III. Retrieved January 26, 2019, from <https://www.cites.org/eng/app/appendices.php>
- Clark, D., & Krynitsky, A. (1980). Organochlorine residues in eggs of loggerhead and green sea turtles nesting at Merritt Island, Florida--July and August 1976. *Pesticides Monitoring Journal*, 14(1), 7–10. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6775282>

- Colas, J.-F., & Schoenwolf, G. C. (2001). Towards a cellular and molecular understanding of neurulation. *Developmental Dynamics*, 221(2), 117–145. <https://doi.org/10.1002/dvdy.1144>
- Colbert, E. H. (Edwin H., Minkoff, E. C., Morales, M., & Colbert, E. H. (Edwin H. (2001). *Colbert's evolution of the vertebrates : a history of the backboned animals through time*. Wiley.
- Colomina, M. T., Albina, M. L., Domingo, J. L., & Corbella, J. (1995). Effects of maternal stress on methylmercury-induced developmental toxicity in mice. *Physiology & Behavior*, 58(5), 979–983. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8577897>
- Consortium, I. H. G. S. (2001). Initial sequencing and analysis of the human genome. *Nature*, 409(6822), 860–921. <https://doi.org/10.1038/35057062>
- Cooke, J., & Zeeman, E. (1976). A clock and wavefront model for control of the number of repeated structures during animal morphogenesis. *Journal of Theoretical Biology*, 58(2), 455–476. [https://doi.org/10.1016/S0022-5193\(76\)80131-2](https://doi.org/10.1016/S0022-5193(76)80131-2)
- Cordero, G. A., & Janzen, F. J. (2014). An enhanced developmental staging table for the painted turtle, *Chrysemys picta* (Testudines: Emydidae). *Journal of Morphology*, 275(4), 442–455. <https://doi.org/10.1002/jmor.20226>
- Cortese, R., Krispin, M., Weiss, G., Berlin, K., & Eckhardt, F. (2008). DNA methylation profiling of pseudogene–parental gene pairs and two gene families. *Genomics*, 91(6), 492–502. <https://doi.org/10.1016/j.ygeno.2008.02.004>
- Crastz, F. (1982). Embryological stages of the marine turtle *Lepidochelys olivacea* (Eschscholtz). *Revista de Biología Tropical*, 30(2), 113–120. Retrieved from <https://revistas.ucr.ac.cr/index.php/rbt/article/view/25228>
- Crews, D., Bull, J., & Wibbels, T. (1991). Estrogen and sex reversal in turtles: a dose-dependent phenomenon. *General and Comparative Endocrinology*, 81(3), 357–364. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2055436>
- Cupul-Magaña, F. G., García de Quevedo-Machain, R., Tovar-Ramos, J. A., & Curiel-Beltrán, J. A. (2014). Duplicación de miembro anterior en Iguana iguana (Linnaeus, 1758): registro de caso. *Cuadernos de Herpetología*, 28(1). <https://doi.org/10.31017/2135>
- Darnell, D., Kaur, S., Stanislaw, S., Davey, S., Konieczka, J., Yatskievych, T., & Antin, P. (2007). GEISHA: an in situ hybridization gene expression resource for the chicken embryo. *Cytogenetic and Genome Research*, 117(1–4), 30–35. <https://doi.org/10.1159/000103162>
- Davis, T., Tremblay, K., & Bartolomei, M. (1998). Imprinted expression and methylation of the mouse H19 gene are conserved in extraembryonic lineages. *Developmental Genetics*, 23(2), 111–118. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1520-6408\(1998\)23:2<111::AID-DVG3>3.0.CO;2-9](https://doi.org/10.1002/(SICI)1520-6408(1998)23:2<111::AID-DVG3>3.0.CO;2-9)
- Davis, T., Yang, G., McCarrey, J., & Bartolomei, M. (2000). The H19 methylation imprint is erased and re-established differentially on the parental alleles during male germ cell development. *Human Molecular Genetics*, 9(19), 2885–2894. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11092765>
- Davis, V., Chan, C.-C., Schoen, T., Couse, J., Chader, G., & Korach, K. (2002). An estrogen receptor repressor induces cataract formation in transgenic mice. *Proceedings of the*

*National Academy of Sciences*, 99(14), 9427–9432. Retrieved from [www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.132247999](http://www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.132247999)

- de Solla, S., Bishop, C., Van der Kraak, & Brooks, R. (1998). Impact of organochlorine contamination on levels of sex hormones and external morphology of common snapping turtles (*Chelydra serpentina serpentina*) in Ontario, Canada. *Environmental Health Perspectives*, 106(5), 253–260. <https://doi.org/10.1289/ehp.98106253>
- Deaton, A. M., & Bird, A. (2011). CpG islands and the regulation of transcription. *Genes & Development*, 25(10), 1010–1022. <https://doi.org/10.1101/gad.2037511>
- Deeming, C., & Ferguson, M. (2004). *Egg incubation : its effects on embryonic development in birds and reptiles*. Cambridge, UK: Cambridge University Press.
- Dennis, S., & Meyer, E. (1965). *Schistosomus reflexus* in a sheep. *Veterinary Record*, 77(47), 1386–1387. <https://doi.org/10.1136/vr.77.47.1386>
- Desaulniers, D., Xiao, G., Lian, H., Feng, Y.-L., Zhu, J., Nakai, J., & Bowers, W. J. (2009). Effects of Mixtures of Polychlorinated Biphenyls, Methylmercury, and Organochlorine Pesticides on Hepatic DNA Methylation in Prepubertal Female Sprague-Dawley Rats. *International Journal of Toxicology*, 28(4), 294–307. <https://doi.org/10.1177/1091581809337918>
- DiLeone, R., Russell, L., & Kingsley, D. (1998). An extensive 3' regulatory region controls expression of *Bmp5* in specific anatomical structures of the mouse embryo. *Genetics*, 148(1), 401–408. Retrieved from <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9475750>
- Dipolo, R., & Beaugé, L. (2006). Sodium/calcium exchanger: influence of metabolic regulation on ion carrier interactions. *Physiological Reviews*, 86(1), 155–203. <https://doi.org/10.1152/physrev.00018.2005>
- DOF. (1990). Acuerdo por el que se establece veda para las especies y subespecies de tortuga marina en aguas de jurisdicción Federal del Golfo de México y Mar Caribe, así como en las costas del Océano Pacífico, incluyendo el Golfo de California.
- Dolinoy, D. C. (2008). The agouti mouse model: an epigenetic biosensor for nutritional and environmental alterations on the fetal epigenome. *Nutrition Reviews*, 66, S7–S11. <https://doi.org/10.1111/j.1753-4887.2008.00056.x>
- Dorval, J., Leblond, V., & Hontela, A. (2003). Oxidative stress and loss of cortisol secretion in adrenocortical cells of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) exposed in vitro to endosulfan, an organochlorine pesticide. *Aquatic Toxicology*, 63(3), 229–241. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12711413>
- Doty, R., Vanasse, G., Disteche, C., & Willerford, D. (2002). The leukemia-associated gene *Mllt1/ENL*: characterization of a murine homolog and demonstration of an essential role in embryonic development. *Blood Cells, Molecules & Diseases*, 28(3), 407–417. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12367585>
- Drennen, D. (1990). Occurrence of Physical Abnormalities in *Caretta caretta* at Hobe Sound National Wildlife Refuge, 1987 and 1988. *Marine Turtle Newsletter*, 48, 19–20. Retrieved from <http://www.seaturtle.org/mtn/archives/mtn48/mtn48p19.shtml>
- Dudakovic, A., Camilleri, E., Xu, F., Riester, S., McGee-Lawrence, M., Bradley, E., ... van

- Wijnen, A. J. (2015). Epigenetic Control of Skeletal Development by the Histone Methyltransferase Ezh2. *The Journal of Biological Chemistry*, 290, 27604–27617. <https://doi.org/10.1074/jbc.M115.672345>
- Dufaure, J., & Hubert, J. (1961). Table De Developpement Du Lezard Vivipare-Lacerta (Zootoca) Vivipara Jacquin. *Archives D Anatomie Microscopique Et De Morphologie Experimentale*, (50), 309–328. Retrieved from [https://scholar.google.com.mx/scholar?hl=es&as\\_sdt=0%2C5&q=Table+De+Developpement+Du+Lezard+Vivipare-Lacerta+%28Zootoca%29+Vivipara+Jacquin&btnG=](https://scholar.google.com.mx/scholar?hl=es&as_sdt=0%2C5&q=Table+De+Developpement+Du+Lezard+Vivipare-Lacerta+%28Zootoca%29+Vivipara+Jacquin&btnG=)
- Eccles, M., He, S., Legge, M., Kumar, R., Fox, J., Zhou, C., ... Tsai, R. (2002). PAX genes in development and disease: the role of PAX2 in urogenital tract development. *The International Journal of Developmental Biology*, 46(4), 535–544. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12141441>
- Echelard, Y., Epstein, D., St-Jacques, B., Shen, L., Mohler, J., McMahon, J., & McMahon, A. (1993). Sonic hedgehog, a member of a family of putative signaling molecules, is implicated in the regulation of CNS polarity. *Cell*, 75(7), 1417–1430. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7916661>
- Eckert, D., Buhl, S., Weber, S., Jäger, R., & Schorle, H. (2005). The AP-2 family of transcription factors. *Genome Biology*, 6(13), 246. <https://doi.org/10.1186/gb-2005-6-13-246>
- Egawa, T., & Littman, D. (2011). Transcription factor AP4 modulates reversible and epigenetic silencing of the Cd4 gene. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 108(36), 14873–14878. <https://doi.org/10.1073/pnas.1112293108>
- Ema, M., Ohe, N., Suzuki, M., Mimura, J., Sogawa, K., Ikawa, S., & Fujii-Kuriyama, Y. (1994). Dioxin binding activities of polymorphic forms of mouse and human arylhydrocarbon receptors. *The Journal of Biological Chemistry*, 269(44), 27337–27343. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7961644>
- EPA. (1996). Method 3052: Microwave assisted acid digestion of siliceous and organically based matrices. Retrieved February 28, 2019, from <https://www.epa.gov/sites/production/files/2015-12/documents/3052.pdf>
- Ericson, J., Briscoe, J., Rashbass, P., van Heyningen, V., & Jessell, T. (1997). Graded sonic hedgehog signaling and the specification of cell fate in the ventral neural tube. *Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology*, 62, 451–466. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9598380>
- Esteller, M. (2007). Cancer epigenomics: DNA methylomes and histone-modification maps. *Nature Reviews Genetics*, 8(4), 286–298. <https://doi.org/10.1038/nrg2005>
- Eto, K. (1997). Review Article: Pathology of Minamata Disease. *Toxicologic Pathology*, 25(6), 614–623. <https://doi.org/10.1177/019262339702500612>
- Ewert, M. (1985). Embryology of turtles. In C. Gans, F. Billett, & P. Maderson (Eds.), *Biology of the Reptilia* (Volume 14, pp. 75–268). New York: John Wiley and Sons.
- Fantes, J., Ragge, N., Lynch, S.-A., McGill, N., Collin, J., Howard-Peebles, P., ... FitzPatrick, D. R. (2003). Mutations in SOX2 cause anophthalmia. *Nature Genetics*, 33(4), 462–463. <https://doi.org/10.1038/ng1120>

- Feng, J., Chang, H., Li, E., & Fan, G. (2005). Dynamic expression of de novo DNA methyltransferases Dnmt3a and Dnmt3b in the central nervous system. *Journal of Neuroscience Research*, 79(6), 734–746. <https://doi.org/10.1002/jnr.20404>
- Fernández, N., & Beiras, R. (2001). Combined toxicity of dissolved mercury with copper, lead and cadmium on embryogenesis and early larval growth of the *Paracentrotus lividus* sea-urchin. *Ecotoxicology*, 10(5), 263–271. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11556113>
- Ferreira, W. A., Araújo, M., Anselmo, N., Harada, M., & Borges, B. (2015). Analysis of the Methylation Pattern of SOX2 and OCT4 Genes in Astrocytomas. *Journal of Genetics and Genome Research*, 2, 012. Retrieved from <https://clinmedjournals.org/articles/jggr/jggr-2-012.pdf>
- Fineberg, S. K., Kosik, K. S., & Davidson, B. L. (2009). MicroRNAs Potentiate Neural Development. *Neuron*, 64(3), 303–309. <https://doi.org/10.1016/J.NEURON.2009.10.020>
- Flagiello, D., Poupon, M., Cillo, C., Dutrillaux, B., & Malfoy, B. (1996). Relationship between DNA methylation and gene expression of the HOXB gene cluster in small cell lung cancers. *FEBS Letters*, 380(1–2), 103–107. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8603715>
- Forbes, V., & Depledge, M. (1996). Environmental stress and the distribution of traits within populations. In D. Baird, L. Maltby, P. Greig-Smith, & P. Douben (Eds.), *ECOTOXICOLOGY: Ecological Dimensions* (pp. 71–86). Dordrecht: Chapman & Hall Ecotoxicology Series. Springer. [https://doi.org/10.1007/978-94-009-1541-1\\_7](https://doi.org/10.1007/978-94-009-1541-1_7)
- Fort, D., Stover, E., Rogers, R. L., Copley, H. F., Morgan, L. A., & Foster, E. R. (2000). Chronic boron or copper deficiency induces limb teratogenesis in *Xenopus*. *Biological Trace Element Research*, 77(2), 173–187. <https://doi.org/10.1385/BTER:77:2:173>
- Fouse, S., Shen, Y., Pellegrini, M., Cole, S., Meissner, A., Van Neste, L., ... Fan, G. (2008). Promoter CpG Methylation Contributes to ES Cell Gene Regulation in Parallel with Oct4/Nanog, PcG Complex, and Histone H3 K4/K27 Trimethylation. *Cell Stem Cell*, 2(2), 160–169. <https://doi.org/10.1016/j.stem.2007.12.011>
- Fraichard, A., Chassande, O., Plateroti, M., Roux, J., Trouillas, J., Dehay, C., ... Samarut, J. (1997). The T3Ralpha gene encoding a thyroid hormone receptor is essential for post-natal development and thyroid hormone production. *The EMBO Journal*, 16(14), 4412–4420. <https://doi.org/10.1093/emboj/16.14.4412>
- Fuyuta, M., Fujimoto, T., & Hirata, S. (1978). Embryotoxic effects of methylmercuric chloride administered to mice and rats during organogenesis. *Experimental Teratology*, 18(3), 353–365. <https://doi.org/10.1002/tera.1420180310>
- Gabra, H. (1993). *Teratology—A monstrous fetus in a one humped camel (Camelus dromedarius)*. *Camel Newsletter, ASCAD*.
- Gale, R., Bergeron, J., Willingham, E., & Crews, D. (2002). Turtle sex determination assay: Mass balance and responses to 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin and 3,3',4,4',5-pentachlorobiphenyl. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 21(11), 2477–2482. <https://doi.org/10.1002/etc.5620211129>

- Gallina, T., Bendini, A., Ricci, A., & Lercker, G. (2003). Pressurized solvent extraction of total lipids in poultry meat. *Food Chemistry*, 83(4), 551–555. [https://doi.org/10.1016/S0308-8146\(03\)00152-3](https://doi.org/10.1016/S0308-8146(03)00152-3)
- García-Solorio, L., Noreña-Barroso, E., & Capella-Vizcaíno, S. (2014). Plaguicidas organoclorados en huevos de la tortuga golfina *Lepidochelys olivacea* (Eschscholtz, 1829), en las costas del estado de Sinaloa, México. In A. Botello, F. Páez-Osuna, L. Méndez-Rodríguez, M. Bentacourt-Lozano, S. Álvarez-Borrego, & R. Lara-Lara (Eds.), *Pacífico Mexicano. Contaminación e impacto ambiental: Diagnóstico y Tendencias*. (pp. 43–56). La Paz, BCS: CIBNOR. Retrieved from <http://dspace.cibnor.mx:8080/handle/123456789/1404>
- Gardiner-Garden, M., & Frommer, M. (1987). CpG Islands in vertebrate genomes. *Journal of Molecular Biology*, 196(2), 261–282. [https://doi.org/10.1016/0022-2836\(87\)90689-9](https://doi.org/10.1016/0022-2836(87)90689-9)
- Gardner, S., Pier, M., Wesselman, R., & Juárez, J. (2003). Organochlorine contaminants in sea turtles from the Eastern Pacific. *Marine Pollution Bulletin*, 46(9), 1082–1089. [https://doi.org/10.1016/S0025-326X\(03\)00254-6](https://doi.org/10.1016/S0025-326X(03)00254-6)
- Ge, C., Ye, J., Weber, C., Sun, W., Zhang, H., Zhou, Y., ... Capel, B. (2018). The histone demethylase KDM6B regulates temperature-dependent sex determination in a turtle species. *Science*, 360(6389), 645–648. <https://doi.org/10.1126/science.aap8328>
- Ge, C., Ye, J., Zhang, H., Zhang, Y., Sun, W., Sang, Y., ... Qian, G. (2017). Dmrt1 induces the male pathway in a turtle species with temperature-dependent sex determination. *Development*, 144, 2222–2233. <https://doi.org/10.1242/dev.152033>
- Gehring, P. S. (2009). A remarkable case of malformation in a free-living individual of *Furcifer pardalis* (Cuvier, 1829) from northern Madagascar. *Herpetology Notes*, 2, 223–225. Retrieved from [http://www.herpetologynotes.seh-herpetology.org/Volume2\\_PDFs/Gehring\\_Herpetology\\_Notes\\_Volume2\\_pages223-225.pdf](http://www.herpetologynotes.seh-herpetology.org/Volume2_PDFs/Gehring_Herpetology_Notes_Volume2_pages223-225.pdf)
- Gilbert, S. F. (2010). *Developmental biology* (9th ed.). Sunderland, Massachusetts: Sinauer Associates.
- Glaser, K. B. (2007). HDAC inhibitors: Clinical update and mechanism-based potential. *Biochemical Pharmacology*, 74(5), 659–671. <https://doi.org/10.1016/j.bcp.2007.04.007>
- Glaser, T., Jepeal, L., Edwards, J., Young, S., Favor, J., & Maas, R. (1994). PAX6 gene dosage effect in a family with congenital cataracts, aniridia, anophthalmia and central nervous system defects. *Nature Genetics*, 7(4), 463–471. <https://doi.org/10.1038/ng0894-463>
- Goller, T., Vauti, F., Ramasamy, S., & Arnold, H. (2008). Transcriptional regulator BPTF/FAC1 is essential for trophoblast differentiation during early mouse development. *Molecular and Cellular Biology*, 28(22), 6819–6827. <https://doi.org/10.1128/MCB.01058-08>
- Gomez, C., Özbudak, E. M., Wunderlich, J., Baumann, D., Lewis, J., & Pourquié, O. (2008). Control of segment number in vertebrate embryos. *Nature*, 454(7202), 335–339. <https://doi.org/10.1038/nature07020>
- González-Bejarano, F. (2018). Los plaguicidas altamente peligrosos en México. Red de Acción sobre Plaguicidas y Alternativas en México (RAPAM). Retrieved February 27, 2019, from <http://www.rapam.org/>

- Gordon, J., Hassan, M., Koss, M., Montecino, M., Selleri, L., van Wijnen, A., ... Lian, J. (2011). Epigenetic regulation of early osteogenesis and mineralized tissue formation by a HOXA10-PBX1-associated complex. *Cells Tissues Organs*, 194(2–4), 146–150. <https://doi.org/10.1159/000324790>
- Gradin, K., McGuire, J., Wenger, R., Kvietikova, I., fhitelaw, M., Toftgård, R., ... Poellinger, L. (1996). Functional interference between hypoxia and dioxin signal transduction pathways: competition for recruitment of the Arnt transcription factor. *Molecular and Cellular Biology*, 16(10), 5221–5231. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8816435>
- Greenbaum, E. (2002). A standardized series of embryonic stages for the emydid turtle *Trachemys scripta*. *Canadian Journal of Zoology*, 80(8), 1350–1370. <https://doi.org/10.1139/z02-111>
- Greer, J., Puetz, J., Thomas, K., & Capecchi, M. (2000). Maintenance of functional equivalence during paralogous Hox gene evolution. *Nature*, 403(6770), 661–665. <https://doi.org/10.1038/35001077>
- Gregor, D., & Gummer, W. (1989). Evidence of atmospheric transport and deposition of organochlorine pesticides and polychlorinated biphenyls in Canadian Arctic snow. *Environmental Science & Technology*, 23(5), 561–565. <https://doi.org/10.1021/es00063a008>
- Guenther, C., Pantalena-Filho, L., & Kingsley, D. (2008). Shaping Skeletal Growth by Modular Regulatory Elements in the Bmp5 Gene. *PLoS Genetics*, 4(12), e1000308. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1000308>
- Guillette, L., Gross, T., Masson, G., Matter, J., Percival, H., Woodward, A., & Woodward, A. R. (1994). Developmental abnormalities of the gonad and abnormal sex hormone concentrations in juvenile alligators from contaminated and control lakes in Florida. *Environmental Health Perspectives*, 102(8), 680–688. <https://doi.org/10.1289/ehp.94102680>
- Guillette, L., Pickford, D., Crain, D., Rooney, A., & Percival, H. (1996). Reduction in penis size and plasma testosterone concentrations in juvenile alligators living in a contaminated environment. *General and Comparative Endocrinology*, 101(1), 32–42. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8713642>
- Guirlet, E., Das, K., & Girondot, M. (2008). Maternal transfer of trace elements in leatherback turtles (*Dermochelys coriacea*) of French Guiana. *Aquatic Toxicology*, 88(4), 267–276. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2008.05.004>
- Guirlet, E., Das, K., Thomé, J.-P., & Girondot, M. (2010). Maternal transfer of chlorinated contaminants in the leatherback turtles, *Dermochelys coriacea*, nesting in French Guiana. *Chemosphere*, 79(7), 720–726. <https://doi.org/10.1016/J.CHEMOSPHERE.2010.02.047>
- Gutierrez, C., Rodríguez, J., Sagrera, M., Corbera, J., & Montoya, J. (1999). Two Cases of *Schistosomus Reflexus* and Two of Omphalocele in the Canarian Goat. *Journal of Applied Animal Research*, 15(1), 93–96. <https://doi.org/10.1080/09712119.1999.9706237>
- Hahn, G., Cohen, R., Wozney, J., Levitz, C., Shore, E., Zasloff, M., & Kaplan, F. (1992). A bone morphogenetic protein subfamily: chromosomal localization of human genes for BMP5,

BMP6, and BMP7. *Genomics*, 14(3), 759–762. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1427904>

- Hamann, M., Godfrey, M., Seminoff, J., Arthur, K., Barata, P., Bjorndal, K., ... Godley, B. (2010). Global research priorities for sea turtles: informing management and conservation in the 21st century. *Endangered Species Research*, 11(3), 245–269. <https://doi.org/10.3354/esr00279>
- Hamlin, H. J., & Guillette, L. J. (2010). Birth defects in wildlife: the role of environmental contaminants as inducers of reproductive and developmental dysfunction. *Systems Biology in Reproductive Medicine*, 56(2), 113–121. <https://doi.org/10.3109/19396360903244598>
- Hansen, R., Wijmenga, C., Luo, P., Stanek, A., Canfield, T., Weemaes, C., & Gartler, S. (1999). The DNMT3B DNA methyltransferase gene is mutated in the ICF immunodeficiency syndrome. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 96(25), 14412–14417. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10588719>
- Harada, M. (1995). Minamata disease: methylmercury poisoning in Japan caused by environmental pollution. *Critical Reviews in Toxicology*, 25(1), 1–24. <https://doi.org/10.3109/10408449509089885>
- Harford, A., O'Halloran, K., & Wright, P. (2005). The effects of in vitro pesticide exposures on the phagocytic function of four native Australian freshwater fish. *Aquatic Toxicology*, 75(4), 330–342. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2005.09.005>
- Hattori, N., Imao, Y., Nishino, K., Hattori, N., Ohgane, J., Yagi, S., ... Shiota, K. (2007). Epigenetic regulation of Nanog gene in embryonic stem and trophoblast stem cells. *Genes to Cells*, 12(3), 387–396. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2443.2007.01058.x>
- Hayashi, K., & Surani, M. (2009). Resetting the Epigenome beyond Pluripotency in the Germline. *Cell Stem Cell*, 4(6), 493–498. <https://doi.org/10.1016/J.STEM.2009.05.007>
- He, Y., Li, B., Li, Z., Liu, P., Wang, Y., Tang, Q., ... Xu, G. (2011). Tet-Mediated Formation of 5-Carboxylcytosine and Its Excision by TDG in Mammalian DNA. *Science*, 333(6047), 1303–1307. <https://doi.org/10.1126/science.1210944>
- Heavner, W., & Pevny, L. (2012). Eye development and retinogenesis. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 4(12), a008391–a008391. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a008391>
- Heinz, G., & Hoffman, D. (1998). Methylmercury chloride and selenomethionine interactions on health and reproduction in mallards. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 17(2), 139–145. Retrieved from <https://pubs.er.usgs.gov/publication/5223337>
- Heinz, G., Hoffman, D., Klimstra, J., Stebbins, K., Kondrad, S., & Erwin, C. (2011). Teratogenic effects of injected methylmercury on avian embryos. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 30(7), 1593–1598. <https://doi.org/10.1002/etc.530>
- Hess, J., Angel, P., & Schorpp-Kistner, M. (2004). AP-1 subunits: quarrel and harmony among siblings. *Journal of Cell Science*, 117(25), 5965–5973. <https://doi.org/10.1242/jcs.01589>
- Hillestad, H., Reimold, R., Stickney, R., Windom, H., & Jenkins, J. (1974). Pesticides, heavy metals and radionuclide uptake in loggerhead sea turtles from South Carolina and Georgia. *Herpetological Review*, 5, 75.



- Hoffman, D., & Eastin, W. (1982). Effects of lindane, paraquat, toxaphene, and 2,4,5-trichlorophenoxyacetic acid on mallard embryo development. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, *11*(1), 79–86. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6176190>
- Hoffman, D., & Moore, J. (1979). Teratogenic effects of external egg applications of methyl mercury in the mallard, *Anas platyrhynchos*. *Teratology*, *20*(3), 453–461. <https://doi.org/10.1002/tera.1420200315>
- Holland, P. W. (2013). Evolution of homeobox genes. *Wiley Interdisciplinary Reviews: Developmental Biology*, *2*(1), 31–45. <https://doi.org/10.1002/wdev.78>
- Holliday, R. (2006). Epigenetics: a historical overview. *Epigenetics*, *1*(2), 76–80. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17998809>
- Holmes, L. B. (2011). Human teratogens: Update 2010. *Birth Defects Research Part A: Clinical and Molecular Teratology*, *91*(1), 1–7. <https://doi.org/10.1002/bdra.20748>
- Hu, N., Strobl-Mazzulla, P., Simoes-Costa, M., Sánchez-Vásquez, E., & Bronner, M. (2014). DNA methyltransferase 3B regulates duration of neural crest production via repression of Sox10. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *111*(50), 17911–17916. <https://doi.org/10.1073/pnas.1318408111>
- Huang, L., Wang, C., Zhang, Y., Wu, M., & Zuo, Z. (2013). Phenanthrene causes ocular developmental toxicity in zebrafish embryos and the possible mechanisms involved. *Journal of Hazardous Materials*, *261*, 172–180. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2013.07.030>
- Ianni, F., Parmigiani, E., Bigliardi, E., Vitellozzi, G., & Corradi, A. (2004). *Schistosoma reflexus* in un sauro appartenente alla specie *pogona vitticeps*. In Società Italiana Riproduzione Animale (Ed.), *La Fecondazione Artificiale nelle specie minori, ATTI Workshop* (pp. 144–146). Turin, Italy: Università degli Studi di Torino. Retrieved from <https://air.unipr.it/handle/11381/1440885#.XE5OKFUzbiU>
- Ikeda, K., & Kawakami, K. (1995). DNA binding through distinct domains of zinc-finger-homeodomain protein AREB6 has different effects on gene transcription. *European Journal of Biochemistry*, *233*(1), 73–82. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7588776>
- Illingworth, R. S., & Bird, A. P. (2009). CpG islands - 'A rough guide.' *FEBS Letters*, *583*(11), 1713–1720. <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2009.04.012>
- INE. (2011). Diagnóstico de la acción del endosulfán en México.
- Innis, C., Tlusty, M., Perkins, C., Holladay, S., Merigo, C., & Weber, E. (2008). Trace Metal and Organochlorine Pesticide Concentrations in Cold-Stunned Juvenile Kemp's Ridley Turtles (*Lepidochelys kempii*) from Cape Cod, Massachusetts. *Chelonian Conservation and Biology*, *7*(2), 230–240. <https://doi.org/10.2744/CCB-0707.1>
- Issa, J.-P., Ottaviano, Y., Celano, P., Hamilton, S., Davidson, N., & Baylin, S. (1994). Methylation of the oestrogen receptor CpG island links ageing and neoplasia in human colon. *Nature Genetics*, *7*(4), 536–540. <https://doi.org/10.1038/ng0894-536>
- Ito, M., Ogawa, K., Sonobe, T., Nakaminami G, Ishida, N., Watanabe, N., ... Nigi, H. (1988).

- Relation of the Congenital Limb-malformation in the Japanese Monkeys and Organochlorin Pesticides. *Primate Research*, 4(2), 103–113. <https://doi.org/10.2354/psj.4.103>
- IUCN. (2019). The IUCN Red List of Threatened Species. Version 2018-2. Retrieved January 25, 2019, from <https://www.iucnredlist.org/>
- Jana, D., & Jana, M. (2013). Studies on schistosomus reflexus in indigenous cattle in tropical West Bengal, India. *Exploratory Animal and Medical Research*, 3(1), 74–77. Retrieved from <https://www.cabdirect.org/cabdirect/abstract/20133303458>
- Janzen, F. J., & Paukstis, G. L. (1991). Environmental Sex Determination in Reptiles: Ecology, Evolution, and Experimental Design. *The Quarterly Review of Biology*, 66(2), 149–179. <https://doi.org/10.1086/417143>
- Jefferson, W. N., Chevalier, D. M., Phelps, J. Y., Cantor, A. M., Padilla-Banks, E., Newbold, R. R., ... Williams, C. J. (2013). Persistently altered epigenetic marks in the mouse uterus after neonatal estrogen exposure. *Molecular Endocrinology*, 27(10), 1666–1677. <https://doi.org/10.1210/me.2013-1211>
- Jensen, M. P., Abreu-Grobois, F. A., Frydenberg, J., & Loeschcke, V. (2006). Microsatellites provide insight into contrasting mating patterns in arribada vs. non-arribada olive ridley sea turtle rookeries. *Molecular Ecology*, 15(9), 2567–2575. <https://doi.org/10.1111/j.1365-294X.2006.02951.x>
- Jia, Z., & Misra, H. (2007). Reactive oxygen species in in vitro pesticide-induced neuronal cell (SH-SY5Y) cytotoxicity: Role of NFκB and caspase-3. *Free Radical Biology and Medicine*, 42(2), 288–298. <https://doi.org/10.1016/J.FREERADBIOMED.2006.10.047>
- Jin, B., Tao, Q., Peng, J., Soo, H., Wu, W., Ying, J., ... Robertson, K. (2008). DNA methyltransferase 3B (DNMT3B) mutations in ICF syndrome lead to altered epigenetic modifications and aberrant expression of genes regulating development, neurogenesis and immune function. *Human Molecular Genetics*, 17(5), 690–709. <https://doi.org/10.1093/hmg/ddm341>
- Jin, X.-T., Song, L., Zhao, J.-Y., Li, Z.-Y., Zhao, M.-R., & Liu, W.-P. (2014). Dichlorodiphenyltrichloroethane exposure induces the growth of hepatocellular carcinoma via Wnt/β-catenin pathway. *Toxicology Letters*, 225(1), 158–166. <https://doi.org/10.1016/j.toxlet.2013.12.006>
- Jones, P. (1999). The DNA methylation paradox. *Trends in Genetics*, 15(1), 34–37. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10087932>
- Jones, P. A. (2012). Functions of DNA methylation: islands, start sites, gene bodies and beyond. *Nature Reviews Genetics*, 13(7), 484–492. <https://doi.org/10.1038/nrg3230>
- Kagiwada, S., Kurimoto, K., Hirota, T., Yamaji, M., & Saitou, M. (2013). Replication-coupled passive DNA demethylation for the erasure of genome imprints in mice. *The EMBO Journal*, 32(3), 340–353. <https://doi.org/10.1038/emboj.2012.331>
- Kamachi, Y., Uchikawa, M., Tanouchi, A., Sekido, R., & Kondoh, H. (2001). Pax6 and SOX2 form a co-DNA-binding partner complex that regulates initiation of lens development. *Genes & Development*, 15(10), 1272–1286. <https://doi.org/10.1101/gad.887101>

- Kaplinsky, N., Gilbert, S., Cebra-Thomas, J., Lilleväli, K., Saare, M., Chang, E., ... Watson, R. (2013). The Embryonic Transcriptome of the Red-Eared Slider Turtle (*Trachemys scripta*). *PLoS ONE*, 8(6), e66357. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0066357>
- Kawata, K., & Tiba, T. (1961). A rare case of *Schistosomus reflexus* in the cat. *Japanese Journal of Veterinary Research*, 9(4), 179–181. Retrieved from <https://eprints.lib.hokudai.ac.jp/dspace/bitstream/2115/1758/1/KJ00002373321.pdf>
- Kayam, G., Kohl, A., Magen, Z., Peretz, Y., Weisinger, K., Bar, A., ... Sela-Donenfeld, D. (2013). A novel role for Pax6 in the segmental organization of the hindbrain. *Development*, 140(10), 2190–2202. <https://doi.org/10.1242/dev.089136>
- Kern, M., Argao, E., Birkenmeier, E., Rowe, L., & Potter, S. (1994). Genomic organization and chromosome localization of the murine homeobox gene Pmx. *Genomics*, 19(2), 334–340. <https://doi.org/10.1006/geno.1994.1066>
- Khera, K. S. (1973). Teratogenic effects of methylmercury in the cat: Note on the use of this species as a model for teratogenicity studies. *Teratology*, 8(3), 293–303. <https://doi.org/10.1002/tera.1420080309>
- Knight, R. (1996). The occurrence of *schistosomus reflexus* in bovine dystocia. *Australian Veterinary Journal*, 73(3), 105–107. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8660209>
- Koch, A., Steffen, J., & Krüger, E. (2011). TCF11 at the crossroads of oxidative stress and the ubiquitin proteasome system. *Cell Cycle*, 10(8), 1200–1207. <https://doi.org/10.4161/cc.10.8.15327>
- Kota, S. K., & Feil, R. (2010). Epigenetic Transitions in Germ Cell Development and Meiosis. *Developmental Cell*, 19(5), 675–686. <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2010.10.009>
- Kotch, L., Iyer, N., Laughner, E., & Semenza, G. (1999). Defective vascularization of HIF-1alpha-null embryos is not associated with VEGF deficiency but with mesenchymal cell death. *Developmental Biology*, 209(2), 254–267. <https://doi.org/10.1006/dbio.1999.9253>
- Kouzarides, T. (2007). Chromatin modifications and their function. *Cell*, 128(4), 693–705. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2007.02.005>
- Kozmik, Z. (2005). Pax genes in eye development and evolution. *Current Opinion in Genetics & Development*, 15(4), 430–438. <https://doi.org/10.1016/j.gde.2005.05.001>
- Kumar, R., & Thompson, E. (2005). Gene regulation by the glucocorticoid receptor: Structure: function relationship. *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*, 94(5), 383–394. <https://doi.org/10.1016/j.jsbmb.2004.12.046>
- Kumari, B., Madan, V., & Kathpal, T. (2007). Pesticide residues in rain water from Hisar, India. *Environmental Monitoring and Assessment*, 133(1–3), 467–471. <https://doi.org/10.1007/s10661-006-9601-2>
- Kwon, S., & Workman, J. (2008). The heterochromatin protein 1 (HP1) family: put away a bias toward HP1. *Molecules and Cells*, 26(3), 217–227. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18664736>
- Lafuente, A., Cabaleiro, T., Caride, A., & Romero, A. (2006). Toxic effects of endosulfan on blood lymphocyte subsets in adult rats. *Toxicology Letters*, 164, S243.

<https://doi.org/10.1016/j.toxlet.2006.07.166>

- Lahvis, G., Lindell, S., Thomas, R., McCuskey, R., Murphy, C., Glover, E., ... Bradfield, C. (2000). Portosystemic shunting and persistent fetal vascular structures in aryl hydrocarbon receptor-deficient mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 97(19), 10442–10447. <https://doi.org/10.1073/pnas.190256997>
- Lam, J., Tanabe, S., Chan, S., Lam, M., Martin, M., & Lam, P. (2006). Levels of trace elements in green turtle eggs collected from Hong Kong: Evidence of risks due to selenium and nickel. *Environmental Pollution*, 144(3), 790–801. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2006.02.016>
- Lankton, J., VanderHart, D., & Terrell, S. (2014). Schistosomus reflexus-like malformation in a southern white rhinoceros (*Ceratotherium simum simum*). *Journal of Zoo and Wildlife Medicine*, 45(3), 708–711. <https://doi.org/10.1638/2013-0272R1.1>
- Laughton, K., Fisher, K., Halina, W., & Partlow, G. (2005). Schistosomus reflexus syndrome: a heritable defect in ruminants. *Anatomia, Histologia, Embryologia: Journal of Veterinary Medicine Series C*, 34(5), 312–318. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0264.2005.00624.x>
- Lazić, M. M., & Crnobrnja-Isailović, J. (2012). Polydactyly in the Common Wall Lizard *Podarcis muralis* (Squamata: Lacertidae). *Herpetology Notes*, 5, 277–279. Retrieved from [http://www.herpetologynotes.seh-herpetology.org/Volume5\\_PDFs/Lazic\\_Herpetology\\_Notes\\_Volume5\\_pages277-279.pdf](http://www.herpetologynotes.seh-herpetology.org/Volume5_PDFs/Lazic_Herpetology_Notes_Volume5_pages277-279.pdf)
- Le Douarin, N., Cruzet, S., Gérard, C., & Dupin, E. (2004). Neural crest cell plasticity and its limits. *Development*, 131(19), 4637–4650. <https://doi.org/10.1242/dev.01350>
- Le Douarin, N., & Kalcheim, C. (1999). *The neural crest* (2nd ed.). United Kingdom: Cambridge University Press. Retrieved from [https://books.google.com.mx/books/about/The\\_Neural\\_Crest.html?id=wvt9sgGbHFwC&redir\\_esc=y](https://books.google.com.mx/books/about/The_Neural_Crest.html?id=wvt9sgGbHFwC&redir_esc=y)
- Le Marchand, L., Kolonel, L., Siegel, B., & Dendle, W. (1986). Trends in Birth Defects for a Hawaiian Population Exposed to Heptachlor and for the United States. *Archives of Environmental Health: An International Journal*, 41(3), 145–148. <https://doi.org/10.1080/00039896.1986.9935768>
- Lechner, M., Begg, G., Speicher, D., & Rauscher, F. (2000). Molecular determinants for targeting heterochromatin protein 1-mediated gene silencing: direct chromoshadow domain-KAP-1 corepressor interaction is essential. *Molecular and Cellular Biology*, 20(17), 6449–6465. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10938122>
- Leclerc, D., Cao, Y., Deng, L., Mikael, L., Wu, Q., & Rozen, R. (2013). Differential gene expression and methylation in the retinoid/PPARA pathway and of tumor suppressors may modify intestinal tumorigenesis induced by low folate in mice. *Molecular Nutrition & Food Research*, 57(4), 686–697. <https://doi.org/10.1002/mnfr.201200212>
- Lee, H., Yun, J., Jung, J., Yang, Y., Kim, B., Lee, S., ... Kwon, Y. (2015). Identification of differentially-expressed genes by DNA methylation in cervical cancer. *Oncology Letters*, 9(4), 1691–1698. <https://doi.org/10.3892/ol.2015.2917>
- Lee, M., Cho, E., Lim, J., & Jee, S. (2017). Association between serum persistent organic

- pollutants and DNA methylation in Korean adults. *Environmental Research*, 158, 333–341. <https://doi.org/10.1016/j.envres.2017.06.017>
- Lee, T., Chang, W., Hsu, J., Chang, T., & Shien, D. (2012). GPMiner: an integrated system for mining combinatorial cis-regulatory elements in mammalian gene group. *BMC Genomics*, 13(Suppl 1), S3. <https://doi.org/10.1186/1471-2164-13-S1-S3>
- Lemaire, G., Balaguer, P., Michel, S., & Rahmani, R. (2005). Activation of retinoic acid receptor-dependent transcription by organochlorine pesticides. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 202(1), 38–49. <https://doi.org/10.1016/j.taap.2004.06.004>
- Lenz, W. (1988). A short history of thalidomide embryopathy. *Teratology*, 38(3), 203–215. <https://doi.org/10.1002/tera.1420380303>
- Léonard, A., & Lauwerys, R. (1980). Carcinogenicity, teratogenicity and mutagenicity of arsenic. *Mutation Research*, 75(1), 49–62. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6987506>
- Lewis, E. (1978). A gene complex controlling segmentation in *Drosophila*. *Nature*, 276(5688), 565–570. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/103000>
- Li, J.-Y., Pu, M.-T., Hirasawa, R., Li, B.-Z., Huang, Y.-N., Zeng, R., ... Xu, G.-L. (2007). Synergistic Function of DNA Methyltransferases Dnmt3a and Dnmt3b in the Methylation of Oct4 and Nanog. *Molecular and Cellular Biology*, 27(24), 8748–8759. <https://doi.org/10.1128/MCB.01380-07>
- Li, L.-C., & Dahiya, R. (2002). MethPrimer: designing primers for methylation PCRs. *Bioinformatics*, 18(11), 1427–1431. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12424112>
- Lim, C. P., & Cao, X. (2006). Structure, function, and regulation of STAT proteins. *Molecular BioSystems*, 2(11), 536–550. <https://doi.org/10.1039/b606246f>
- Lindahl Allen, M., & Antoniou, M. (2007). Correlation of DNA methylation with histone modifications across the HNRPA2B1-CBX3 ubiquitously-acting chromatin open element (UCOE). *Epigenetics*, 2(4), 227–236. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18032920>
- Lister, R., Pelizzola, M., Dowen, R. H., Hawkins, R. D., Hon, G., Tonti-Filippini, J., ... Ecker, J. R. (2009). Human DNA methylomes at base resolution show widespread epigenomic differences. *Nature*, 462(7271), 315–322. <https://doi.org/10.1038/nature08514>
- Liu, Y., Balaraman, Y., Wang, G., Nephew, K., & Zhou, F. C. (2009). Alcohol exposure alters DNA methylation profiles in mouse embryos at early neurulation. *Epigenetics*, 4(7), 500–511. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20009564>
- Lo, C.-L., & Zhou, F. C. (2014). Environmental Alterations of Epigenetics Prior to the Birth. *International Review of Neurobiology*, 115, 1–49. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-801311-3.00001-9>
- Loh, Y.-H., Wu, Q., Chew, J.-L., Vega, V., Zhang, W., Chen, X., ... Ng, H.-H. (2006). The Oct4 and Nanog transcription network regulates pluripotency in mouse embryonic stem cells. *Nature Genetics*, 38(4), 431–440. <https://doi.org/10.1038/ng1760>
- Longnecker, M., Klebanoff, M., Zhou, H., & Brock, J. (2001). Association between maternal

serum concentration of the DDT metabolite DDE and preterm and small-for-gestational-age babies at birth. *The Lancet*, 358(9276), 110–114. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(01\)05329-6](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(01)05329-6)

- Longnecker, M., Rogan, W., & Lucier, G. (1997). The human health effects of DDT (dichlorodiphenyltrichloroethane) and PCBS (polychlorinated biphenyls) and an overview of organochlorines in public health. *Annual Review of Public Health*, 18, 211–244. <https://doi.org/10.1146/annurev.publhealth.18.1.211>
- Luster, M., Portier, C., Pait, D., White, K., Gennings, C., Munson, A., & Rosenthal, G. (1992). Risk assessment in immunotoxicology: I. Sensitivity and predictability of immune tests. *Fundamental and Applied Toxicology*, 18(2), 200–210. [https://doi.org/10.1016/0272-0590\(92\)90047-L](https://doi.org/10.1016/0272-0590(92)90047-L)
- Lydon, J., DeMayo, F., Funk, C., Mani, S., Hughes, A., Montgomery, C., ... O'Malley, B. (1995). Mice lacking progesterone receptor exhibit pleiotropic reproductive abnormalities. *Genes & Development*, 9(18), 2266–2278. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7557380>
- Lynch, J. (2013). Exposure to and Effects of Persistent Organic Pollutants. In J. Wyneken, K. Lohmann, & J. Musick (Eds.), *The Biology of Sea Turtles Volume 3* (1st ed., pp. 285–328). Boca Raton, FL: CRC Press. Retrieved from <https://www.nist.gov/publications/exposure-and-effects-persistent-organic-pollutants>
- Lynch, J., Kucklick, J., Stamper, M., Harms, C., & McClellan-Green, P. (2004). Associations between Organochlorine Contaminant Concentrations and Clinical Health Parameters in Loggerhead Sea Turtles from North Carolina, USA. *Environmental Health Perspectives*, 112(10), 1074–1079. <https://doi.org/10.1289/ehp.6923>
- Lynn, W., & Ullrich, M. (1950). Experimental Production of Shell Abnormalities in Turtles. *Copeia*, 1950(4), 253–262. <https://doi.org/10.2307/1437903>
- Mahmoud, I., Klicka, J., & Hess, G. L. (1973). Normal embryonic stages of the western painted turtle, *Chrysemys picta bellii*. *Journal of Morphology*, 141(3), 269–279. <https://doi.org/10.1002/jmor.1051410303>
- Maltepe, E., Schmidt, J., Baunoch, D., Bradfield, C., & Simon, M. (1997). Abnormal angiogenesis and responses to glucose and oxygen deprivation in mice lacking the protein ARNT. *Nature*, 386(6623), 403–407. <https://doi.org/10.1038/386403a0>
- Mandal, P. (2005). Dioxin: a review of its environmental effects and its aryl hydrocarbon receptor biology. *Journal of Comparative Physiology B*, 175(4), 221–230. <https://doi.org/10.1007/s00360-005-0483-3>
- Marcos, S., Gonzalez-Lazaro, M., Beccari, L., Carramolino, L., Martin-Bermejo, M., Amarie, O., ... Bovolenta, P. (2015). Meis1 coordinates a network of genes implicated in eye development and microphthalmia. *Development*, 142(17), 3009–3020. <https://doi.org/10.1242/dev.122176>
- Márquez, R. (1990). *FAO species catalogue. Vol.11: Sea turtles of the world. An annotated and illustrated catalogue of sea turtle species known to date. FAO Fisheries Synopsis* (Vol. 11). Rome: Food and Agriculture Organization of the United Nations. Retrieved from <http://www.fao.org/docrep/009/t0244e/t0244e00.HTM>

- Martín-del-Campo, R., Bárcenas-Ibarra, A., Sifuentes-Romero, I., Llera-Herrera, R., & García-Gasca, A. (2018). Methylation status of the putative Pax6 promoter in olive ridley sea turtle embryos with eye defects: An initial approach. *Mechanisms of Development*, *154*. <https://doi.org/10.1016/j.mod.2018.08.005>
- Martín-del-Campo, R., & García-Gasca, A. (2018). Tortugas marinas: seres ancestrales, sus misterios, adaptaciones y amenazas. *CiENCiA UANL*, *21*(91), 16–21.
- Martín-del-Campo, R., Sifuentes-Romero, I., & García-Gasca, A. (2018). Hox Genes in Reptile Development, Epigenetic Regulation, and Teratogenesis. *Cytogenetic and Genome Research*. <https://doi.org/10.1159/000495712>
- Martin, J., Bradley, A., & Olson, E. (1995). The paired-like homeo box gene MHox is required for early events of skeletogenesis in multiple lineages. *Genes & Development*, *9*(10), 1237–1249. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7758948>
- Martin, K., Trouche, D., Hagemeyer, C., & Kouzarides, T. (1995). Regulation of transcription by E2F1/DP1. *Journal of Cell Science Supplement*, *19*, 91–94. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8655653>
- Martins-Taylor, K., Schroeder, D., LaSalle, J., Lalande, M., & Xu, R.-H. (2012). Role of DNMT3B in the regulation of early neural and neural crest specifiers. *Epigenetics*, *7*(1), 71–82. <https://doi.org/10.4161/epi.7.1.18750>
- Massague, J., Seoane, J., & Wotton, D. (2005). Smad transcription factors. *Genes & Development*, *19*(23), 2783–2810. <https://doi.org/10.1101/gad.1350705>
- Mateo, I., & Camón, J. (2008). Schistosoma reflexum in a cat: insights into aetiopathogenesis. *Journal of Feline Medicine and Surgery*, *10*(4), 376–379. <https://doi.org/10.1016/j.jfms.2007.12.010>
- Matsushima, D., Heavner, W., & Pevny, L. (2011). Combinatorial regulation of optic cup progenitor cell fate by SOX2 and PAX6. *Development*, *138*(3), 443–454. <https://doi.org/10.1242/dev.055178>
- Matysiak-Scholze, U., & Nehls, M. (1997). The structural integrity of ROR alpha isoforms is mutated in staggerer mice: cerebellar coexpression of ROR alpha1 and ROR alpha4. *Genomics*, *43*(1), 78–84. <https://doi.org/10.1006/geno.1997.4757>
- Mayer, W., Niveleau, A., Walter, J., Fundele, R., & Haaf, T. (2000). Demethylation of the zygotic paternal genome. *Nature*, *403*(6769), 501–502. <https://doi.org/10.1038/35000656>
- Maynard, R. (2000). Environmental toxicants: human exposures and their health effects. *Occupational and Environmental Medicine*, *57*(7), 503–504. <https://doi.org/10.1136/OEM.57.7.503C>
- Mckenzie, C., Godley, B., Furness, R., & Wells, D. (1999). Concentrations and patterns of organochlorine contaminants in marine turtles from Mediterranean and Atlantic waters. *Marine Environmental Research*, *47*(2), 117–135. [https://doi.org/10.1016/S0141-1136\(98\)00109-3](https://doi.org/10.1016/S0141-1136(98)00109-3)
- McNutt, T., & Harris, C. (1994). Lindane embryotoxicity and differential alteration of cysteine and glutathione levels in rat embryos and visceral yolk sacs. *Reproductive Toxicology (Elmsford, N.Y.)*, *8*(4), 351–362. Retrieved from

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7524828>

- Medina-Martínez, O., Bradley, A., & Ramírez-Solis, R. (2000). A large targeted deletion of Hoxb1-Hoxb9 produces a series of single-segment anterior homeotic transformations. *Developmental Biology*, 222(1), 71–83. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10885747>
- Meissner, A., Mikkelsen, T. S., Gu, H., Wernig, M., Hanna, J., Sivachenko, A., ... Lander, E. S. (2008). Genome-scale DNA methylation maps of pluripotent and differentiated cells. *Nature*, 454(7205), 766–770. <https://doi.org/10.1038/nature07107>
- Messerschmidt, D., Knowles, B., & Solter, D. (2014). DNA methylation dynamics during epigenetic reprogramming in the germline and preimplantation embryos. *Genes & Development*, 28, 812–828. <https://doi.org/10.1101/gad.234294.113>
- Micoló, T. I., Herrán, M. F. S., & Ontiveros, S. M. D. (2000). Reconsideraciones sobre la terminología de los defectos congénitos. *Cirugía Plástica*, 10(3), 119–121. Retrieved from <http://www.medigraphic.com/cgi-bin/new/resumen.cgi?IDARTICULO=3496>
- Milesi, M., Varayoud, J., Ramos, J., & Luque, E. (2017). Uterine ER $\alpha$  epigenetic modifications are induced by the endocrine disruptor endosulfan in female rats with impaired fertility. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 454, 1–11. <https://doi.org/10.1016/j.mce.2017.05.028>
- Miller, J. D. (1985). Embryology of Marine Turtles. In C. Gans, F. Billett, & P. Maderson (Eds.), *Biology of the Reptilia* (Volume 14, pp. 270–328). New York: Wiley & Sons. Retrieved from [https://books.google.com.mx/books/about/Embryology\\_of\\_Marine\\_Turtles.html?id=qqz7GgAACAAJ&redir\\_esc=y](https://books.google.com.mx/books/about/Embryology_of_Marine_Turtles.html?id=qqz7GgAACAAJ&redir_esc=y)
- Miller, S., Dykes, D., & Polesky, H. (1988). A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. *Nucleic Acids Research*, 16(3), 1215. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3344216>
- Milne, T., Briggs, S., Brock, H., Martin, M., Gibbs, D., Allis, C., & Hess, J. (2002). MLL Targets SET Domain Methyltransferase Activity to Hox Gene Promoters. *Molecular Cell*, 10(5), 1107–1117. [https://doi.org/10.1016/S1097-2765\(02\)00741-4](https://doi.org/10.1016/S1097-2765(02)00741-4)
- Minoli, I., Feltrin, N., & Ávila, L. J. (2009). Un caso de polidactilia en *Liolaemus petrophilus* (Iguania: Squamata: Liolaemini). *Cuadernos de Herpetología*, 23(2), 89–92. Retrieved from [http://www.scielo.org.ar/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S1852-57682009000200002](http://www.scielo.org.ar/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1852-57682009000200002)
- Mironov, A., Fickett, J., & Gelfand, M. (1999). Frequent alternative splicing of human genes. *Genome Research*, 9(12), 1288–1293. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10613851>
- Mitsui, K., Tokuzawa, Y., Itoh, H., Segawa, K., Murakami, M., Takahashi, K., ... Yamanaka, S. (2003). The homeoprotein Nanog is required for maintenance of pluripotency in mouse epiblast and ES cells. *Cell*, 113(5), 631–642. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12787504>
- Miura, F., Enomoto, Y., Dairiki, R., & Ito, T. (2012). Amplification-free whole-genome bisulfite



sequencing by post-bisulfite adaptor tagging. *Nucleic Acids Research*, 40(17), e136.  
<https://doi.org/10.1093/nar/gks454>

- Molina, V., Oviedo, C., Casado, A., & Arias, M. (2012). Schistosomus reflexus en un canino: reporte caso. *Revista de La Facultad de Medicina Veterinaria y de Zootecnia*, 59(1), 49–55. Retrieved from <http://www.scielo.org.co/pdf/rfmvz/v59n1/v59n1a05.pdf>
- Moore, K. L., Persaud, T., & Torchia, M. G. (2013). *The developing human : clinically oriented embryology*. Saunders/Elsevier.
- Morohashi, K., & Omura, T. (1996). Ad4BP/SF-1, a transcription factor essential for the transcription of steroidogenic cytochrome P450 genes and for the establishment of the reproductive function. *FASEB Journal*, 10(14), 1569–1577. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9002548>
- Morreale, S., Plotkin, P., Shaver, D., & Kalb, H. (2007). Adult migration and habitat utilization. In P. T. Plotkin (Ed.), *Biology and conservation of Ridley sea turtles* (pp. 213–229). . Baltimore, Maryland: The Johns Hopkins University Press.
- Muenke, M., & Beachy, P. (2000). Genetics of ventral forebrain development and holoprosencephaly. *Current Opinion in Genetics & Development*, 10(3), 262–269. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10826992>
- Mulder, J. (1995). Congenital anomalies in morphology and colour in captive-bred vipers (Reptilia, Serpentes, Viperidae). *Deinsea*, 2(1), 41–50. Retrieved from <http://natuurtijdschriften.nl/download?type=document;docid=538571>
- Nagata, T., Kanno, Y., Ozato, K., & Taketo, M. (1994). The mouse Rxb gene encoding RXR beta: genomic organization and two mRNA isoforms generated by alternative splicing of transcripts initiated from CpG island promoters. *Gene*, 142(2), 183–189. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8194750>
- Nagel, S., Burek, C., Venturini, L., Scherr, M., Quentmeier, H., Meyer, C., ... MacLeod, R. (2007). Comprehensive analysis of homeobox genes in hodgkin lymphoma cell lines identifies dysregulated expression of HOXB9 mediated via ERK5 signaling and BMI1. *Blood*, 109(7), 3015–3023. <https://doi.org/10.1182/blood-2006-08-044347>
- Natsume, A., Ito, M., Katsushima, K., Ohka, F., Hatanaka, A., Shinjo, K., ... Kondo, Y. (2013). Chromatin Regulator PRC2 Is a Key Regulator of Epigenetic Plasticity in Glioblastoma. *Cancer Research*, 73(14), 4559–4570. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-13-0109>
- Nau, H., Zierer, R., Spielmann, H., Neubert, D., & Gansau, C. (1981). A new model for embryotoxicity testing: teratogenicity and pharmacokinetics of valproic acid following constant-rate administration in the mouse using human therapeutic drug and metabolite concentrations. *Life Sciences*, 29(26), 2803–2813. [https://doi.org/10.1016/0024-3205\(81\)90541-5](https://doi.org/10.1016/0024-3205(81)90541-5)
- Nau, M., Brooks, B., Carney, D., Gazdar, A., Battey, J., Sausville, E., & Minna, J. (1986). Human small-cell lung cancers show amplification and expression of the N-myc gene. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 83(4), 1092–1096. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2869482>
- Navarro-Martín, L., Viñas, J., Ribas, L., Díaz, N., Gutiérrez, A., Di Croce, L., & Piferrer, F.

- (2011). DNA Methylation of the Gonadal Aromatase (cyp19a) Promoter Is Involved in Temperature-Dependent Sex Ratio Shifts in the European Sea Bass. *PLoS Genetics*, 7(12), e1002447. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1002447>
- Needham, L. L., Calafat, A. M., & Barr, D. B. (2008). Assessing Developmental Toxicant Exposures via Biomonitoring. *Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology*, 102(2), 100–108. <https://doi.org/10.1111/j.1742-7843.2007.00185.x>
- Nerlov, C. (2007). The C/EBP family of transcription factors: a paradigm for interaction between gene expression and proliferation control. *Trends in Cell Biology*, 17(7), 318–324. <https://doi.org/10.1016/j.tcb.2007.07.004>
- Nettersheim, D., Biermann, K., Gillis, A., Steger, K., Looijenga, L., & Schorle, H. (2011). NANOG promoter methylation and expression correlation during normal and malignant human germ cell development. *Epigenetics*, 6(1), 114–122. <https://doi.org/10.4161/epi.6.1.13433>
- Nie, M., Blankenship, A., & Giesy, J. (2001). Interactions between aryl hydrocarbon receptor (AhR) and hypoxia signaling pathways. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 10(1–2), 17–27. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11382553>
- Nilsen, F., Parrott, B., Bowden, J., Kassim, B., Somerville, S., Bryan, T., ... Guillette, L. (2016). Global DNA methylation loss associated with mercury contamination and aging in the American alligator (*Alligator mississippiensis*). *The Science of the Total Environment*, 545–546, 389–397. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2015.12.059>
- NIOH. (2002). *The Investigation of Unusual Illnesses Allegedly Produced by Endosulfan Exposure in Padre Village of Kasargod District (N.Kerala)*. Ahmedabad. Retrieved from <http://www.indiaenvironmentportal.org.in/files/NIOH-FinalReport.pdf>
- Noakes, D., Parkinson, T., England, G., & Arthur, G. (2001). *Arthur's veterinary reproduction and obstetrics*. (D. Noakes, T. Parkinson, & G. England, Eds.) (8th ed.). Philadelphia, PA: Saunders .
- Nottoli, T., Hagopian-Donaldson, S., Zhang, J., Perkins, A., & Williams, T. (1998). AP-2-null cells disrupt morphogenesis of the eye, face, and limbs in chimeric mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences* , 95(23), 13714–13719. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9811866>
- O’Riordan, M., & Grosschedl, R. (1999). Coordinate regulation of B cell differentiation by the transcription factors EBF and E2A. *Immunity*, 11(1), 21–31. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10435576>
- Odorizzi, G., Cowles, C., & Emr, S. (1998). The AP-3 complex: a coat of many colours. *Trends in Cell Biology*, 8(7), 282–288. [https://doi.org/10.1016/S0962-8924\(98\)01295-1](https://doi.org/10.1016/S0962-8924(98)01295-1)
- Ogden, J., Robertson, W., Davis, G., & Schmidt, T. (1974). *South Florida Environmental Project. Pesticides, polychlorinated biphenyls, and heavy metals in upper food chain levels, Everglades National Park and vicinity. Final report. Division of Natural Science and Research Management Studies, Everglades National* .
- Ogueta, S., Schwartz, S., Yamashita, C., & Farber, D. (1999). Estrogen receptor in the human eye: influence of gender and age on gene expression. *Investigative Ophthalmology &*

*Visual Science*, 40(9), 1906–1911. Retrieved from  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10440242>

- Ohtake, F., Takeyama, K., Matsumoto, T., Kitagawa, H., Yamamoto, Y., Nohara, K., ... Kato, S. (2003). Modulation of oestrogen receptor signalling by association with the activated dioxin receptor. *Nature*, 423(6939), 545–550. <https://doi.org/10.1038/nature01606>
- Okano, M., Bell, D., Haber, D., & Li, E. (1999). DNA methyltransferases Dnmt3a and Dnmt3b are essential for de novo methylation and mammalian development. *Cell*, 99(3), 247–257. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10555141>
- Okano, M., Xie, S., & Li, E. (1998). Cloning and characterization of a family of novel mammalian DNA (cytosine-5) methyltransferases. *Nature Genetics*, 19(3), 219–220. <https://doi.org/10.1038/890>
- Oldfield, A., Yang, P., Conway, A., Cinghu, S., Freudenberg, J., Yellaboina, S., & Jothi, R. (2014). Histone-fold domain protein NF-Y promotes chromatin accessibility for cell type-specific master transcription factors. *Molecular Cell*, 55(5), 708–722. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2014.07.005>
- Omurtag, G., Tozan, A., Şehirli, A., & Şener, G. (2008). Melatonin protects against endosulfan-induced oxidative tissue damage in rats. *Journal of Pineal Research*, 44(4), 432–438. <https://doi.org/10.1111/j.1600-079X.2007.00546.x>
- Onishchenko, N., Tamm, C., Vahter, M., Hökfelt, T., Johnson, J. A., Johnson, D. A., & Ceccatelli, S. (2007). Developmental exposure to methylmercury alters learning and induces depression-like behavior in male mice. *Toxicological Sciences*, 97(2), 428–437. <https://doi.org/10.1093/toxsci/kfl199>
- Oswald, J., Engemann, S., Lane, N., Mayer, W., Olek, A., Fundele, R., ... Walter, J. (2000). Active demethylation of the paternal genome in the mouse zygote. *Current Biology*, 10(8), 475–478. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10801417>
- Overdier, D., Ye, H., Peterson, R., Clevidence, D., & Costa, R. (1997). The winged helix transcriptional activator HFH-3 is expressed in the distal tubules of embryonic and adult mouse kidney. *The Journal of Biological Chemistry*, 272(21), 13725–13730. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9153225>
- Ozalp, G., Celikler, S., Simsek, G., Ozyigit, M., & Inan, S. (2011). A case of schistosoma reflexum in a cat with chromosomal aberrations. *Reproduction in Domestic Animals*, 46(2), 373–376. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0531.2010.01649.x>
- Páez-Osuna, F., Calderón-Campuzano, M., Soto-Jiménez, M., & Ruelas-Inzunza, J. (2011). Mercury in blood and eggs of the sea turtle *Lepidochelys olivacea* from a nesting colony in Oaxaca, Mexico. *Marine Pollution Bulletin*, 62(6), 1320–1323. <https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2011.04.004>
- Pajusalu, S., Reimand, T., Uibo, O., Vasar, M., Talvik, I., Zilina, O., ... Õunap, K. (2015). De novo deletion of HOXB gene cluster in a patient with failure to thrive, developmental delay, gastroesophageal reflux and bronchiectasis. *European Journal of Medical Genetics*, 58(6–7), 336–340. <https://doi.org/10.1016/j.ejmg.2015.04.002>
- Pal-Bhadra, M., Bhadra, U., Jackson, D. E., Mamatha, L., Park, P.-H., & Shukla, S. D. (2007).

Distinct methylation patterns in histone H3 at Lys-4 and Lys-9 correlate with up- & down-regulation of genes by ethanol in hepatocytes. *Life Sciences*, 81(12), 979–987. <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2007.07.030>

Pan, M., Xiong, Y., & Chen, F. (2013). NFAT gene family in inflammation and cancer. *Current Molecular Medicine*, 13(4), 543–554. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22950383>

Pandey, S. C., Ugale, R., Zhang, H., Tang, L., & Prakash, A. (2008). Brain Chromatin Remodeling: A Novel Mechanism of Alcoholism. *The Journal of Neuroscience*, 28(14), 3729–3737. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.5731-07.2008>

Papaioannou, V. E. (2014). The T-box gene family: emerging roles in development, stem cells and cancer. *Development*, 141(20), 3819–3833. <https://doi.org/10.1242/dev.104471>

Pauws, E., Hoshino, A., Bentley, L., Prajapati, S., Keller, C., Hammond, P., ... Stanier, P. (2009). Tbx22 null mice have a submucous cleft palate due to reduced palatal bone formation and also display ankyloglossia and choanal atresia phenotypes. *Human Molecular Genetics*, 18(21), 4171–4179. <https://doi.org/10.1093/hmg/ddp368>

Pelegrin, N. (2007). Presence of a Polydactylous *Tropidurus etheridgei* (Squamata: Iguanidae: Tropidurinae) in the Dry Chaco of Córdoba Province, Argentina. *Cuadernos de Herpetología*, 21(2), 115–116. Retrieved from <http://sedici.unlp.edu.ar/handle/10915/6456>

Peñaflores-Salazar, C., Vasconcelos, J., Albavera, E., & Márquez, R. (2000). Twenty five years nesting of olive ridley sea turtle *Lepidochelys olivacea* in Escobilla beach, Oaxaca, Mexico. In F. A. Abreu-grobois, R. Briseño-dueñas, R. Márquez, & L. Sarti-martínez (Eds.), *Proceedings of the 18th International Sea Turtle Symposium* (pp. 27–29). US Dept. Commerce NOAA Tech. Memo. NMFSSSEFSC-436.

Pikkarainen, S., Tokola, H., Kerkelä, R., & Ruskoaho, H. (2004). GATA transcription factors in the developing and adult heart. *Cardiovascular Research*, 63(2), 196–207. <https://doi.org/10.1016/j.cardiores.2004.03.025>

Pillai, R. S., Bhattacharyya, S. N., & Filipowicz, W. (2007). Repression of protein synthesis by miRNAs: how many mechanisms? *Trends in Cell Biology*, 17(3), 118–126. <https://doi.org/10.1016/j.tcb.2006.12.007>

Plotkin, P. (2010). Nomadic behaviour of the highly migratory olive ridley sea turtle *Lepidochelys olivacea* in the eastern tropical Pacific Ocean. *Endangered Species Research*, 13(1), 33–40. <https://doi.org/10.3354/esr00314>

Podreka, S., Georges, A., Maher, B., & Limpus, C. J. (1998). The environmental contaminant DDE fails to influence the outcome of sexual differentiation in the marine turtle *Chelonia mydas*. *Environmental Health Perspectives*, 106(4), 185–188. <https://doi.org/10.1289/ehp.98106185>

Popp, C., Dean, W., Feng, S., Cokus, S. J., Andrews, S., Pellegrini, M., ... Reik, W. (2010). Genome-wide erasure of DNA methylation in mouse primordial germ cells is affected by AID deficiency. *Nature*, 463(7284), 1101–1105. <https://doi.org/10.1038/nature08829>

Portelli, M., de Solla, S., Brooks, R., & Bishop, C. (1999). Effect of Dichlorodiphenyltrichloroethane on Sex Determination of the Common Snapping Turtle

- (*Chelydra serpentina serpentina*). *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 43(3), 284–291. <https://doi.org/10.1006/EESA.1999.1791>
- Pozo, K., Harner, T., Wania, F., Muir, D., Jones, K., & Barrie, L. (2006). Toward a global network for persistent organic pollutants in air: results from the GAPS study. *Environmental Science & Technology*, 40(16), 4867–473. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16955879>
- Priester, W. (1972). Congenital ocular defects in cattle, horses, cats, and dogs. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 160(11), 1504–1511. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/4623843>
- Pritchard, P. (1997). Evolution, Phylogeny, and Current Status. In P. Lutz & J. Musick (Eds.), *The Biology of Sea Turtles, Volume I* (pp. 1–28). Florida: CRC Press. <https://doi.org/10.1201/9780203737088-1>
- Pritchard, P. (2007). Arribadas I have known. In P. Plotkin (Ed.), *Biology and Conservation of Ridley Sea Turtles* (pp. 7–21). Baltimore, Maryland: The Johns Hopkins University Press.
- Quelle, F., Shimoda, K., Thierfelder, W., Fischer, C., Kim, A., Ruben, S., ... Nelms, K. (1995). Cloning of murine Stat6 and human Stat6, Stat proteins that are tyrosine phosphorylated in responses to IL-4 and IL-3 but are not required for mitogenesis. *Molecular and Cellular Biology*, 15(6), 3336–3343. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7760829>
- Rai, K., Jafri, I., Chidester, S., James, S., Karpf, A., Cairns, B., & Jones, D. (2010). Dnmt3 and G9a cooperate for tissue-specific development in zebrafish. *Journal of Biological Chemistry*, 285(6), 4110–4121. <https://doi.org/10.1074/jbc.M109.073676>
- Rainwater, T., Adair, B., Platt, S., Anderson, T., Cobb, G., & McMurry, S. (2002). Mercury in Morelet's crocodile eggs from northern Belize. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, 42(3), 319–324. <https://doi.org/10.1007/s00244-001-0020-7>
- Rajani, C., & Raghavan, K. (2010). Dystocia due to conjoined twins with schistosomus reflexus in cattle. *Tamilnadu Journal Of Veterinary And Animal Sciences*, 6(1), 52–53. Retrieved from [http://www.tanuvas.ac.in/tnjvas/tnjvas/vol6\(1\)/52-53.pdf](http://www.tanuvas.ac.in/tnjvas/tnjvas/vol6(1)/52-53.pdf)
- Rajendran, G., Shanmuganandam, K., Bendre, A., Mujumdar, D., Goel, A., & Shiras, A. (2011). Epigenetic regulation of DNA methyltransferases: DNMT1 and DNMT3B in gliomas. *Journal of Neuro-Oncology*, 104(2), 483–494. <https://doi.org/10.1007/s11060-010-0520-2>
- Rakyan, V. K., Blewitt, M. E., Druker, R., Preis, J. I., & Whitelaw, E. (2002). Metastable epialleles in mammals. *Trends in Genetics*, 18(7), 348–351. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12127774>
- Ramsahoye, B., Biniszkiwicz, D., Lyko, F., Clark, V., Bird, A., & Jaenisch, R. (2000). Non-CpG methylation is prevalent in embryonic stem cells and may be mediated by DNA methyltransferase 3a. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 97(10), 5237–5242. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10805783>
- Ratra, G., & Casida, J. (2001). GABA receptor subunit composition relative to insecticide potency and selectivity. *Toxicology Letters*, 122(3), 215–222. [https://doi.org/10.1016/S0378-4274\(01\)00366-6](https://doi.org/10.1016/S0378-4274(01)00366-6)
- Raymond, L., & Ralston, N. (2004). *Mercury: selenium interactions and health implications*.

*Seychelles Medical and Dental Journal* (Vol. 7). Retrieved from <http://amalgam-informationen.de/dokument/SECIIC.pdf>

- Reese, M. (2001). Application of a time-delay neural network to promoter annotation in the *Drosophila melanogaster* genome. *Computers & Chemistry*, 26(1), 51–56. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11765852>
- Reeves, R., & Beckerbauer, L. (2001). HMGI/Y proteins: flexible regulators of transcription and chromatin structure. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1519(1–2), 13–29. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11406267>
- Reik, W., Collick, A., Norris, M. L., Barton, S. C., & Surani, M. A. (1987). Genomic imprinting determines methylation of parental alleles in transgenic mice. *Nature*, 328(6127), 248–251. <https://doi.org/10.1038/328248a0>
- Rhen, T., & Schroeder, A. (2010). Molecular Mechanisms of Sex Determination in Reptiles. *Sexual Development*, 4, 16–28. <https://doi.org/10.1159/000282495>
- Richards, E., & Elgin, S. (2002). Epigenetic codes for heterochromatin formation and silencing: rounding up the usual suspects. *Cell*, 108(4), 489–500. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11909520>
- Richardson, K., Lopez Castro, Gardner, S., & Schlenk, D. (2010). Polychlorinated Biphenyls and Biotransformation Enzymes in Three Species of Sea Turtles from the Baja California Peninsula of Mexico. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, 58(1), 183–193. <https://doi.org/10.1007/s00244-009-9360-5>
- Riggs, A. (2002). X chromosome inactivation, differentiation, and DNA methylation revisited, with a tribute to Susumu Ohno. *Cytogenetic and Genome Research*, 99(1–4), 17–24. <https://doi.org/10.1159/000071569>
- Ringrose, L., & Paro, R. (2007). Polycomb/Trithorax response elements and epigenetic memory of cell identity. *Development*, 134(2), 223–232. <https://doi.org/10.1242/dev.02723>
- Ritter, L., Solomon, K., Forget, J., Stemeroff, M., & O'leary, C. (1995). *A Review of Selected Persistent Organic Pollutants*. Guelph ON, Canada. Retrieved from [https://www.who.int/ipcs/assessment/en/pcs\\_95\\_39\\_2004\\_05\\_13.pdf](https://www.who.int/ipcs/assessment/en/pcs_95_39_2004_05_13.pdf)
- Roberts, E., English, P., Grether, J., Windham, G., Somberg, L., & Wolff, C. (2007). Maternal residence near agricultural pesticide applications and autism spectrum disorders among children in the California Central Valley. *Environmental Health Perspectives*, 115(10), 1482–1489. <https://doi.org/10.1289/ehp.10168>
- Roessler, E., Belloni, E., Gaudenz, K., Jay, P., Berta, P., Scherer, S., ... Muenke, M. (1996). Mutations in the human Sonic Hedgehog gene cause holoprosencephaly. *Nature Genetics*, 14(3), 357–360. <https://doi.org/10.1038/ng1196-357>
- Roessler, E., & Muenke, M. (2010). The molecular genetics of holoprosencephaly. *American Journal of Medical Genetics Part C*, 154C(1), 52–61. <https://doi.org/10.1002/ajmg.c.30236>
- Rojas-Lleonart, I., García-Gasca, S. A., & Bárcenas-Ibarra, A. (2015). Teratogénesis; consideraciones y actualización. *REDVET. Revista Electrónica de Veterinaria*, 16(9), 1–16. Retrieved from <https://www.redalyc.org/articulo.oa?id=63641785001>
- Rought, S., Yau, P., Chuang, L., Doi, R., & Chuang, R. (1999). Effect of the chlorinated

hydrocarbons heptachlor, chlordane, and toxaphene on retinoblastoma tumor suppressor in human lymphocytes. *Toxicology Letters*, 104(1–2), 127–135. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10048758>

- Rought, S., Yau, P., Schnier, J., Chuang, L., & Chuang, R. (1998). The effect of heptachlor, a chlorinated hydrocarbon insecticide, on p53 tumor suppressor in human lymphocytes. *Toxicology Letters*, 94(1), 29–36. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9544696>
- Rudolph, B. L., Andreller, I., & Kennedy, C. J. (2008). Reproductive success, early life stage development and survival of westslope cutthroat trout (*Oncorhynchus clarki lewisi*) exposed to elevated selenium in an area of active coal mining. *Environmental Science and Technology*, 42(8), 3109–3114. <https://doi.org/10.1021/es072034d>
- Sabater, M., & Pérez, M. (2013). Congenital ocular and adnexal disorders in reptiles. *Veterinary Ophthalmology*, 16(1), 47–55. <https://doi.org/10.1111/j.1463-5224.2012.01017.x>
- Sado, T., Fenner, M. H., Tan, S.-S., Tam, P., Shioda, T., & Li, E. (2000). X inactivation in the mouse embryo deficient for Dnmt1: distinct effect of hypomethylation on imprinted and random X inactivation. *Developmental Biology*, 225(2), 294–303. <https://doi.org/10.1006/dbio.2000.9823>
- Saha, A., Wittmeyer, J., & Cairns, B. R. (2006). Chromatin remodelling: the industrial revolution of DNA around histones. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 7, 437–447. <https://doi.org/10.1038/nrm1945>
- Saitou, M., & Yamaji, M. (2012). Primordial Germ Cells in Mice. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 4, a008375. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a008375>
- Saiyed, H., Dewan, A., Bhatnagar, V., Shenoy, U., Shenoy, R., Rajmohan, H., ... Lakkad, B. (2003). Effect of endosulfan on male reproductive development. *Environmental Health Perspectives*, 111(16), 1958–1962. <https://doi.org/10.1289/ehp.6271>
- Sakai, H., Ichihashi, H., Sukanuma, H., & Tatsukawa, R. (1995). Heavy metal monitoring in sea turtles using eggs. *Marine Pollution Bulletin*, 30(5), 347–353. [https://doi.org/10.1016/0025-326X\(94\)00185-C](https://doi.org/10.1016/0025-326X(94)00185-C)
- Sakaue, M., Kitazawa, S., Nishida, K., Kitazawa, R., & Maeda, S. (1996). Molecular Cloning and Characterization of Human Bone Morphogenic Protein (BMP)-5 Gene Promoter. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 221(3), 768–772. <https://doi.org/10.1006/BBRC.1996.0671>
- Samson, J., & Shenker, J. (2000). The teratogenic effects of methylmercury on early development of the zebrafish, *Danio rerio*. *Aquatic Toxicology (Amsterdam, Netherlands)*, 48(2–3), 343–354. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10686337>
- Sanford, L., Ormsby, I., Gittenberger-de Groot, A., Sariola, H., Friedman, R., Boivin, G., ... Doetschman, T. (1997). TGFbeta2 knockout mice have multiple developmental defects that are non-overlapping with other TGFbeta knockout phenotypes. *Development*, 124(13), 2659–2670. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9217007>
- Sanpera, C., Ruiz, X., Jover, L., Llorente, G., Jabeen, R., Muhammad, A., ... Fasola, M. (2003). Persistent Organic Pollutants in Little Egret Eggs from Selected Wetlands in Pakistan.

*Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, 44(3), 360–368.  
<https://doi.org/10.1007/s00244-002-2044-z>

- Sant'Anna, S., Grego, K., Lorigados, C., Fonseca-Pinto, A., Fernandes, W., Sá-Rocha, L., & Catão-Dias, J. (2013). Malformations in Neotropical Viperids: Qualitative and Quantitative Analysis. *Journal of Comparative Pathology*, 149(4), 503–508.  
<https://doi.org/10.1016/J.JCPA.2013.06.001>
- Santos, F., & Dean, W. (2004). Epigenetic reprogramming during early development in mammals. *Reproduction*, 127(6), 643–651. Retrieved from  
<https://rep.bioscientifica.com/view/journals/rep/127/6/1270643.xml>
- Santos, F., Hendrich, B., Reik, W., & Dean, W. (2002). Dynamic Reprogramming of DNA Methylation in the Early Mouse Embryo. *Developmental Biology*, 241(1), 172–182.  
<https://doi.org/10.1006/dbio.2001.0501>
- Sasaki, H., & Matsui, Y. (2008). Epigenetic events in mammalian germ-cell development: reprogramming and beyond. *Nature Reviews Genetics*, 9(2), 129–140.  
<https://doi.org/10.1038/nrg2295>
- Schoenwolf, G., & Smith, J. (2000). Gastrulation and early mesodermal patterning in vertebrates. *Methods in Molecular Biology*, 135, 113–125. Retrieved from  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10791309>
- Schröder, M., Danielsson, C., Wiesenberg, I., & Carlberg, C. (1996). Identification of natural monomeric response elements of the nuclear receptor RZR/ROR. They also bind COUP-TF homodimers. *The Journal of Biological Chemistry*, 271, 19732–19736.  
<https://doi.org/10.1074/JBC.271.33.19732>
- Schuettengruber, B., Martinez, A. M., Iovino, N., & Cavalli, G. (2011). Trithorax group proteins: Switching genes on and keeping them active. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 12(12), 799–814. <https://doi.org/10.1038/nrm3230>
- Schulz, R. (2004). Field studies on exposure, effects, and risk mitigation of aquatic nonpoint-source insecticide pollution: a review. *Journal of Environmental Quality*, 33(2), 419–448. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15074794>
- Scott, E., Simon, M., Anastasi, J., & Singh, H. (1994). Requirement of transcription factor PU.1 in the development of multiple hematopoietic lineages. *Science*, 265(5178), 1573–1577. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8079170>
- SEMARNAT. (2010). Norma Oficial Mexicana NOM-059-SEMARNAT-2010: Protección ambiental de especies nativas de México de flora y fauna silvestres. Categorías de riesgo y especificaciones para la inclusión, exclusión o cambio de listas de especies en riesgo. Retrieved January 26, 2019, from <https://www.gob.mx/profepa/documentos/norma-oficial-mexicana-nom-059-semarnat-2010>
- Semenza, G. (2000). HIF-1 and human disease: one highly involved factor. *Genes & Development*, 14(16), 1983–1991. Retrieved from  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10950862>
- Sergi, C., & Kamnasaran, D. (2011). PRRX1 is mutated in a fetus with agnathia-otocephaly. *Clinical Genetics*, 79(3), 293–295. <https://doi.org/10.1111/j.1399-0004.2010.01531.x>



- Shilatifard, A. (2006). Chromatin Modifications by Methylation and Ubiquitination: Implications in the Regulation of Gene Expression. *Annual Review of Biochemistry*, 75, 243–269. <https://doi.org/10.1146/annurev.biochem.75.103004.142422>
- Shirane, K., Toh, H., Kobayashi, H., Miura, F., Chiba, H., Ito, T., ... Sasaki, H. (2013). Mouse oocyte methylomes at base resolution reveal genome-wide accumulation of non-CpG methylation and role of DNA methyltransferases. *PLoS Genetics*, 9(4), e1003439. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1003439>
- Simpson, J. T., Workman, R. E., Zuzarte, P. C., David, M., Dursi, L. J., & Timp, W. (2017). Detecting DNA cytosine methylation using nanopore sequencing. *Nature Methods*, 14(4), 407–410. <https://doi.org/10.1038/nmeth.4184>
- Singh, N., Sharma, A., Dwivedi, P., Patil, R., & Kumar, M. (2007). Citrinin and endosulfan induced teratogenic effects in Wistar rats. *Journal of Applied Toxicology*, 27(2), 143–151. <https://doi.org/10.1002/jat.1185>
- Sladek, R., Beatty, B., Squire, J., Copeland, N., Gilbert, D., Jenkins, N., & Giguère, V. (1997). Chromosomal Mapping of the Human and Murine Orphan Receptors ERR $\alpha$  (ESRRA) and ERR $\beta$  (ESRRB) and Identification of a Novel Human ERR $\alpha$ -Related Pseudogene. *Genomics*, 45(2), 320–326. <https://doi.org/10.1006/geno.1997.4939>
- Slama, R., & Cordier, S. (2010). Environmental contaminants and impacts on healthy and successful pregnancies. In T. Woodruff, L. Guillette, & L. Giudice (Eds.), *Environmental Impacts on Reproductive Health and Fertility* (p. 262). Cambridge University Press. Retrieved from <https://hal-univ-rennes1.archives-ouvertes.fr/hal-00672165/>
- Smith, W. D. (1975). Classification, nomenclature, and naming of morphologic defects. *The Journal of Pediatrics*, 87(1), 162–163. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1151544>
- Smithson, T. R. (1989). The earliest known reptile. *Nature*, 342(6250), 676–678. <https://doi.org/10.1038/342676a0>
- Solloway, M., & Robertson, E. (1999). Early embryonic lethality in Bmp5;Bmp7 double mutant mice suggests functional redundancy within the 60A subgroup. *Development*, 126(8), 1753–1768. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10079236>
- Solovyev, V., Shahmuradov, I., & Salamov, A. (2010). Identification of Promoter Regions and Regulatory Sites. *Methods in Molecular Biology*, 674, 57–83. [https://doi.org/10.1007/978-1-60761-854-6\\_5](https://doi.org/10.1007/978-1-60761-854-6_5)
- Song, Y., Wu, N., Wang, S., Gao, M., Song, P., Lou, J., ... Liu, K. (2014). Transgenerational impaired male fertility with an Igf2 epigenetic defect in the rat are induced by the endocrine disruptor p,p'-DDE. *Human Reproduction*, 29(11), 2512–2521. <https://doi.org/10.1093/humrep/deu208>
- Spotila, J. R. (2004). *Sea turtles : a complete guide to their biology, behavior, and conservation*. Johns Hopkins University Press.
- Steinmayr, M., André, E., Conquet, F., Rondi-Reig, L., Delhaye-Bouchaud, N., Auclair, N., ... Becker-André, M. (1998). Staggerer phenotype in retinoid-related orphan receptor alpha-

deficient mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 95(7), 3960–3965. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9520475>

- Stewart, K., Keller, J., Templeton, R., Kucklick, J., & Johnson, C. (2011). Monitoring persistent organic pollutants in leatherback turtles (*Dermochelys coriacea*) confirms maternal transfer. *Marine Pollution Bulletin*, 62(7), 1396–1409. <https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2011.04.042>
- Steyermark, A., & Spotila, J. (2001). Effects of Maternal Identity and Incubation Temperature on Hatching and Hatchling Morphology in Snapping Turtles, *Chelydra serpentina*. *Copeia*, 2001(1), 129–135. <https://doi.org/10.2307/1448102>
- Stouder, C., & Paoloni-Giacobino, A. (2010). Transgenerational effects of the endocrine disruptor vinclozolin on the methylation pattern of imprinted genes in the mouse sperm. *REPRODUCTION*, 139(2), 373–379. <https://doi.org/10.1530/REP-09-0340>
- Stower, M., Diaz, R., Fernandez, L. C., Crother, M. W., Crother, B., Marco, A., ... Bertocchini, F. (2015). Bi-modal strategy of gastrulation in reptiles. *Developmental Dynamics*, 244(9), 1144–1157. <https://doi.org/10.1002/dvdy.24300>
- Stumpel, D., Schneider, P., van Roon, E., Boer, J., de Lorenzo, P., Valsecchi, M., ... Stam, R. (2009). Specific promoter methylation identifies different subgroups of MLL-rearranged infant acute lymphoblastic leukemia, influences clinical outcome, and provides therapeutic options. *Blood*, 114(27), 5490–5498. <https://doi.org/10.1182/blood-2009-06-227660>
- Suthar, D., Sharma, V., Dabas, V., & Bhoi, D. (2011). Per-vaginal handling of *Schistosomus reflexus* as a cause of dystocia in a Goat Introduction. *Veterinary World*, 4(7), 330–331. <https://doi.org/10.5455/vetworld.4.330>
- Sutherland, T., Home, I., Weir, K., Russell, R., & Oakeshott, J. (2004). Toxicity and residues of endosulfan isomers. *Reviews of Environmental Contamination and Toxicology*, 183, 99–113. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15369323>
- Suzuki, Y., Tsunoda, T., Sese, J., Taira, H., Mizushima-Sugano, J., Hata, H., ... Sugano, S. (2001). Identification and characterization of the potential promoter regions of 1031 kinds of human genes. *Genome Research*, 11(5), 677–684. <https://doi.org/10.1101/gr.164001>
- Szarski, H. (1968). The origin of vertebrate foetal membranes. *Evolution*, 22(1), 211–214. <https://doi.org/10.1111/j.1558-5646.1968.tb03464.x>
- Taberlay, P., Kelly, T., Liu, C.-C., You, J., De Carvalho, D., Miranda, T., ... Jones, P. (2011). Polycomb-repressed genes have permissive enhancers that initiate reprogramming. *Cell*, 147(6), 1283–1294. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2011.10.040>
- Takai, D., & Jones, P. (2003). The CpG island searcher: a new WWW resource. *In Silico Biology*, 3(3), 235–240. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12954087>
- Tam, P. P. (1981). The control of somitogenesis in mouse embryos. *Journal of Embryology and Experimental Morphology*, 65 Suppl, 103–128. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6801176>
- Taranova, O., Magness, S., Fagan, B., Wu, Y., Surzenko, N., Hutton, S., & Pevny, L. (2006). SOX2 is a dose-dependent regulator of retinal neural progenitor competence. *Genes & Development*, 20(9), 1187–1202. <https://doi.org/10.1101/gad.1407906>

- Terranova, R., Agherbi, H., Boned, A., Meresse, S., & Djabali, M. (2006). Histone and DNA methylation defects at Hox genes in mice expressing a SET domain-truncated form of Mll. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *103*(17), 6629–6634. <https://doi.org/10.1073/pnas.0507425103>
- Thomson, M., Liu, S., Zou, L.-N., Smith, Z., Meissner, A., & Ramanathan, S. (2011). Pluripotency Factors in Embryonic Stem Cells Regulate Differentiation into Germ Layers. *Cell*, *145*(6), 875–889. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2011.05.017>
- Tokita, M., & Kuratani, S. (2001). Normal Embryonic Stages of the Chinese Softshelled Turtle *Pelodiscus sinensis* (Trionychidae). *Zoological Science*, *18*(5), 705–715. <https://doi.org/10.2108/zsj.18.705>
- Ton, C., Hirvonen, H., Miwa, H., Weil, M., Monaghan, P., Jordan, T., ... Drechsler, M. (1991). Positional cloning and characterization of a paired box- and homeobox-containing gene from the aniridia region. *Cell*, *67*(6), 1059–1074. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1684738>
- Turner, J., Alt, S., Cao, L., Vernocchi, S., Trifonova, S., Battello, N., & Muller, C. (2010). Transcriptional control of the glucocorticoid receptor: CpG islands, epigenetics and more. *Biochemical Pharmacology*, *80*(12), 1860–1868. <https://doi.org/10.1016/j.bcp.2010.06.037>
- Turusov, V., Rakitsky, V., & Tomatis, L. (2002). Dichlorodiphenyltrichloroethane (DDT): ubiquity, persistence, and risks. *Environmental Health Perspectives*, *110*(2), 125–128. <https://doi.org/10.1289/ehp.02110125>
- Ujházy, E., Mach, M., Navarová, J., Brucknerová, I., & Dubovický, M. (2012). Teratology – past, present and future. *Interdisciplinary Toxicology*, *5*(4), 163–168. <https://doi.org/10.2478/v10102-012-0027-0>
- Ullrich, S. M., Tanton, T. W., & Abdrashitova, S. (2001). Mercury in the Aquatic Environment: A Review of Factors Affecting Methylation. *Critical Reviews in Environmental Science and Technology*, *31*(3), 241–293. <https://doi.org/10.1080/20016491089226>
- UNEP. (2008). The 12 initial POPs under the Stockholm Convention. Retrieved February 27, 2019, from <http://chm.pops.int/TheConvention/ThePOPs/The12InitialPOPs/tabid/296/Default.aspx>
- UNEP. (2011). Endosulfan included under the Convention. Fifth meeting of the conference of the parties to the Stockholm Convention on Persistent Organic Pollutants. Retrieved February 27, 2019, from <http://chm.pops.int/TheConvention/ConferenceoftheParties/Meetings/COP5/tabid/1267/mct1/ViewDetails/EventModID/870/EventID/109/xmid/4351/Default.aspx>
- Unrine, J. M., Jagoe, C. H., Hopkins, W. A., & Brant, H. A. (2004). Adverse effects of ecologically relevant dietary mercury exposure in southern leopard frog (*Rana sphenoccephala*) larvae. *Environmental Toxicology and Chemistry*, *23*(12), 2964–2970. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15648772>
- USEPA. (1998). Method 3545A: Pressurized Fluid Extraction (PFE). In J. Munich (Ed.) (p. 10). National Exposure Research Laboratory Office of Research and Development, U.S. Environmental Protection Agency, Cincinnati, Ohio 45268. Retrieved from <https://www.epa.gov/sites/production/files/2015-06/documents/epa-3545a.pdf>

- USEPA. (2007). *Method 8081B: Organochlorine Pesticides by Gas Chromatography*. (J. Munich, Ed.). National Exposure Research Laboratory Office of Research and Development, U.S. Environmental Protection Agency, Cincinnati, Ohio 45268. Retrieved from <https://www.epa.gov/sites/production/files/2015-12/documents/8081b.pdf>
- van de Merwe, J., Hodge, M., Olszowy, H., Whittier, J., & Lee, S. (2010). Using blood samples to estimate persistent organic pollutants and metals in green sea turtles (*Chelonia mydas*). *Marine Pollution Bulletin*, 60(4), 579–588. <https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2009.11.006>
- van de Merwe, J., Hodge, M., Whittier, J., Ibrahim, K., & Lee, S. (2010). Persistent organic pollutants in the green sea turtle *Chelonia mydas*: nesting population variation, maternal transfer, and effects on development. *Marine Ecology Progress Series*, 403, 269–278. <https://doi.org/10.3354/meps08462>
- van de Merwe, J., Hodge, M., Whittier, J., & Lee, S. Y. (2009). Analysing persistent organic pollutants in eggs, blood and tissue of the green sea turtle (*Chelonia mydas*) using gas chromatography with tandem mass spectrometry (GC-MS/MS). *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 393(6–7), 1719–1731. <https://doi.org/10.1007/s00216-009-2608-0>
- Van Meter, R. J., Spotila, J. R., & Avery, H. W. (2006). Polycyclic aromatic hydrocarbons affect survival and development of common snapping turtle (*Chelydra serpentina*) embryos and hatchlings. *Environmental Pollution*, 142(3), 466–475. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2005.10.018>
- Veenstra, G., Weeks, D., & Wolffe, A. (2000). Distinct roles for TBP and TBP-like factor in early embryonic gene transcription in *Xenopus*. *Science*, 290(5500), 2312–2315. <https://doi.org/10.1126/science.290.5500.2312>
- Venegas, D., Marmolejo-Valencia, A., Valdes-Quezada, C., Govenzensky, T., Recillas-Targa, F., & Merchant-Larios, H. (2016). Dimorphic DNA methylation during temperature-dependent sex determination in the sea turtle *Lepidochelys olivacea*. *General and Comparative Endocrinology*, 236, 35–41. <https://doi.org/10.1016/J.YGCEN.2016.06.026>
- Verma, A., & Fitzpatrick, D. (2007). Anophthalmia and microphthalmia. *Orphanet Journal of Rare Diseases*, 2, 47. <https://doi.org/10.1186/1750-1172-2-47>
- Vorkamp, K., Riget, F., Glasius, M., Pécseli, M., Lebeuf, M., & Muir, D. (2004). Chlorobenzenes, chlorinated pesticides, coplanar chlorobiphenyls and other organochlorine compounds in Greenland biota. *Science of The Total Environment*, 331(1–3), 157–175. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2004.03.027>
- Walker, C. L. (2016). Minireview: Epigenomic Plasticity and Vulnerability to EDC Exposures. *Molecular Endocrinology*, 30(8), 848–855. <https://doi.org/10.1210/me.2016-1086>
- Walsh, C. P., Chaillet, J. R., & Bestor, T. H. (1998). Transcription of IAP endogenous retroviruses is constrained by cytosine methylation. *Nature Genetics*, 20(2), 116–117. <https://doi.org/10.1038/2413>
- Walther, C., & Gruss, P. (1991). Pax-6, a murine paired box gene, is expressed in the developing CNS. *Development*, 113(4), 1435–1449. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1687460>

- Wang, Z., Oron, E., Nelson, B., Razis, S., & Ivanova, N. (2012). Distinct Lineage Specification Roles for NANOG, OCT4, and SOX2 in Human Embryonic Stem Cells. *Cell Stem Cell*, *10*(4), 440–454. <https://doi.org/10.1016/j.stem.2012.02.016>
- Warnecke, P., Stirzaker, C., Song, J., Grunau, C., Melki, J., & Clark, S. (2002). Identification and resolution of artifacts in bisulfite sequencing. *Methods*, *27*(2), 101–107. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12095266>
- Wasylyk, B., Hagman, J., & Gutierrez-Hartmann, A. (1998). Ets transcription factors: nuclear effectors of the Ras-MAP-kinase signaling pathway. *Trends in Biochemical Sciences*, *23*(6), 213–216. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9644975>
- Watanabe, D., Uchiyama, K., & Hanaoka, K. (2006). Transition of mouse de novo methyltransferases expression from Dnmt3b to Dnmt3a during neural progenitor cell development. *Neuroscience*, *142*(3), 727–737. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2006.07.053>
- Weber, M., Hellmann, I., Stadler, M. B., Ramos, L., Pääbo, S., Rebhan, M., & Schübeler, D. (2007). Distribution, silencing potential and evolutionary impact of promoter DNA methylation in the human genome. *Nature Genetics*, *39*(4), 457–466. <https://doi.org/10.1038/ng1990>
- Weis, P., & Weis, J. S. (1977). Methylmercury teratogenesis in the killifish, *Fundulus heteroclitus*. *Teratology*, *16*(3), 317–325. <https://doi.org/10.1002/tera.1420160311>
- Weissmann, F., Muyrers-Chen, I., Musch, T., Stach, D., Wiessler, M., Paro, R., & Lyko, F. (2003). DNA hypermethylation in *Drosophila melanogaster* causes irregular chromosome condensation and dysregulation of epigenetic histone modifications. *Molecular and Cellular Biology*, *23*(7), 2577–2586. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12640138>
- Wesseling, C., Corriols, M., & Bravo, V. (2005). Acute pesticide poisoning and pesticide registration in Central America. *Toxicology and Applied Pharmacology*, *207*(2), 697–705. <https://doi.org/10.1016/j.taap.2005.03.033>
- WHO. (1989). *DDT and its derivatives: Environmental aspects. Environmental Health Criteria 83*. Geneva, Switzerland: World Health Organization. Retrieved from <http://www.inchem.org/documents/ehc/ehc/ehc83.htm>
- WHO. (2006). *Concise International Chemical Assessment Document 70, Heptachlor*. Geneva, Switzerland. Retrieved from <https://www.who.int/ipcs/publications/cicad/cicad70.pdf?ua=1>
- Williams, S., Mustoe, T., Mulcahy, T., Griffiths, M., Simpson, D., Antoniou, M., ... Crombie, R. (2005). CpG-island fragments from the HNRPA2B1/CBX3 genomic locus reduce silencing and enhance transgene expression from the hCMV promoter/enhancer in mammalian cells. *BMC Biotechnology*, *5*, 17. <https://doi.org/10.1186/1472-6750-5-17>
- Williamson, S. A., Evans, R. G., & Reina, R. D. (2017). When Is Embryonic Arrest Broken in Turtle Eggs? *Physiological and Biochemical Zoology*, *90*(5), 523–532. <https://doi.org/10.1086/692630>
- Wilson, J. G. (1973). *Environment and birth defects*. New York: Academic Press. Retrieved from [https://books.google.com.mx/books/about/Environment\\_and\\_birth\\_defects.html?id=AyKB](https://books.google.com.mx/books/about/Environment_and_birth_defects.html?id=AyKB)

AAAAIAAJ&redir\_esc=y

- Wilson, S., & Houart, C. (2004). Early steps in the development of the forebrain. *Developmental Cell*, 6(2), 167–181. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14960272>
- Wu, H., Coskun, V., Tao, J., Xie, W., Ge, W., Yoshikawa, K., ... Sun, Y. (2010). Dnmt3a-dependent nonpromoter DNA methylation facilitates transcription of neurogenic genes. *Science*, 329(5990), 444–448. <https://doi.org/10.1126/science.1190485>
- Wu, S. C., & Zhang, Y. (2010). Active DNA demethylation: many roads lead to Rome. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 11(9), 607–620. <https://doi.org/10.1038/nrm2950>
- Wyneken, J. (2012). *Reptilian eyes and orbital structures. Proceedings Association of Reptilian and Amphibian Veterinarians*. Boca Raton, FL: Reptilian and Amphibian Veterinarians. Retrieved from <https://pdfs.semanticscholar.org/116c/0f9a2684394a824bc8bc57336bb30c864257.pdf>
- Xu, G.-L., Bestor, T., Bourc'his, D., Hsieh, C.-L., Tommerup, N., Bugge, M., ... Viegas-Péquignot, E. (1999). Chromosome instability and immunodeficiency syndrome caused by mutations in a DNA methyltransferase gene. *Nature*, 402(6758), 187–191. <https://doi.org/10.1038/46052>
- Xu, Q., Fang, S., Wang, Z., & Wang, Z. (2006). Heavy metal distribution in tissues and eggs of Chinese alligator (*Alligator sinensis*). *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, 50(4), 580–586. <https://doi.org/10.1007/s00244-005-1018-3>
- Yamaguchi, S., Kimura, H., Tada, M., Nakatsuji, N., & Tada, T. (2005). Nanog expression in mouse germ cell development. *Gene Expression Patterns*, 5(5), 639–646. <https://doi.org/10.1016/J.MODGEP.2005.03.001>
- Yang, S., Whitmarsh, A., Davis, R., & Sharrocks, A. (1998). Differential targeting of MAP kinases to the ETS-domain transcription factor Elk-1. *The EMBO Journal*, 17(6), 1740–1749. <https://doi.org/10.1093/emboj/17.6.1740>
- Yao, Y., Yang, W., & Seto, E. (2001). Regulation of transcription factor YY1 by acetylation and deacetylation. *Molecular and Cellular Biology*, 21(17), 5979–5991. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11486036>
- Yin, L.-J., Zhang, Y., Lv, P.-P., He, W.-H., Wu, Y.-T., Liu, A.-X., ... Huang, H.-F. (2012). Insufficient maintenance DNA methylation is associated with abnormal embryonic development. *BMC Medicine*, 10, 26. <https://doi.org/10.1186/1741-7015-10-26>
- Yntema, C. (1968). A series of stages in the embryonic development of *Chelydra serpentina*. *Journal of Morphology*, 125(2), 219–251. <https://doi.org/10.1002/jmor.1051250207>
- Yue, Y., Farcas, R., Thiel, G., Bommer, C., Grossmann, B., Galetzka, D., ydra serpenti007). De novo t(12;17)(p13.3;q21.3) translocation with a breakpoint near the 5' end of the HOXB gene cluster in a patient with developmental delay and skeletal malformations. *European Journal of Human Genetics*, 15(5), 570–577. <https://doi.org/10.1038/sj.ejhg.5201795>
- Yue, Y., Liu, J., & He, C. (2015). RNA N 6-methyladenosine methylation in post-transcriptional gene expression regulation. *Genes & Development*, 29, 1343–1355. <https://doi.org/10.1101/gad.262766>

- Zefferino, R., Piccoli, C., Ricciardi, N., Scrima, R., & Capitanio, N. (2017). Possible Mechanisms of Mercury Toxicity and Cancer Promotion. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2017, 1–6. <https://doi.org/10.1155/2017/7028583>
- Zenteno, J., Perez-Cano, H., & Aguinaga, M. (2006). Anophthalmia-esophageal atresia syndrome caused by anSOX2 gene deletion in monozygotic twin brothers with markedly discordant phenotypes. *American Journal of Medical Genetics Part A*, 140(18), 1899–1903. <https://doi.org/10.1002/ajmg.a.31384>
- Zerbino, D. R., Achuthan, P., Akanni, W., Amode, M., Barrell, D., Bhai, J., ... Flicek, P. (2018). Ensembl 2018. <https://doi.org/10.1093/nar/gkx1098>
- Zhang, S., & Cui, W. (2014). Sox2, a key factor in the regulation of pluripotency and neural differentiation. *World Journal of Stem Cells*, 6(3), 305–311. <https://doi.org/10.4252/wjsc.v6.i3.305>
- Zhang, S., Wei, J.-Y., Li, C., Barnstable, C., & Fu, X.-Y. (2003). Expression and activation of STAT proteins during mouse retina development. *Experimental Eye Research*, 76(4), 421–431. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12634107>
- Zhang, Y., Chen, A., Yan, X.-M., & Huang, G. (2012). Disordered epigenetic regulation in MLL-related leukemia. *International Journal of Hematology*, 96(4), 428–437. <https://doi.org/10.1007/s12185-012-1180-0>
- Zhu, Y., McAvoy, S., Kuhn, R., & Smith, D. (2006). RORA, a large common fragile site gene, is involved in cellular stress response. *Oncogene*, 25(20), 2901–2908. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1209314>
- Zuber, M., Gestri, G., Viczian, A., Barsacchi, G., & Harris, W. (2003). Specification of the vertebrate eye by a network of eye field transcription factors. *Development*, 130(21), 5155–5167. <https://doi.org/10.1242/dev.00723>