



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

**INDICADORES DE BIOLOGÍA REPRODUCTIVA Y
EXPRESIÓN DE VITELÓGENINA EN TOTOABA (*Totoaba
macdonaldi*) EN EL GOLFO DE CALIFORNIA**

Por:

IBQ. Daniela Rodríguez Aguirre

Tesis aprobada por la:

UNIDAD MAZATLÁN EN ACUICULTURA Y MANEJO AMBIENTAL

Como requisito para obtener el grado de:

Maestría en Ciencias

Mazatlán Sinaloa, Diciembre 2015

DECLARACIÓN INSTITUCIONAL

La información generada en esta tesis 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, siempre y cuando se dé 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 de tesis.

Dr. Pablo Wong González
Director General

APROBACIÓN

Los miembros del comité designado para revisar la tesis de Daniela Rodríguez Aguirre, la han encontrado satisfactoria y recomiendan que sea aceptada como requisito parcial para obtener el grado de Maestra en Ciencias.



Dra. Silvia Alejandra García Gasca
Directora de tesis



Dr. Miguel Belancourt Lozano
Asesor



Dra. Itzel Sifuentes Romero
Asesora



Dr. Raúl A. Llera Herrera
Asesor

AGRADECIMIENTOS

Agradezco a CONACYT por el apoyo brindado durante el periodo de mis estudios de Maestría en Ciencias. Mi más sincero agradecimiento para el CIAD, especialmente a unidad Mazatlán por ser la institución que me permitió desarrollarme y crecer. También agradezco al proyecto: “Estado de salud y estatus de conservación de la(s) población(es) de totoaba (*Totoaba macdonaldi*) en el Golfo de California: una especie en peligro de extinción” por la oportunidad y apoyo brindados.

Agradezco a Dios por la fortaleza dada para cumplir una más de mis metas.

Quisiera agradecer muy especialmente a mi directora de tesis la Dra. Alejandra García, por la oportunidad de trabajar bajo su tutela y el gran apoyo que siempre me mostró, gracias por compartir su conocimiento y por formar parte tan importante en esta etapa de mi vida.

A mi comité por siempre enriquecer con su conocimiento al proyecto, por su disponibilidad y guía en cada paso, al Dr. Miguel por ayudarme a ver el panorama completo y que siempre se deben considerar diferentes perspectivas, a la Dra. Itzel Sifuentes por su paciencia y por enseñarme que con perseverancia y dedicación ninguna meta es inalcanzable y al Dr. Raúl Llera por su apoyo y disponibilidad, gracias por su guía y enseñanzas.

Rubí muchísimas gracias por su tiempo e infinita paciencia, sin usted este camino definitivamente no hubiera sido el mismo, la aprecio de todo corazón.

Finalmente a mis compañeros de la maestría, sin ustedes este viaje no hubiera sido el mismo, aprendí y crecí con ustedes, Luz, Ale, Eveline, Adriana, Marian, Andrés y Martin, les deseo siempre lo mejor: amigos.

DEDICATORIA

Quisiera dedicarte a ti mamá esta tesis, siempre me has apoyado y has estado en todo momento del camino a mi lado, gracias infinitas me honras y te dedico este y cada uno de mis triunfos, pues te los debo a ti.

También a mi hermana Gabriela por ser mi inspiración y fuerza, no hay día que no me ilumines con tu risa y tu actitud maravillosa.

Quisiera dedicar esta tesis a mi familia entera y amigos, ustedes son mi fortaleza, mi más grande logro y mi alma entera, gracias por llenarme de amor cada día; especialmente a mis dos ángeles que me dieron la prueba más difícil hasta ahora enfrentada pero sé que me cuidan y que ustedes nos guiarán en todo momento, los llevo en mi corazón **siempre**.

CONTENIDO

AGRADECIMIENTOS.....	4
DEDICATORIA.....	5
CONTENIDO.....	6
LISTA DE FIGURAS.....	7
LISTA DE TABLAS.....	10
RESUMEN.....	12
I. INTRODUCCIÓN.....	14
II. ANTECEDENTES.....	27
III. JUSTIFICACIÓN.....	35
IV. HIPÓTESIS.....	36
V. OBJETIVOS.....	37
VI. METODOLOGÍA.....	38
VII. RESULTADOS Y DISCUSIONES.....	43
VIII. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES.....	62
IX. LITERATURA CITADA.....	63
ANEXO 1.....	71
ANEXO 2.....	84

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Mecanismos implicados en los procesos de vitelogénesis maduración ovocitaria de los teleósteos. (Ilustración obtenida de Castelló, 1993).....	21
Figura 2. <i>Totoaba macdonaldi</i> . A) Adulto y B) Juvenil (Ilustración obtenida de FAO, 1972 y Chávez, 1973)	23
Figura 3. Zona de distribución de <i>Totoaba macdonaldi</i> (Ilustración obtenida de FAO, 1972).	25
Figura 4. Área geográfica en la que se circunscribe el trabajo de investigación. Estratificación del Golfo de California en cuatro puntos de muestreo: I) Río El Fuerte-Isla Tiburón; II) Isla Tiburón-Río Colorado; III) Río Colorado-Isla Ángel de la Guarda; IV) Isla Ángel de la Guarda-Bahía Concepción.....	39
Figura 5. Estadio ovárico I. Estroma ovárico inmaduro de <i>T. macdonaldi</i> en crecimiento primario, se observan perinúcleolos tempranos (i). Tinción hematoxilina-eosina, A) 40X B) 200X.	44
Figura 6. Estadio ovárico II, Pre-Vitelogénesis. Ovario de <i>T. macdonaldi</i> en el que se observan perinúcleolos tardíos (ii) y alvéolos corticales (iii). Tinción hematoxilina eosina, A) 40X, B) 200X, C) 40X y D) 200X.	44
Figura 7. Estadio ovárico III, Vitelogénesis inicial-intermedia. Ovario de <i>T. macdonaldi</i> en el que se observan ovocitos en vitelogénesis inicial (vgi), intermedia (vgm) y glóbulos de vitelo (gv). Tinción hematoxilina-eosina, A) 40X, B) 100X, C) 40X y D) 100X.....	45

LISTA DE FIGURAS (CONTINUACIÓN)

- Figura 8. Estadio ovárico IV, Vitelogénesis tardía-madurez. Ovario de *T. macdonaldi* en el que se observan ovocitos en vitelogénesis terminal (vgt) con migración de la vesícula germinal (vg). Tinción hematoxilina-eosina, A) 40X y B) 100X.45
- Figura 9. Estadio ovárico V, Ovulación. Ovario de *T. macdonaldi* en el que se observan ovocitos hidratados (oh). Tinción hematoxilina-eosina 100X.46
- Figura 10. Estadio ovárico VI, Desove. Estroma ovárico de *T. macdonaldi* en el que se observan desoves parciales por la presencia de folículos atrésicos (fa) y folículos post-ovulatorios (po). Tinción hematoxilina-eosina, A) y B) 200X.....46
- Figura 11. Estadio I, Inmadurez. Testículo de *T. macdonaldi* mostrando células germinales (cg) y espermatogonias (sg) inmersas en el tejido conjuntivo. Tinción hematoxilina-eosina, A) 100X y B) 400X.47
- Figura 12. Estadio II, Maduración temprana. Testículo de *T. macdonaldi* en el que se observan espermatoцитos primarios (sp1) y secundarios (sp2). Tinción hematoxilina-eosina, A) 100X y B) 400X.47
- Figura 13. Estadio III, Maduración intermedia. Testículo de *T. macdonaldi* donde se observan espermatoцитos (sp) primarios (sp1) y secundarios (sp2), espermátidas (sa) y espermatozoos (so) libres con las caudas orientadas hacia el lumen. Tinción hematoxilina-eosina, A) 100X, B) 400X y C) 1000X.48
- Figura 14. Estadio IV, Maduración avanzada. Testículo de *T. macdonaldi* en el que se observa epitelio germinal discontinuo, se observan abundantes espermatozoos (so). Tinción hematoxilina-eosina, donde A) y C) 100X y B) y D) 400X.49

LISTA DE FIGURAS (CONTINUACIÓN)

- Figura 15. Índice gonadosomático de población de totoaba de acuerdo al estadio de los organismos, donde H1: hembra en crecimiento primario; H2: hembra en previtelogénesis; H3: hembra en vitelogénesis inicial-intermedia; H4: hembra en vitelogénesis tardía-madurez; H5: hembra en ovulación; H6: hembra en desove; M1: macho inmaduro; M2: macho en maduración temprana; M3: macho en maduración intermedia y M4: macho en maduración avanzada. Letras diferentes indican diferencias significativas en IGS.50
- Figura 16. Índice gonadosomático, durante el periodo de muestreo. Letras diferentes indican diferencias significativas en IGS.51
- Figura 17. Época reproductiva de *Totoaba macdonaldi* donde H1: hembra en crecimiento primario; H2: hembra en previtelogénesis; H3: hembra en vitelogénesis inicial-intermedia; H4: hembra en vitelogénesis tardía-madurez; H5: hembra en ovulación; H6: hembra en desove; M1: macho inmaduro; M2: macho en maduración temprana; M3: macho en maduración intermedia; M4: macho en maduración avanzada y I: indiferenciados.52
- Figura 18. Proporción de sexos de totoaba durante el periodo de muestreo.....54
- Figura 19. Curva estándar 18s ribosomal.56
- Figura 20. Curva estándar vitelogenina.57
- Figura 21. Expresión relativa de vitelogenina en hembras y machos de totoaba donde H1: hembra en crecimiento primario; H2: hembra en previtelogénesis; H3: hembra en vitelogénesis inicial-intermedia; H4: hembra en vitelogénesis tardía-madurez; H5: hembra en ovulación; H6: hembra en desove; M1: macho inmaduro; M2: macho en maduración temprana; M3: macho en maduración intermedia y M4: macho en maduración avanzada.....58

LISTA DE FIGURAS (CONTINUACIÓN)

- Figura 22. Expresión relativa de vitelogenina en hembras y machos de totoaba donde H1: hembra en crecimiento primario; H2: hembra en previtelogénesis; H3: hembra en vitelogénesis inicial-intermedia; H4: hembra en vitelogénesis tardía-madurez; H5: hembra en ovulación; H6: hembra en desove y M: machos en general. Letras diferentes indican diferencias significativas de la expresión de vitelogenina.....60
- Figura 23. Análisis de correlación de Pearson entre índice gonadosomático (IGS) y expresión de vitelogenina (Vtg) en machos y hembras.61
- Figura 24 A-1. Descripción del proceso de un PCR en los primeros ciclos de reacción (Ilustración obtenida de Asuar, 2007).....75

LISTA DE TABLAS

Tabla 1. ANOVA 1 vía para IGS de totoaba durante el periodo de muestreo... 51	51
Tabla 2. Datos de cq para curva estándar para ribosomal y vitelogenina..... 56	56
Tabla 3. ANOVA 1 vía machos (en general) contra cada estadio de hembras. 58	58
Tabla 4. Coeficientes de correlación entre IGS y expresión de vitelogenina, para hembras y machos de totoaba, método de Pearson..... 61	61
Tabla 5 A-1. Mezcla maestra para tratamiento con ADNasa, volúmenes por muestra..... 72	72
Tabla 6 A-1. Mezcla maestra para síntesis de ADNc, volúmenes para una muestra..... 73	73
Tabla 7 A-1. Mezcla maestra para PCR, volúmenes para una muestra. 76	76
Tabla 8 A-1. Mezcla maestra para ligación, colúmenes para una muestra..... 79	79
Tabla 9 A-1. Mezcla maestra para digestión, volúmenes para una muestra. ... 83	83
Tabla 10 A-1. Mezcla maestra para qPCR. 83	83
Tabla 11 A-2. Comparaciones múltiples de IGS durante el periodo de muestreo, método de Holm-Sidak. 84	84
Tabla 12 A-2. Comparaciones múltiples de vitelogenina contra un grupo control (machos en general), método de Dunnett..... 85	85

RESUMEN

La totoaba (*Tototaba macdonaldi*) es un pez carnívoro, que alcanza tallas aproximadas de hasta dos metros de longitud y hasta 100 kg de peso; es una especie endémica del Golfo de California y considerada en peligro de extinción. En un esfuerzo multidisciplinario e interinstitucional por conocer y evaluar el estatus actual de la totoaba en el Golfo de California con fines de conservación y aprovechamiento sustentable, se llevó a cabo el proyecto “Estado de salud y estatus de conservación de la(s) población(es) de totoaba (*Totoaba macdonaldi*) en el Golfo de California: una especie en peligro de extinción”. El presente estudio forma parte de este proyecto integral cuyo objetivo es conocer si esta especie presenta evidencias de exposición a contaminantes estrogénicos. Los compuestos endocrino-alterantes se distribuyen extensamente en el ambiente, presentan efectos miméticos o antagónicos en las funciones biológicas de las hormonas naturales alterando el equilibrio hormonal y la regulación del desarrollo embrionario, por tanto, tienen la capacidad de provocar efectos adversos sobre la salud de un organismo o de su progenie. Existen diversos indicadores biológicos del estado reproductivo de una especie, en este trabajo se analizaron proporción de sexos, época reproductiva y expresión de vitelogenina, ya que la alteración de estos parámetros indicaría una posible exposición a contaminantes estrogénicos. La vitelogenina es una fosfoglicolipoproteína sintetizada en el hígado y liberada a la sangre en respuesta a los estrógenos. Los niveles bajos o no detectables de vitelogenina en machos en condiciones normales, y la capacidad de ser expresada o inducida por exposición a compuestos estrogénicos la hacen un biomarcador ampliamente utilizado y estudiado en diferentes organismos. En el presente estudio se detectaron niveles de vitelogenina en machos comparables

con los de hembras inmaduras, en ovulación y en desove, lo cual sugiere exposición a compuestos estrogénicos. Los parámetros reproductivos no presentaron alteraciones, la proporción de sexos fue cercana a 1:1, mientras que la época reproductiva se detectó de febrero a mayo, coincidiendo con lo reportado por otros autores. Se concluyó que existe exposición de la totoaba a contaminación estrogénica en el Golfo de California, sin embargo ésta no parece afectar la biología reproductiva ni la proporción de sexos.

Palabras clave: Totoaba, reproducción, contaminación estrogénica, vitelogenina.

I. INTRODUCCIÓN

En peces la reproducción conlleva una serie de cambios somáticos y fisiológicos que se manifiestan, entre otras cosas, en el desarrollo gonadal del adulto y culmina durante el desove cuando las gónadas liberan óvulos o espermatozoides y, en el caso de presentarse fertilización, inicia la formación del huevo o cigoto (Csirke, 1980).

Debido a la importancia de este proceso, es uno de los parámetros más importantes para la evaluación del estado de salud de una población, ya que es muy susceptible a los cambios en el ambiente y a la exposición a sustancias químicas.

Actualmente, México enfrenta dificultades en materia de salud ambiental debido a la contaminación de ríos, lagos, lagunas y mares, producida por descargas de aguas residuales domésticas, agrícolas y urbanas. El Golfo de California es una de las zonas de pesca más importante de México, tiene importantes atributos biológicos determinados en parte, por la composición única de especies, abundancia de endemismos y la existencia de sitios importantes de reproducción de aves y lobos marinos, esta zona representa una gran riqueza biológica y ecológica de gran importancia económica para el país (CONANP, 2012) por lo que los asentamientos humanos en esta zona se dedican principalmente a la agricultura, la silvicultura, la extracción de minerales y la ganadería (UNESCO, 2005). Sin embargo el crecimiento de la población y los desechos de estas actividades, representan parte de una contaminación que afecta seriamente al medio ambiente y por lo tanto se ha deteriorado la capacidad de esta zona para albergar actividades como la pesca y la acuicultura (CNA, 2004; Arias-Patrón, 2005).

Muchos compuestos químicos sintéticos han demostrado ser beneficiosos para el control de plagas y enfermedades, la producción de cultivos y la industria, sin embargo estos mismos productos químicos han tenido efectos imprevistos sobre la salud humana y el medio ambiente. Éstos compuestos orgánicos persistentes (COPs) fueron ampliamente utilizados durante el auge de la producción industrial después de la Segunda Guerra Mundial y la mayoría de éstos compuestos, sus derivados y los generados durante el proceso de su producción suelen acabar casi siempre en el mar.

Los COPs actúan de numerosas formas e interfieren en procesos biológicos fundamentales para los seres vivos (EPA, 2002; Monagas, 2007), dentro de este tipo de contaminantes encontramos los que tienen efectos endocrino-alterantes (EDCs) capaces de alterar el equilibrio hormonal de los organismos (Bern, *et al.*, 1992); entre los EDCs se encuentran los xenoestrógenos y los antiandrogénicos; los xenoestrógenos actúan mediante la unión al receptor a estrógenos y mimetizan o bloquean las respuestas normales de las hormonas, entre estos se pueden incluir ciertos insecticidas orgánicos clorados, bifenilos policlorados (PCBs) y, más recientemente, algunos componentes no clorados, usados como antioxidantes (Canales, *et al.*, 2003). Los andrógenos desempeñan un papel fundamental en el desarrollo temprano de los machos, de ellos depende la masculinización de los órganos reproductivos y el cerebro, la exposición a antiandrogénicos inhibe la síntesis de andrógenos y es asociado con malformaciones además del paso transgeneracional de los efectos a nivel de células germinales. Pesticidas como el vinclozolin y el DDE (metabolito del DDT), compuestos de origen industrial como ftalatos, dioxinas y PCB, así como los de uso farmacológico como la flutamida, han sido clasificados como compuestos con efectos antiandrogénicos (Guzmán y Zambrano, 2007).

Las funciones reproductivas tanto en invertebrados como vertebrados están bajo el control de una red integrada de señales químicas que se definen como sistema endocrino. Los llamados disruptores endocrinos interfieren en el funcionamiento del sistema hormonal suplantando a las hormonas naturales,

bloqueando su acción o aumentando o disminuyendo sus niveles (Chichizola, 2003; Bejarano, 2004), afectando la salud de los seres humanos y de otros organismos vivos, incluso en cantidades muy pequeñas. Los disruptores endocrinos presentan cuatro características principales: 1) son tóxicos para la salud animal y humana, 2) son “orgánicos” por tener carbono en su estructura química, lo que los hace ser solubles en grasas y permite que se bioacumulen y biomagnifiquen a lo largo de las cadenas alimenticias, 3) son persistentes ya que duran décadas antes de degradarse, y 4) pueden desplazarse a grandes distancias debido a la facilidad con la que ingresan a la cadena trófica y su persistencia en el medio (Bejarano, 2004).

Ejemplos de estos compuestos orgánicos son el aldrín, clordano, DDT, dieldrín, heptacloro, mirex, tozafeno (canfecloro), bifenilos policlorados (PCBs), hexaclorobenceno (HCB), dibenzo-p-dioxinas (PCDD) y dibenzo-p-furanos policlorados (PCDF) los cuales se caracterizan por sus propiedades de bioacumulación y biomagnificación, y se sabe, que la exposición a éstos compuestos puede ocasionar diversos trastornos (SEMARNAT, 2013) y por ende representan un gran peligro para las especies expuestas, en especial aquellas que se encuentran amenazadas o en peligro de extinción, tal como lo es *Totoaba macdonaldi*.

1.1 Indicadores de biología reproductiva

Dentro de los factores de regulación poblacional, uno de los más importantes es la reproducción, cuya función es la perpetuación de la especie y la continuidad de la población, de suspenderse este proceso, la consecuencia inevitable sería el colapso de la población (Csirke, 1980).

Además de formar parte del conocimiento general de una especie, los indicadores de biología reproductiva son clave para la recuperación de la población ante alguna contingencia (sobrepesca, destrucción de hábitat, etcétera) incluso se considera que las características taxonómicas son menos

importantes para el riesgo de extinción que las características del ciclo biológico, y que la propiedad más importante de las especies y poblaciones en relación con el riesgo de extinción es la resistencia, ya que la resistencia de una población está estrechamente relacionada con su productividad (la fecundidad, tasa de crecimiento, mortalidad natural, edad de madurez y longevidad) de la población, y es probable que las especies más productivas tengan más capacidad de recuperarse de una contingencia (FAO, 2004).

Es de gran importancia conocer los aspectos biológicos relevantes de la dinámica poblacional, entre éstos la biología reproductiva (temporada de reproducción, talla de maduración sexual, proporción de sexos, índice gonadosomático, fecundidad y su comportamiento reproductivo, entre otros), los cuales están influenciados por la variación espacial y temporal de los factores bióticos y abióticos (Hernández, 2008).

Hay indicadores de biología reproductiva que cuando presentan alguna alteración, puede significar una exposición a xenobióticos, y estos pueden ser utilizados como biomarcadores. En el presente estudio, se analizaron los siguientes indicadores de biología reproductiva: índice gonadosomático, ciclo reproductivo, proporción de sexos y expresión de vitelogenina. Debido a que estos indicadores están regulados principalmente por estrógenos y andrógenos, una alteración de los mismos podría indicar una posible exposición a EDCs.

1.2 Biomarcadores

En un contexto toxicológico, los biomarcadores son considerados indicadores sensibles de exposición o efecto a xenobióticos (McCarthy y Shugart, 1990). Silbergeld y Davis (1994) hablan de marcadores biológicos para referirse a señales fisiológicas inducidas por xenobióticos que reflejan ya sea exposición, respuesta celular precoz, o susceptibilidad inherente o adquirida, proporcionando una estrategia para el seguimiento y la resolución de estos problemas.

De acuerdo con Grandjean y colaboradores (1994) un biomarcador ideal cumple con las siguientes características: a) Debe ser detectable en una muestra de fácil recolección y análisis; b) debe ser específico; c) debe reflejar únicamente un cambio subclínico y reversible; d) debe permitir adoptar medidas preventivas; y por ultimo e) debe ser éticamente aceptable. Sin embargo no todos los biomarcadores cumplen con todas o las mismas características, por lo tanto existen diversas clasificaciones de los mismos (Corella y Ordovás, 2015), pero en general diversos autores coinciden que se pueden clasificar en tres grupos: de exposición, susceptibilidad y de respuesta (Derosa, *et al.*, 1993; Silbergeld y Davis, 1994; 1996; Repetto, 1997; Peakall, *et al.*, 2012).

Un biomarcador de exposición puede ser un compuesto exógeno (o un metabolito) presente dentro del organismo; en el caso de tóxicos acumulativos, la dosis interna puede también reflejar la cifra de agente tóxico almacenado en uno o varios compartimentos corporales. Los biomarcadores de susceptibilidad sirven como indicadores de sensibilidad individual al efecto de un xenobiótico o grupo de compuestos tóxicos, la cual se debe generalmente a factores genéticos, reconocibles por estudios de ADN. El biomarcador de respuesta o efecto es indicativo de cambios bioquímicos en un organismo como resultado de la exposición a xenobióticos; incluyen modificaciones en la composición celular sanguínea, alteraciones en actividades enzimáticas, aparición de aductos del ADN, incrementos localizados de ARN-m, aumento de determinadas proteínas, e incluso aparición de anticuerpos específicos contra un xenobiótico o frente a fracciones celulares (Van Cauteren, *et al.*, 1996; Repetto, 1997).

1.3 Vitelogénesis

La vitelogénesis, que incluye tanto la síntesis de la vitelogenina como su secuestro al ovocito, es responsable de la mayor parte del crecimiento de los

ovocitos en la mayoría de los vertebrados ovíparos y puede atribuírsele hasta el 90% del tamaño final del huevo (Di Giulio y Tillitt, 1999).

Representa el principal acontecimiento funcional del crecimiento del ovocito dado que en la mayoría de los vertebrados las proteínas del vitelo contribuyen con un 80-90% del peso seco de los huevos.

La vitelogenina, es una fosfoglicolipoproteína (oscila entre 250 y 600 kDa, varía según la especie) que en respuesta a un estímulo estrogénico es sintetizada en el hígado, y liberada al torrente sanguíneo, constituye el principal precursor de las proteínas del vitelo (Tyler, 1991; Castelló, 1993).

La vitelogenina llega a la superficie del ovocito a través de la circulación sanguínea y allí, después de atravesar las células mesoepiteliales de la teca, la lámina basal, los espacios intercelulares de la granulosa, la matriz extracelular (localizada entre la granulosa y la membrana plasmática del ovocito) y los canales de la zona radiata a lo largo de las microvellosidades del ovocito, alcanza el oolema. Allí se forman unas vesículas recubiertas de clatrina que se desprenden de él y entran de manera aislada en el ooplasma periférico. Luego se fusionan para dar lugar a los cuerpos multivesiculares, que no son otra cosa que lisosomas modificados. En éstos se produce la ruptura proteolítica de la vitelogenina para dar lugar a la fosvitina y lipovitelina, que son los principales componentes del vitelo. Los gránulos de vitelo se fusionan posteriormente para formar los glóbulos de vitelo (Castelló, 1993).

En los teleósteos marinos, las proteínas de vitelo no se encuentran en forma de plaquetas insolubles como en los ciclóstomos o en los anfibios, sino que se acumulan en forma de esferas de vitelo fluido. En peces con huevos pelágicos, estas esferas se fusionan durante la maduración post-vitelogenética lo cual les confiere el aspecto transparente característico de los huevos pelágicos. Se ha visto que en los teleósteos, el secuestro de la vitelogenina y de las proteínas no se da únicamente durante la vitelogénesis, sino que también puede extenderse hacia la primera parte de la maduración. En consecuencia, se puede afirmar

que los acontecimientos fisiológicos no son secuencialmente reemplazados unos por otros, sino que más bien es su inicio el que se realiza de forma secuencial y que una vez iniciados pueden permanecer activos a lo largo del desarrollo de los ovocitos. Todos estos procesos una vez iniciados, pueden acelerarse o retardarse según el régimen hormonal, o incluso abortarse dando lugar a la atresia ovocitaria (Castelló, 1993).

La formación definitiva del huevo depende en gran medida de la regulación de las hormonas secretadas por la hipófisis y de la síntesis y secreción de esteroides secretados por los tejidos del ovario (Castelló, 1993).

La figura 1 muestra la entrada de la vitelogenina procedente del hígado en el interior del ovocito y su transformación en glóbulos de vitelo. La vitelogenina se sintetiza en el hígado bajo la estimulación de estrógeno, el cual es producido cuando el ovocito ha completado su desarrollo por estimulación de las hormonas gonadotropinas (GtHI y GtHII), la estimulación hormonal desencadena la maduración del ovocito, tras la cual este será liberado en el lumen del ovario.

La GtH I u hormona folículo estimulante (FSH, por sus siglas en inglés) se denomina hormona vitelogénica porque induce la captura de vitelogenina, además en algunas especies puede estimular la esteroidogénesis y liberación del Adenosín Monofosfato Cíclico (AMPc) (Zanuy y Carrillo 1987, Luckenbach, *et al.*, 2008). Mientras que la GtH II u hormona luteinizante (LH, por sus siglas en inglés) induce la maduración de los ovocitos, la ovulación, y estimula la formación de AMPc, por lo cual se denomina hormona de maduración (Zanuy y Carrillo 1987, Zanuy, *et al.*, 2009). Ambos tipos de GtH son liberadas desde la hipófisis y vertidas al torrente sanguíneo, donde al llegar a las gónadas, estimulan a los tejidos ováricos para realizar la síntesis esteroidogénica a nivel folicular en las células de la granulosa, células tecales, cuerpos atrésicos y folículos postovulatorios (Nagahama, 1983; Valdebenito, 2008; Mylonas, *et al.*, 2010).

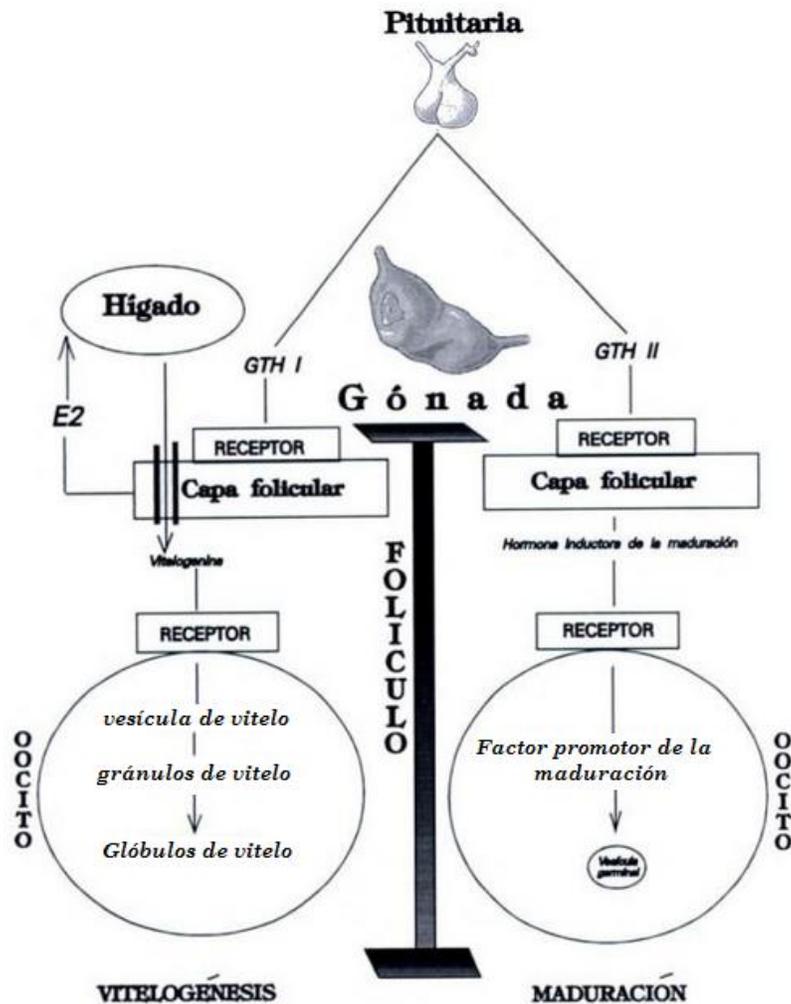


Figura 1. Mecanismos implicados en los procesos de vitelogenesis maduración ovocitaria de los teleosteos. (Ilustración obtenida de Castelló, 1993)

Como se explicó anteriormente, la síntesis de vitelogenina está estrechamente ligada con el desarrollo gonadal de las hembras y depende de estímulos estrogénicos; por lo que niveles altos de ésta proteína en machos podría significar una exposición a algún compuesto xenoestrógeno).

La cuantificación de la vitelogenina ha demostrado ser una herramienta útil para el seguimiento de la exposición a estrógenos y compuestos estrogénicos en peces y en otros vertebrados ovíparos (Palmer y Palmer 1995; Sumpter y Jobling, 1995). Durante la vitelogenesis un precursor de la proteína se sintetiza en el hígado y es absorbido por los ovocitos en crecimiento (Tyler, 1991). La

producción de vitelogenina es dependiente de estrógenos y por lo tanto generalmente restringido a las hembras; debido a que los machos son portadores del gen de vitelogenina, bajas cantidades de esta proteína o de su RNA mensajero puede ser detectada en el plasma en condiciones normales (Copeland, *et al.*, 1986) sin embargo, la exposición a los estrógenos naturales o sintéticos, y a compuestos con actividad estrogénica pueden promover una alta expresión (Chen, 1983).

Estas características del proceso de vitelogénesis (dependencia de estrógeno, los bajos niveles de vitelogenina en machos en condiciones normales y los cambios en la concentración de vitelogenina debido a compuestos estrogénicos) proporcionan la base ideal para hacer de la vitelogenina un biomarcador confiable y muy útil para determinar exposición a estrógenos ambientales en peces de vida silvestre.

1.4 *Totoaba macdonaldi*

Inicialmente la totoaba se encontraba clasificada en el género *Cynoscion*, en la familia *Sciaenidae*, actualmente se clasifica como *Totoaba macdonaldi* (Figura 2), en un género y especie única, siendo un pez endémico del Golfo de California (FAO, 1972; Cisneros, *et al.*, 1997). La Totoaba alcanza tallas cercanas a los dos metros de longitud (Berdegué, 1955) y peso máximo de 135 kg (Cannon, 1966). Esta especie muestra un patrón de migración ontogenético usando como área de crianza el estuario del Río Colorado (Cisneros, *et al.*, 1997), son peces muy longevos que llegan a alcanzar los 25 años de edad (Román, 1994). Esta especie fue, durante la mitad del siglo 20, una de las especies de mayor importancia comercial y deportiva en el alto Golfo de California. El manejo irresponsable de su pesquería originó una sobreexplotación, y sumado a las alteraciones de tipo ecológico y de origen antropogénico ocurrida en la zona del delta del Río Colorado, provocó un fuerte decremento en las poblaciones (Flanagan y Hendrickson, 1976). Debido a esto,

a partir de 1975 esta especie se encuentra en veda permanente la cual continua vigente (Pedrín, *et al.*, 2001) y en 1976 fue incluida en la lista de especies en peligro de extinción de acuerdo al CITES (Convención sobre el Comercio Internacional de Especies Amenazadas de Fauna y Flora Silvestres) (2014). La revisión del estado actual de esta especie, indica que es un organismo vulnerable a la sobrepesca y que sus poblaciones han sido impactadas; sin embargo, se desconocen los efectos en la salud reproductiva de la especie causados principalmente por actividades humanas.

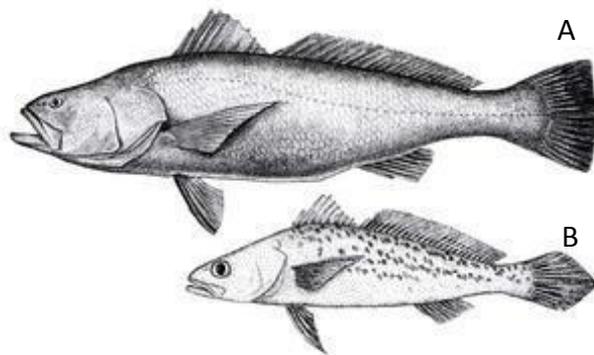


Figura 2. *Totoaba macdonaldi*. A) Adulto y B) Juvenil (Ilustración obtenida de FAO, 1972 y Chávez, 1973)

La temporada de reproducción de esta especie se da en el periodo comprendido de febrero a junio, siendo el mes de abril y principios de mayo el periodo que se presentan los máximos desoves (Berdegú, 1955). Thompson (1969) indicó que los máximos desoves se presentan en abril o principios de mayo. Durante la temporada reproductiva de la totoaba entre los años 1985 y 1988, Barrera-Guevara (1990) reportó estadísticas descriptivas de un total de 201 organismos adultos (140 hembras y 61 machos). Las hembras variaron entre 134 y 197 cm de longitud total e intervalos de peso entre 21 y 81 kg; en este grupo el índice gonadosomático (IGS) varió entre 1.18 y 24.3, mientras que los machos midieron entre 125 y 166 cm, pesaron entre 22 y 55 kg, y el IGS varió entre 0.83 y 6.8. Mediante análisis histológico, el autor sugirió que el

desarrollo oocítico sigue un patrón “asincrónico continuo” y con desove único. La fecundidad fluctuó entre 980,000 y 3'600,000 huevos para hembras entre 124 y 145 cm de longitud total y un peso total entre 21 y 54 kg. Por su parte, Morales en 1999 describió el desarrollo embrionario de totoaba en condiciones ex situ desde que el huevo es fecundado hasta que las larvas agotan su saco vitelino, a una temperatura de 26°C y salinidad de 35 ppm. Cisneros y colaboradores en 1995 reportan la edad media de primera madurez en machos y hembras en 6 y 7 años, respectivamente. Estos análisis no han continuado, y el hecho de que las poblaciones se redujeron a niveles alarmantes sugiere la ocurrencia de ajustes en las variables reproductivas pudiendo afectar la dinámica de la especie (Valenzuela-Quiñonez, *et al.*, 2011).

Distribución

La totoaba se distribuye exclusivamente en el Golfo de California, desde la desembocadura del río Colorado hasta el río Fuerte en Sinaloa (Jordan y Evermann, 1986) en la costa oriental, y del río Colorado a Bahía del Coyote, en Bahía Concepción, Baja California, en la costa occidental. El máximo de densidad se localiza en el extremo norte del Golfo de California, en las cercanías de Puerto Peñasco y Santa Clara, Sonora, y San Felipe, Baja California (Figura 3).

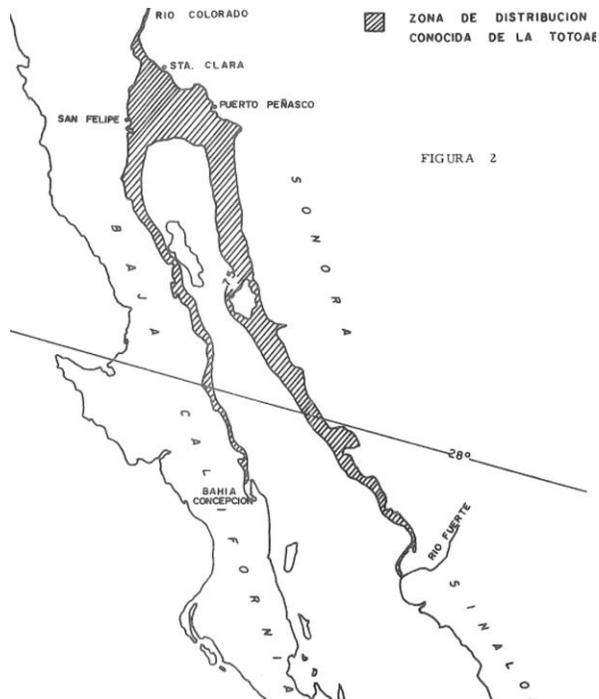


Figura 3. Zona de distribución de *Totoaba macdonaldi* (Ilustración obtenida de FAO, 1972).

Lercari y Chávez (2007), usando registros históricos de captura de 1929 a 1970 obtenidos de Arvizu y Chávez (1972), reportaron que la alteración del hábitat podría explicar la reducción de la abundancia de la totoaba, debido a la disminución y prácticamente cese del flujo de agua del Río Colorado, debido a la construcción de represas y proyectos de irrigación en los Estados Unidos (represa Hoover terminada en 1935 y la represa Glen Canyon terminada en 1963). Dicho represamiento de las aguas del Río Colorado cambió las condiciones estuarinas en el extremo norte del Golfo de California. Algunos de esos cambios incluyen la disminución en los nutrientes y sedimentos aportados por el río (Pitcher *et al.*, 2005). Este cambio de salinidad se relaciona con las tasas de sobrevivencia de las crías, ya que éstas requieren de aguas salobres para desarrollarse (Berdegué, 1955; Hendrickson, 1979), por lo que la totoaba es considerada como una especie anádroma.

Las diferentes medidas de manejo consistieron en vedas de 1940 a 1955 para proteger la reproducción. En 1974 se estableció la zona de refugio en la desembocadura del Río Santa Clara, en Sonora, y la zona de reserva de Punta Zacatosa, en Baja California, al faro del Cerro el Machorro, en Sonora, al sur del poblado de Santa Clara. En 1975 se vedó permanentemente la captura de totoaba en el Golfo de California, en 1991 fue declarada especie en peligro de extinción (Pedrín, *et al*, 2001).

Aun con las estrategias de protección establecidas, persisten problemas asociados al uso humano de los recursos naturales, como el crecimiento urbano. La población registrada en el alto Golfo de California en 2005 sumaba 69,665 habitantes, repartidos en 210 localidades rurales (dependientes de actividades primarias como agricultura y pesca) y tres urbanas: San Felipe, B.C., el Golfo de Santa Clara y Puerto Peñasco, Sonora, que entre el año 2000 y 2005 tuvieron incrementos anuales superiores al promedio nacional. De acuerdo al INEGI (2000 y 2005) el crecimiento demográfico aumentó la demanda de servicios públicos como suministro de electricidad y abastecimiento de agua, que debido a la escasez en infraestructura y poca disponibilidad de recursos se originaron problemas de recolección y disposición de basura, entre otros.

II. ANTECEDENTES

A nivel internacional se han realizado diversos estudios para conocer y determinar la presencia y concentración de los COPs en diferentes especies de peces; los contaminantes que afectan como disruptores endocrinos tienen el potencial de alterar las vías hormonales que regulan los procesos reproductivos, por lo que el uso de biomarcadores como la vitelogenina ha permitido el monitoreo sobre presencia y exposición a dichos compuestos.

Los efectos de los contaminantes orgánicos persistentes pueden ser muy sutiles y desencadenarse a bajas concentraciones, presentándose varios años después de la exposición, llegando en ocasiones a presentarse en subsecuentes generaciones. Estos contaminantes tienen una larga vida media biológica, facilitando de esta manera la acumulación de concentraciones aparentemente pequeñas durante períodos prolongados de tiempo. Para varios de estos contaminantes se han realizado investigaciones que indican que la exposición a bajas concentraciones podría estar asociada con efectos no letales crónicos, entre ellos una posible inmunotoxicidad, efectos cutáneos y alteración del rendimiento reproductor. Ya se ha comprobado la relación entre exposición a COPs y sus efectos a la salud, como cáncer, impedimento en el comportamiento neuronal, alteraciones en el sistema inmune y deficiencias reproductivas (SEMARNAT, 2013).

Los COPs pueden afectar la salud de distinta manera ya que pueden ser genotóxicos, pueden producir efectos fisiológicos o bioquímicos adversos en cualquiera de las etapas del desarrollo (Gómez y Zúñiga, 2007).

En el Golfo de California se liberan descargas agroindustriales, urbanas, mineras y desechos generados por la acuicultura, los cuales son vertidos al

medio sin control alguno y sin pasar por procesos de purificación previos (Salinas, *et al.*, 2004). A pesar de esto no se considera que esta zona esté muy contaminada y que ello represente un factor de riesgo para las poblaciones de cetáceos que habitan allí.

Valdez y colaboradores (2001) reportaron la presencia de hidrocarburos clorados en la grasa de ballena azul, con base en biopsias tomadas en Loreto y Bahía de La Paz, así como la presencia de estos compuestos en eufáusidos muestreados en la región de San Quintín, fuera de la costa occidental de la Península de Baja California. Sin embargo, estos mismos autores mencionan que la presencia de los hidrocarburos clorados en las agregaciones de ballena azul de la zona se encuentran en niveles relativamente bajos, y que los niveles de estos compuestos en los eufáusidos de San Quintín fueron diez veces mayores a los reportados para el golfo debido a la primera zona cuenta con un mayor impacto con agroquímicos

En 1992, Readman y colaboradores, reportaron 300 pg g⁻¹ de DDT en el tejido blando de almejas y 103 pg g⁻¹ en huevos de cormorán (ave acuática), además de la presencia de diversos contaminantes tales como clorpirifos en concentraciones de hasta 34 ng g⁻¹ en sedimento seco en la zona de Altata-Ensenada del Pabellón, concluyendo que a pesar de que los organofosforados de nueva generación son de rápida degradación, clorpirifos y paratión son lo suficientemente persistentes para considerarse contaminantes altamente tóxicos en el ambiente.

En un estudio llevado a cabo en la misma zona, se encontró una amplia variedad de residuos procedentes de las tierras agrícolas de los alrededores en los sedimentos, el agua y muestras de biota, se detectaron concentraciones de algunos compuestos organoclorados como endosulfan (140 ng g⁻¹ en tejido blando del mejillón *Mytella strigata*) y clorpirifos (7.6 ng g⁻¹ en sedimentos) mediante la técnica de C¹⁴ (Carvalho, *et al.*, 1996).

En diciembre de 1997 y abril y septiembre de 1998, Galindo-Reyes y colaboradores (1999) midieron la temperatura del agua, salinidad, oxígeno disuelto, nutrientes, clorofila y residuos de plaguicidas en la laguna de Ensenada del Pabellón y Bahía de Santa María, Sinaloa considerados dos de los mayores productores de camarón de la región, reportando altos niveles de nitritos y fosfatos y concentración de clorofila en comparación a otros ecosistemas cercanos, probablemente debido a los fertilizantes utilizados en las tierras agrícolas que rodean a los cuerpos de agua estudiados. Los plaguicidas detectados con mayor frecuencia fueron BHC α , aldrín, endosulfán y paratión. En algunos casos, se detectaron plaguicidas prohibidos por las normas mexicanas. Estos resultados indican que los ecosistemas estudiados están en una condición de aviso, debido a graves alteraciones bioquímicas y fisiológicas se han reportado en crustáceos expuestos a plaguicidas.

En 2002, expusieron larvas de camarón a DDT, azinfosmetil, permetrina, paratión, clorpirifos, malatión, endosulfán y carbaril, con el fin de determinar la CL₅₀, concluyendo que la exposición a cualquiera de estos plaguicidas afecta las proteínas totales de las larvas además que los que fueron expuestos al DDT presentaban daño en su ADN, por lo tanto estos plaguicidas podrían ser una de las causas del lento crecimiento, diversas patologías y la mortalidad en los camarones que se han reportado afectando seriamente la economía de este sector (Galindo-Reyes *et al.* 2002).

En 2003 Ríos-Sicairos (2004) realizó una investigación donde evaluó y analizó malformaciones, índices de condición biológica y nemátodos parásitos en la lisa blanca (*Mugil curema*) en dos sistemas lagunares de la costa sur de Sinaloa (Estero de Urías y Estero de Teacapán) para estimar su posible utilización como bioindicador de estrés ambiental. Los resultados proporcionaron evidencias de que las condiciones ambientales del Estero de Urías son capaces de ocasionar efectos negativos en mayor proporción que las del Estero Teacapán respecto a la condición biológica de los organismos. La contaminación por desechos urbanos e industriales en el Estero de Urías,

causó efectos de malformaciones, problemas de desarrollo, disminución de la capacidad reproductiva, alteración morfológica de órganos como el hígado y desequilibrios en la ecología parasitaria de las lisas. Por lo tanto se concluyó que *Mugil curema* puede ser considerada como un buen bioindicador.

Ríos-Sicairos en un estudio posterior (2008) evaluó la variación espacio-temporal de biomarcadores moleculares y biológicos en *M. curema* y *Mytella strigata* como indicadores de efectos biológicos por multi-estresores en tres lagunas costeras (Ensenada del Pabellón, Estero de Urías y Estero de Teacapán) con diferente grado de impacto antropogénico. Como resultado encontró que la proporción de sexos en *M. curema* fue constante y significativamente mayor para hembras en los tres ecosistemas lo que podría estar relacionado con alteraciones ambientales, mientras que la población del Estero de Teacapán presentó la mejor condición reproductiva, menor estrés hepático y mejor condición general reflejados en los índices biológicos. Para la especie *M. strigata* los índices de condición biológica fueron indicadores principalmente de la presencia de materia orgánica y enriquecimiento de nutrientes en los ecosistemas, sobresaliendo el Estero de Urías y Ensenada del Pabellón. Concluye que ambas especies podrían ser consideradas candidatas a estudios de biomonitoreo ambiental y que en términos de estrés ambiental el Estero de Urías es el más impactado, seguido por Ensenada del Pabellón y el menos impactado sería el Estero de Teacapán.

Un biomarcador puede ser usado para diferentes finalidades, dependiendo del propósito del estudio y del tipo de exposición. Los biomarcadores también contribuyen a la evaluación del riesgo de salud del organismo y a la verificación de la relación causa-efecto y dosis-efecto (World Health Organization, 1996).

La presencia de vitelogenina en plasma de peces macho es un indicador de exposición a estrógenos ambientales, aun no se conoce a que grado altas concentraciones de vitelogenina en peces macho afecta su reproducción, se sabe que altas concentraciones de vitelogenina requieren grandes cantidades de energía, esta demanda de energía podría tener otras consecuencias, por

ejemplo Herman y Kincaid (1988) demostraron que altas concentraciones de vitelogenina en el plasma de peces macho de trucha (*Onchorhynchus mykiss*) puede provocar fallas renales.

Purdom y colaboradores (1994) realizaron un experimento en el que expusieron a machos de trucha arcoíris *O. mykiss* en jaulas a efluentes de aguas residuales, encontrando que los machos llegaron a producir concentraciones de vitelogenina en plasma mayores ($100 \text{ mg}\cdot\text{ml}^{-1}$) de las que normalmente se encuentran en hembras totalmente maduras, no identifican la sustancia con efectos estrogénicos que ocasionara esta respuesta sin embargo argumentan que posiblemente se trate de etinilestradiol, procedente de uso farmacéutico, o alquiflenoles-etoxilatosx procedentes de la biodegradación de los tensioactivos y detergentes.

En 2007, Vega y colaboradores, realizaron un estudio evaluando los efectos estrogénicos de PCBs sobre *Girardinichthys viviparus*, una especie de pez en peligro de extinción en México con una reducida distribución debido a la contaminación de su medio ambiente natural. La vitelogenina se determinó a través de un inmunoensayo (ELISA) mostrando que la mezcla comercial de PCBs fue estrogénica en ambos sexos.

Denslow y Sepúlveda en 2007, mencionan que los compuestos disruptores endocrinos (EDCs) se encuentran en el medio ambiente y pueden afectar la reproducción de los peces, y que dichos compuestos son de gran relevancia para la salud humana y la vida silvestre, ya que la señalización endocrina controla muchos procesos fisiológicos fundamentales que repercuten en la salud del individuo, tales como el crecimiento y el desarrollo, la respuesta al estrés, y en última instancia, la reproducción.

Scholz y Maier (2008) consideran que los peces pequeños representan un modelo rentable para las pruebas de potenciales EDCs porque permiten la posibilidad de integrar efectos fenotípicos y funcionales. Los autores recabaron datos de exposición-efecto a partir de cuatro diferentes especies modelo

pequeños: el pez cebra, medaka, carpita cabezona y pez espinoso. La mayoría de los datos disponibles se refieren a que los EDCs interfieren con las hormonas reproductivas, sin embargo, también incluyeron el efecto que tienen las interacciones con otros sistemas hormonales, en especial las hormonas tiroideas.

En 2013, Schiller y colaboradores discuten acerca de la demanda de ensayos rápidos y confiables para detectar disruptores endocrinos. La identificación de las características de los disruptores endocrinos que se encuentran en el medio ambiente acuático se basa en las pruebas de toxicidad con peces, la evaluación de los efectos adversos sobre la reproducción y el desarrollo sexual. Dos compuestos de referencia, 17α -etinilestradiol y flutamida, se pusieron a prueba para evaluar los efectos sobre el desarrollo y el transcriptoma después de 48 horas de exposición a peces cebra. La comparación de la respuesta del transcriptoma con otros compuestos estrogénicos y anti-androgénicos (genisteína, bisfenol A, metilparabeno, linurón, procloraz, propanil) mostró similitudes en las vías reguladas, por lo cual no pudieron clasificar la potencia estrogénica y anti-androgénica. Así mismo Arcand y Benson en 1998, coinciden con Schiller y colaboradores en que se necesita el desarrollo de técnicas que permitan predecir y evaluar con mayor precisión la importancia ecológica y los efectos de exposición a disruptores endocrinos. En su revisión, Arcand y Benson se centraron en la reproducción de peces como un indicador ecológico relevante de las alteraciones endocrinas, específicamente la actividad estrogénica. Los autores proponen un modelo para identificar criterios de valoración de exposición utilizando medaka japonesa (*Oryzias latipes*); este bioensayo se basa en la exposición durante eventos clave de desarrollo y es lo suficientemente flexible en el diseño para evaluar la toxicidad en el desarrollo de las larvas y en la reproducción de los adultos. Concluyen que hay tres criterios de valoración principales: A) los reproductivos que incluyen tiempo de desove, tamaño del huevo, viabilidad de los huevos, tiempo de eclosión y supervivencia de las larvas; B) los de exposición que incluyen a la producción de vitelogenina y la producción de hormonas esteroides; y 3) los histológicos

que incluyen el fenotipo gonadal, los estados de reproducción gonadal y sus anomalías.

En 2007, Burger y colaboradores, publican acerca de la importancia que tiene la diferenciación sexual y su afectación, afirman que los organismos machos y hembras pueden tener diferencias significativas en exposición, toxicocinética, y respuesta a los productos químicos, pero que los efectos género-específicos habían recibido relativamente poca atención, a menudo vistos como un factor de confusión en lugar de una importancia primordial. En ésta revisión afirman que sólo mediante el estudio de los animales silvestres, especialmente las especies nativas, se podrá verdaderamente entender el impacto potencial de los efectos de exposición género-específicos a sustancias químicas en las poblaciones.

Hay otros factores que afectan las respuestas a las sustancias químicas incluyendo la exposición, la edad, el tamaño, la estacionalidad y la variación genética y fenotípica. Una amplia gama de nuevas tecnologías y métodos están disponibles para examinar las diferencias relacionadas con el género en las respuestas a los productos químicos.

Uno de los estudios más recientes es el realizado por Ting y colaboradores en 2014, donde evaluaron el efecto de la exposición a largo plazo del di-(2-etilhexil) ftalato (DEHP). El objetivo del estudio fue examinar si la exposición a largo plazo al DEHP y su metabolito activo (MEHP) interrumpe la función endocrina en larvas de pez medaka (*Oryzias melastigma*). Las larvas fueron expuestas a DEHP (0,1 y 0,5 mg L⁻¹) o MEHP (0,1 y 0,5 mg L⁻¹) durante seis meses y se midieron los efectos en la reproducción, en las hormonas esteroides sexuales, la vitelogenina, la histología de las gónadas y la expresión de genes implicados en el eje hipotálamo-pituitaria gonadal (HPG). La exposición al DEHP, pero no MEHP, desde el nacimiento hasta la edad adulta aceleraron el inicio del desove y la disminución de la producción de huevos de las hembras expuestas. Por otra parte, la exposición a DEHP y MEHP resultó en una reducción en la tasa de fecundación de ovocitos generados por las hembras no tratadas

emparejadas con machos tratados. Por lo tanto, el DEHP ejerce efectos tóxicos más evidentes en comparación con MEHP. Se identificaron algunos puntos comunes en los efectos tóxicos y los mecanismos moleculares de DEHP y MEHP, lo que sugirió que algunos de los efectos tóxicos de DEHP pueden ser inducidos. Estos resultados indican que la exposición al DEHP y MEHP desde el nacimiento hasta la edad adulta provoca alteraciones endocrinas con efectos sexo-específicos en peces medaka, siendo los machos más sensibles que las hembras.

Bajo este contexto, el presente trabajo pretende contribuir con la generación de información acerca de la posible exposición a compuestos estrogénicos en poblaciones silvestre de totoaba. Este trabajo forma parte de un proyecto integral e interinstitucional titulado “Estado de salud y estatus de conservación de la(s) población(es) de totoaba (*Totoaba macdonaldi*) en el Golfo de California: una especie en peligro de extinción”.

III. JUSTIFICACIÓN

La totoaba (*Totoaba macdonaldi*) es una especie catalogada en peligro de extinción por lo tanto es importante generar información acerca del estado actual de las poblaciones silvestres.

Con el incremento de los asentamientos humanos alrededor del Golfo de California, los niveles de contaminación también incrementan. Este nuevo escenario ecológico es un desafío para las poblaciones silvestres de cualquier organismo marino, especialmente para aquellas que se encuentran amenazadas. Además no existe evaluación alguna sobre la posible exposición a contaminantes ambientales en la totoaba que permita la valoración de la salud de las poblaciones, a pesar de que existen algunos antecedentes de la presencia de compuestos estrogénicos en el área de distribución y de que es una especie carnívora muy longeva.

IV. HIPÓTESIS

Si la totoaba (*Totoaba macdonaldi*) en el Golfo de California ha sido expuesta a compuestos estrogénicos, esto se verá reflejado en la alteración de los indicadores reproductivos y la expresión de vitelogenina en machos.

V. OBJETIVOS

Evaluar por medio del análisis de parámetros reproductivos y niveles de expresión de vitelogenina la posible exposición a compuestos estrogénicos en la totoaba (*Totoaba macdonaldi*) del Golfo de California.

Objetivos particulares

- 1) Determinar la época de reproducción (mediante histología e índice gonadosomático) y compararla con reportes anteriores.
- 2) Determinar la proporción de sexos de totoaba en el Golfo de California y compararla con los reportes previos disponibles.
- 3) Medir los niveles de expresión de vitelogenina tanto en hembras como en machos durante el periodo de muestreo.

VI. METODOLOGÍA

6.1 Muestreo

Se recolectaron 365 muestras de hígado de *T. macdonaldi* tanto de machos, hembras y algunos organismos no diferenciados. Los muestreos se realizaron a bordo de embarcaciones de pesca deportiva y pesca artesanal mediante el uso de cañas y una red con luz de malla 10" con una longitud aproximada de 150 m. Debido a que la totoaba es una especie protegida se solicitaron permisos de pesca para muestreo científico: SGPA/DGVS/02913/10 y SGPA/DGVS/05508/11.

Se realizaron muestreos dentro de periodos comprendidos entre abril-mayo 2010, noviembre 2010, febrero 2011, marzo 2011, octubre 2011, noviembre-diciembre 2011, abril 2012, enero 2013 y marzo-abril 2013.

La colecta se realizó a lo largo del Golfo de California, por medio de un muestreo estratificado comprendiendo un total de cuatro puntos (Figura 4):

- I) desde la desembocadura del Río El Fuerte en Sinaloa hasta la Isla Tiburón en Sonora.
- II) desde la Isla Tiburón hasta el delta del Río Colorado en Sonora.
- III) desde el delta del Río Colorado en Baja California hasta la Isla Ángel de la Guarda.
- IV) desde la Isla Ángel de la Guarda hasta la Bahía Concepción en Baja California Sur.

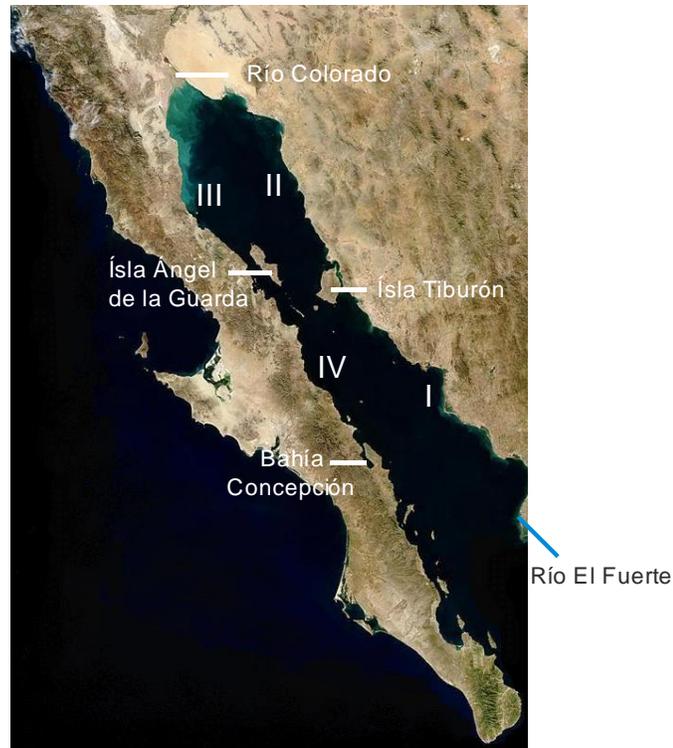


Figura 4. Área geográfica en la que se circunscribe el trabajo de investigación. Estratificación del Golfo de California en cuatro puntos de muestreo: I) Río El Fuerte-Isla Tiburón; II) Isla Tiburón-Río Colorado; III) Río Colorado-Isla Ángel de la Guarda; IV) Isla Ángel de la Guarda-Bahía Concepción.

6.2 Ciclo gonádico

El sexo de los organismos y el ciclo gonádico se identificó por medio de histología. Las muestras se fijaron inmediatamente después de la disección de los organismos en formaldehído al 4 % hasta ser procesadas de acuerdo con Luna (1968).

Los tejidos fijados se colocaron en histocassettes, se deshidrataron, aclararon y embebieron en parafina en un histoquinette. Se colocaron con parafina en un molde utilizando un histoembebedor. A continuación los tejidos se cortaron a 5 μm de grosor en un microtomo y se desparafinaron a 50 °C. La rehidratación y tinción de los tejidos se realizó en un tren de tinción con solución de hematoxilina-eosina (H&E). Los tejidos teñidos se montaron con resina sintética en cubreobjetos y finalmente se dejaron secar a 37 °C (Luna, 1968).

Los cortes histológicos se observaron en un microscopio óptico y las imágenes se capturaron en un sistema digital integrado.

6.3 Índice gonadosomático (IGS)

El índice gonadosomático (IGS) está en función de la proporción del tejido gonadal respecto al peso corporal del organismo, lo que es directamente proporcional al desarrollo y maduración gonadal (Rodríguez y Maraño, 1993).

Se esperaría que en estadios de maduración avanzada el IGS sea mayor, tanto en hembras como en machos, por lo que en conjunto son utilizados para comparar la salud reproductiva de la población en el ecosistema (Devlin y Nagahama, 2002).

A partir de los datos morfométricos, se calculó el IGS de los peces por medio de la ecuación propuesta por Rossenblum y colaboradores en 1987, tomado de Rodríguez y Maraño (1993).

$$\text{IGS} = (\text{Wg} / \text{Wt}) \times 100$$

Donde

Wg = Peso fresco de la gónada (g)

Wt = Peso total del ejemplar (g)

6.4 Proporción de sexos

Para el análisis de la proporción de sexos se revisó el porcentaje de hembras, machos e individuos indiferenciados en el periodo de muestreo 2010-2013. Por otro lado la identificación de los estadios de maduración gonádica se realizó con base en los estadios de maduración ovárica establecidos por Merson y

colaboradores (2000) y los estadios de maduración testicular establecidos por Gutiérrez (2002).

6.5 Expresión relativa de vitelogenina mediante qPCR

El análisis de expresión de vitelogenina se realizó mediante PCR cuantitativa en tiempo real (qPCR) utilizando un gen de referencia para la estimación de expresión relativa. Para esto, las muestras de hígado se preservaron en RNAlater (Ambion). El ARN total fue extraído con TRIZOL (Introvigen) (anexo 1-A) seguido por digestión con DNAsa I (anexo 1-B). La síntesis de ADNc se llevó a cabo a 45°C con 5 µg de ARN total, transcriptasa reversa MMLV (Promega) y hexanucleótidos aleatorios (random primers) (anexo 1-C).

Los oligos degenerados para amplificar el gen de vitelogenina fueron los siguientes: vtg-F 5' AAR ACC TAT GTG TAC AAG TAT GAG G 3' y vtg-R 5' GTC TTC TTG AKG TTR AGC TG 3' (donde K = G/T, Y = C/T, W = A/T, R = A/G). Las condiciones de PCR fueron: un ciclo a 94°C 1.5 min, y 35 ciclos a 94°C 1 min, 50°C 1 min, 72°C 1 min, obteniendo productos de 358 bases para vitelogenina (anexo 1-D). Los productos de PCR fueron purificados y ligados en un vector pGEM-T (Promega) (ver Anexo 1-F y G). Las transformaciones se llevaron a cabo en células competentes de *E. coli* DH5α (Invitrogen) (anexo 1-H, I, y K). Las clonas positivas fueron secuenciadas en macrogen Inc (Corea). Las secuencias obtenidas fueron verificadas mediante la comparación con otros genes en la base de datos de GenBank (NCBI), encontrando que tenía una gran similitud con la vitelogenina de otras especies de peces. A partir de las secuencias parciales de vitelogenina, se diseñaron oligos específicos para la eficiente amplificación por qPCR (Tm 60°C; 220 pb): toto-vtg-F 5' ATC TTC GAG TAC AGC GGC ATT TG 3' y toto-vtg-R 5' CAC AGT TGC AGA GAC TCC AAT CG 3'. Como gen de referencia, se empleó al fragmento de 300 pb del ARN ribosomal18S (Tm 60°C): TOTO-rib-F 5' CTG AAC TGG GGC CAT GAT

TAA GAG 3' y TOTO-rib-R 5' GTC TTC GAA CCT CCG ACT TTC FTT 3, los cuales son específicos de la especie.

Se realizaron curvas estándar para los dos genes, las cuales relacionan el valor del ciclo umbral (Ct) en tiempo real con el número de copias en la muestra (diluciones seriadas), para el cálculo de la eficiencia de amplificación, utilizando la siguiente fórmula, publicada por Llera-Herrera *et al.*, (2012) basado en Bustin *et al.* (2009):

$$E = (10^{(-1/\text{pendiente})} - 1)$$

La amplificación de vitelogenina (gen de interés) y 18S (gen de referencia) se llevaron a cabo en un termociclador Bio-Rad CFX96 y el método de CT comparativo (Livak y Schmittgen, 2001). Las condiciones de amplificación tanto para vitelogenina como para el fragmento de gen ribosomal 18S fueron las siguientes: un ciclo a 94°C por 2 minutos y 40 ciclos de 1 minuto a 94°C, 1 minuto a 60°C y 1 minuto a 72°C (anexo 1-L).

6.6 Análisis estadísticos

Los datos fueron analizados mediante un Análisis de Varianza (ANOVA) de una vía, los datos no cumplieron los criterios de normalidad por lo cual se utilizaron los métodos de comparaciones pareadas por el método de Holm-Sidak para el índice gonadosomático (IGS) y comparaciones múltiples por el método de Dunnet para los datos de expresión relativa de vitelogenina. Adicionalmente, se llevó a cabo un análisis de correlación de Pearson entre el índice gonadosomático y la expresión de vitelogenina, para conocer la fuerza y proporcionalidad de éstas dos variables.

VII. RESULTADOS Y DISCUSIONES

Para el objetivo particular 1: **Determinar la época de reproducción (mediante histología e índice gonadosomático) y compararla con reportes anteriores**, los resultados son los siguientes.

Las clases reproductivas en hembras de *T. macdonaldi* se dividieron en seis estadios:

- Estadio I (crecimiento primario) que se caracteriza por la presencia de perinúcleolos tempranos (44 a 76 μm) que presenta varios nucléolos dispersos en el nucleoplasma (Figura 5).
- Estadio II (pre-vitelogénesis) en el que se observan perinúcleolos tardíos (76 a 102 μm) cuyos nucléolos se encuentran en la periferia del núcleo y alvéolos corticales distribuidos por todo el ovoplasma (Figura 6).
- Estadio III (vitelogénesis inicial-intermedia) pueden observarse ovocitos en vitelogénesis inicial (103 a 136 μm) y los ovocitos en vitelogénesis intermedia (227-360 μm) se caracteriza este estadio por el comienzo de la inclusión de glóbulos de vitelo y el incremento marcado de tamaño de los ovocitos (Figura 7).
- Estadio IV (vitelogénesis tardía-madurez) caracterizado por ovocitos vitelogénicos tardíos (400-502 μm) que aumentaron de tamaño por la acumulación de vitelo también se observa en éste estadio la fusión de los glóbulos de vitelo y ovocitos con migración de la vesícula germinal (Figura 8).
- Estadio V (ovulación) en el que se observan principalmente ovocitos hidratados (>600 μm) en esta fase la ovulación es evidente histológicamente por la pérdida de integridad del folículo (Figura 9).
- Estadio VI (desove) que se caracteriza por presentar folículos atrésicos y post-ovulatorios caracterizados por un lumen folicular grande en reabsorción (Figura 10).

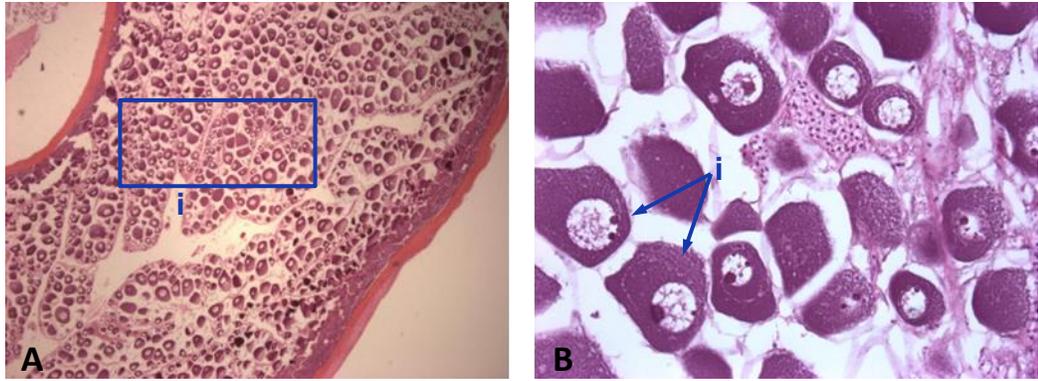


Figura 5. Estadio ovárico I. Estroma ovárico inmaduro de *T. macdonaldi* en crecimiento primario, se observan perinúcleolos tempranos (i). Tinción hematoxilina-eosina, A) 40X B) 200X.

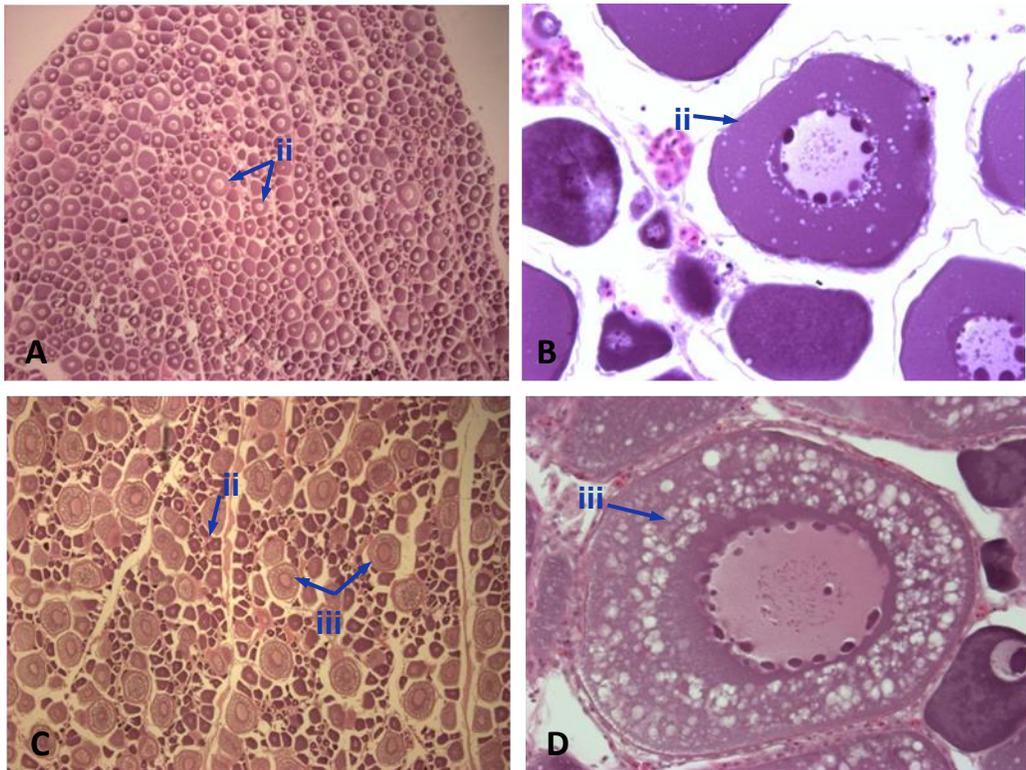


Figura 6. Estadio ovárico II, Pre-Vitelogénesis. Ovario de *T. macdonaldi* en el que se observan perinúcleolos tardíos (ii) y alvéolos corticales (iii). Tinción hematoxilina eosina, A) 40X, B) 200X, C) 40X y D) 200X.

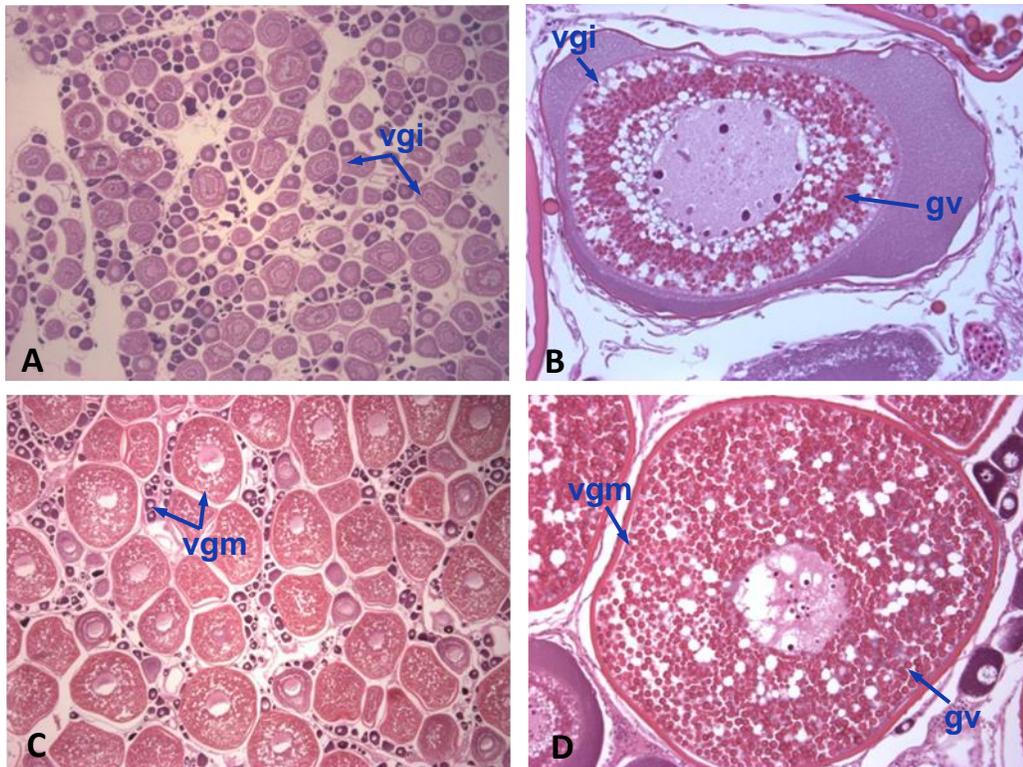


Figura 7. Estadio ovárico III, Vitelogénesis inicial-intermedia. Ovario de *T. macdonaldi* en el que se observan ovocitos en vitelogénesis inicial (vgi), intermedia (vgm) y glóbulos de vitelo (gv). Tinción hematoxilina-eosina, A) 40X, B) 100X, C) 40X y D) 100X.

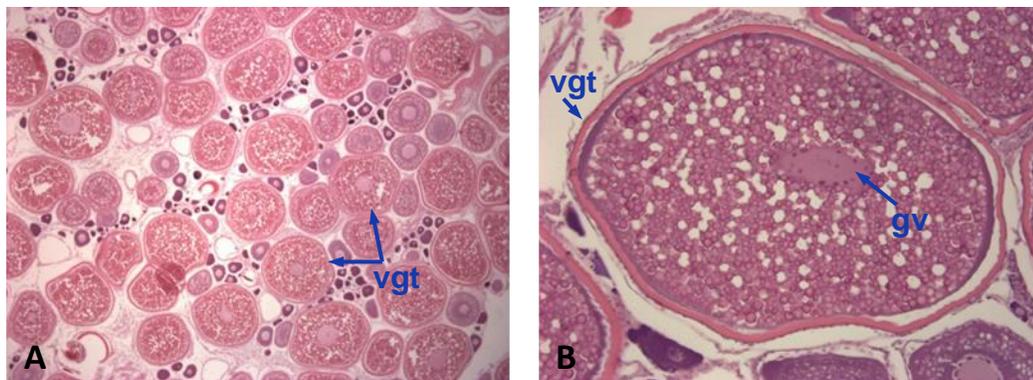


Figura 8. Estadio ovárico IV, Vitelogénesis tardía-madurez. Ovario de *T. macdonaldi* en el que se observan ovocitos en vitelogénesis terminal (vgt) con migración de la vesícula germinal (vg). Tinción hematoxilina-eosina, A) 40X y B) 100X.



Figura 9. Estadio ovárico V, Ovulación. Ovario de *T. macdonaldi* en el que se observan ovocitos hidratados (oh). Tinción hematoxilina-eosina 100X.

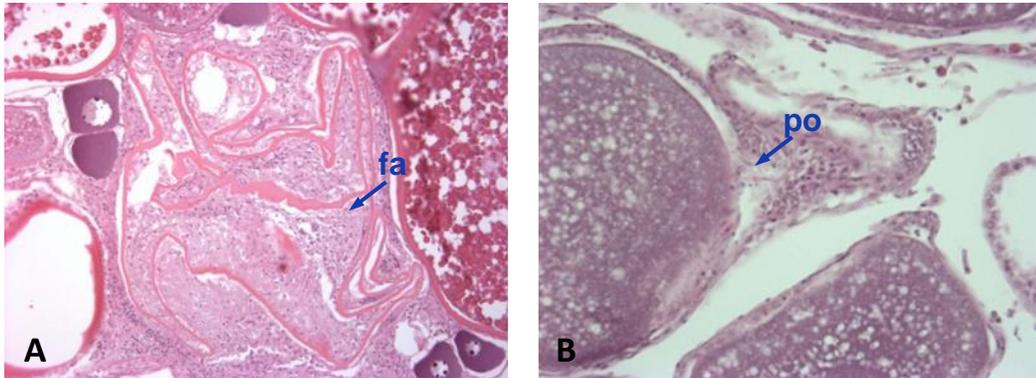


Figura 10. Estadio ovárico VI, Desove. Estroma ovárico de *T. macdonaldi* en el que se observan desoves parciales por la presencia de folículos atrésicos (fa) y folículos post-ovulatorios (po). Tinción hematoxilina-eosina, A) y B) 200X.

En el caso de teleósteos macho se manejan cinco clases reproductivas (quiescencia, maduración temprana, maduración intermedia, maduración avanzada y regresión) basadas en cambios del epitelio germinal masculino y los tipos de células germinales presentes. Se ha identificado en el desarrollo de *T. macdonaldi* cuatro de las cinco clases descritas para teleósteos:

- Estadio I (inmaduro) caracterizado histológicamente por la presencia de células germinales primarias y espermatogonias (Figura 11).
- Estadio II (maduración temprana) se puede observar el epitelio germinal continuo entre los conductos, el lumen parcialmente cerrado y se considera el inicio de la espermatogénesis (Figura 12).

- Estadio III (maduración intermedia) se observa un aumento en la profundidad del surco ventral del testículo, los lóbulos están alargados y las células germinales se encuentran en todas las etapas de la espermatogénesis y espermiogénesis (Figura 13).
- Estadio IV (maduración avanzada) aquí el testículo aumenta de tamaño de manera significativa con un profundo y más visible surco ventral (Figura 14).

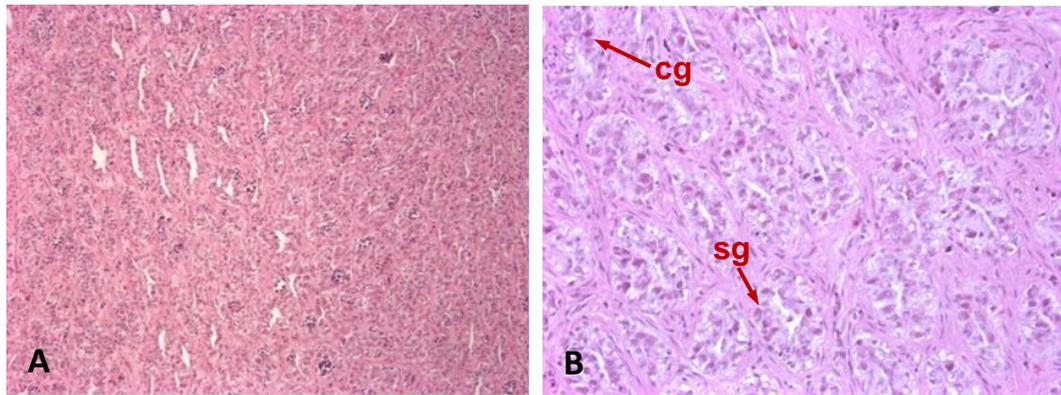


Figura 11. Estadio I, Inmadurez. Testículo de *T. macdonaldi* mostrando células germinales (cg) y espermatogonias (sg) inmersas en el tejido conjuntivo. Tinción hematoxilina-eosina, A) 100X y B) 400X.

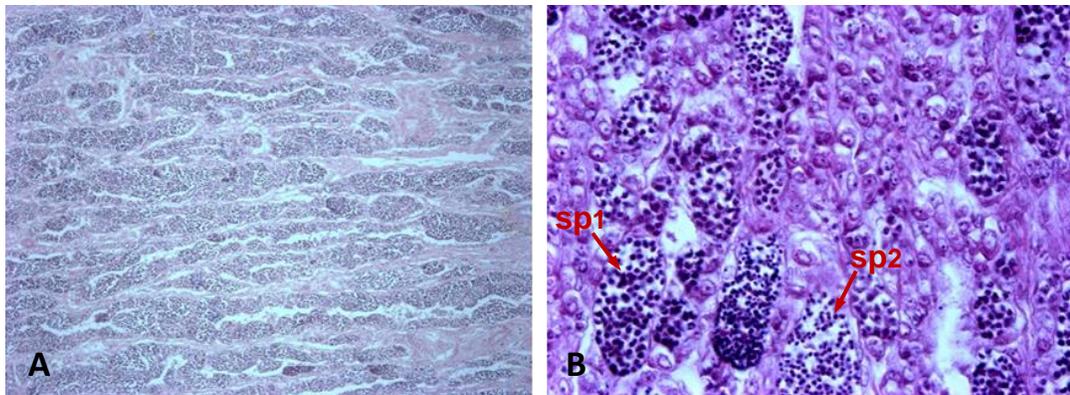


Figura 12. Estadio II, Maduración temprana. Testículo de *T. macdonaldi* en el que se observan espermatoцитos primarios (sp1) y secundarios (sp2). Tinción hematoxilina-eosina, A) 100X y B) 400X.

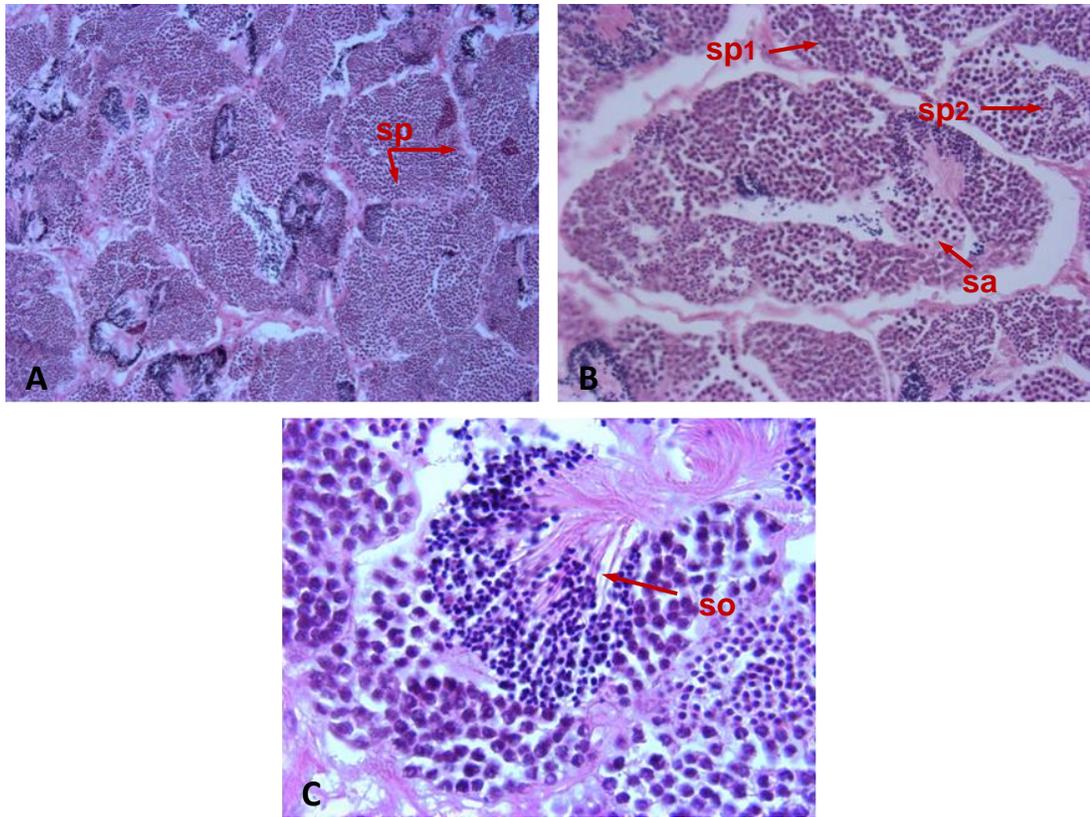


Figura 13. Estadio III, Maduración intermedia. Testículo de *T. macdonaldi* donde se observan espermatocitos (sp) primarios (sp1) y secundarios (sp2), espermatidas (sa) y espermatozoos (so) libres con las caudas orientadas hacia el lumen. Tinción hematoxilina-eosina, A) 100X, B) 400X y C) 1000X.

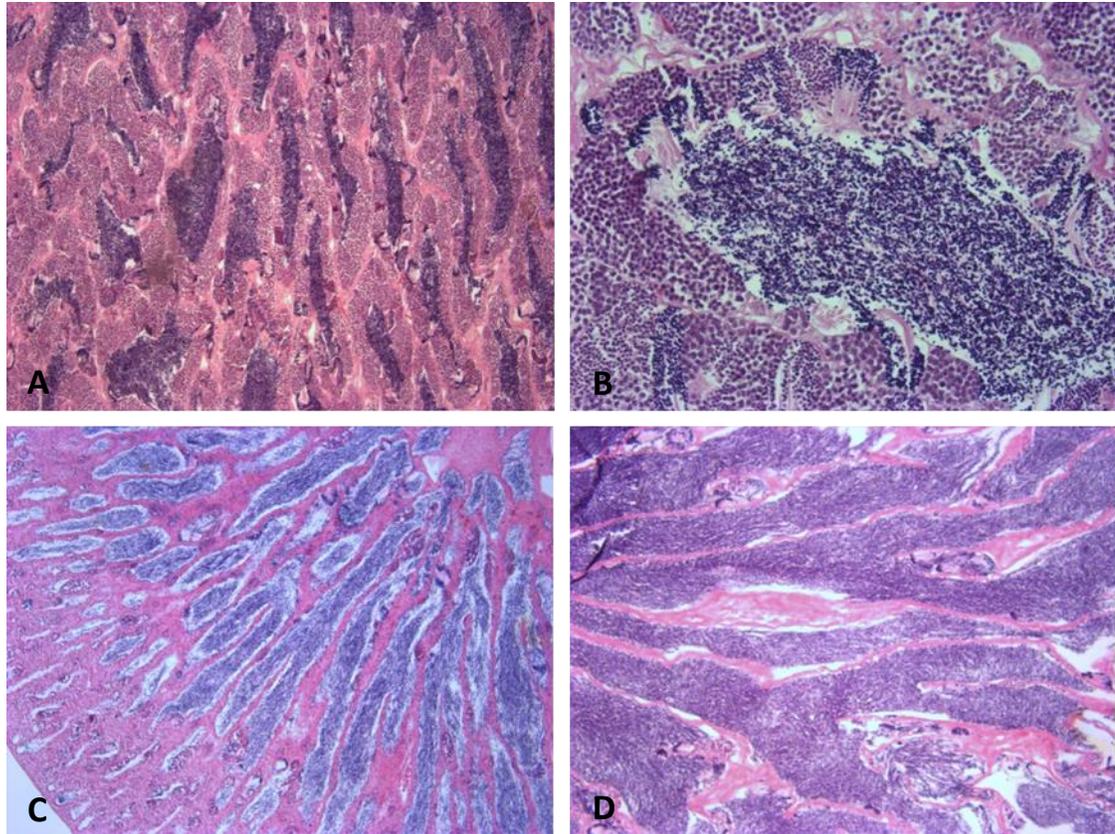


Figura 14. Estadio IV, Maduración avanzada. Testículo de *T. macdonaldi* en el que se observa epitelio germinal discontinuo, se observan abundantes espermatozoos (so). Tinción hematoxilina-eosina, donde A) y C) 100X y B) y D) 400X.

No se encontraron gónadas hermafroditas o intersex que pudieran sugerir una alteración física por una posible exposición a xenoestrógenos o antiandrogénicos, hasta este momento la totoaba no presenta signos de exposición a contaminantes género-específico o que alteren su desarrollo gonadal, sin embargo es necesario revisar los demás parámetros para poder hacer un diagnóstico más certero.

Para el análisis de índice gonadosomático se tuvo un tamaño de muestra de 245 individuos debido a que fueron las muestras que contaban con la información suficiente para determinar su IGS, de las cuales 113 fueron hembras y 132 machos. En la figura 15 se observa que los datos se comportan de forma ascendente de acuerdo a la madurez del organismo, lo cual es congruente pues conforme avanza la época reproductiva y los peces empiezan

a madurar, el tamaño del organismo también va en aumento, este índice también se conoce como coeficiente de madurez (West, 1990).

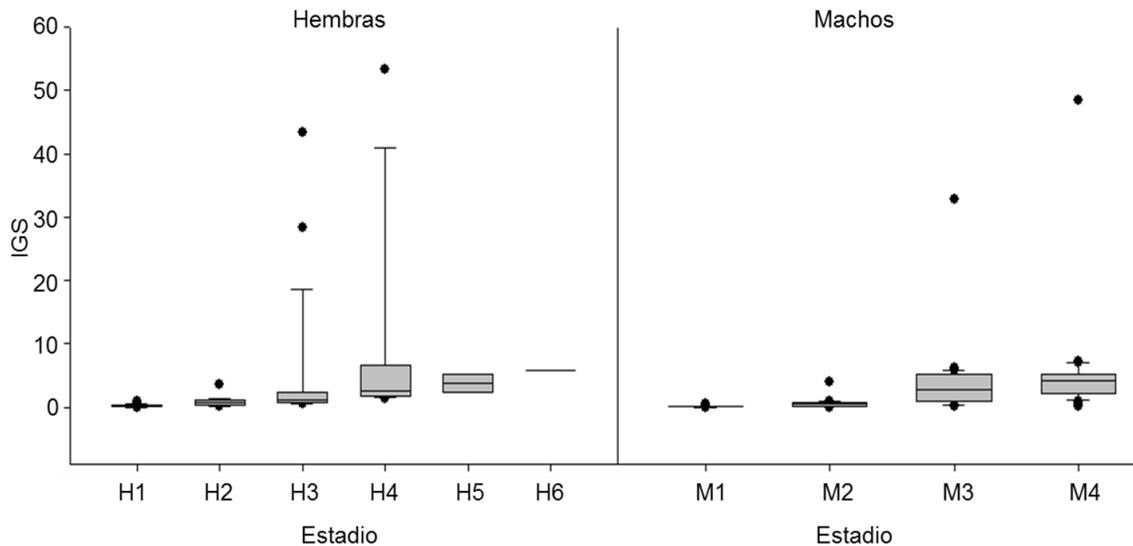


Figura 15. Índice gonadosomático de población de totoaba de acuerdo al estadio de los organismos, donde H1: hembra en crecimiento primario; H2: hembra en previtelogénesis; H3: hembra en vitelogénesis inicial-intermedia; H4: hembra en vitelogénesis tardía-madurez; H5: hembra en ovulación; H6: hembra en desove; M1: macho inmaduro; M2: macho en maduración temprana; M3: macho en maduración intermedia y M4: macho en maduración avanzada. Letras diferentes indican diferencias significativas en IGS.

El índice gonadosomático (IGS) varió entre 0.015 a 53.26 para hembras y 0.015 a 32.78 para machos, mientras que Barrera-Guevara en 1990 reportó para hembras que el índice varió de 1.18 a 24.3 y para machos de 0.83 a 6.8.

Se realizó un Análisis de Varianza (ANOVA) de una vía para los datos de índice gonadosomático ($P < 0.050$) en las diferentes épocas del año 2010-2015 y se encontraron diferencias significativas ($P < 0.001$, ver Tabla 1), así que se realizó una prueba de comparaciones múltiples por el método de Holm-Sidak. En la figura 16 se observan valores mayores del IGS de febrero a mayo, coincidiendo con la época reproductiva previamente reportada en la literatura (Berdegué, 1955) (anexo 2-Tabla 11).

Tabla 1. ANOVA 1 vía para IGS de totoaba durante el periodo de muestreo.

Fuente de Variación	DF	SS	MS	F	P
Entre grupos	8	676.186	84.523	77.089	<0.001
Residual	251	275.205	1.096		
Total	259	951.391			

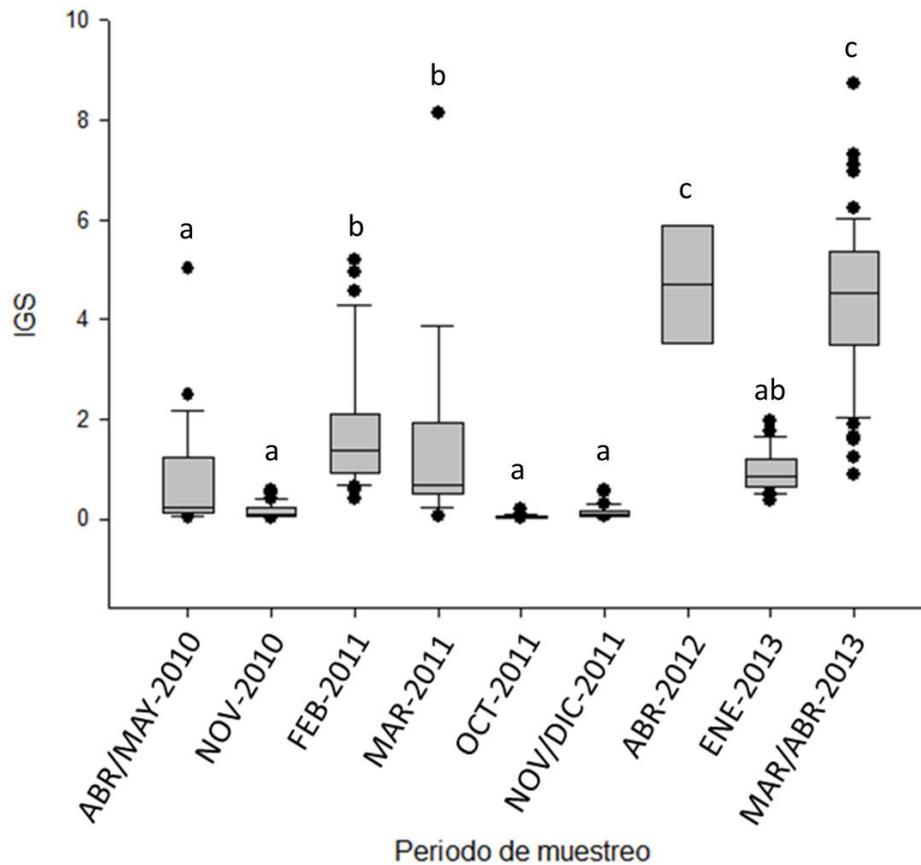


Figura 16. Índice gonadosomático, durante el periodo de muestreo. Letras diferentes indican diferencias significativas en IGS.

En la Figura 17 se muestra la distribución porcentual de los organismos muestreados de acuerdo a su madurez; los meses que tuvieron un menor índice gonadosomático, corresponden al periodo en el que se observan organismos indiferenciados o en etapas muy tempranas del ciclo reproductivo (octubre, noviembre y diciembre). Para este análisis se tuvo un tamaño de

muestra de 284 individuos, de los cuales 118 son hembras, 146 machos y 20 indiferenciados.

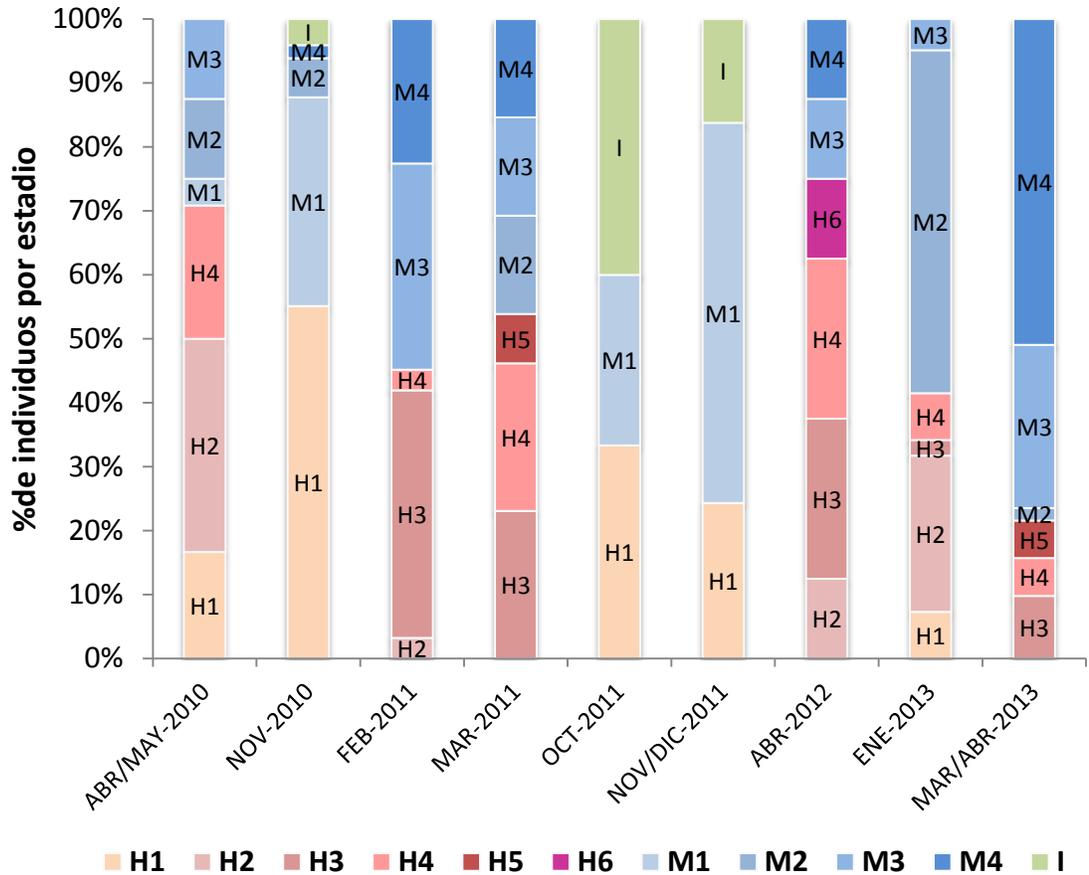


Figura 17. Época reproductiva de *Totoaba macdonaldi* donde H1: hembra en crecimiento primario; H2: hembra en previtelogénesis; H3: hembra en vitelogénesis inicial-intermedia; H4: hembra en vitelogénesis tardía-madurez; H5: hembra en ovulación; H6: hembra en desove; M1: macho inmaduro; M2: macho en maduración temprana; M3: macho en maduración intermedia; M4: macho en maduración avanzada y I: indiferenciados.

Se puede observar que los datos coinciden con lo reportado en la literatura, ya que la época de reproducción reportada se encuentra en los meses de Febrero a Mayo, y los únicos individuos indiferenciados se encuentran en los meses de octubre, noviembre y diciembre (Berdegué, 1955; Thompson, 1969; Barrera-Guevara, 1990; Cisneros, *et al*, 1995); sin embargo el sesgo de datos durante el periodo de muestreo 2010-2013, representó una limitante para poder determinar el ciclo reproductivo con más precisión.

Para el objetivo particular 2: **Determinar la proporción de sexos de totoaba en el Golfo de California y compararla con reportes previos disponibles**, los resultados son los siguientes:

La determinación de la proporción de sexos y la serie de cambios en la fase de madurez que ocurren durante el año son de enorme importancia para adquirir un conocimiento completo de la biología general de una población explotada y forman parte de su evaluación fundamental. Determinar la proporción sexual y las fases de madurez sexual tiene su aplicación primordial porque proporciona conocimientos fundamentales de la biología de la reproducción de una población.

La información obtenida de estos análisis puede emplearse para establecer la edad y talla a que los peces alcanzan la madurez sexual, el momento y lugar de la reproducción y la duración del ciclo desde el comienzo del desarrollo del ovario hasta la puesta de los huevos (FAO, 1975). Para este análisis se revisó el porcentaje de hembras, machos e individuos indiferenciados en el periodo de muestreo 2010-2013.

Se trabajó con un tamaño de muestra de 273 individuos de los cuales 118 fueron hembras, 135 machos y 20 individuos indiferenciados, de acuerdo con Guevara-Barrera (1990) proporción de sexos en 1990 era de 2H:1M, sin embargo en este periodo muestreado 2010-2013 se encontró una proporción 1H:1.14M. En la Figura 18, se muestra la proporción de sexos que se registró durante el periodo de muestreo 2010-2013.

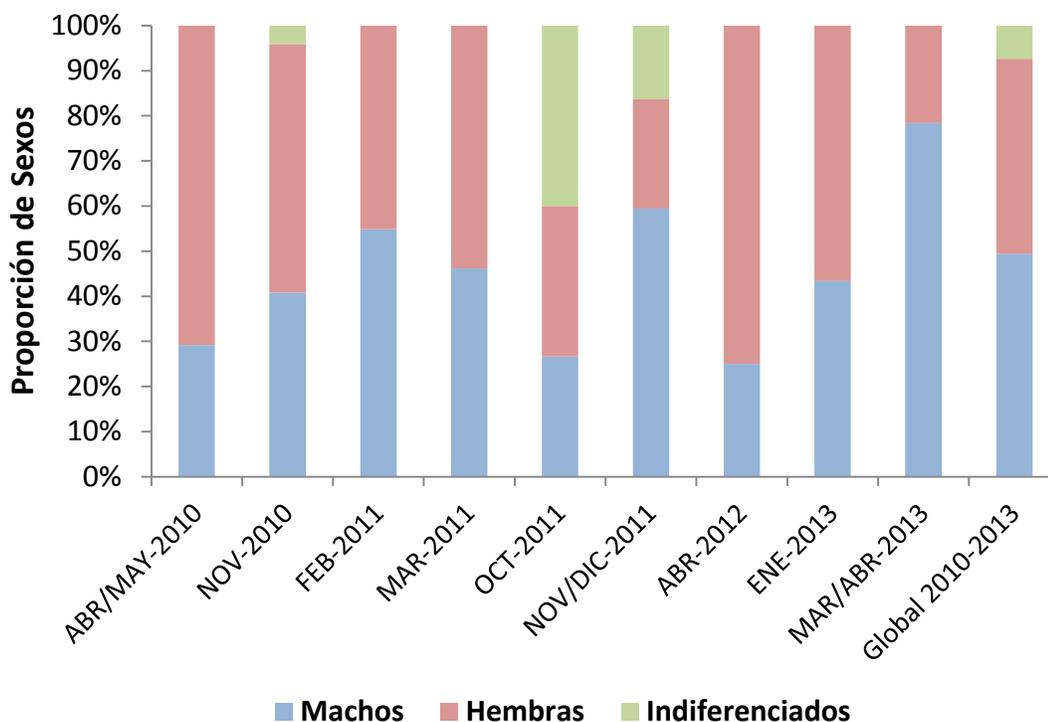


Figura 18. Proporción de sexos de totoaba durante el periodo de muestreo.

Se observa que si bien la proporción de sexos global en el periodo de muestreo 2010-2013 fue cercana a 1:1; si se aprecia una variación temporal, esta variación puede darse por la etapa en la que se encuentran en su ciclo reproductivo, edades de las cohortes representadas en cada muestreo, patrones de agregación, e incluso el arte de pesca, entre otras posibilidades.

La identificación del sexo de las gónadas es macroscópicamente posible debido a la presencia del surco ventral, que se hace más profundo con el avance de la madurez.

De acuerdo con Fisher (1930) las propias presiones de la selección hacen que en la mayoría de los casos la proporción de sexos en las poblaciones naturales tienda a ser 1:1 (50% machos y 50% hembras), sin embargo se ha demostrado que una proporción de sexos equilibrada está en realidad estratégicamente constituida por lo que evolutivamente mantenga a la población estable, es decir no necesariamente por una equidad en géneros, por ejemplo en 2013 Hadj, et

al., realizaron un estudio en donde evalúan la proporción de sexos en *Sparus aurata* y atribuyen al sesgo de esta proporción una reversión sexual natural ya que esta especie es hermafrodita y se conoce que tiende a favorecer la predominancia de machos en la familia Sparidae. Piferrer *et al.* (2005) observaron que si la temperatura del agua en la que se desarrollan las larvas de *Dicentrarchus labrax* es más elevada de lo normal (13-18°C), alrededor de unos 21°C, la proporción de machos aumenta al 80, 90 hasta al 100%.

En un estudio realizado en 2008 Soto-Rojas *et al.* encontraron diferencias en la proporción sexual de pargo *Lutjanus guttatus* de acuerdo a las reportadas con otros autores, tal es el caso del presente estudio, una de las atribuciones que argumentan es que este tipo de variaciones tienden a equilibrarse en la época de desove (Claro, 1994) por lo tanto la época del muestreo es el factor determinante para esta especie, a diferencia de esta especie la totoaba no se reproduce todo el año pero los picos de reproducción del pargo coinciden con los periodos de reproducción de la totoaba, así que este factor determinante también podría aplicar a la totoaba, los autores sugieren atribuir este factor a la demanda y distribución del alimento.

Entonces de acuerdo a la literatura una proporción de sexos sesgada puede atribuirse a diferentes factores, la diferencia de proporción de sexos entre el estudio previo por Barrera-Guevara en 1990 y la proporción observada en el periodo muestreado 2010-2013, no puede considerarse como positivo o negativo debido a que no hay un registro histórico constante de este dato, además el muestreo realizado por Barrera Guevara comprende una zona más delimitada de muestreo (más al alto Golfo de California, sin llegar a Sinaloa) en comparación a la que se muestreo en este periodo 2010-2013, sin embargo es importante y de gran utilidad continuar éstos estudios para conocer el panorama general de estatus de las poblaciones actuales.

Para el objetivo particular 3. **Medir los niveles de expresión de vitelogenina tanto en hembras como en machos durante el periodo de muestreo**, se obtuvieron los siguientes resultados:

Para las curvas estándar en los dos genes (vitelogenina, 18S ribosomal), se obtuvo una R^2 de 0.99 (Tabla 2 y Figuras 19 y 20), lo cual indica que los análisis son altamente reproducibles. Las eficiencias obtenidas (ribosomal $e=0.803$, vitelogenina $e=0.939$), demostraron que se cuenta con sensibilidad analítica y robustez en el análisis para vitelogenina.

Tabla 2. Datos de cq para curva estándar para ribosomal y vitelogenina.

Factor de Dilución	Log Copy Number	Ct 18S rRNA	Ct Vitelogenina
$1e^{-5}$	1	27.56	34.33
$1e^{-4}$	2	23.97	30.00
$1e^{-3}$	3	19.85	26.33
$1e^{-2}$	4	15.97	23.39
$1e^{-1}$	5	11.79	20.09
1	6	8.32	-

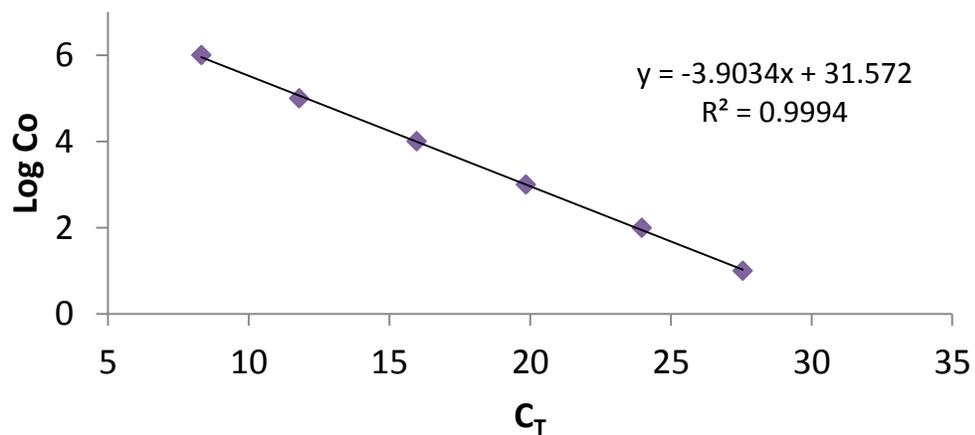


Figura 19. Curva estándar 18s ribosomal.

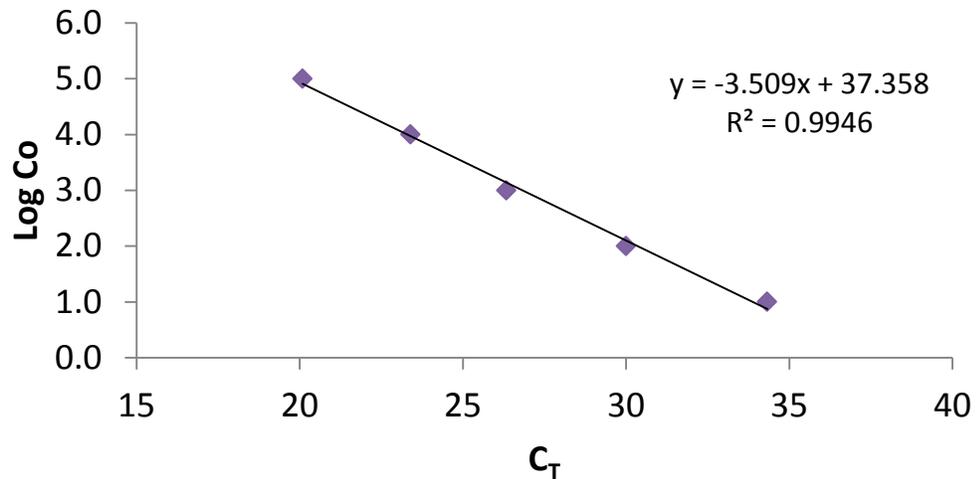


Figura 20. Curva estándar vitelogenina.

Después se realizó la cuantificación relativa de transcritos de vitelogenina. Se observó que la expresión de vitelogenina en hembras muestra un perfil asociado a la vitelogénesis, observando un aumento considerable en los niveles de expresión en las hembras desde el estadio H2 que corresponde a previtelogénesis; H3 a vitelogénesis inicial-intermedia y H4 a vitelogénesis tardía-madurez, con un decremento en los estadios H5 y H6, que corresponden a las hembras en ovulación y desove; en machos se observa un aumento en los niveles de expresión en los estadios M3 y M4 que corresponden a maduración intermedia y avanzada, alcanzando en algunos organismos valores comparables con los de las hembras en vitelogénesis.

Una vez obtenidos los datos de C_q, se analizaron los valores de hembras contra machos mediante un Análisis de Varianza (ANOVA) de una vía, (P<0.050) encontrando diferencias significativas (P<0.007, ver Tabla 3) por lo que se realizó una prueba de comparaciones múltiples contra un grupo control (machos) por el método de Dunnett, solo se encontró diferencia significativa entre los niveles de vitelogenina de machos respecto a los de las hembras del Estadio III (Figura 21, Anexo 2-Tabla 12), indicando que la expresión de vitelogenina en machos es estadísticamente diferente a la expresión de vitelogenina en hembras en vitelogénesis.

Sin embargo no se encontraron diferencias significativas en los niveles de expresión de vitelogenina en machos y hembras en los Estadios IV, V y VI (hembras maduras, en ovulación y desove) sugiriendo una posible exposición a compuestos estrogénicos. Cabe mencionar a que en esta zona en 1975 se registraron altos índices de DDT y sus metabolitos en almejas y sedimentos en el Valle de Mexicali y Alto Golfo de California (García-Hernández, *et al.*, 2001), sin embargo esto parece no afectar (aparentemente) la fisiología reproductiva de la población ni la diferenciación sexual, ya que no se encontraron gónadas intersex ni evidencias de feminización.

Tabla 3. ANOVA 1 vía machos (en general) contra cada estadio de hembras.

Fuente de Variación	DF	SS	MS	F	P
Entre grupos	5	7.89×10^{-8}	1.58×10^{-8}	3.329	<0.007
Residual	185	8.77×10^{-7}	4.74×10^{-9}		
Total	190	9.55×10^{-7}			

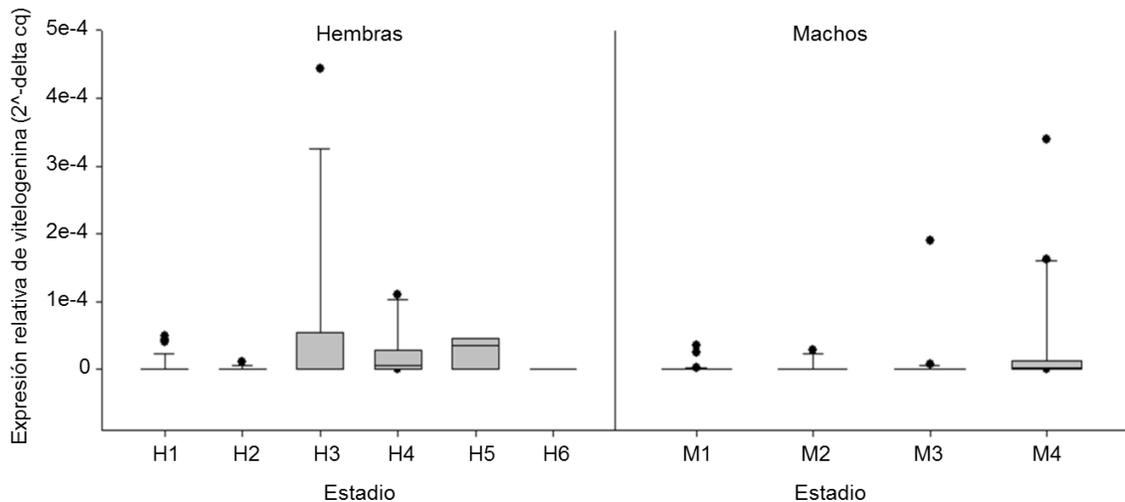


Figura 21. Expresión relativa de vitelogenina en hembras y machos de totoaba donde H1: hembra en crecimiento primario; H2: hembra en previtelogénesis; H3: hembra en vitelogénesis inicial-intermedia; H4: hembra en vitelogénesis tardía-madurez; H5: hembra en ovulación; H6: hembra en desove; M1: macho inmaduro; M2: macho en maduración temprana; M3: macho en maduración intermedia y M4: macho en maduración avanzada.

La expresión de vitelogenina es congruente en los diferentes estadios de hembras. Los machos expresan vitelogenina en niveles estadísticamente comparables con los de las hembras maduras, en ovulación y desove aunque con gran variabilidad individual (Figura 22), indicando cierta exposición a compuestos estrogénicos (unos machos más que otros) sin afectaciones reproductivas aparentes.

Aunque la producción agrícola en la península de Baja California no es destacada, se ha documentado la contaminación por PCBs, DDT, Chlore, HCB, Aldrin, Dieldrin, Endosulfan, Endrin y Lindano en tortugas marinas (Gardner, *et al.*, 2003). Diecisiete de 21 pesticidas organoclorados analizados fueron detectados, siendo Heptacloro epoxi (Chlore) presente en el 40% de las muestras y Hexaclorobenceno (HCB) presente en el 31% del total de las muestras, además de que se detectaron PCBs en todas las muestras.

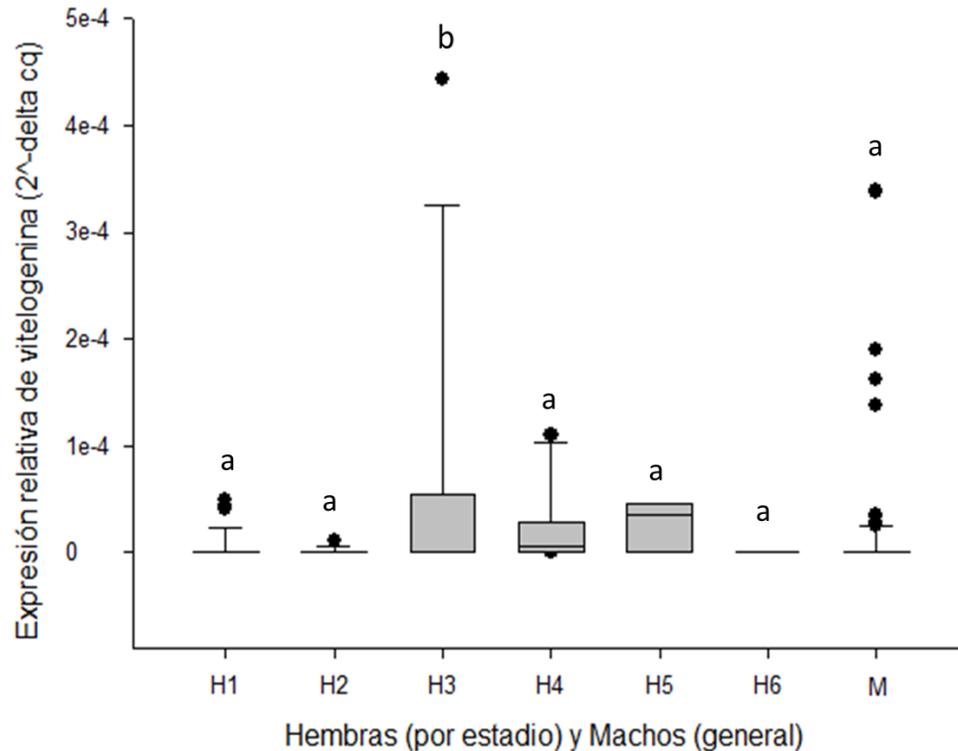


Figura 22. Expresión relativa de vitelogenina en hembras y machos de totoaba donde H1: hembra en crecimiento primario; H2: hembra en previtelogénesis; H3: hembra en vitelogénesis inicial-intermedia; H4: hembra en vitelogénesis tardía-madurez; H5: hembra en ovulación; H6: hembra en desove y M: machos en general. Letras diferentes indican diferencias significativas de la expresión de vitelogenina.

Se realizó la correlación de Pearson entre la expresión relativa de vitelogenina y el IGS tanto en hembras como en machos de totoaba (Tabla 4, Fig. 23). La correlación entre índice gonadosomático y expresión de vitelogenina para hembras resultó ser baja pero significativa, indicando que la expresión de vitelogenina incrementa con el desarrollo de la gónada, sin embargo se observan hembras con IGS alto y baja expresión de vitelogenina en la etapa de madurez, lo cual pudiera relacionarse a la presencia de la proteína en plasma, es decir la vitelogenina se expresa a niveles altos durante la vitelogénesis inicial-intermedia, pero la proteína se encuentra a mayores concentraciones durante la vitelogénesis tardía-madurez; por tanto el IGS es alto porque la gónada está completamente madura pero la vitelogenina ha dejado de transcribirse.

En machos no se encontró correlación significativa entre el IGS y la expresión de vitelogenina. Como se puede ver en la figura 23, algunos machos con IGS bajo presentaron expresión de vitelogenina alta (probablemente por exposición a compuestos estrogénicos) y sólo un macho presentó IGS alto pero baja expresión de vitelogenina. En la mayoría de los machos, tanto el IGS como la expresión de vitelogenina fueron bajos

Tabla 4. Coeficientes de correlación entre IGS y expresión de vitelogenina, para hembras y machos de totoaba, método de Pearson.

	Coeficiente de correlación	Significancia
Hembras	0.438	0.0000193
Machos	0.114	0.265

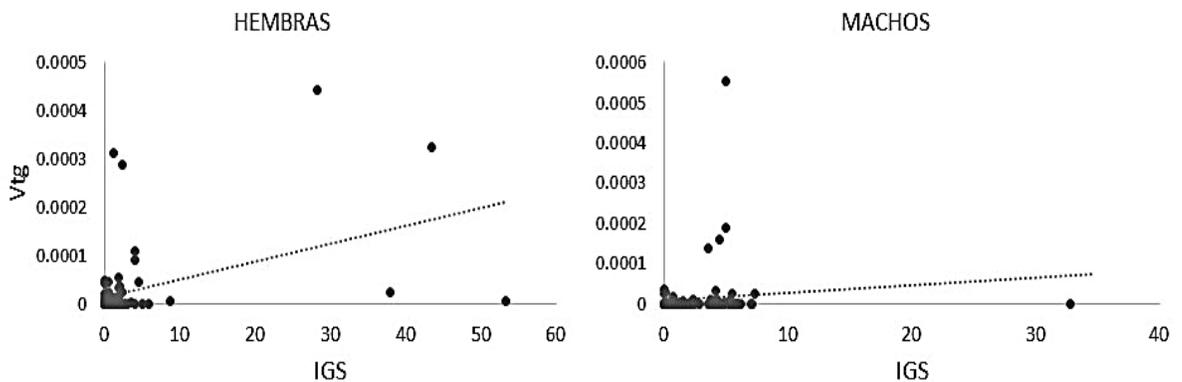


Figura 23. Análisis de correlación de Pearson entre índice gonadosomático (IGS) y expresión de vitelogenina (Vtg) en machos y hembras.

VIII. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

- La proporción de sexos de totoaba en Golfo de California en el periodo 2010-2013 fue de cercana a 1:1, difiriendo de un reporte previo en la que fue de 2H:1M. Se recomienda llevar un seguimiento de la proporción de sexos para obtener información histórica que nos lleve a un análisis más certero. No se encontraron gónadas intersex ni indicios de feminización por lo que no hay evidencia de alguna disfunción en la determinación o diferenciación sexual.
- La época reproductiva reportada en este estudio es congruente con estudios previos, lo cual indica que la especie no ha interrumpido su ciclo reproductivo a pesar de ser una especie en peligro de extinción. Sin embargo sería conveniente tener muestreos que completen todos los meses del ciclo reproductivo para poder determinarlo con precisión.
- Se detectaron niveles significativos de vitelogenina en machos, lo que sugiere potencial exposición a compuestos estrogénicos que no comprometen el ciclo reproductivo ni la diferenciación sexual.
- Integrando los resultados obtenidos en el presente estudio, se concluye que la totoaba (*Totoaba macdonaldi*) en el Golfo de California presenta buena salud reproductiva a pesar de las actividades agrícolas y la pesca clandestina, sin embargo se sugiere investigar las causas de la alta expresión de vitelogenina en machos a pesar de que no presentan evidencias histológicas en el desarrollo gonádico.

IX. LITERATURA CITADA

Arcand, L. y Benson, W. 1998. Fish Reproduction: an ecologically relevant indicator of endocrine disruption. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 17(1). 49–57 p.

Arias-Patrón, E. 2005. Plan de acción para el uso eficiente de agua dulce en el Golfo de California. Reporte técnico final para WWF. 64 pp.

Arvizu, J. y Chávez, H. 1972. Sinopsis sobre la Biología de la Totoaba *Cynoscion macdonaldi* Gilbert, 1891. Fisheries Synopsis N° 108. *Food and Agriculture Organization*, Roma, Italia. 26 pp.

Asuar, L. 2007. Ecología Molecular: Guía práctica sobre la técnica de PCR. Instituto Nacional de Ecología SEMARNAT. Primera edición. 520-523 pp.

Barrera-Guevara, J. 1990. The conservation of *Totoaba macdonaldi* (Gilbert), (Pisces: Sciaenidae), in the Gulf of California, México. *J. Fish Biol.* 37: 201-202.

Bejarano, F. 2004. Guía Ciudadana para la aplicación del Convenio de Estocolmo. Primera Edición. ISBN. 220 pp.

Berdegúe, A.J., 1955. La pesquería de la totoaba (*Cynoscion macdonaldi*), en San Felipe, Baja California. *Revista de la Sociedad Mexicana de Historia Natural*. 16(1-4): 45-78 p.

Bern, H., Blair, P., Basseur, S., Colborn, T., Cunha, G., Davis, W., Dohler, C., McLachlan, J., Myers, J., Peterson, R., Reijnders, P., Fox, G., Fry, M., Gray, E., Green, R., Hines, M., Kubiak, T., Soto, A., Van Der Kraak, G., Vom Saal, F. y Whitten, P. 1992. Statement from the work session on chemically-induced alterations in sexual development: the wildlife/human connection. *Chemically-Induced Alterations in Sexual and Functional Development: The Wildlife/Human Connection*. Princeton Scientific Publishing Co., NJ, U.S. 8 pp.

Burger, J., Fossi, C., McClellan-Greenc, P. y Orlando, E. 2007. Methodologies, bioindicators, and biomarkers for assessing gender-related differences in wildlife exposed to environmental chemicals. *Environmental Research*. 104. 135–152 p.

Bustin, S., Benes, V., Garson, J., Hellemans, J., Huggett, J., Kubista, M., Mueller, R., Nolan, T., Pfaffl, M., Shipley, G., Vandesompele, J., Wittwer, C. 2009. The MIQE Guidelines: Minimum information for publication of quantitative Real-Time PCR experiments. *Clinical Chemistry*. 55: 611-622 p.

- Canales, A., De Celis, R., Salado, H. y Feria, A. 2003. Xenoestrógenos: Función y Efectos. *e-Gnosis*. México. 1(2): 11 pp.
- Cannon, R., 1966. The Sea of Cortez. Lane Magazine and Book Co. *Menlo Park*, California, 283 pp.
- Carvalho, F., Fowler, S., González-Farías, F., Mee, L. y Readman, J. 1996. Agrochemical residues in the Altata-Ensenada del Pabellón coastal lagoon (Sinaloa, Mexico): a need for 56 integrated coastal zone management. *International Journal of Environmental Health Research*. 6: 209-220 p.
- Castelló, F. 1993. Acuicultura marina: fundamentos biológicos y tecnología de la producción. Universitat Barcelona. Cuarta edición. España. 739 pp.
- Chávez, H. 1973. Descripción de los ejemplares juveniles de totoaba *Cynoscion macdonaldi* (Gilbert, 1890). *Rev. Soc. Mex. Hist. Nat.* 34: 293-300 p.
- Chen, T. 1983. Identification and characterisation of estrogen responsive gene products in the liver of the rainbow trout. *Biochem Cell Biol* 61: 802-810 p.
- Chichizola, C. 2003. Disruptores Endocrinos. Efectos en la Reproducción. *Revista Argentina de Endocrinología y Metabolismo*. 40(3): 1-17 p.
- Cisneros, M., Botsford, L. y Quinn, J. 1997. Projecting viability of *Totoaba macdonaldi*, a population with unknown age-dependent variability. *Ecol. Applic.* 7: 968-980 p.
- Cisneros, M., Montemayor, G. y Román, M. 1995. Life history and conservation of *Totoaba macdonaldi*. *Cons. Biol.* 9: 806-814 p.
- CITES. 2014. Appendixes I, II and III (12/01/2014). Convention on International Trade in Endangered Species of Wild Fauna and Flora. Brussels, Belgium. 93 pp.
- CNA. 2004. Estadísticas del agua en México. Comisión Nacional del Agua, México. Comisión de Servicios de Agua del Estado (COSAE). 2003. Reseña del Acueducto Río Colorado-Tijuana.
- Copeland, P., Sumpter, J., Walker, T. y Croft, M. 1986. Vitellogenin levels in male and female rainbow trout (*Salmo gairdneri* Richardson) at various stages of the reproductive cycle. *Comp Biochem Physiol.* 83: 487-493 p.
- Corella, D. y Ordovás, J. 2015. Biomarkers: background, classification and guidelines for applications in nutritional epidemiology. *Nutr Hosp.* 31(3): 177-188 p.
- Csirke, J. 1980. Introducción a la dinámica de poblaciones de peces. FAO, Doc *Téc. Pesca*. 192: 82 p.

- Denslow, N. y Sepúlveda, M. 2007. Ecotoxicological effects of endocrine disrupting compounds of fish reproduction. *The Fish Oocyte: From Basic Studies to Biotechnological Applications*. 255–322 p.
- Derosa C., Stevens, Y., Wilson, J., Ademoyero, A., Buchanan, S. y Cibulas, W. 1993. The agency for toxic substances and disease registry role in development and 18 application of biomarkers in public health practice. *Toxicol Ind Health*. 9(6): 979-995 p.
- Devlin, R. y Nagahama, Y. 2002. Sex determination and sex differentiation in fish: an overview of genetic, physiological and environmental influences. *Aquaculture*. 208: 191-364.
- Di Giulio, R. y Tillitt, D. 1999. Reproductive and Developmental Effects of Contaminants in Oviparous Vertebrates. SETAC. 464 pp.
- EPA. 2002. Persistent Organic Pollutants. United States Environmental Protection Agency. Office of International Affairs (2610R) 26 pp.
- FAO. 1972. Sinopsis sobre la biología de la totoaba, *Cynoscion macdonaldi* Gilbert, 1890. FAO Fisheries Synopsis No. 108 SAST-totoaba- I. 70 (37): 27 pp.
- FAO. 1975. Manual de ciencia pesquera. Parte 2 - Métodos para Investigar los Recursos y su Aplicación. Redactado por Holde, M. y Raitt, D. <http://www.fao.org/docrep/003/f0752s/F0752S05.htm> Fecha de consulta: el 13 de Agosto de 2014 a las 17:34 hrs.
- FAO, 2004. El estado mundial de la pesca y la acuicultura. Parte 2: Temas de interés para los pescadores y acuicultores. 36 pp.
- Fisher, R. 1930. La teoría genética de la selección natural. Ed. J. H. Bennet. Oxford University Press 2006. 318 pp.
- Flanagan, C. y Hendrickson, J. 1976. Observations on the commercial fishery and reproductive biology of the totoaba *Cynoscion macdonaldi*, in the northern Gulf of California. *Fishery Bulletin*. 74, 531-544 p.
- Galindo-Reyes, G., Villagrana-Lizarraga, C. y Álvarez, G.L. 1999. Environmental conditions and pesticide pollution of two coastal ecosystems in the Gulf of California, Mexico. *Ecotoxicology and Environmental Safety*. 44(3): 280-286 p.
- Galindo-Reyes, G., Leyva, N. R., Millan, O. A. y Lazcano, G. A. 2002. Effects of pesticides on DNA and protein of shrimp larvae *Litopenaeus stylirostris* of the California Gulf. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 53(2): 191-195 p.
- Galván, A., Tejada, M., Camargo, A., Higuera, J., Mariscal, V. y Fernández-Reyes, E. 1989. Aislamiento y purificación del DNA de un plásmido recombinante. *Bioquímica y Biología Molecular*. 39: 2 p.

- García-Hernández, J., King, K., Velasco, A., Shumilin, E., Mora, M. y Glenn, E. 2001. Selenium, selected inorganic elements, and organochlorine pesticides in bottom material and biota from the Colorado River delta. *J. Arid Env.* 49: 65-89 p.
- Gardner, S., Dawn, P., Raymond, W. y Arturo, J. 2003. Organochlorine contaminants in sea turtles from the Eastern Pacific. *Mar. Poll. Bull.* 46(9):1082-1089 p.
- Gómez, B. y Zúñiga, G. 2007. Genotoxicidad y potencial teratógeno. *Revista de divulgación científica y tecnológica de la Universidad Veracruzana.* 20: 3 p.
- Grandjean, P., Brown, S., Reavey, P. y Young, D. 1994. Biomarkers of chemical exposure: State of the art. *Clin Chem.* 40: 1360-1362 p.
- Gutiérrez, J. 2002. Clonación y expresión de un receptor de hormona glicoproteico en el ovario del botete *Sphoeroides annulatus* (Jenyns, 1842). Tesis de Maestría. Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, A. C. Unidad Mazatlán.
- Guzmán, C. y Zambrano, E. 2007. Compuestos disruptores endocrinos y su participación en la programación del eje reproductivo. *Revista de Investigación Clínica.* 59(1): 73-81 p.
- Hadj, T., Ghorbel, A., Hadj, M., Naden, B. y Jarboui, O. 2013. Proporción de sexos, reproducción y crecimiento de la dorada, *Sparus aurata* (Pisces: Sparidae), en el golfo de Gabes, Túnez. *Cienc. Mar.* 39(1): 101-112 p.
- Hendrickson, J. 1979. Totoaba: Sacrifice in the Gulf of California. *Ocean. Soc.* 12: 14-28 p.
- Herman, R. y Kincaid, H. 1988. Pathological effects of orally administered estradiol to rainbow trout. *Aquaculture.* 72: 165-172.
- Hernández, L. 2008. Ecología reproductiva de peces de arrecife rocoso en el sureste del Golfo de California. Tesis de doctorado, CICIMAR, IPN, La Paz, BCS, México. 199 pp.
- Herráez, Á., 2001. Biología molecular e ingeniería genéticas: conceptos, técnicas y aplicaciones en ciencias de la salud. Primera edición. *Elsevier.* 200-201 p.
- INEGI. 2000. xii Censo general de población y vivienda. México: inegi.
- INEGI. 2005. ii Conteo de población y vivienda. México: inegi.
- Jordan, D. y Evermann, B. 1986. The fishes of North and Middle America, U.S. *Nat. Mus. Bull.* 47 (2): 1400-1415 p.

Lercari, D. y Chávez, E. 2007. Possible causes related to historic stock depletion of the totoaba, *Totoaba macdonaldi* (Perciformes: Sciaenidae), endemic to the Gulf of California. *Fish. Res.* 86: 136-142 p.

Livak, K. y Schmittgen, T. 2001. Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real-Time Quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta C_T}$ Method. *Elsevier Science.* 25: 402–408 p.

Llera-Herrera, R., García-Gasca, A., Huvet, A. & Ibarra, A.M. 2012. Identification of a tubulin- α gene specifically expressed in testis and adductor muscle during stable reference gene selection in the lion's paw scallop *Nodipecten subnodosus*. *Marine Genomics*, 6: 33-44 p.

Lodish, B., Matsudaira, K., Krieger, S. y Zipursky, D. 2005. Biología celular y molecular.. Editorial Médica Panamericana Quinta edición. 365 pp.

Luckenbach, J., Kusakabe, M., Swanson, P. y Young, G. 2008. Unilateral ovariectomy increases egg size and reduces follicular atresia in the semelparous Coho Salmon, *Oncorhynchus kisutch*. *J Exp Zool.* 309: 468-476 p.

Luna L. 1968. Histopathologic methods and color atlas of special stains and tissues artifacts. Amer Histolabs Pub Dept. primera edición. 767 pp.

McCarthy, J. y Shugart, L. 1990. Biomarkers of environmental contamination. J.F. McCarthy & L.R. Shugart (Eds.). Lewis Publishers, Boca Raton, Florida. 475 pp.

Merson R., Casey, C., Martínez, C., Soffientino, B., Chandlee, M. y Speaker, J. 2000. Oocytes development en summer flounder: seasonal changes and steroids correlates. *Fish Biol.* 57: 182-196 p.

Monagas, P. 2007. Detección de compuestos organoclorados en tortugas marinas varadas en las islas canarias y causas de mortalidad. Universidad de las Palmas de Gran Canaria. Departamento de Patología Animal, Producción Animal, Bromatología y Tecnología de los Alimentos. Tesis doctoral. 257 pp.

Morales, C. 1999. Descripción del desarrollo embrionario de Totoaba (*Totoaba macdonaldi*) bajo condiciones de laboratorio. Tesis (Licenciatura). Universidad Autónoma de Baja California. 55 pp.

Mylonas C, A Fostier, S Zanuy. 2010. Broodstock management and hormonal manipulation of fish reproduction. *Gen Comp Endocrinol.* 165: 516-534 p.

Nagahama Y. 1983. The functional morphology of teleost gonads. In: Hoar WS, Randall DJ, Donaldson EM (eds) *Fish Physiology*. Academic Press, New York, USA. 9: 223-276 p.

Palmer, B. y Palmer, S. 1995. Vitellogenin induction by xenobiotic estrogens in the red-eared-turtle and African clawed toad. *Environ Health Persp* 103: 19-25 p.

Peakall, D., Walker, C. y Migula, P. 2012. Biomarkers: A Pragmatic Basis for Remediation of Severe Pollution in Eastern Europe. Springer Science and Business Media. 324 pp.

Pedrín, O., Córdova, M. y Delgado, M. 2001. Crecimiento y mortalidad de la totoaba, *Totoaba macdonaldi*, del alto golfo de California. INP. SAGARPA. México. *Ciencia Pesquera*. 15: 131-138 p.

Piferrer, F., Blázquez, M., Navarro, L. y González, A. 2005. Componentes genéticos, endocrinos y ambientales para la determinación y diferenciación sexual en lubina europea (*Dicentrarchus labrax*). *Gen. Comp. Endocrinol.* 142: 102-110 p.

Pitcher, T., Ainsworth, C., Buchary, E., Cheung, W., Forrest, R., Haggan, N., Lozano, H., Morato, T. y Morissette, L. 2005. Strategic management of marine ecosystems using whole ecosystem simulation modelling: The “back to the future” policy approach. En Levner E, Linkov I, Proth JM (Eds.) *Strategic Management of Marine Ecosystems*. Springer Holanda. 199-258 p.

Purdom, C., Hardiman, P., Bye, V., Eno, N., Tyler, C. y Sumpter, J. 1994. Estrogenic effects of efluents from sewage treatment works. *Chem Ecol* 8: 275-285 p.

Readman, J., Kwong, L., Mee, L., Bartocci, J., Nilve, G., Rodríguez-Solano, J., y González-Farías, F. 1992. Persistent organophosphorus pesticides in tropical marine environments. *Mar. Poll. Bull.* 24: 398-402 p.

Repetto, M. 1997. Diagnóstico de la intoxicación. *Tox. Fund.* Madrid. 327-333 p.

Ríos-Sicairos, J. 2004. Análisis comparativo de la condición biológica de la lisa blanca (*Mugil curema Valenciennes, 1836*) como indicador de estrés ambiental en dos sistemas lagunar-estuarinos de la costa sureste del golfo de California. Tesis de Licenciatura. Mazatlán, Sinaloa, México. 102 pp.

Ríos-Sicairos, J. 2008. Utilización de Biomarcadores en peces y moluscos como indicadores de estrés ambiental en lagunas costeras. Tesis Grado de Maestría en Ciencias. Mazatlán, Sinaloa, México. 115 pp.

Rodríguez, M. y Marañón, S. 1993. Relación del factor de condición múltiple con la reproducción de machos en la carpa *Cyprinus carpio*. *Inst. Cienc. Mar y Limnol. Univ. Nal. Autón. México.* 20(1): 105-113 p.

Román, M. 1994. Edad y crecimiento de la Totoaba (*Totoaba macdonaldi*) Gilbert en el alto Golfo de California Tesis (Maestro en Ciencias). Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada 90 pp

Salinas, Z., Martínez, S., Jaume, S. y Elorriaga, V. 2004. La educación ambiental en la conservación de los mamíferos marinos. *Panorama*. 48: 13-18 p.

Schiller, V., Wichmann, A., Kriehuber, R., Schäfers, C., Fischer, R. y Fenske, M. 2013. Transcriptome alterations in zebrafish embryos after exposure to environmental estrogens and anti-androgens can reveal endocrine disruption. *Reproductive Toxicology*. 42 (2013) 210– 223 p.

Scholz, S. y Mayer, I. 2008. Molecular biomarkers of endocrine disruption in small model fish. *Molecular and Cellular Endocrinology*. 293: 57-70 p.

SEMARNAT. 2013. Contaminantes Orgánicos Persistentes (COPs). <http://www.inecc.gob.mx/sqre-temas/765-sqre-cop#5>. Fecha de consulta: 2 de Julio de 2014.

Silbergeld, E. y Davis, D. 1994. Role of biomarkers in identifying and understanding environmentally induced disease. *Clin Chem* 40: 1363-1367 p.

Soto-Rojas, R., Mejía-Arana, F., Palacios, J. y Hiramatzu, K. 2008. Reproducción y crecimiento del pargo mancha *Lutjanus guttatus* (Pisces: Lutjanidae) en el Golfo de Nicoya, Costa Rica. *Rev. Biol. Trop.* 57(1-2): 125-131 p.

Sumpter, J. y Jobling, S. 1995. Vitellogenesis as a biomarker for estrogenic contamination of the aquatic environment. *Environ Health Perspect* 103: 173-178 p.

Thompson, R. 1969. "Tidal currents and general circulation". En: Environmental impact of brine effluents on Gulf of California. U.S. *Report Ins. and Dev. Prog. Rep.* 387 pp.

Ting, Y., Mei, K., Qiansheng, H., Chao, F., Yajie, C., Heqing, S. y Sijun, D. 2014. Exposure to DEHP and MEHP from hatching to adulthood causes reproductive dysfunction and endocrine disruption in marine medaka (*Oryzias melastigma*). *Aquatic Toxicology* 146 (14):115– 126 p.

Tyler, C. 1991. Vitellogenesis in salmonids. In: Scott AP *et al.* (eds) Reproductive physiology of fish. University of East Anglia. *Printing Unit*, Norwich. 295-299 p.

Valdebenito, I. 2008. Terapias hormonales utilizadas en el control artificial de la madurez sexual en peces de cultivo: una revisión. *Arch Med Vet.* 40: 115-123 p.

Valenzuela-Quíñonez, F., García-De-León, F., De-Anda-Montañez, J. y Balart, E. 2011. La Totoaba Del Golfo De California ¿Una Especie En Peligro De Extinción? . *Interciencia*. 36(9): 664-671 p.

Van Cauteren, H., De Kok, M. y Van Schooten, F. 1996. Cancer risk evaluation. Niesink, R., De Vries, J. and Hollinger, M. (eds). *Toxicology. Principles and applications*. New York. 384-413 p.

Vega, L., Martínez, T., Domínguez, L., García, L., Ramón, G. y García, G. 2007. Vitellogenin induction in the endangered goodeid fish *Girardinichthys viviparus*:

Vitellogenin characterization and estrogenic effects of polychlorinated biphenyls. *Comparative Biochemistry and Physiology, Part C* 142: 356–364 p.

West, G. 1990. Methods of assessing ovarian development in fishes: a review. *Aust. J. Mar. Freshwater Res.* 41: 199 – 222 p.

World Health Organization. 1996. Biological monitoring of chemical exposure in the workplace. Geneva: World Health Organization.

Zanuy, S. y Carrillo, M. 1987. La reproducción de los peces teleósteos y su aplicación en acuicultura. En: Espinosa de los Monteros, J. y Labarta, U. (eds). *Reproducción en acuicultura*. CAICYT. Madrid, España. 1-131 p.

Zanuy, S., Carrillo, M., Rocha, A. y Molés, G. 2009. II Regulación y control hormonal del proceso reproductor de los teleósteos. En: Carrillo, M., Espinosa de los Monteros, J. (eds). *La reproducción de los peces: aspectos básicos y sus aplicaciones en acuicultura*. Madrid, España. 97-172 p.

ANEXO 1

A) *Extracción de ARN total con Trizol*

El Trizol es un reactivo que se utiliza en el aislamiento de ARN de células y tejidos, es una solución mono-fásica de fenol e isocianato de guanidina que durante la homogenización o lisis de la muestra mantiene la integridad del ARN, al mismo tiempo que altera la estabilidad de las células y disuelve los componentes celulares. La adición de cloroformo seguida de centrifugación separa la muestra en dos fases, una de ellas acuosa y la otra orgánica, el ARN permanece exclusivamente en la fase acuosa y puede ser recuperado por precipitación con alcohol isopropílico, una vez removida la fase acuosa el ADN y las proteínas en la muestra pueden ser recuperadas por precipitaciones secuenciales de la misma.

- 1) Retirar el RNAlater de las muestras.
- 2) Homogenizar en 500 µl de Trizol.
- 3) Pasar el tejido a través de una jeringa.
- 4) Incubar 5 minutos a temperatura ambiente.
- 5) Añadir 100 µl de cloroformo y agitar vigorosamente.
- 6) Incubar a temperatura ambiente por 3 minutos.
- 7) Centrifugar a 12000 rpm por 15 minutos a 4° C.
- 8) Transferir el sobrenadante a un tubo limpio.
- 9) Añadir 250 µl de isopropanol al tubo con sobrenadante y agitar un poco.
- 10) Incubar a temperatura ambiente por 15 minutos.
- 11) Centrifugar a 12000 rpm por 10 minutos a 4° C.
- 12) Retirar sobrenadante.
- 13) Añadir al pellet 500 µl de etanol al 70%.

- 14) Centrifugar a 12000 rpm por 5 minutos a 4° C.
- 15) Retirar sobrenadante
- 16) Añadir 50 µl de agua DEPC para resuspender.

B) Tratamiento con ADNasa

Este tratamiento con la endonucleasa ADNasa elimina el ADN de la muestra, previniendo la contaminación por ADN genómico.

- 1) Preparar mezcla maestra para tratamiento con ADNasa (Tabla 3 A-1).
- 2) Agregar 15 µl de la mezcla a cada tubo.
- 3) Incubar 30 minutos a 37 °C
- 4) Añadir 6.5 µl de LiCl 4 M.
- 5) Añadir 65 µl de fenocloroformo y dar vórtex.
- 6) Centrifugar 10 minutos a temperatura ambiente.
- 7) Transferir el sobrenadante a un tubo limpio.
- 8) Agregar 2.5 volúmenes de etanol absoluto.
- 9) Precipitar toda la noche a -20 °C.
- 10) Centrifugar 15 minutos a 12000 rpm a 4 °C.
- 11) Retirar sobrenadante
- 12) Añadir 500 µl de etanol al 70%.
- 13) Centrifugar 15 minutos a 12000 rpm a 4 °C.
- 14) Retirar sobrenadante.
- 15) Agregar 40 µl de agua DEPC para resuspender.

Tabla 5 A-1. Mezcla maestra para tratamiento con ADNasa, volúmenes por muestra.

Agua DEPC	2 µl
Buffer ADNasa	6.5 µl
RNasin	0.5 µl
ADNasa	6 µl

C) Síntesis de ADNc

El ADN complementario o ADNc es un ADN de doble cadena. Se sintetiza a partir de una hebra simple de ARNm maduro. Se suele utilizar para la clonación de genes propios de células eucariotas en células procariontas, debido a que, dada la naturaleza de su síntesis, carece de intrones (Lodish, *et al.*, 2005).

- 1) Mezclar 5 μ l de ARN más 1 μ l de random primers.
- 2) Incubar a 70 °C por 10 minutos.
- 3) Preparar mezcla maestra para síntesis de ADNc (Tabla 4 A-1).
- 4) Añadir 14 μ l de la mezcla a cada tubo.
- 5) Incubar a temperatura ambiente por 10 minutos.
- 6) Incubar a 45 °C por una hora.
- 7) Incubar a 90-95 °C por 5 minutos.
- 8) Poner en hielo.
- 9) Almacenar a -20 °C.

Tabla 6 A-1. Mezcla maestra para síntesis de ADNc, volúmenes para una muestra.

Agua DEPC	7.7 μ l
Buffer 5x M-MLV	4 μ l
dNTP's 10 mM	1 μ l
ARNsin	0.5 μ l
M-MLV	0.8 μ l

Para la clonación del transcrito de VTG se llevaron a cabo los siguientes protocolos:

D) PCR

PCR son las siglas en inglés de Polymerase Chain Reaction o Reacción en Cadena de la Polimerasa. La idea básica de la técnica es sintetizar muchas veces un pedazo o fragmento de ADN utilizando una polimerasa que puede trabajar a temperaturas muy elevadas (Asuar, 2007). Esta técnica consiste en ciclos (Figura 24 A-1) repetitivos:

1. Desnaturalización del ADN por fusión a temperatura elevada, a fin de convertir el ADN bicatenario en ADN monocatenario (Asuar, 2007).
2. Unión (anillamiento) de dos oligonucleótidos, utilizados como cebadores (primers), al ADN diana. En este caso se utilizarán primers degenerados para la VTG de peces (Vega, *et al.*, 2007).
3. Extensión de la cadena de ADN por adición de nucleótidos a partir de los cebadores utilizando ADN polimerasa como catalizador, en presencia de iones Mg^{2+} (Herráez, 2001).

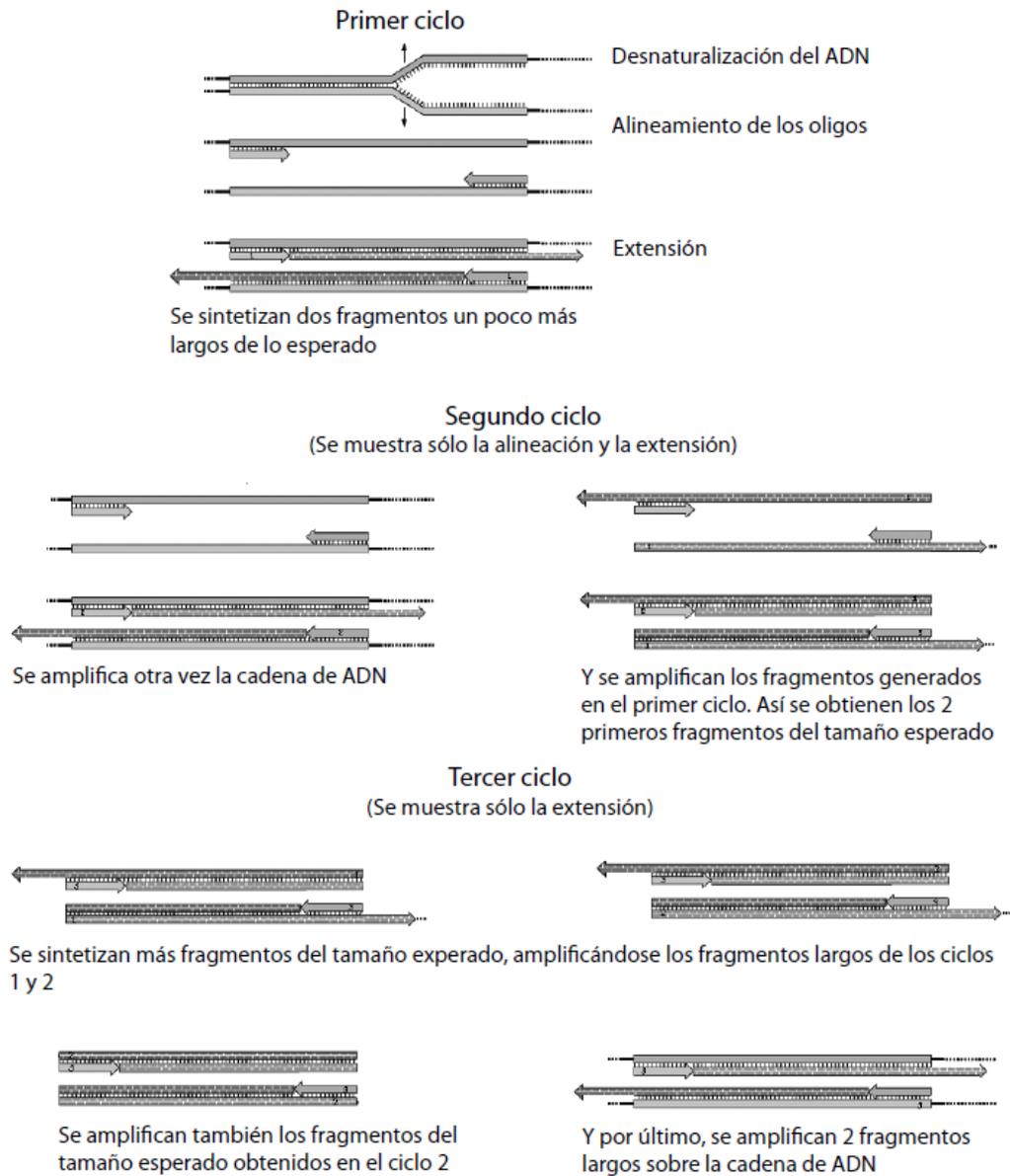


Figura 24 A-1. Descripción del proceso de un PCR en los primeros ciclos de reacción (Ilustración obtenida de Asuar, 2007).

Protocolo

- 1) Preparar mezcla para PCR (Tabla 5 A-1).
- 2) Repartir 11.5 µl en cada tubo.

- 3) Agregar 1 μl de ADN.
- 4) Colocar los tubos en el termociclador.

Tabla 7 A-1. Mezcla maestra para PCR, volúmenes para una muestra.

H ₂ O18 Ω estéril	7.23 μl
MgCl	0.75 μl
dNTP's	0.66 μl
Buffer 10X	2.5 μl
Primer F	0.13 μl
Primer R	0.13 μl
Taq	0.1 μl
Total	11.5 μl

E) Electroforesis en gel de Agarosa.

Es una técnica que permite separar y purificar macromoléculas (por ejemplo proteínas y ácidos nucleicos) de acuerdo al tamaño de cada uno. Para poder analizar los resultados de la PCR, se hace un gel de agarosa y es colocado en un campo eléctrico, el gel forma una especie de red con agujeros de tamaños diferentes, por la cual migrarán los fragmentos de ADN, por medio de corriente eléctrica, hacia el polo positivo (ánodo) debido a que la carga de una molecular de ADN es negativa por la presencia de los grupos fosfato (Asuar, 2007).

Protocolo para la preparación de geles de agarosa

Para preparar un gel chico mezclar:

- 1) 30 ml de Buffer TAE 1x
- 2) 0.6 g de Agarosa
- 3) 0.5 μ l de gel red

Para preparar un gel mediano mezclar:

- 1) 50 ml de Buffer TAE 1x
- 2) 1 g de Agarosa
- 3) 0.8 μ l de gel red.

*Se cargan 5 μ l de muestra y 3 μ l de marcador de peso molecular.

La única diferencia entre utilizar un gel chico y un gel mediano es el número de muestras que se van a cargar. Las condiciones que se utilizarán son: 90 volts y 500 amperes durante 30 minutos.

F) Purificación

Este proceso permite limpiar el ADN que será utilizado en la clonación con el fin de evitar contaminación durante el proceso.

*Se utilizó Wizard SV Gel and PCR Clean up System (Promega).

- 1) Pesar un tubo eppendorf.
- 2) Cortar la banda del gel con una navaja estéril, ponerla en el tubo eppendorf y volver a pesar el tubo.
- 3) Agregar membrane binding solution (la diferencia en peso en μl).
- 4) Incubar entre 50 y 65 °C por 10 minutos. Colocar en vórtex cada 2 o 3 minutos o hasta que la agarosa se haya disuelto por completo.
- 5) Colocar una columna en un tubo colector.
- 6) Transferir el producto de PCR a la columna e incubar durante 1 minuto.
- 7) Centrifugar a 12000 rpm durante 1 minuto y descartar lavado.
- 8) Lavar con 700 μl de membrane wash sol. y centrifugar a 12000 rpm por 5 minutos y descartar lavado.
- 9) Lavar con 500 μl de membrane wash sol. y centrifugar a 12000 rpm por 5 minutos y descartar lavado.
- 10) Poner columna en tubo colector y centrifugar por 1 minuto en seco.
- 11) Poner columna en tubo eppendorf.
- 12) Agregar 20 μl de agua libre de nucleasas e incubar por 1 minuto.
- 13) Centrifugar a 12000 rpm por 1 minuto y almacenar a -20 °C.

G) Ligación

Este paso permite ligar o unir el ADN purificado con un vector que contiene un gen de resistencia a Ampicilina.

*Se utilizó pGEMT easy vector (Promega).

- 1) Preparar mezcla maestra para ligación (Tabla 6 A-1).
- 2) Incubar por 2 horas a temperatura ambiente o toda la noche a 4 °C.
- 3) Almacenar a -20 °C.

Tabla 8 A-1. Mezcla maestra para ligación, colúmenes para una muestra.

Buffer 2X ligation	10 µl
pGEMT easy vector	1 µl
ADN (purificado)	8 µl
ADN ligasa (T4)	1 µl

H) Transformación

En este proceso se utilizan bacterias competentes (*E. coli* DH5- α) que se ponen en contacto con el vector que contiene el ADN de interés, de esta manera la bacteria lo incorpora en su ADN con el fin replicarlo.

- 1) Preparar cajas de Petri LB-Amp.
- 2) Sacar bacterias de -80°C , ponerlas directo en hielo y dejar que se descongelen.
- 3) Mezclar 5 μl de ligación (inserto) + (vector) 50 μl de bacterias.
- 4) Incubar en hielo por 30 minutos.
- 5) Poner 40 μl de xGal y 7 μl de dimetil formamida en cajas Petri con LB-Amp.
- 6) Choque térmico a 37°C por 20 segundos.
- 7) Regresar al hielo por 2 minutos.
- 8) Incubar en 1.5 ml de SOC.
- 9) Transferir a un tubo para centrifugar.
- 10) Incubar a 37°C con agitación por 1 hora.
- 11) Centrifugar a 8000 rpm por 5 minutos a temperatura ambiente.
- 12) Descartar sobrenadante y resuspender en el residual.
- 13) Incubar en cajas de LB-Amp toda la noche a 37°C .

l) Levantamiento de Colonias

La mayoría de los plásmidos usados en Biología Molecular contienen el sitio de clonación múltiple dentro del gen de la β -galactosidasa lo que permite la interrupción e inactivación de este gen cuando un ADN inserto se clona en esta región. En medios de cultivo que contengan el análogo de la lactosa X-gal, esta estrategia permite distinguir las colonias de bacterias que contienen el vector recombinante (con inserto) de aquellas que han recibido un vector no recombinante (sin inserto). Las bacterias que reciben el vector recombinante no pueden utilizar lactosa ni su análogo y formará colonias blancas. Las bacterias que reciben un vector no recombinante sí pueden utilizar la lactosa o su análogo y formarán colonias azules (Galván, *et al.*, 1989).

- 1) Preparar LB-Amp fresco en la campana, consiste en 10 ml LB + 24 μ l de Amp.
- 2) Preparar: 26 ml LB + 62.4 μ l ampicilina.
- 3) Distribuir en tubos falcón, 2 ml de LB-Amp por tubo.
- 4) Levantar las colonias más aisladas con un palillo de madera y colocar uno por tubo.
- 5) Incubar a 37 °C con agitación a 240 rpm toda la noche.

J) Minipreps

Esta es una extracción de ADN de naturaleza plasmídica de un cultivo bacteriano por lisis alcalina.

- 1) Transferir 1.5 ml de cultivo bacteriano a un tubo eppendorf.
- 2) Centrifugar 1 minuto a máximo y eliminar todo el sobrenadante.
- 3) Agregar 100 μ l de cell resuspension solution y resuspender.
Preparación: 50 mM Tris-Hel pH 8
10 mM EDTA pH 8 \rightarrow 20 μ l ARNasa
Para: 1.2 ml Tris \rightarrow 3 μ l ARNasa
- 4) Agregar 100 μ l de buffer lisis (200 mM NaOH y 1% SDS).
- 5) Agregar 120 μ l de buffer de neutralización (3 M acetato de potasio pH 5.5) y mezclar por 3 minutos.
- 6) Centrifugar 1 minuto a máxima y transferir sobrenadante a tubo nuevo.
- 7) Agregar 200 μ l de isopropanol y mezclar.
- 8) Centrifugar 1 minuto a máxima y descartar sobrenadante.
- 9) Agregar 500 μ l de etanol al 70% y mezclar.
- 10) Centrifugar 1 minuto a máxima y descartar sobrenadante, volver a centrifugar y eliminar sobrenadante con punta.
- 11) Agregar 25 μ l de agua estéril y resuspender.

K) Digestión

Mediante este proceso la endonucleasa de restricción ECOR1 corta o separa el ADN de interés o el inserto, del vector.

- 1) Preparar mezcla (Tabla 7 A-1)
- 2) Distribuir 9 μ l de la mezcla en cada tubo.
- 3) Agregar 1 μ l de ADN (minipreps)
- 4) Incubar a 37 °C por 2 horas.
- 5) Correr gel de agarosa 1 %.

Tabla 9 A-1. Mezcla maestra para digestión, volúmenes para una muestra.

H ₂ O18 Ω estéril	7.1 μ l
Buffer H 10X	1 μ l
BSA 100X	0.1 μ l
ECOR 1	0.8 μ l

L) qPCR

Tabla 10 A-1. Mezcla maestra para qPCR.

Solución	Reacción 1X
Agua libre de nucleasas	1.3 μ l
Eva Green Super Mix 2x	2.5 μ l
Primer F	0.3 μ l
Primer R	0.3 μ l
Volumen total	4 μ l

Protocolo:

- 1) Se prepara la mezcla maestra (Tabla 10 A-1)
- 2) Se reparten 4 μ l en cada tubo
- 3) Se adiciona 1 μ l de muestra a cada tubo.

ANEXO 2

Tabla 11 A-2. Comparaciones múltiples de IGS durante el periodo de muestreo, método de Holm-Sidak.

Comparación	Diff of Means	t	P	P<0.050
MAR/ABR-2013 vs. NOV-2010	4.242	20.252	<0.001	Sí
MAR/ABR-2013 vs. NOV/DIC-2011	4.253	18.657	<0.001	Sí
MAR/ABR-2013 vs. OCT-2011	4.335	17.181	<0.001	Sí
MAR/ABR-2013 vs. ENE-2013	3.417	14.184	<0.001	Sí
MAR/ABR-2013 vs. ABR/MAY-2010	3.567	13.354	<0.001	Sí
MAR/ABR-2013 vs. FEB-2011	2.627	11.017	<0.001	Sí
MAR/ABR-2013 vs. MAR-2011	2.802	8.614	<0.001	Sí
FEB-2011 vs. NOV-2010	1.615	6.72	<0.001	Sí
FEB-2011 vs. NOV/DIC-2011	1.625	6.335	<0.001	Sí
FEB-2011 vs. OCT-2011	1.708	6.134	<0.001	Sí
ABR-2012 vs. OCT-2011	4.644	6.044	<0.001	Sí
ABR-2012 vs. NOV-2010	4.551	6.025	<0.001	Sí
ABR-2012 vs. NOV/DIC-2011	4.562	5.996	<0.001	Sí
ABR-2012 vs. ABR/MAY-2010	3.876	5.012	<0.001	Sí
ABR-2012 vs. ENE-2013	3.726	4.873	<0.001	Sí
MAR-2011 vs. NOV-2010	1.44	4.407	<0.001	Sí
MAR-2011 vs. OCT-2011	1.533	4.31	<0.001	Sí
MAR-2011 vs. NOV/DIC-2011	1.45	4.28	<0.001	Sí
ABR-2012 vs. MAR-2011	3.111	3.912	0.002	Sí
ABR-2012 vs. FEB-2011	2.936	3.844	0.003	Sí
ENE-2013 vs. NOV-2010	0.825	3.398	0.013	Sí
ENE-2013 vs. OCT-2011	0.918	3.272	0.018	Sí
ENE-2013 vs. NOV/DIC-2011	0.835	3.227	0.02	Sí
FEB-2011 vs. ABR/MAY-2010	0.94	3.219	0.019	Sí
FEB-2011 vs. ENE-2013	0.79	2.946	0.041	Sí
ABR/MAY-2010 vs. OCT-2011	0.769	2.534	0.123	No
ABR/MAY-2010 vs. NOV-2010	0.675	2.513	0.119	No
ABR/MAY-2010 vs. NOV/DIC-2011	0.686	2.42	0.137	No
MAR-2011 vs. ABR/MAY-2010	0.764	2.087	0.266	No
MAR-2011 vs. ENE-2013	0.615	1.768	0.435	No
ENE-2013 vs. ABR/MAY-2010	0.15	0.509	0.997	No
FEB-2011 vs. MAR-2011	0.175	0.507	0.991	No

ABR-2012 vs. MAR/ABR-2013	0.309	0.409	0.99	No
NOV-2010 vs. OCT-2011	0.0933	0.367	0.977	No
NOV/DIC-2011 vs. OCT-2011	0.0828	0.307	0.942	No
NOV-2010 vs. NOV/DIC-2011	0.0105	0.0459	0.963	No

Tabla 12 A-2. Comparaciones múltiples de vitelogenina contra un grupo control (machos en general), método de Dunnett.

Comparación	Diff of Means	q'	P<0.050
M vs H3	0.0000612	3.556	Sí
M vs H6	0.0000154	0.222	No
M vs H2	0.0000151	0.816	No
M vs H1	0.0000110	0.851	No
M vs H5	0.0000110	0.273	No
M vs H4	0.00000585	0.288	No