

K. Keel^{1*}, D. Míguez¹, A. Carnikian¹, A. Parodi²

¹ Departamento de Aguas y Productos Químicos. Laboratorio Tecnológico del Uruguay (LATU), Montevideo, Uruguay.

² Sección Genética, Facultad de Ciencias, Universidad de la República, Montevideo, Uruguay. * kkeel@latu.org.uy

INTRODUCCIÓN

Los **disruptores endócrinos** son sustancias químicas, naturales o artificiales, exógenas al organismo que tienen la capacidad de alterar la homeostasis del sistema endocrino-reproductivo. Dentro de los mismos, los de mayor interés han sido los compuestos estrogénicos, los cuales alteran el sistema hormonal induciendo trastornos neurológicos y efectos adversos sobre el desarrollo sexual y la reproducción [1].

Se ha descrito la expresión de la **vitelogenina (Vtg)** en larvas y machos adultos del pez *Pimephales promelas* como un indicador de exposición a xenoestrógenos [2]. En condiciones normales la Vtg en larvas, hembras inmaduras y machos es indetectable debido a que el estrógeno circulante es insuficiente para inducir su síntesis. Sin embargo, en presencia de estrógeno exógeno el hígado es capaz de producir y secretar Vtg al torrente sanguíneo [3].

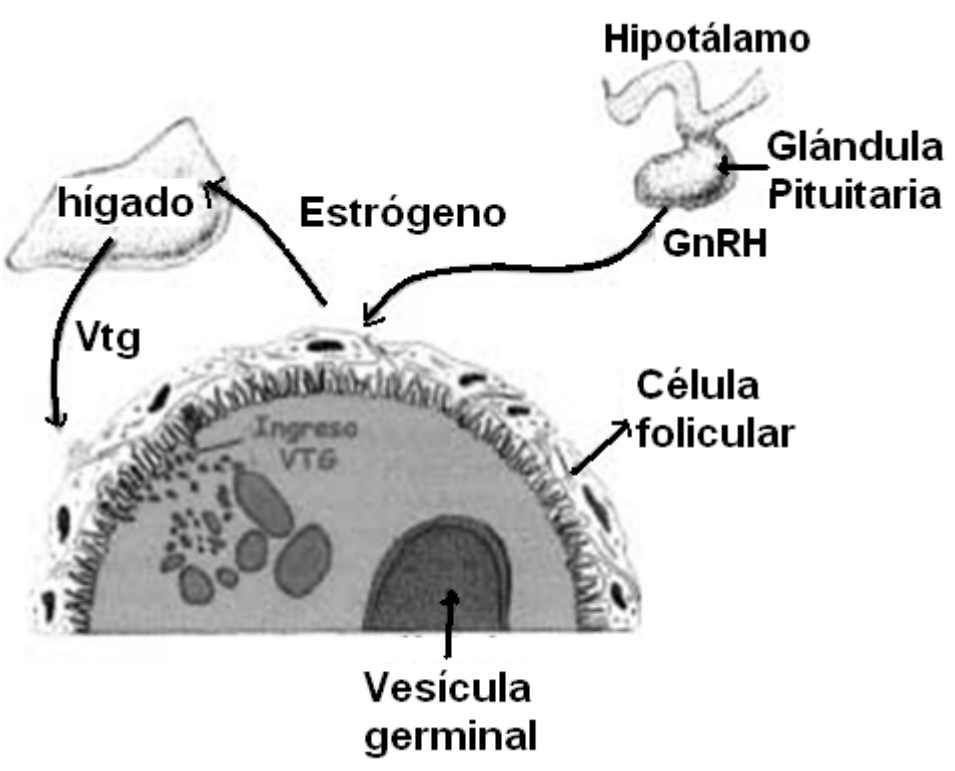


Figura 1. Síntesis de vitelogenina

¿Por qué *Pimephales promelas*?

- ✓ Pequeño Tamaño
- ✓ Elevada Fecundidad
- ✓ Fácil mantenimiento en el laboratorio
- ✓ Dimorfismo sexual
- ✓ Ampliamente utilizado como especie referente en estudios ecotoxicológicos por organismos internacionales de regulación ambiental

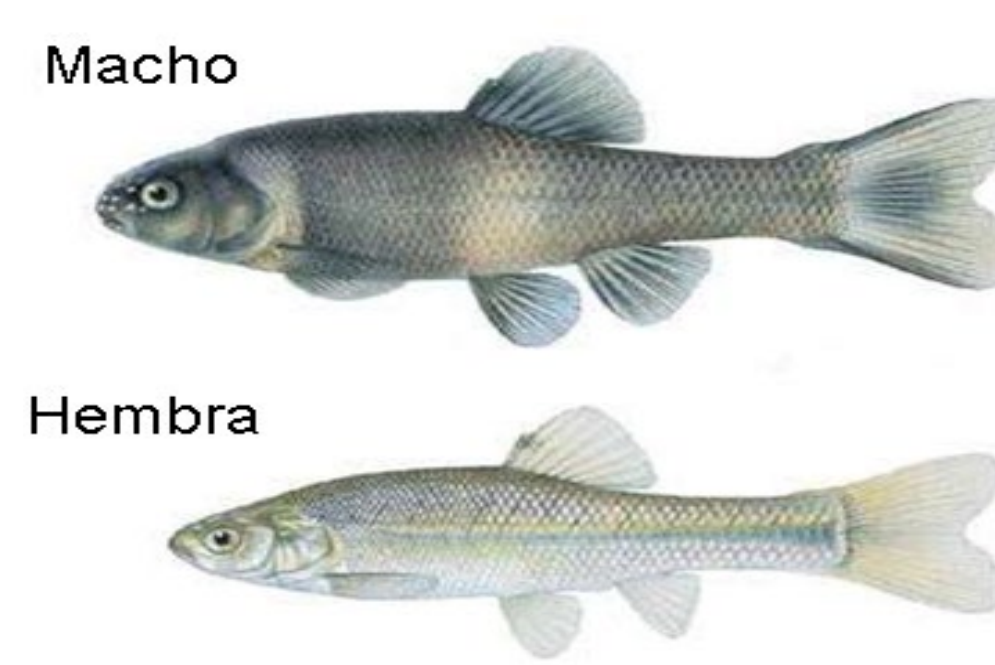


Figura 2. Ejemplares de *Pimephales promelas*

OBJETIVO

El presente trabajo consistió en poner a punto técnicas que permitan con facilidad y rapidez verificar posibles efectos estrogénicos en aguas de nuestro país. Para ello se pusieron a punto los métodos PCR en tiempo real y ELISA, evaluando la transcripción del gen de Vtg y la expresión de la proteína. Asimismo se realizó una comparación de ambos métodos.

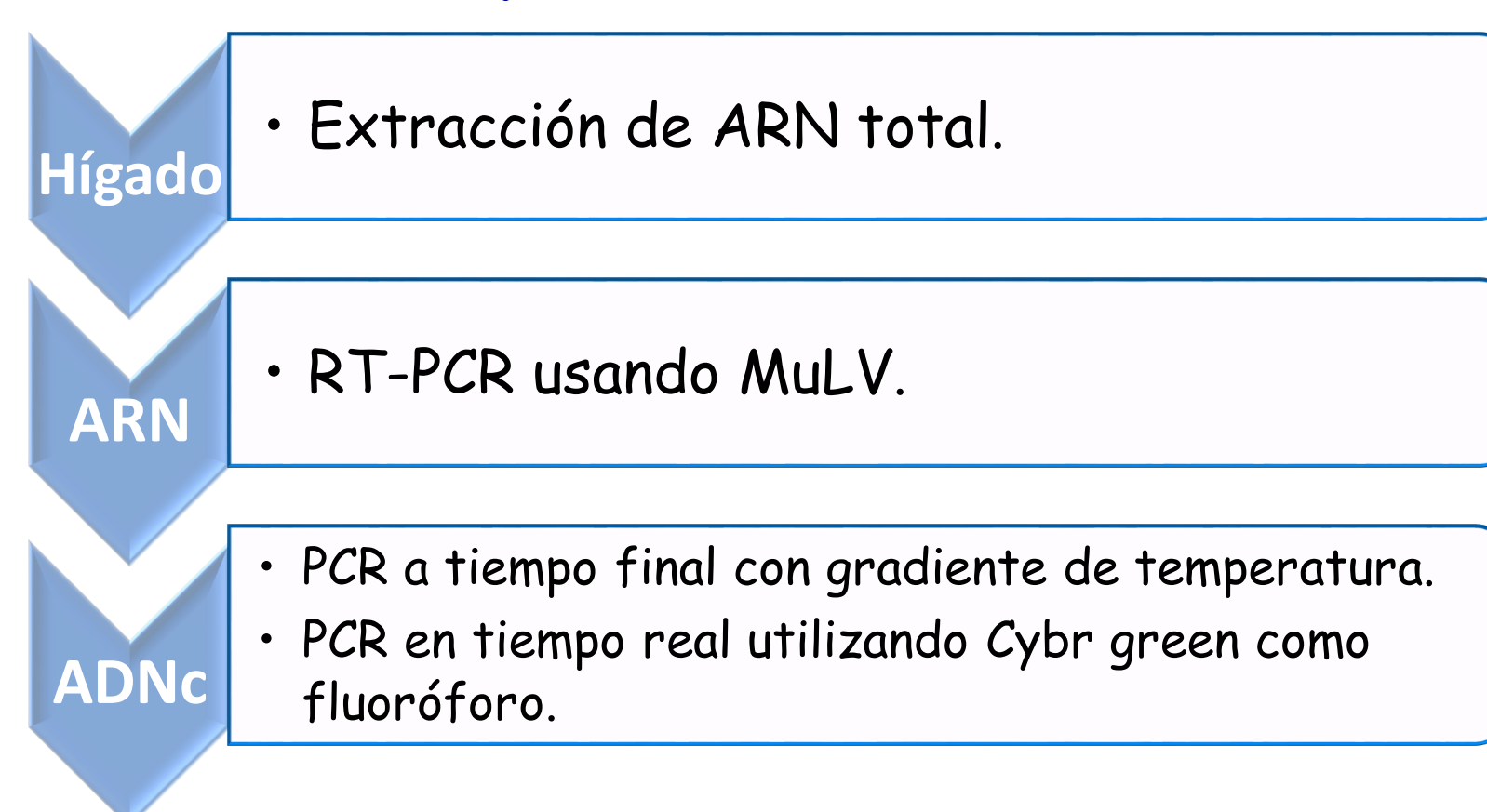
METODOLOGÍA

Variables Ambientales para exposición de <i>Pimephales promelas</i>	
Muestra	Efluente urbano
Estado de vida	Adultos
Tiempo de exposición	21 días (crónico)
Nº Individuos/pecera	2 Machos: 4 hembras
Régimen	Semiestático, renovación del 90% del volumen cada 48 h
Temperatura	25 ± 2 °C
Fotoperíodo	16luz:8oscuridad horas
Réplicas	Triplicados
Volumen de agua en los acuarios	8 litros
Alimentación	Artemia sp. 1 vez al día Escamas "Tetra"® 2 veces al día
Obtención de las muestras	Incisión cervical, muerte Diseción para obtención de hígado



Figura 3. Acuarios donde se realizó el ensayo de exposición de *Pimephales promelas*

PCR en tiempo real



Termociclador: Corbett Life Science Rotor-gene 6000 (Unidad de Biología Molecular, Instituto Pasteur).

La cuantificación de la expresión del gen Vtg se realizó por comparación con un gen de expresión constitutiva (ARN ribosomal 18S).

PROGRAMA DE PCR en tiempo real

95°C 10 minutos
40 ciclos → 94°C 10 segundos
60°C 20 segundos
72°C 20 segundos

ELISA

A partir de extractos proteicos obtenidos de hígado, se evaluó la expresión de Vtg mediante un ensayo ELISA sandwich (ver figura 5) utilizando un kit comercial específico para *Pimephales promelas* de biosense: Fathead minnow vitellogenin ELISA test kit.



Figura 4. Lector de microplaca, Thermo, Multiskan EX en el cual se midió la absorbancia de las placas de ELISA.

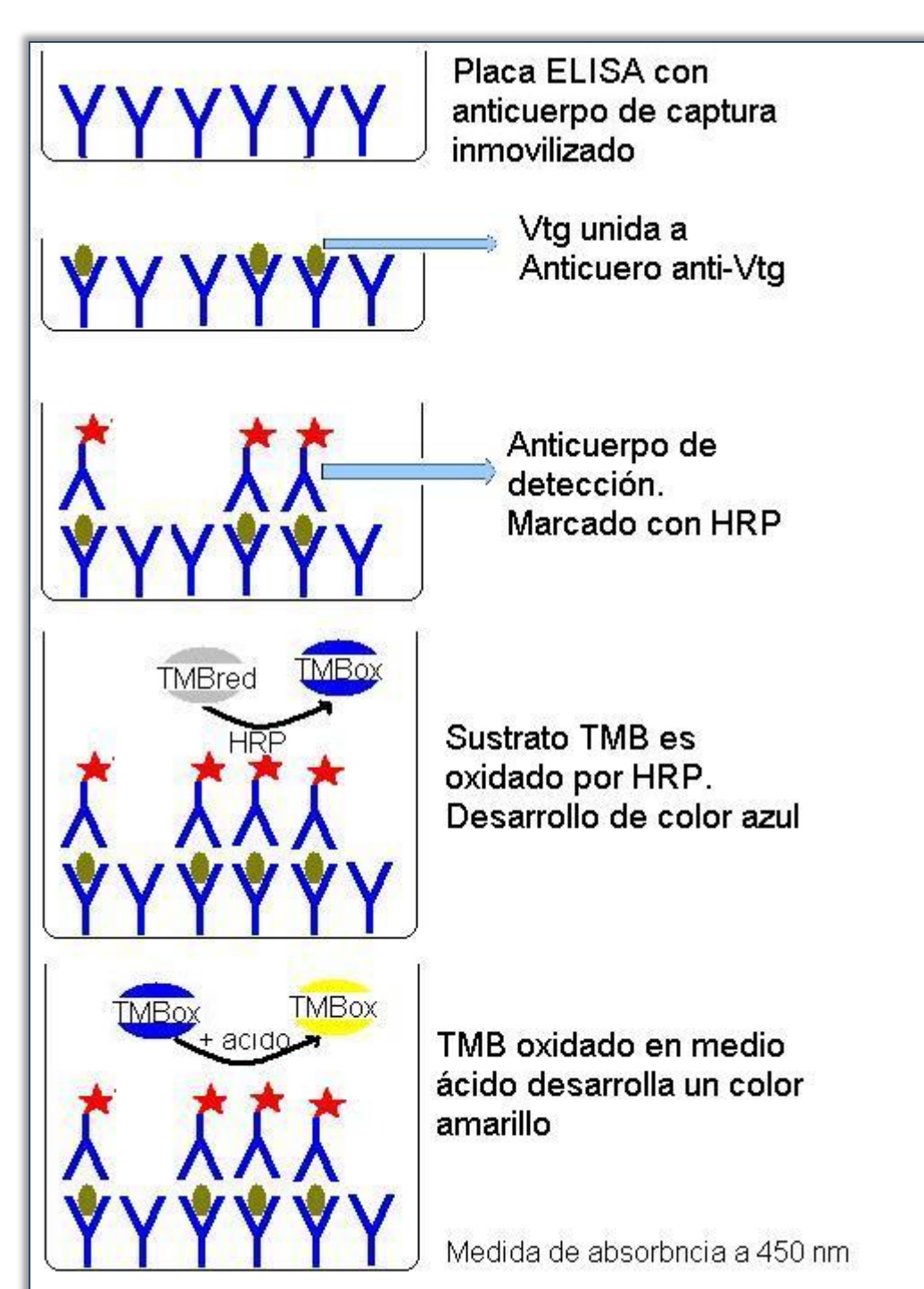


Figura 5. Esquema del desarrollo del Kit ELISA

RESULTADOS

Extracción de ARN

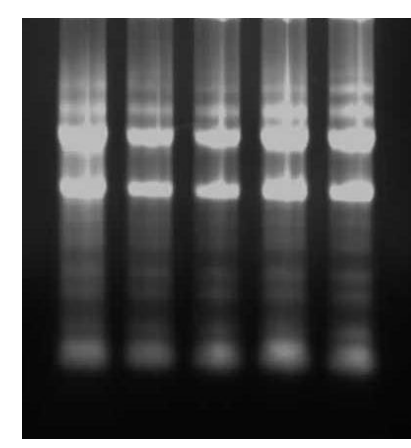


Figura 6. Gel de electroforesis en agarosa para muestras de ARN extraído.

PCR en tiempo real

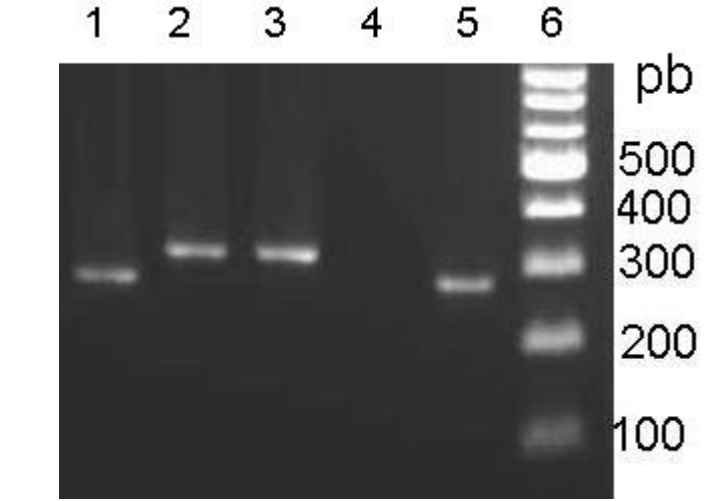


Figura 7. Gel de electroforesis en agarosa con productos obtenidos de la PCR luego de 40 ciclos. Carriles 1 y 5 muestras de ADNc de hembras con primers para Vtg (279 pb). Carriles 2 y 3 muestras de ADNc de las mismas hembras con primers para 18S (324 pb). Carril 4 Blanco. Carril 6 marcador de peso molecular.

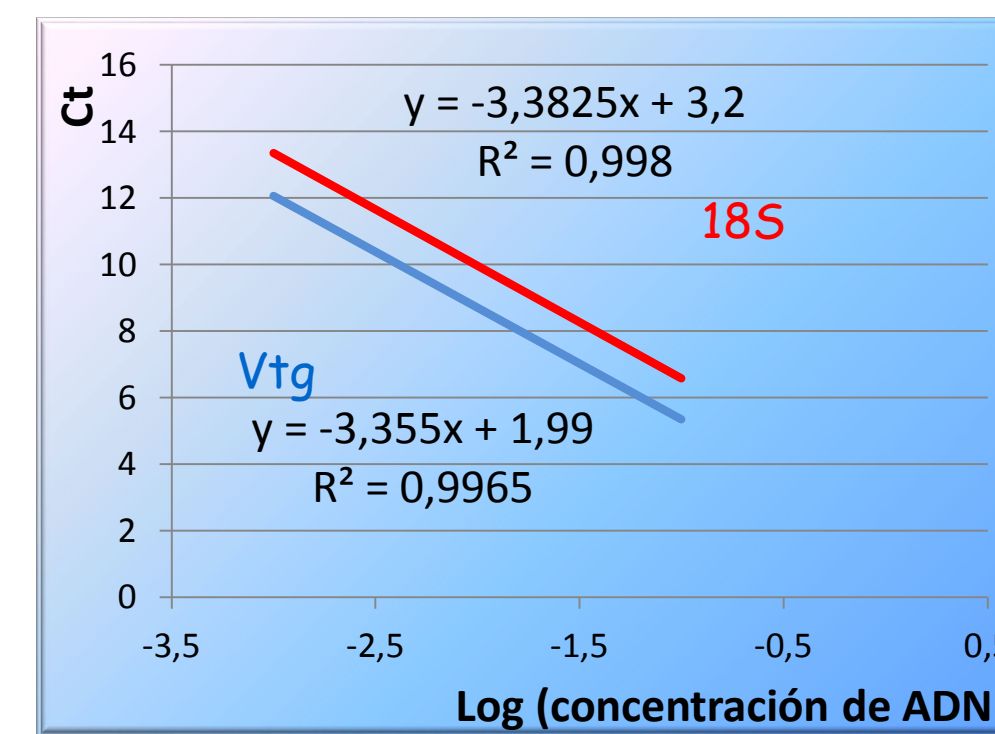


Figura 8. Gráfico de eficiencia para el PCR en tiempo real

$\text{Eficiencia} = 10^{(-1/\text{pendiente})} - 1$
 Eficiencia Vtg = 0,986
 Eficiencia 18S = 0,975

Análisis estadísticos de resultados de PCR en tiempo real con el software Rest 2005

	Expresión relativa	Valor P
Hembras expuestas - Hembras control	0,73	1,000
Machos expuestos - Machos control	1,13	0,969
Machos control - Hembras control	0,05	0,005

No hay diferencia significativa entre los grupos de hembras expuestas y controles, así como tampoco entre machos expuestos y controles.

Existe diferencia significativa entre machos controles y hembras controles.

ELISA

Tratamiento estadístico

Se calculó el límite de detección (LD) del método, definiéndolo como la concentración correspondiente al valor de absorbancia de 7 blancos más 3 desviaciones estándares.
LD=2 ng/ml.

A los valores de concentración obtenidos se les realizó un análisis estadístico para verificar si se alejaban de la normalidad, encontrándose dentro del rango esperado.

Análisis de varianza (ANOVA) con el software Statgraphics PLUS

	Expresión relativa	Valor P
Hembras expuestas - Hembras control	0,40	0,072
Machos expuestos - Machos control	2,14	0,083
Machos control - Hembras control	0,004	0,005

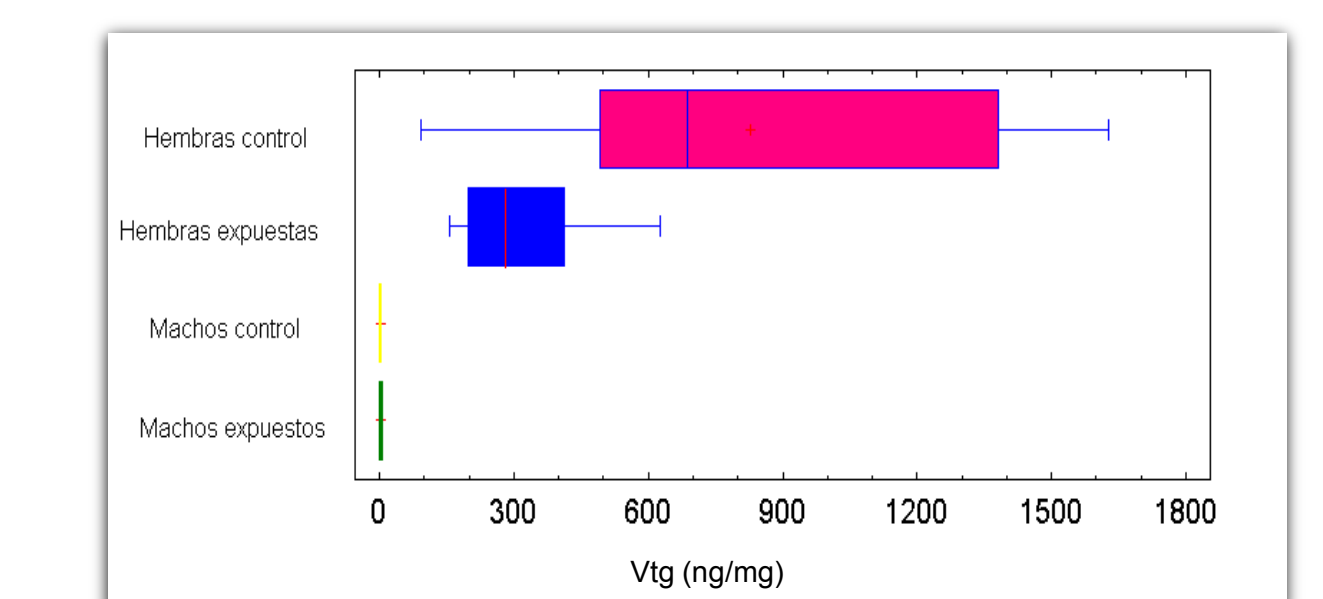


Figura 12. Concentración de Vtg (ng/mg) en hígado para hembras y machos, controles y expuestos.

Valor P > 0,05 → no hay diferencia estadísticamente significativa entre las medias de las 2 variables.
 Valor P < 0,05 → existe diferencia estadísticamente significativa entre las medias de las 2 variables.

CONCLUSIÓN

- La puesta a punto del ELISA y el PCR en tiempo real fue exitosa.
- Los resultados de ambos métodos son coherentes entre sí y muestran una misma tendencia.
- No existe diferencia significativa entre individuos expuestos y control, por lo tanto, no se observa efecto estrogénico para la muestra ensayada.

BIBLIOGRAFÍA

- [1] Argemi F., Cianni N. y Porta A. 2005. Acta Bioquím Clín Latinoam; 39 (3): 291-300
- [2] Lattier DL, et al. 2002. Environ Toxicol Chem 21: 2385-2393.
- [3] Biales A. et al. 2007. Environ Toxicol Chem 26: 287-296.

AGRADECIMIENTOS

Agustina Aizpún - Anabel Martínez - Marcelo Bado - Gabriela Bedó
Departamentos de Aguas y Productos Químicos y de Medio Ambiente del LATU
Integrantes de la Unidad de Biología Molecular del Instituto Pasteur
Dr James Lazorchack y equipo, USEPA por proporcionar el cultivo de peces inicial