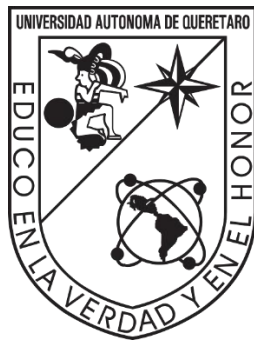


2023

Efecto del dietil ftalato en la locomoción  
y mielogénesis del pez cebra (*Danio rerio*)

LN. María Guadalupe

García Martínez



Universidad Autónoma de Querétaro  
Facultad de Medicina

EFFECTO DEL DIETIL FTALATO (DEP) EN LA LOCOMOCIÓN Y  
MIELOGÉNESIS DEL PEZ CEBRA (*DANIO RERIO*)

**Tesis**

Que como parte de los requisitos para obtener el grado de  
Maestra en Ciencias en Neurometabolismo

Presenta:

LN. María Guadalupe García Martínez

Dirigido por:

Dra. en C. Ana Gabriela Hernández Puga

Dra. en C. Aurea Orozco Rivas

Querétaro, Querétaro del 2023



Dirección General de Bibliotecas y Servicios Digitales  
de Información



Efecto del dietil ftalato (DEP) en la locomoción y  
mielogénesis del pez cebra (*Danio rerio*)

**por**

María Guadalupe García Martínez

se distribuye bajo una [Licencia Creative Commons  
Atribución-NoComercial-SinDerivadas 4.0  
Internacional](https://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/).

**Clave RI:** MEMAC-290988



Universidad Autónoma de Querétaro  
Facultad de Medicina  
Maestría en Ciencias en Neurometabolismo

**Efecto del dietil ftalato (DEP) en la locomoción y mielogénesis del pez cebra (*Danio rerio*).**

**Tesis**

Que como parte de los requisitos para obtener el Grado de Maestro en Ciencias en Neurometabolismo

Presenta

LN. María Guadalupe García Martínez

Dirigido por:

Dra. en C. Ana Gabriela Hernández Puga

Co-dirigido por:

Dra. en C. Aurea Orozco Rivas

Dra. Ana Gabriela Hernández Puga  
Presidente

Dra. Aurea Orozco Rivas  
Secretario

Dr. Iván Lazcano Sánchez  
Vocal

Dr. Juan Carlos Solís Sainz  
Suplente

Dr. Hebert Luis Hernández Montiel  
Suplente

Centro Universitario, Querétaro, Qro.  
2023  
México

## **DEDICATORIA**

A mi madre, Rosalía, que siempre cree en mí más que yo misma y me ha respaldado en todos mis proyectos, por haberme brindado todo el apoyo cuando más lo necesitaba, te quiero.

A mis amigos, que me contagiaron las ganas de continuar y ser perseverante.

## **AGRADECIMIENTOS**

Agradezco el apoyo económico brindado por el CONACyT (1009796), como estudiante de la Maestría en Neurometabolismo y al financiamiento que este proyecto recibió de los proyectos UNAM PAPIIT IN210823 y IA201122; y CONACyT Ciencia de Frontera, Paradigmas y Controversias de la Ciencia 2022 399880.

Agradezco a mis directoras de tesis la Dra. Ana Gabriela Hernández Puga y la Dra. Aurea Orozco Rivas, por brindarme su valioso tiempo, sus enseñanzas, sus consejos y apoyo durante todo el trayecto de la maestría, pero sobre todo poner su confianza en mí.

Agradezco al Dr. Iván Lazcano Sánchez y a M.C Patricia Villalobos Aguilera por todo el conocimiento, apoyo y paciencia que me brindaron durante todo el recorrido de mi formación.

Agradezco al Dr. Víctor De Lafuente Flores, por su apoyo, enseñanza y por la creación del algoritmo para la edición de las imágenes.

Agradezco a todos mis maestros y sinodales, que estuvieron presentes durante mi formación y hacerme crecer en conocimiento y persona.

Agradezco a mis compañeras de maestría, Mony, Edel y Karla por sus consejos y ayuda en todo cuando lo necesitaba, por hacer de este recorrido una increíble aventura.

Agradezco a mi compañera Anahí, que estuvo conmigo y me apoyo en los primeros meses más difíciles de la maestría, por sacarme una sonrisa cuando lo necesita, donde sea que estés, gracias.

Muchas gracias a todos.

## INDICE

INDICE DE FIGURAS .....	5
INDICE DE TABLAS.....	6
ABREVIATURAS Y SIGLAS.....	7
RESUMEN.....	8
ABSTRACT .....	9
INTRODUCCIÓN.....	10
ANTECEDENTES .....	11
1. Disruptores endocrinos.....	11
1.1 Dietil ftalato (DEP) .....	15
1.2 Metabolismo del DEP .....	17
1.3 Efectos biológicos de los ftalatos en sistema nervioso.....	18
2. Neurona y glía .....	19
2.1 Oligodendrogénesis.....	20
2.2 Desarrollo de las células de Schwann.....	24
2.3 Composición de la mielina.....	27
JUSTIFICACIÓN .....	28
HIPÓTESIS .....	29
OBJETIVO GENERAL.....	29
OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	29
MATERIAL Y MÉTODOS .....	29
1. Modelo experimental .....	29
2. Bioseguridad.....	31
3. Diagrama metodológico.....	32
4. Metodología.....	32
RESULTADOS .....	38
1. Evaluación de la locomoción en las larvas tempranas .....	38
2. Efecto del DEP sobre la formación de fibras de mielina .....	41
3. Efecto del DEP sobre la expresión de <i>mbp</i> , <i>plp</i> , <i>p0</i> y <i>sox10</i> .....	43
DISCUSIÓN.....	44

CONCLUSIÓN.....	48
BIBLIOGRAFÍA.....	48

## INDICE DE FIGURAS

Figura 1. Principales mecanismos de acción de los disruptores endocrinos .....	13
Figura 2. Estructura química del dietil ftalato .....	15
Figura 3. Metabolismo del DEP .....	18
Figura 4. Interacción de un oligodendrocito y una célula de Schwann con la neurona .....	20
Figura 5. Oligodendrogénesis .....	21
Figura 6. Desarrollo de las células de Schwann .....	25
Figura 7. Proteínas más abundantes de la vaina de mielina .....	27
Figura 8. Fases del desarrollo embrionario del pez cebra .....	31
Figura 9. Metodología .....	32
Figura 10. Imagen del sistema de barras a blanco y negro .....	35
Figura 11. Evaluación de la locomoción mediante el sistema a blanco y negro .....	39
Figura 12. Evaluación de la locomoción mediante una respuesta evocada al tacto .....	41
Figura 13. Tinción con BGII .....	42
Figura 14. Intensidad de mielina teñida con BGII .....	42
Figura 15. Porcentajes de intensidad de la mielina con BGII .....	43
Figura 16. Expresión de <i>mbp</i> , <i>p0</i> , <i>plp</i> , <i>sox10</i> en peces con o sin tratamiento con DEP .....	44



## INDICE DE TABLAS

Tabla 1. Concentraciones de DEP en productos de la canasta básica de México...	16
Tabla 2. Concentraciones de MEP en suero, sudor y orina ( $\mu\text{g/g}$ ) .....	17
Tabla 3. Porcentaje de proteínas en la mielina del SNC y SNP .....	27
Tabla 4. Concentraciones experimentales de DEP .....	34

## ABREVIATURAS Y SIGLAS

DE: disruptores endocrinos  
SNC: sistema nervioso central  
SNP: sistema nervioso periférico  
DEP: dietil ftalato  
MBP: proteína básica de mielina  
P0: proteína cero  
PLP: proteína de proteolípidos  
PPARs: proliferación peroxisomal  
RXR: receptores X de ácido retinoico  
RAR: receptores para ácido retinoico  
MEP: mono-etil ftalato  
MiBP: mono-isobutil ftalato  
MBP: mono-butil ftalato  
MMP: mono-metil ftalato  
SHH: sonic hedgehog  
NPC: células progenitoras neurales  
OPC: células precursoras de oligodendrocitos  
OL: oligodendrocito  
CS: células de Schwann  
PSC: células precursoras de las células de Schwann  
PKA: proteína quinasa a  
MAG: Mielina oligodendrocito glicoproteína

## RESUMEN

El dietil ftalato (DEP) es un disruptor endócrino que altera la actividad hormonal normal tanto en humanos como en animales. El DEP se utiliza indiscriminadamente en la industria debido a sus propiedades fisicoquímicas y es común encontrarlo en productos como maquillaje, cremas, jabones, biberones; perfumes; entre muchos otros. Además de sus efectos adversos sobre los sistemas endócrinos, estudios recientes han demostrado que este compuesto también afecta el desarrollo del sistema nervioso durante la gestación, contribuyendo a ser uno de los factores desencadenantes para el desarrollo de patologías neuroendocrinas como la depresión y la demencia. Su efecto sobre el proceso de mielinización y de locomoción no ha sido estudiado. Estos datos hacen necesaria la evaluación de los peligros asociados a su exposición. Por lo anterior, el objetivo de la presente tesis fue determinar el efecto del DEP sobre la locomoción y mielinización en el modelo embrionario de pez cebra (*Danio rerio*). Para este fin, los embriones fueron tratados con dosis de 50, 500, 5000, 25000  $\mu\text{g/L}$  durante las primeras 120 horas post fertilización y se evaluó su efecto sobre la locomoción, el contenido de mielina y la expresión de genes asociados al proceso de mielinización. Se encontró una alteración en la locomoción utilizando el sistema a blanco y negro y en la evaluación de la respuesta evocada al tacto. En esta última prueba encontramos que las larvas tratadas con la dosis máxima 25000  $\mu\text{g/L}$  aumentan el tiempo de reacción y la velocidad de respuesta disminuía. Adicionalmente se encontró una disminución de la intensidad de las fibras de mielina visualizadas con la tinción con Black Gold II en las larvas tratadas con 500, 5000 y 25000  $\mu\text{g/L}$  de DEP. La expresión del gen de la proteína básica de la mielina (*mbp*) mostró una disminución en todas las dosis después del tratamiento. En conjunto, los resultados obtenidos muestran que la exposición a dosis elevadas de DEP disminuye la formación de mielina en las larvas de pez cebra, repercutiendo en su locomoción.

Palabras clave: disruptor endócrino, dietil ftalato, mielina, pez cebra.

## ABSTRACT

Diethyl phthalate (DEP) is an endocrine disruptor that disrupts normal hormonal activity in both humans and animals. It is used indiscriminately in the Mexican industry due to its physicochemical properties and it is common to find it in makeup, creams, soaps, baby bottles; perfumes; among many others. In addition to its adverse effects on the endocrine systems, recent studies have shown that this compound also affects the development of the nervous system during pregnancy, contributing to be one of the triggering factors for the rise of neuronal alterations, however, these studies are focused in behavioral pathologies. Its effect on the process of myelination and locomotion is almost null. These data make it necessary to evaluate the dangers associated with its exposure. Therefore, the objective of this thesis was to determine the effect of DEP on locomotion and myelination in a model of zebrafish (*Danio rerio*) embryos. For this purpose, the embryos were treated with doses of 50, 500, 5000, 25000 µg/L during the first 120 hours after fertilization and their effect on locomotion, myelin content and the expression of genes associated with the process of myelination was evaluated. An alteration was found in locomotion using "automated analysis of behavior in zebrafish larvae" and in the evaluation of the evoked response to touch. In this last test we found that the larvae treated with the maximum dose of 25,000 µg/L increased the reaction time and the response speed decreased. Additionally, a decrease in the intensity of myelin fibers visualized with Black Gold II staining was found in fingerlings treated with 500, 5000 and 25000 µg/L of DEP. Protein basic myelin (*mbp*) expression was decreased at all doses after treatment. Taken together, the results obtained show that exposure to high doses of DEP affects locomotion and myelin formation in zebrafish fingerlings.

Key words: endocrine disruptor, diethyl phthalate, myelin, zebrafish

## INTRODUCCIÓN

El dietil ftalato (DEP) es un compuesto que altera el equilibrio hormonal debido a su capacidad de unirse a receptores celulares que señalizan en los sistemas endócrinos, por lo que se le reconoce como un perturbador endócrino. Las vías de exposición del DEP en los humanos son transdérmicas, por inhalación e ingestión y puede ser acumulado en diferentes órganos y tejidos. Esta acumulación produce toxicidad, la cual varía en intensidad de acuerdo con la dosis y tiempo de exposición, ontogenia, así como la presencia de patologías (Gore *et al.*, 2015). El DEP es empleado principalmente para proporcionar flexibilidad a los plásticos por lo que se encuentra en diversos productos de consumo y uso diario como pinturas, juguetes, envases de comida; fármacos, cepillos de dientes, shampoos y perfumes (ATSDR, 1995; You *et al.*, 2018; García *et al.*, 2018). Los niveles de ftalatos en orina han sido relacionados con alteraciones conductuales como problemas de conducta, aumento de ansiedad y TDAH (Engel *et al.*, 2010). Por otro lado, estudios moleculares han mostrado que el tratamiento con DEP induce un aumento en la expresión de la proteína básica de la mielina en embriones de pez cebra, generando alteraciones en la síntesis de mielina (Xu *et al.*, 2013). Sin embargo, aún se desconoce si el DEP pudiera impactar en procesos conductuales. Por lo que en el presente estudio se analizaron los efectos del DEP sobre el proceso de mielinización, la expresión de genes asociados a la mielinización y la conducta en el modelo de pez cebra.

## ANTECEDENTES

En la actualidad, los humanos se encuentran expuestos a múltiples compuestos químicos que pueden perjudicar su salud de forma inmediata y/o a largo plazo. Entre estos compuestos encontramos a los disruptores endocrinos (DE), los cuales pueden alterar diferentes sistemas u órganos e incluso inducir efectos que son transmitidos a futuras generaciones (Gore *et al.*, 2015).

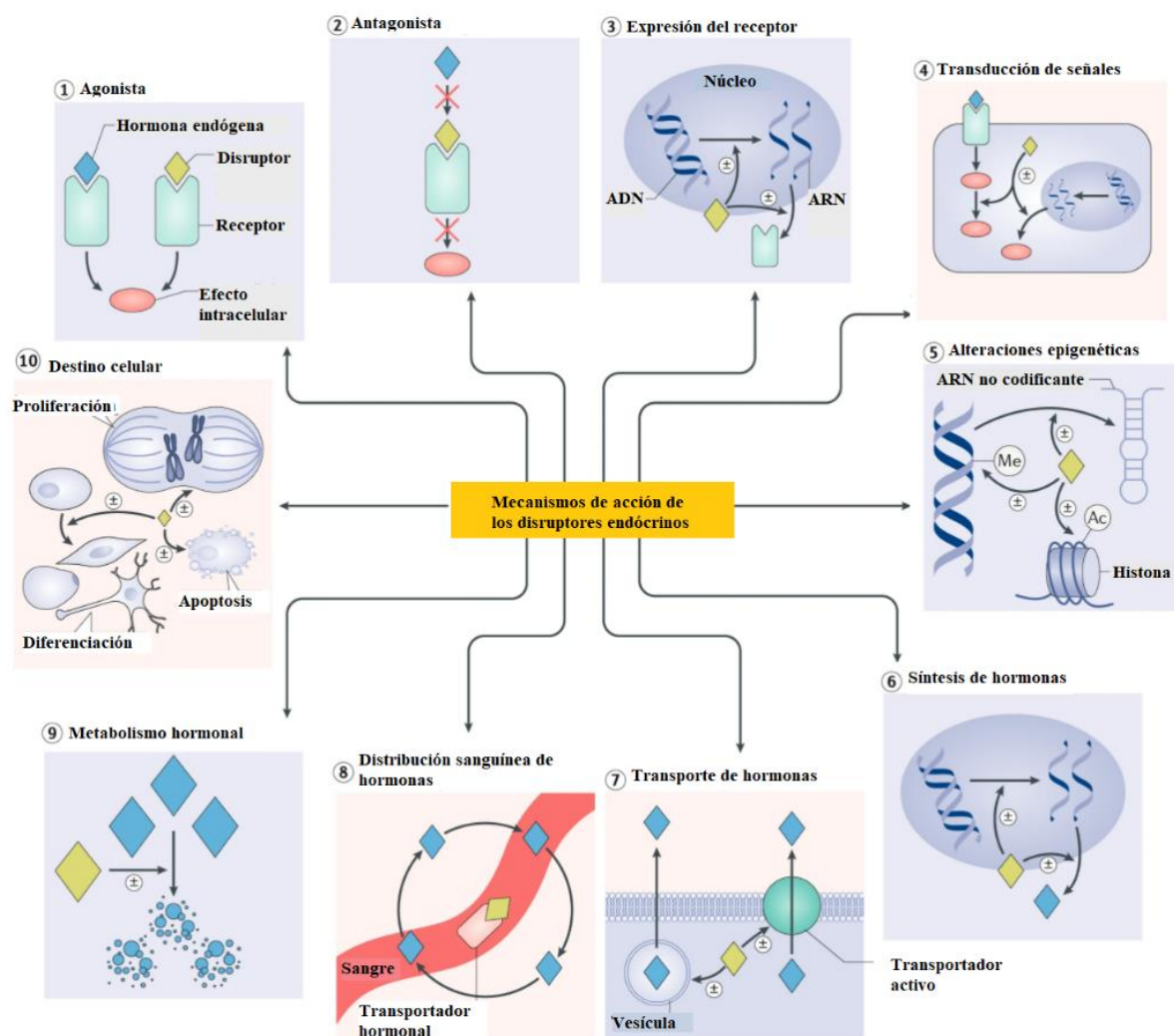
En el sistema nervioso, los disruptores endocrinos inducen afectaciones en procesos neuronales clave como la transmisión sináptica y síntesis de neurotransmisores o alteraciones de procesos cognitivos asociados al desarrollo de patologías neurológicas, entre otras (Gore *et al.*, 2015). Las nuevas evidencias científicas generan incógnitas sobre el tipo de alteraciones celulares que pueden inducir los DE, de forma particular, en el proceso de mielogénesis y en la actividad motora.

### 1. Disruptores endocrinos

Los DE son compuestos con capacidad de alterar el equilibrio hormonal debido a su capacidad de unirse a receptores hormonales que señalizan a los sistemas endócrinos. Los encontramos en productos de uso cotidiano como: plásticos, juguetes, cosméticos, cremas, shampoos, detergentes, materiales de uso médico, revestimiento de latas, biberones, filtros solares, entre otros, incluso en alimentos como frutas y verduras. Las vías de exposición a DE son diversas: dérmica, por inhalación y por ingestión; posteriormente pueden ser acumulados en diferentes órganos y tejidos. Existen múltiples factores que determinan la toxicidad de los DE, las cuales varían de acuerdo con la región demográfica, naturaleza química, dosis, tiempo de exposición y la ontogenia del individuo (Gore *et al.*, 2015).

Los DE son moléculas de alta lipofiliidad que pueden ser almacenados en plasma, suero sanguíneo, leche materna, fluidos corporales (líquido seminal), pulmón, tejido adiposo e hígado, así como en orina y cabello (Gore *et al.*, 2015).

Sus efectos son inducidos a través de diversos mecanismos de acción, como se resume a continuación (**Fig. 1**): 1. activación de receptores por la unión de los DE a receptores hormonales, modificando la señalización celular; 2. antagonismo de receptores hormonales, induciendo la inhibición de los efectos de hormonas endógenas; 3. alteración de la expresión del receptor al inducir su degradación; 4. alteración de la transducción de señales, ya que pueden modificar las respuestas intracelulares específicas que dependen del receptor con la unión de su ligando, incluidos los cambios con factores activadores y/o represores; 5. inducción de modificaciones epigenéticas en células productoras de hormonas o sensibles a las hormonas, incluyendo modificaciones en el ADN, histonas y del ARN no codificante; 6. alteración de la síntesis de hormonas, a través de la alteración de elementos y factores que participan en su síntesis; 7. alteración de la distribución de hormonas o los niveles de hormonas circulantes, al desplazar a las hormonas de su unión con proteínas transportadoras; 8. alteración del transporte de hormonas a través de membranas celulares, ya que los DE pueden alterar los procesos de selectividad de transportadores de membrana; 9. alteración del metabolismo hormonal, al aumentar la cantidad de enzimas que inactivan y/o degradan a las hormonas, induciendo un aumento desproporcionado de hormona inactivas o una disminución de la síntesis de enzimas para la eliminación o inactivación hormonal, y 10. alteración del destino de las células sensibles a hormonas, ya que los DE interfieren en la señalización celular y aumentan o disminuyen la proliferación, diferenciación y migración de células causando anomalías en tejidos (La Merrill *et al.*, 2020).



**Figura 1. Principales mecanismos de acción de los disruptores endocrinos.** 1. Agonistas de receptores, 2. Antagonistas de receptores, 3. Alteración de la expresión del receptor, 4. Alteración la transducción de señales, 5. Inducción de modificaciones epigenéticas, 6. Alteración de la síntesis de hormonas, 7. Alteración de la distribución y/o niveles de hormonas circulantes, 8. Alteración del transporte de hormonas a través de membranas celulares, 9. Alteración del metabolismo o aclaramiento hormonal, 10. Alteración del destino de las células sensibles a hormonas (Modificado de La Merrill *et al.*, 2020).

A la fecha se han descrito más de 1,000 compuestos que actúan como DE, entre los cuales destacan los compuestos organoclorados (DDT, MXC, PCB's), el bisfenol-A (BPA), el estrógeno sintético no esteroideo (DES), compuestos derivados



del 17 $\beta$ -estadiol (EE2); ftalatos; fluorsurfactantes (PFOA); y herbicidas y fungicidas como el vinclozolin (VZ) e isoflavonas como la genisteína.

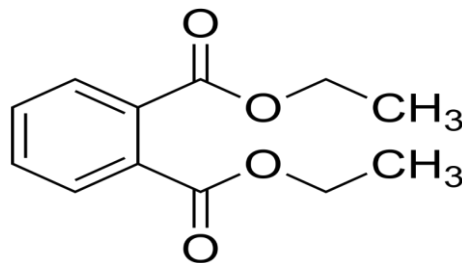
Respecto a su actividad biológica, los DE han sido caracterizados como compuestos obesogénicos, diabetogénicos y disruptores cardiovasculares que promueven diversas alteraciones como resistencia a la insulina e intolerancia a la glucosa, dislipidemias y disminución de la respuesta inmune (Gore, *et al*, 2015). Respecto a sus efectos en el eje gonadal, promueven atresias de ovarios y la disminución del número de células germinativas, alteran el crecimiento del endometrio, incrementan el ARNm que codifica para hormonas estrogénicas, disminuyen la fertilidad, aumentan el desarrollo temprano de la menopausia, reducen el peso testicular; disminuyen el conteo de espermatozoides, y aumentan el desarrollo de criptorquidias y malformaciones de los órganos sexuales (Gore, *et al*, 2015).

En sistema nervioso, los DE inducen alteraciones en el desarrollo cerebral e incrementan conductas depresivas e hiperactividad en humanos (Gore *et al.*, 2015). Además, la exposición temprana a DE induce diversos cambios celulares como hipoplasia en la materia blanca cerebral (Fujimoto *et al.*, 2011), disminución del número de oligodendrocitos y retraso del tiempo de mielinización (Zoeller *et al.*, 2000; Fernández *et al.*, 2010), inducción de la desmielinización en el área del hipocampo (Rosińczuk *et al.*, 2015), inhibición de la proliferación y diferenciación de las células precursoras de oligodendrocitos (Seiwa *et al.*, 2004), reducción de la expresión de proteínas de mielina en el hipocampo (*mbp*, *plp* y *mag*) y por tanto reducción del número de axones mielinizados (Tiwari *et al.*, 2015; Xu *et al.*, 2017), así como aumento el comportamiento social alterado y de ansiedad en ratas macho (Luo *et al.*, 2017).

Entre los disruptores de amplio uso en la industria se encuentra el dietil ftalato (DEP), el cual se ha asociado a alteraciones en sistema nervioso, como se describe a continuación.

## 1.1 Dietil ftalato (DEP)

El dietil ftalato o ácido 1,2-bencenodicarboxílico (DEP), es un éster de ácido ftálico, de estado líquido ligeramente color amarillo, perteneciente a la familia de los DE (**Fig. 2**). El DEP es un compuesto empleado principalmente para proporcionar flexibilidad a los plásticos por lo que se encuentra en diversos productos de consumo y uso diario como cintas aislantes, pinturas, juguetes, envases de comida; muebles; fármacos; cepillos de dientes; shampoos; talcos; perfumes; tortillas de maíz y harina de maíz; material para intubación, entre otros (ATSDR, 1995; You *et al.*, 2018; García *et al.*, 2018).



**Figura 2. Estructura química del dietil ftalato.** Su estructura consiste en un anillo de benceno y dos grupos funcionales ésteres enlazados por carbonos consecutivos (tomado de National Research Council, 2008).

El DEP no se encuentra unido químicamente a los polímeros de los plásticos y por lo tanto se libera a temperaturas moderadamente altas o cuando los productos que lo contienen tienen un pH ligeramente ácido. Cuando las sustancias que contienen DEP son perfumes, cremas y talcos, su vía de exposición es a través de la vía dérmica, debido a que estos productos utilizan el DEP como estabilizante, ayudando a facilitar la disolución de los componentes del producto y mantener una apariencia homogénea (National Research Council, 2008). El humano se encuentra expuesto al DEP a través de inhalación, ingestión y absorción dérmica (ATSDR, 1995). En

pacientes hospitalizados se ha detectado exposición a DEP por contacto con tubos de sondas intravenosas en la nutrición parenteral total o por tubos utilizados para la respiración artificial, donde los ésteres de ftalatos son liberados por calor y transferidos a la mezcla de nutrición (Genius *et al.*, 2012).

La presencia de DEP en el ambiente es variable, siendo en suelos agrícolas de 0.26 a 2.53 mg/kg; en agua subterránea de 6.70 µg/L<sup>-1</sup> y en aire de 136–203 ng/mL. En estudios recientes se determinaron las concentraciones del DEP en diversos alimentos de la canasta básica en México como se muestran en la **Tabla 1** (García *et al.*, 2018).

**Tabla 1. Concentraciones de DEP en productos de la canasta básica de México** (García *et al.*, 2018).

<b>Alimento</b>	<b>Concentración máxima (µg/kg)</b>
Abarrotes	2.5
Aceites y grasas	154
Aderezos y salsas	84
Cárnicos y aves	1.4
Cereales y tubérculos	558
Frutas y verduras	2.0
Pescados y mariscos	9.3
Embutidos y lácteos	11

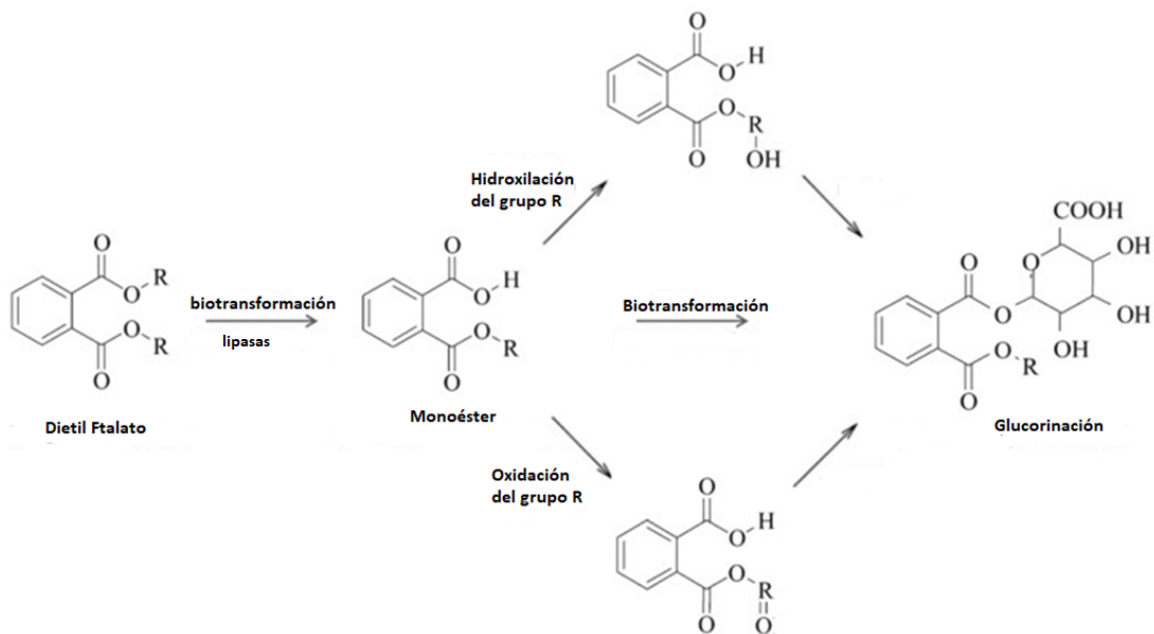
En productos de uso dérmico, la exposición reportada de DEP se encuentra entre 1-15 g/kg/día (Genius *et al.*, 2012) y en fluidos biológicos la concentración del metil-ftalato (MEP), metabolito del DEP con actividad biológica, es de 5.69-535 µg/g (**Tabla 2**).

**Tabla 2. Concentraciones de MEP en suero, sudor y orina ( $\mu\text{g/g}$ ). Los datos muestran la media  $\pm$  DS (Franco *et al.*, 2011).**

<b>Población</b>	<b>Orina</b>	<b>Suero</b>	<b>Sudor</b>
Americana	535 $\pm$ 1560	5.69 $\pm$ 8.61	91.1 $\pm$ 172
Mexicana	83.20 $\pm$ DS	-	-

## 1.2 Metabolismo del DEP

Al ingresar al cuerpo, el DEP es metabolizado rápidamente por la lipasa salival que induce una hidrólisis de un enlace alquilo del DEP generando ftalatos de monoésteres que contienen un ácido carboxílico y un éster en la cadena lateral: metil-ftalato (MEP), monobutil-ftalato (MBP), metilhexil-ftalato (MEHP), entre otros, los cuales posteriormente son transformados en metabolitos oxidados por la oxidación en su carbono terminal o penúltimo de la cadena lateral del éster alquílico o pueden ser hidroxilados por su carbono terminal denominándose hidroxí ftalatos u oxo ftalatos. Los metabolitos oxidados poseen actividad disruptiva al generar un estado de homeorresis en el organismo, en especial los metabolitos de bajo peso molecular (MEP y MBP), los cuales permanecen en el cuerpo humano y se bioacumulan en tejido graso, hígado y músculo esquelético, o pueden conjugarse por la glucoronidación y sulfatación para su posterior degradación hepática y excreción vía renal-fecal (**Fig. 3**) (ATSDR, 1995; National Research Council, 2008). El metabolismo de MEP y MBP depende de factores como la dosis, edad, sexo, raza y patologías presentes (National Research Council, 2008).



**Figura 3. Metabolismo del DEP.** El DEP ingresa por vía oral y es metabolizado por lipasas salivales, las cuales inducen hidrólisis de un enlace alquilo generando ftalatos de monoésteres que contienen un ácido carboxílico y un éster en la cadena lateral. En el intestino, los metabolitos sufren una segunda biotransformación, donde sufren una glucoronidación o sulfatación en el grupo "R" para su excreción vía urinaria (Modificado de ATSDR, 1995; National Research Council, 2008).

Los ftalatos pueden unirse y activar a receptores de membrana celular y receptores nucleares como: receptores de activadores de la proliferación peroxisomal (PPARs), receptores X de ácido retinoico (RXR), receptores para ácido retinoico (RAR), entre otros, así como atravesar estructuras como la barrera hematoencefálica y placenta, y su acumulación induce alteraciones del sistema nervioso (Cheng *et al.*, 2012, Tao *et al.*, 2019).

### 1.3 Efectos biológicos de los ftalatos en sistema nervioso

Los ftalatos inducen distintas alteraciones en el sistema nervioso con implicaciones funcionales relevantes. En un estudio realizado por Tseng y col. (2013) se encontró que el tratamiento con los ftalatos DEHP, DBP y DIBP modifican la concentración

de especies reactivas de oxígeno como iones de oxígeno y peróxido en las neuronas, provocando neurotoxicidad y alteraciones en el sistema locomotor de *Caenorhabditis elegans*. En un modelo experimental empleando embriones de pez cebra que fueron expuestos a dosis de 5, 50 y 500 µg/L de DEP, se encontró que la dosis más alta de DEP aumento la expresión de *mbp* (por sus siglas en inglés, *proteína básica de mielina*), la cual es una proteína estructural de la vaina de mielina que rodea los axones de las neuronas e indujo la inhibición de la enzima acetilcolinesterasa causando neurotoxicidad en los embriones (Xu *et al.*, 2013).

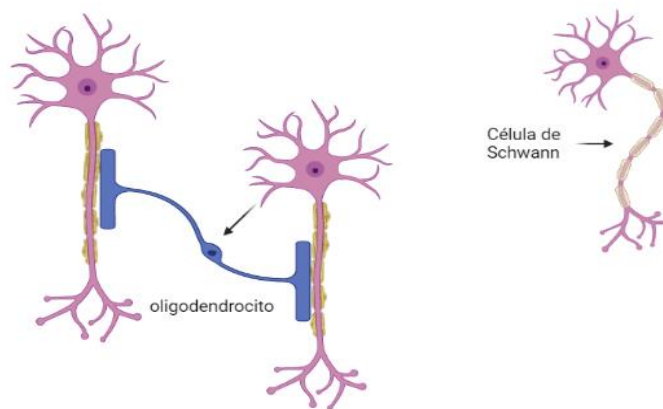
Estudios epidemiológicos han mostrado asociaciones entre los niveles de ftalatos y la presencia de alteraciones conductuales. En un estudio realizado por Engel *et al.*, (2010) se determinó la concentración de los ftalatos MEP (mono-etil ftalato), MiBP (mono-isobutil ftalato), MBP (mono-butil ftalato) y MMP (mono-metil ftalato) en orina de madres embarazadas y de sus hijos desde el nacimiento y hasta la edad de 9 años, y se encontró que existía una asociación positiva entre la concentración de ftalatos y problemas de conducta y de externalización, así como con un mayor número de niños con diagnóstico con TDAH y ansiedad aumentada.

## **2. Neurona y glía**

El sistema nervioso central (SNC) y sistema nervioso periférico (SNP) se componen de sustancia gris y sustancia blanca, la primera abarca las células de la glía y neuronas (somas) y la blanca incluye todas las fibras nerviosas; el color blanco es proporcionado por el alto contenido de lípidos presente en la mielina. La neurona es la unidad funcional del sistema nervioso, es una célula excitable especializada en la recepción y transmisión de impulsos eléctricos, se encuentra formada por un soma (cuerpo) y prolongaciones denominadas neuritas. Las neuritas que reciben el estímulo se denominan dendritas, mientras que la neurita que envía el estímulo se denomina axón, el cual está cubierto de mielina que le proporciona mayor conductividad y mejora la comunicación neuronal. La neurona se asocia a la glía,

que se encuentra formada por células de origen nervioso cuya función principal es alimentar, proteger, sostener y actuar como sistema de defensa de las neuronas. La glía comprende a los astrocitos, oligodendrocitos, microglía; células endoteliales; células capsulares y células de Müller (Snell, 2007).

Los oligodendrocitos junto con las células de Schwann sintetizan la mielina que recubre los axones neuronales en SNC y SNP, respectivamente (**Fig. 4**). Los oligodendrocitos y células de Schwann se originan durante el desarrollo embrionario a través de la oligodendrogenesis y genesis de células de Schwann (Snell, 2007).

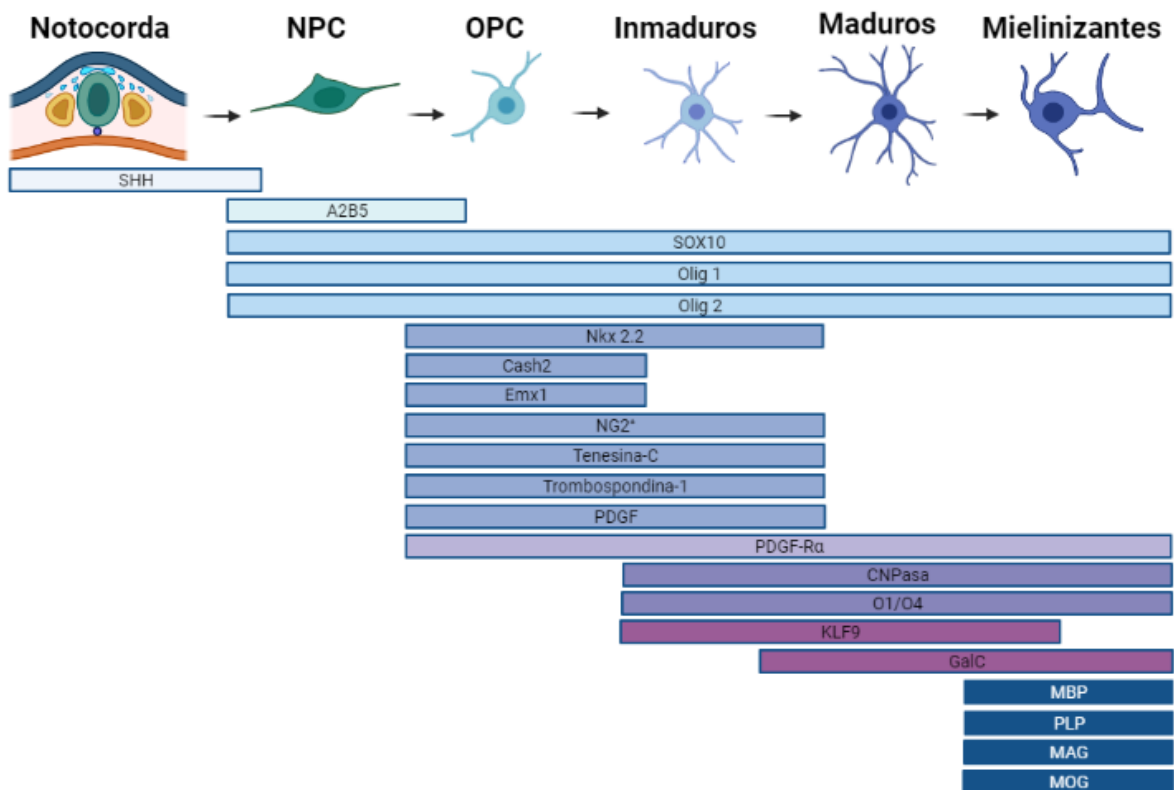


**Figura 4. Interacción de un oligodendrocito y una célula de Schwann con la neurona.** Se muestra la interacción de las dos células mielinizantes con neuronas.

## 2.1 Oligodendrogenesis

La oligodendrogenesis comienza durante la etapa embrionaria con la formación de la capa germinativa ectodermo, la cual da origen a una placa denominada notocorda en donde se sintetiza la proteína SHH (*por sus siglas en inglés, sonic hedgehog*) para iniciar con la neurogenesis (**Fig. 5**). La expresión de SHH induce la formación de áreas denominadas "dominios progenitores en el tubo neural", uno de estos, es el dominio de precursores de neuronas motoras (pMN), localizado en el eje dorsal-ventral del tubo neural, el cual genera a las células progenitoras neurales (NPC) que expresan A2B5 (Rojas *et al.*, 2014; Kuhn *et al.*, 2019) y a las células progenitoras

de oligodendrocitos de tipo 2 de astrocitos (O-2A). A su vez, las células O-2A, maduran hacia células precursoras de oligodendrocitos (OPCs), las cuales son células poligonales y con morfología bipolar que expresan marcadores específicos como OLIG2, OLIG1 y SOX10, los cuales son esenciales para la diferenciación celular de NPCs hacia OPCs (Barateiro *et al.*, 2016).



**Figura 5. Oligodendrogénesis.** Se muestran los distintos tipos celulares del proceso de generación de oligodendrocitos que inicia en la notocorda y culmina con oligodendrocitos mielinizantes. Se indican las proteínas que intervienen en cada etapa de la oligodendrogénesis. Modificado de Ackerman *et al.*, 2015.

La proliferación de OPCs se determina por tres oleadas que inician en la zona ventral posterior al cierre del tubo neural en todos los vertebrados: 1) la primera oleada genera OPCs en prosencéfalo, los cuales expresan proteína Nkx 2.2, esencial para la migración de las células hacia otras regiones del telencéfalo; 2) la



segunda oleada inicia en la zona dorsal y genera OPCs que expresan proteína Cash2; y 3) la tercera oleada inicia en zonas de la corteza durante etapas postnatales y genera OPCs que expresan la proteína Emx1 (Kuhn *et al.*, 2019; Barateiro *et al.*, 2016). Las OPCs que están en prosencefalo y zona dorsal comienzan a expresar diferentes mitógenos, los principales son los proteoglicanos de sulfato de condroitina (NG2<sup>+</sup>) los cuales promueven un aumento de la proliferación celular. Las OPCs que se generan en la segunda oleada se caracterizan por la expresión de factores de supervivencia dada por astrocitos y neuronas, además que representan el 5 - 8% del total de las células gliales tanto en materia gris como en materia blanca, estas se encuentran localizadas en la materia blanca expresando NG2<sup>+</sup> que promueve un aumento en la respuesta proliferativa a mitógenos para su maduración; sin embargo, las OPCs localizadas en materia gris presentan menor respuesta a mitógenos (Kuhn *et al.*, 2019).

Posteriormente las OPCs migran desde el dominio pMN a la zona subventricular (SVZ) del cuarto ventrículo y otras partes del encéfalo (Barateiro *et al.*, 2016) a través de señalización de morfógenos y moléculas de la matriz extracelular como tenesina-C y trombospondina-1, las cuales actúan como mediadoras cerebrales, y de la activación de la proteína NG2<sup>+</sup>, la cual inicia con su actividad reguladora para la migración de las OPCs (Baumann, 2001; Ackerman *et al.*, 2016). La migración de las OPCs se da en "salto o gateo" a través de los vasos sanguíneos del SNC por señalización de la vía WNT (*por sus siglas en inglés, Wingless related integration site*) (Kuhn *et al.*, 2019) y de forma multidireccional a través de señales de atracción y repulsión por parte de neuronas y astrocitos (Barateiro *et al.*, 2016). Después de que las OPC's migran y se instalan en las áreas destinadas, inicia otra proliferación celular por señales provenientes de astrocitos y neuronas, tales como PDGF (*por sus siglas en inglés, factor de crecimiento derivado de plaquetas*), otro fuerte mitógeno que estimula la proliferación de las OPC en estos sitios (Barres *et al.*, 1993) y su receptor la proteína PDGFR- $\alpha$  (*por sus siglas en inglés, receptor  $\alpha$  del*

*factor de crecimiento derivado de plaquetas*) que ayuda a la supervivencia celular (Kuhn *et al.*, 2019).

Para todas las oleadas de generación de OPCs, se presenta un mecanismo intrínseco de tiempo el cual tiene dos componentes: 1) un componente que cuenta el tiempo de división celular y 2) un componente efector para la proliferación que detiene el ciclo celular por medición del tiempo, al inhibir a la ciclina D1 y c-Myc (Calza, 2015; Gao *et al.*, 1998), el cual está determinado por cierto número de divisiones por célula de OPC (Billon *et al.*, 2001; Gao *et al.*, 1998). Este mecanismo no considera el número de divisiones celulares sino el tiempo de división (Ahlgren *et al.*, 1997) y el número final de OPCs está regulado por la proliferación celular y la muerte celular programada (apoptosis) (Farsetti *et al.*, 1992; Baumann, 2001).

Una vez concluida la segunda oleada de proliferación, las OPC maduran hacia oligodendrocitos premielinizantes (OL-premielinizantes) que expresan Nkx 2.2, la cual ayuda a que estos se extiendan y envuelvan los axones sin formar mielina (Ackerman *et al.*, 2015); y al interactuar con un axón pierden su forma bipolar y pasan a tener morfología multipolar, comenzando a construir extensiones mayores sobre los axones expresando tres marcadores: a) 2', 3'-nucleotidocíclico 3'-fosfatodiesterasa (CNPasa), b) O4, presente desde los progenitores tardíos y c) O1, presente en OL-premielinizantes (Kuhn *et al.*, 2019; Barateiro *et al.*, 2016). La maduración hacia OL-premielinizante es influenciada por señales de otras células como astrocitos y la actividad neuronal, las cuales ayudan a determinar el número determinado de axones por mielinizar (Farsetti *et al.*, 1992; Baumann, 2001); sin embargo, aún se desconocen las señales o receptores que determinan qué axones deben ser mielinizados, aunque se cree que podría ser por factores propios de la actividad neuronal (Ackerman *et al.*, 2016).

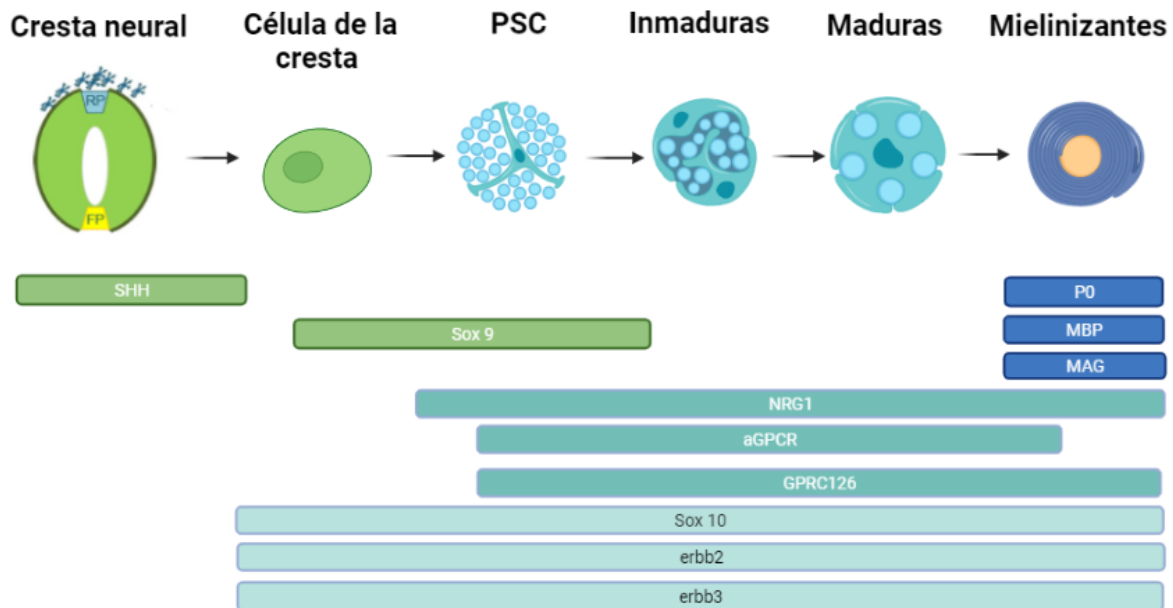
En esta etapa los OL-premielinizantes son influenciados por el factor de transcripción Kruppel-like factor 9 (KLF9), el cual actúa como regulador del tiempo de diferenciación y maduración de los OL (Dugas *et al.*, 2012). Además, se expresa GalC, el cual es un lípido perteneciente a los galactocerebrósidos y

sulfogalactosilceramidas que actúa como marcador temprano de maduración (Baumann, 2001). Posterior a su maduración, los OLs se extienden y retraen hacia los axones neuronales a través de su citoesqueleto, para asentarse en su posición final y dar comienzo a la formación de mielina. Los OL maduros se caracterizan por sintetizar proteínas estructurales de la vaina de mielina: MBP, proteína de proteolípidos (PLP), proteína asociada a glucoproteína (MAG) y glicoproteína de la mielina de oligodendrocitos (MOG) además de expresar el factor regulador del gen de mielina (MRF) y la proteína del dedo de zinc 488 (Barateiro *et al.*, 2016). Dicha interacción con el axón promueve cambios en la estructura del OL y hace que se proyecte hacia los axones, permitiendo así que la mielina se extienda alrededor del axón. La mielinización se realiza de manera lateral y hacia la parte inferior del axón para la formación de las capas de mielina. Cabe señalar que solo los axones de gran diámetro se mielinizan. Una vez concluido el proceso de mielinización, la mielogénesis en OL-maduros será regulada por la actividad de Ca<sup>+</sup> y la actividad neuronal (Kuhn *et al.*, 2019).

## 2.2 Desarrollo de las células de Schwann

La generación de las células de Schwann (CS) comienza durante el desarrollo embrionario cuando surge la capa germinativa denominada ectodermo, el cual da lugar a la cresta neural en donde se sintetiza la proteína SHH de donde surgen las células precursoras de las células de Schwann (PSC) (**Fig. 6**), las cuales expresan SOX9 y SOX10, que son factores de transcripción que regulan la migración y proliferación celular. Las SC migran hacia la periferia y una vez que se instalan en el lugar designado, expresan a las proteínas ErbB2 y ErbB3; posteriormente, las SC detectan a los axones y realizan la separación de estos por tamaño, en un proceso denominado "clasificación radial"; durante el cual los axones expresan neuregulina 1 tipo 3 (NRG1), la cual deriva de los axones sin mielinizar y su presencia varía dependiendo del tamaño axonal; los axones de calibre pequeño la expresan en

menor cantidad, mientras que los de mayor calibre la expresan en altos niveles, dicha clasificación de prolongaciones citoplasmáticas entre los diferentes axones permite separarlos y establecer la relación 1:1 axón:célula de Schwann (Ackerman *et al.*, 2016).



**Figura 6. Desarrollo de las células de Schwann.** Se muestran los distintos tipos celulares del proceso de generación de las células de Schwann que inician en la cresta neural y culmina con células de Schwann mielinizantes. Se indican las proteínas que intervienen en cada etapa de la formación de células de Schwann. Modificado de Ackerman *et al.*, 2015.

La diferenciación de las CS promielinizantes, sus cambios morfológicos y la regulación de los genes que le confieren la capacidad de mielinizar proporcionan un aumento de síntesis de lípidos característicos de la vaina de mielina (Ackerman *et al.*, 2016). Un regulador característico para el desarrollo de las CS es el receptor acoplado a proteínas G de adhesión (aGPCR), el cual tiene un dominio de transmembranal de siete pasos acoplado a proteínas G que media la unión célula-célula para la mielinización. El receptor GPRC126 genera ligandos denominados "stachel" los cuales son necesarios para comenzar la mielinización. En esta etapa el GPRC126 se acopla a proteínas G aumentando los niveles de AMPc que activará

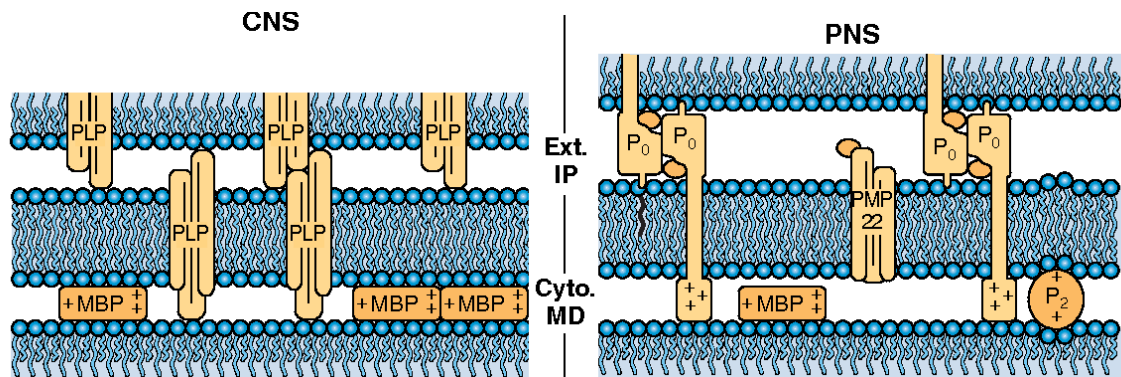
a la proteína quinasa A (PKA) dando inicio a la transcripción de genes (Oct 6) que promoverán la diferenciación de las células de Schwann (Ackerman *et al.*, 2016).

La proteína NRG1 interviene en la migración de los precursores de las CS, aumentando el número de progenitores de CS, promoviendo la supervivencia de las células y además interviene en la clasificación radial independiente de la proliferación, y regulando el espesor de vaina de mielina. La alteración de esta vía impide la generación de células precursoras de células de Schwann, así como su proliferación y migración (Ackerman *et al.*, 2016). La formación de mielina que se forma actúa como un aislante para que las señales eléctricas se propaguen con más rapidez en los axones, haciendo que el estímulo tenga una velocidad alta para llegar a los espacios sinápticos y así exista buena comunicación neuronal (Bauman, 2001). Además, funciona como un apoyo metabólico al axón y genera lactato que transfiere al axón o axones para generar energía por ATP (Kuhn, *et al.*, 2019).

Las hormonas también participan en el proceso de génesis de las células mielinizantes, y aunque los mecanismos moleculares permanecen por ser elucidados, se ha descrito su participación en la oligodendrogenesis y génesis de células de Schwann a través de distintas vías: 1) cortisol, aumenta la diferenciación, maduración, supervivencia y mielinización, a través de la fosforilación de la proteína SGK1 (kinasa 1 de glucocorticoides), la cual a su vez fosforila a NDRG1 y ambos aumentan la expresión de N-cadherina y  $\alpha/\beta$  catenina, manteniendo la estabilización y unión del axón con los OL promoviendo la mielinización; 2)  $17\beta$ -estradiol, aumenta la proliferación de las NPC a OPC, aumenta la diferenciación y disminuye la salida de las OPC del ciclo celular aumentando así la proliferación, además, aumenta la síntesis de actina para conferir mayor estabilidad a la vaina de mielina; 3) andrógenos, aumentan la diferenciación de los OL; 4) hormonas tiroideas, participan en la regulación de la proliferación, diferenciación y mielinización de los OL y la muerte de las células oligodendocíticas, y su inhibición disminuye la proliferación de los OL (Long *et al.*, 2021).

### 2.3 Composición de la mielina

La mielina se caracteriza por tener una composición en SNC 70% de lípidos y un 30% de proteínas, mientras que en SNP es de 71.3% de lípidos y 28.7% de proteínas. Las proteínas más abundantes se encuentran la MBP, PLP y P0 (**Fig. 7**), mientras que las de menor abundancia son CNP, MAG, P2 y PMP-22 (**Tabla 3**) (Harry *et al.*, 1998).



**Figura 7. Proteínas más abundantes de la vaina de mielina.** Se aprecia la proteína MBP, PLP, y P0 distribuidas en la vaina de mielina y su forma arquitectónica (Tomado de Rasban *et al.*, 2012).

**Tabla 3. Porcentaje de proteínas en la mielina del SNC y SNP** (tomado de Harry *et al.*, 1998).

Proteína	SNC (%)	SNP (%)
MBP	30	18
PLP	50	0.01
P0	0.01	50
CNP	4	0.4
MAG	1	0.1
P2	<1	1-15
PMP-22	<0.01	5-10

Las proteínas MBP tienen la función de estabilizar y formar la vaina de mielina, son codificadas por el gen *Golli* y presentan varias isoformas derivadas de splicing alternativo (Jean *et al.*, 1998). Todas sus isoformas son codificadas por los exones I, II, IV y VII. Las isoformas más pequeñas en tamaño (kDa) tienen la función de remielinización (I, II, IV) en lesiones a nivel de la vaina de mielina (GeneCard, 2022).

Las PLP o proteínas de proteolípidos son las de mayor composición en el SNC, tienen la función de compactación, estabilización y mantenimiento de la vaina de mielina, así como de supervivencia axonal (GeneCard, 2022).

La proteína p0, también conocida como MPZ, es la más abundante en el SNP, su función es la de compactación de estructuras membranales en la vaina de mielina (Raasakka *et al.*, 2019).

Dichas proteínas se encuentran altamente conservadas en humano, ratón y pez cebra (Ackerman *et al.*, 2016). Su estudio permite comprender el proceso de mielinización y el rol de factores que pueden afectar su estabilidad y funcionalidad, y favorecer el desarrollo de patologías asociadas a procesos de desmielinización.

## JUSTIFICACIÓN

En la actualidad existe un elevado uso de objetos materiales y consumo de alimentos que contienen disruptores endócrinos, tales como el dietil ftalato presente en frutas, verduras, vinos, aceites, cosméticos, juguetes, entre otros. La presencia de DEP y sus metabolitos se ha detectado en diferentes fluidos biológicos en humanos. Asimismo, el DEP posee la capacidad de alterar la homeostasis hormonal y se ha relacionado a la presencia de enfermedades de índole neurológico, siendo la glía uno de los posibles blancos de afectación. El desarrollo de los oligodendrocitos y células de Schwann en etapas embrionarias puede afectarse por factores externos o compuestos que alteran la formación de mielina y repercutir negativamente en la transmisión del impulso nervioso. Por lo anterior, como un

primer acercamiento para comprender los efectos del DEP en sistema nervioso, en el presente trabajo nos planteamos evaluar si el DEP podría alterar la formación de mielina, empleando el modelo experimental de pez cebra (*Danio rerio*).

## **HIPÓTESIS**

El dietil ftalato (DEP) altera la locomoción y mielogénesis del pez cebra (*Danio rerio*).

## **OBJETIVO GENERAL**

Determinar el efecto del dietil ftalato (DEP) en la locomoción y mielogénesis del pez cebra (*Danio rerio*).

## **OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

1. Evaluar el efecto del dietil ftalato sobre la locomoción de larvas de pez cebra.
2. Determinar el efecto del dietil ftalato sobre la formación de las fibras de mielina en larvas de pez cebra.
3. Determinar el efecto del dietil ftalato en la expresión de *mbp*, *plp*, *p0* y *sox10* en larvas de pez cebra.

## **MATERIAL Y MÉTODOS**

### **1. Modelo experimental**









El pez cebra (*Danio rerio*) es un vertebrado pequeño de agua dulce y cálida perteneciente de ríos y lagunas; y en los últimos años se les puede encontrar en



tiendas de mascotas o acuarios. En efecto, se trata de un pez con un vasto número de ventajas que lo han posicionado como modelo experimental en las neurociencias. Esta especie se reproduce exitosamente en cautiverio y de una sola hembra se pueden llegar a obtener hasta 200 embriones, pueden pasar de tener una sola célula a contar con una cola y corazón en menos de 48 h (Kimmel *et al.*, 1995).

Su transparencia durante el desarrollo y de manera externa a la madre hace que sea una forma fácil de obtener imágenes del proceso de desarrollo en tiempo real. En comparación con otros modelos animales como el ratón, su mantenimiento resulta de bajo costo y dado que alrededor del 70-90% de su genoma se comparte con el humano, los procesos de mielinización, la composición de la mielina y su empaquetamiento están conservados tanto en humanos como en el pez cebra. Sus embriones son adecuados para identificar fármacos potenciales o sustancias tóxicas, una de las razones por las cuales esta especie es empleada para abordar preguntas experimentales en diversos campos del conocimiento biológico, incluyendo el proceso de mielogénesis y su alteración con sustancias disruptoras (Preston *et al.*, 2015, Ackerman *et al.*, 2015)

Las fases del desarrollo embrionario del pez cebra se organizan por periodos de tiempo en ocho etapas que se ilustran en la **Figura 8**.

<b>Zigoto</b> 0 hpf	<b>Escisión</b> 3/4 hpf	<b>Blástula</b> 2 ¼ hpf	<b>Gástrula</b> 5 ¼ hpf
			
<b>Segmentación</b> 10 hpf	<b>Faringula</b> 24 hpf	<b>Eclosión</b> 48 hpf	<b>Larva temprana</b> 72 hpf
			

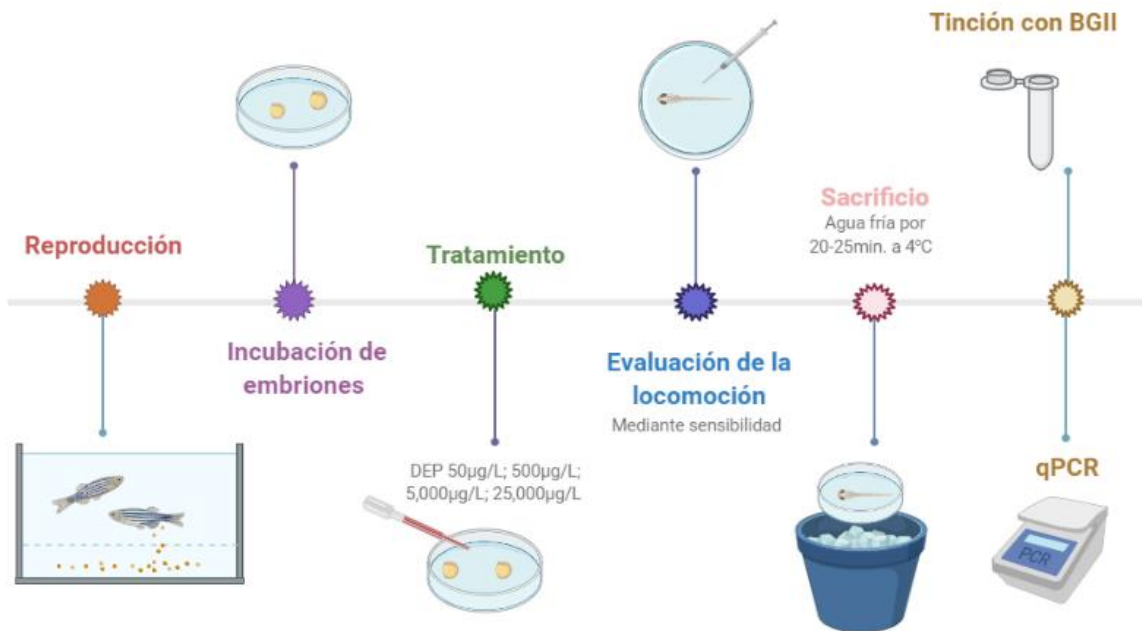
**Figura 8. Fases del desarrollo embrionario del pez cebra.** Las etapas del desarrollo embrionario se diferencian de acuerdo al número de células y horas. **Zigoto**, es la unión de las dos células germinativas. **Escisión**, es la división de las células en intervalos de 15 min. **Blástula**, periodo en el cual el blastocito comienza a verse como una esfera de células (64 células). **Gástrula**, comienzan los movimientos celulares morfogenéticos y se producen las capas germinativas. **Segmentación**, se visualizan las somitas y comienzan a hacerse visibles los órganos primarios, la yema de la cola se hace prominente y se alarga el embrión. **Faringula**, en esta fase, el desarrollo tiene semejanza con otros vertebrados y presenta mejor organización de las estructuras que lo componen (ojos, corazón, saco vitelino, aleta, etc). **Eclosión**, etapa donde el embrión sale del corión y la morfogénesis es casi completa. **Larva temprana**, se caracteriza por el nado de la larva y alta actividad motora (Modificado de Kimmel *et al.*, 1995)

## 2. Bioseguridad

Los procedimientos se realizaron de acuerdo con la NOM-062-Z00-1999. Los embriones de pez cebra se incubaron a temperatura de 27-28°C. Una vez que la

hembra liberó los embriones, estos se lavaron cuidadosamente con agua del grifo para después pasarlos a cajas Petri con su respectivo medio de cultivo y tratamiento. Los residuos biológicos y guantes fueron desechados en bolsa roja. A continuación, se describe la metodología utilizada (**Fig. 9**).

### 3. Diagrama metodológico



**Figura 9. Metodología.** El diagrama muestra los pasos realizados para llevar a cabo el protocolo de experimentación, el cual inicia con la reproducción de los peces hasta obtener los embriones, pasan a ser incubados y a proporcionarles el tratamiento a las diferentes concentraciones de DEP hasta llegar a las 120 hpf. Se les evalúa la capacidad de locomoción y se sacrifican para analizar el contenido de mielina (BGII) y la cuantificación de genes implicados en la mielogénesis (qPCR).

### 4. Metodología

#### 4.1 Reproducción y recolección de embriones del pez cebrá

Para la obtención de embriones de pez cebrá, se colocaron a los peces adultos en cajas de reproducción (un macho y dos hembras), los cuales fueron aclimatados

con un flujo de agua corriente a 28°C y un fotoperiodo de 16:8 (luz-oscuridad) en la pecera dentro del laboratorio de "Receptores Nucleares y Neurobiología" de la UNAM durante toda la noche. Al día siguiente se removió el separador de la caja de reproducción y se dejaron juntos para la reproducción por un tiempo aproximado de 20-25 min, una vez que los embriones fueron expulsados, los peces se trasladaron a la pecera, mientras que los embriones pasaron a una coladera de plástico con rejillas muy compactas donde se les dio un cuidadoso lavado con agua corriente y por consiguiente para ser trasladados a cajas Petri.

#### **4.2. Medio de cultivo embrionario**

Los embriones de pez cebra fueron mantenidos en un medio de cultivo embrionario (ME) que contenía los nutrientes necesarios para su crecimiento: 5 mM NaCl, 0.17 mM KCl, 0.33 mM CaCl<sub>2</sub>, 0.33 mM MgSO<sub>4</sub> y 5 gotas de azul de metileno (Jung *et al.*, 2010).

#### **4.3 Tratamiento de embriones con DEP**

Los embriones fueron agrupados en cajas Petri (n = 25 grupo) con ME y fueron incubados a 28°C durante 120 h, en presencia o ausencia de DEP (50; 500; 5000; 25000 µg/L). Las concentraciones empleadas de DEP equivalen a aquellas administradas en estudios previos (Xu *et al.*, 2013) y/o concentraciones reportadas en sangre y orina de humano (García *et al.*, 2018). La **Tabla 4** muestra las equivalencias de los tratamientos en molaridad. El tratamiento fue administrado por inmersión durante cinco días (120 h) con recambio de medio cada 24 h.

**Tabla 4. Concentraciones experimentales de DEP.**

<b>DEP (<math>\mu\text{g/L}</math>)</b>	<b>DEP (<math>\mu\text{M}</math>)</b>
50	0.22
500	2.2
5000	22.4
25000	112

#### ***4.4 Evaluación de la locomoción por el sistema a blanco y negro automatizado***

La evaluación de la locomoción de las larvas se realizó a las 120 hpf mediante un sistema de imagen a blanco y negro. El fundamento del sistema es evaluar la movilidad locomotora de las larvas simulando la corriente de los lagos o ríos que siguen por naturaleza. El sistema consistió en una imagen con barras negras y blancas intercaladas de forma horizontal que se proyectaban en formato de video creando un movimiento de los colores blanco y negro hacia la parte superior o inferior de la imagen y colocado debajo de las cajas Petri de los peces. Entre cada tipo de movimiento, en el video se reprodujo una imagen en blanco para identificar la posición de las larvas entre cada tipo de movimiento (**Fig. 10**). La evaluación se realizó de la siguiente manera (Creton, 2009): las larvas fueron posicionadas en una caja Petri limpia con un poco de medio de cultivo; posteriormente, la caja fue colocada sobre una pantalla de laptop que proyectaba la imagen de las barras blanco y negro para habituar a las larvas al nuevo ambiente visual durante 2 min. Posteriormente se inició la reproducción del video de las barras blancas y negras intercaladas con movimiento hacia la parte superior e inferior de la imagen. Se tomaron fotografías entre cada imagen en blanco para determinar la posición de las larvas y se registraron las posiciones de las larvas por cuadrantes superior e inferior. Dicho proceso se realizó en cuatro ocasiones.



**Figura 10. Imagen del sistema de barras a blanco y negro.** Se muestra la caja Petri que contenía a las larvas, posicionada sobre la imagen de barras alternadas de color blanco y negro.

#### **4.5 Evaluación de la locomoción mediante respuesta evocada por el tacto**

El sistema de locomoción mediante respuesta evocada por el tacto se fundamenta en la evaluación de la respuesta o movimiento que resulta de un estímulo de manera externa en las larvas, el cual se caracteriza por simular una amenaza a la larva, la cual consiste en proporcionar un pequeño toque en el tronco de la larva y determinar su reacción en locomoción. El protocolo consistió en colocar la larva en una caja de Petri con medio de cultivo templado a 27-28 °C y se procedió a realizar un ligero toque en el tronco de la larva con una aguja de jeringa para insulina. Se midió el tiempo de reacción de la larva inmediatamente después del estímulo, la distancia recorrida por el alevín después de su respuesta, y la velocidad después del estímulo externo hasta los 0.20 cm como distancia establecida (Sztal, *et al.*, 2016). Los movimientos de las larvas fueron monitoreados a través de una cámara de video durante todo el experimento y los videos obtenidos fueron procesados en el programa Kinovea (versión 0.9.5).

#### **4.6 Anestesia y sacrificio**

Una vez concluidas las evaluaciones conductuales se realizó el sacrificio de las larvas mediante frío, para lo cual las cajas de Petri con las larvas fueron colocadas

sobre camas de hielo durante 25-30 min hasta verificar que su corazón dejaba de latir mediante microscopia.

#### **4.8 Tinción de la mielina en el pez cebra**

Las larvas fueron divididas en dos grupos para destinarlos a tinción con Black Gold II (BGII) y determinación de la expresión génica (ver más adelante) (n=12/grupo). Las larvas destinadas a tinción fueron colocadas a micro tubos de 1.5 mL, se les eliminó el medio de cultivo embrionario y se agregó PFA al 4% (paraformaldehído) y se incubaron por 24 h, posteriormente el PFA fue desechado y las larvas se lavaron dos veces con PBS (buffer fosfato salino) y se incubaron en sacarosa al 30% por 24 h.

Para la tinción de las fibras de mielina en el pez cebra se empleó la técnica de BGII en una preparación del animal completo o “whole-mount”. El BGII es un aurohalofosfato en polvo color amarillo que se utiliza para marcar tractos y fibras de mielina tiñéndola de color violeta. La tinción se realizó con el siguiente protocolo: el BGII y el tiosulfato (4%) fueron calentados a 60 °C por 15 min, el BGII caliente fue agregado a los microtubos con las larvas tempranas previamente fijadas y sin la sacarosa hasta sumergirlas. Posteriormente, las larvas fueron incubadas al horno por 45 min a 60 °C y al término de la incubación, se eliminó el BGII de los tubos y se lavaron dos veces con agua MilliQ por 2 min cada uno, retirando al final toda la solución remanente en el tubo. Finalmente, se agregó el tiosulfato a los tubos y se llevaron al horno por 3 min a 60 °C, se eliminó el tiosulfato y se lavó dos veces con agua MilliQ por 2 min cada uno. Se prosiguió a la visualización de las larvas por medio del microscopio Zeiss y a la toma de fotografías a través del programa TCapture.

Las fotografías fueron analizadas con el algoritmo de edición de imágenes de Matlab desarrollado por el Dr. Víctor De Lafuente Flores del Instituto de Neurobiología de

la UNAM, Campus Juriquilla, para detectar la intensidad de color que se tiñó la mielina con el BGII.

#### **4.9 Determinación de la expresión de *mbp*, *p0*, *plp* y *sox10***

Para determinar el efecto del tratamiento con DEP en la expresión de genes relacionados al proceso de mielinización, se extrajo el RNA total de las larvas a las 120 hpf mediante el método del TRIzol. El protocolo consistió en lo siguiente: se trasladaron las larvas a un microtubo de 1.5 mL sin el ME y se lavaron con agua destilada dos veces, una vez lavadas y sin ningún líquido las larvas fueron pesadas en una balanza y se prosiguió a agregar 1 mL de TRIzol por cada 100  $\mu$ L de muestra de tejido, se trituró con un mortero hasta que no se visualizó ningún tejido. Posteriormente, se agregaron 0.2 mL de cloroformo por cada 1 mL de TRIzol utilizado al microtubo, se llevó al vortex por 5 veces y se dejó reposar por 3 min, las muestras se centrifugaron a 12,000 rpm por 15 min a 4°C. Se continuó con el pipeteo del ARN para pasarlo a otro microtubo etiquetado, se añadió 0.5 mL de isopropanol por cada 1 mL de TRIzol utilizado, se llevó al vortex y se dejó reposar 10 min a temperatura ambiente. Una vez terminado el tiempo de reposo se centrifugó a 12,000 rpm por 10 min a 4 °C. Después se removió el líquido del microtubo sin llevarnos el pellet, se agregó 1 mL de etanol al 75 % por cada 1 mL de TRIzol, se pasó al vortex 2 veces y se centrifugó a 7,500 por 5 min a 4 °C. Se retiró el etanol sin llevarnos el pellet. Una vez terminado ese paso se prosiguió a suspender en pellet en agua libre de ARNasas (20-50  $\mu$ L) y se diluyó para dejarlo reposar por 5 min en el horno a 60 °C. Por último, se realizó la lectura en el equipo nanodrop para determinar la cantidad de ARN por  $\mu$ L de muestra.

Para la elaboración de RT, se partió de 2,000 ng de muestra de acuerdo con los datos obtenidos anteriormente en el nanodrop. En un tubo de PCR se prepararon las siguientes reacciones: en la primera mezcla llevamos a un total de 15  $\mu$ L de la muestra, el oligo dT y el agua DEPC. La reacción fue termociclador con el siguiente



protocolo: 70 °C por 5 min, 4 °C por 5 min, y 42 °C por 1 h. Una vez que el termociclador llegó a los 4 °C, procedimos a agregar los  $\mu\text{L}$  que se requerían de la segunda mezcla.

La segunda mezcla se preparó de acuerdo al protocolo del fabricante de la enzima, agregando 90  $\mu\text{L}$  de Buffer 5x RT, 22.5  $\mu\text{L}$  de dinucleótido, 9  $\mu\text{L}$  de RNA sintetasa, 18  $\mu\text{L}$  de enzima RT y 40.5  $\mu\text{L}$  de agua libre de ARNasas,

Para la PCR, se realizó la mezcla con los oligos y el SyberGreen, partiendo de que se agregaron 6  $\mu\text{L}$  de esta mezcla a cada tubo. Una vez que las muestras salieron del termociclador se les agregó 60  $\mu\text{L}$  de agua de PCR, y agregamos 4  $\mu\text{L}$  de está a los tubos con la mezcla del SyberGreen y los oligos sin dejar burbujas, por último, procedimos a llevar las muestras a un sistema de PCR siguiendo el programa: desnaturalización 94 °C (2min), alineación 94 °C (15 seg), síntesis de ADN 72 °C.

#### ***4.10 Análisis estadístico***

Los resultados obtenidos se analizaron mediante el análisis de varianza (ANOVA) de una vía acoplado a una prueba post-hoc de Tukey para determinar diferencias entre tratamientos y controles utilizando el programa GraphPad Prism 7.

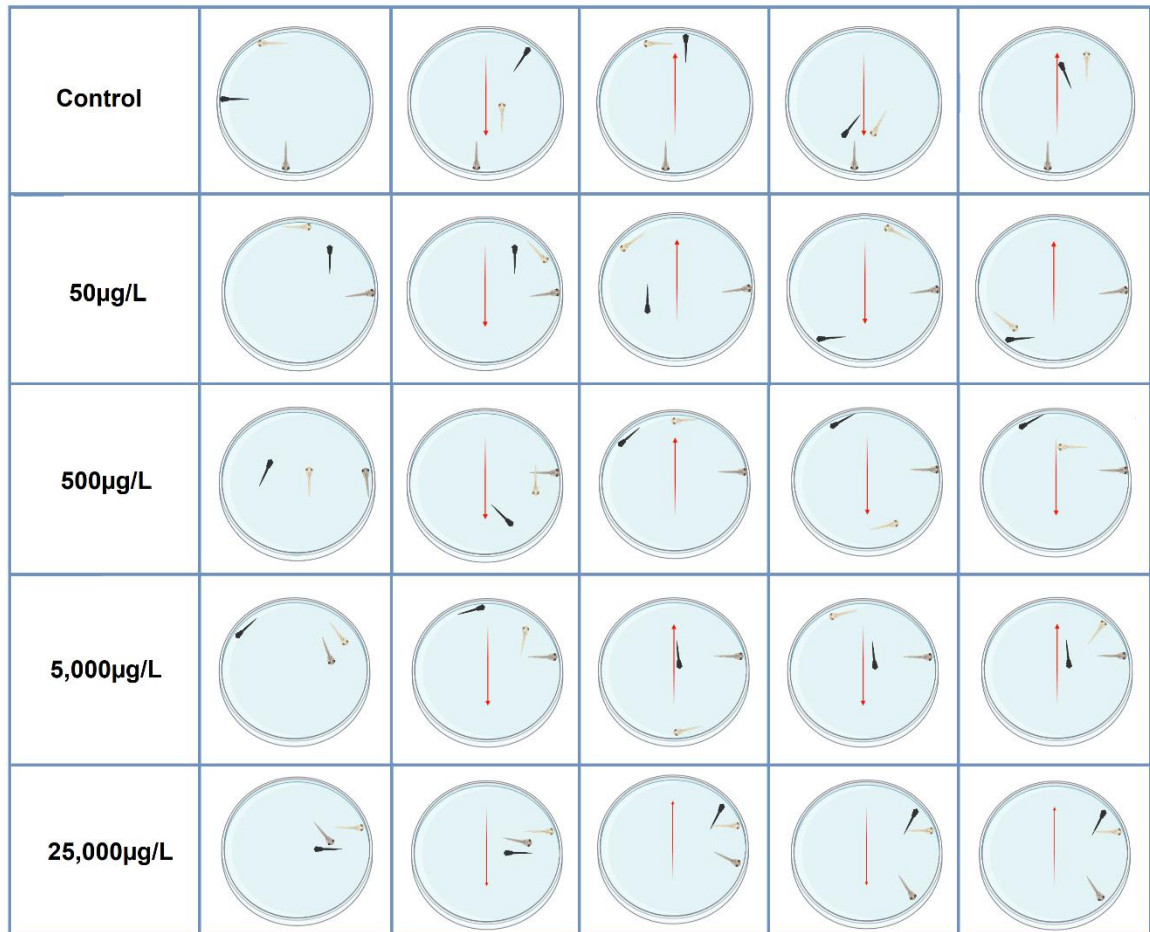
## **RESULTADOS**

### **1. Evaluación de la locomoción en las larvas tempranas**

#### **i. Sistema de locomoción a blanco y negro automatizado**

Este sistema permite visualizar el movimiento de la larva cuando el programa realiza movimientos de desplazamiento hacia arriba y hacia abajo de una imagen con líneas negras y blancas intercaladas, se analizó esta actividad motora en tres larvas por cada grupo. Se encontró que las larvas control siguen el patrón de las líneas

blancas y negras durante el ensayo conductual, sin embargo, la mayoría de las larvas tratadas con DEP pierden este patrón conductual (**Fig. 11**).

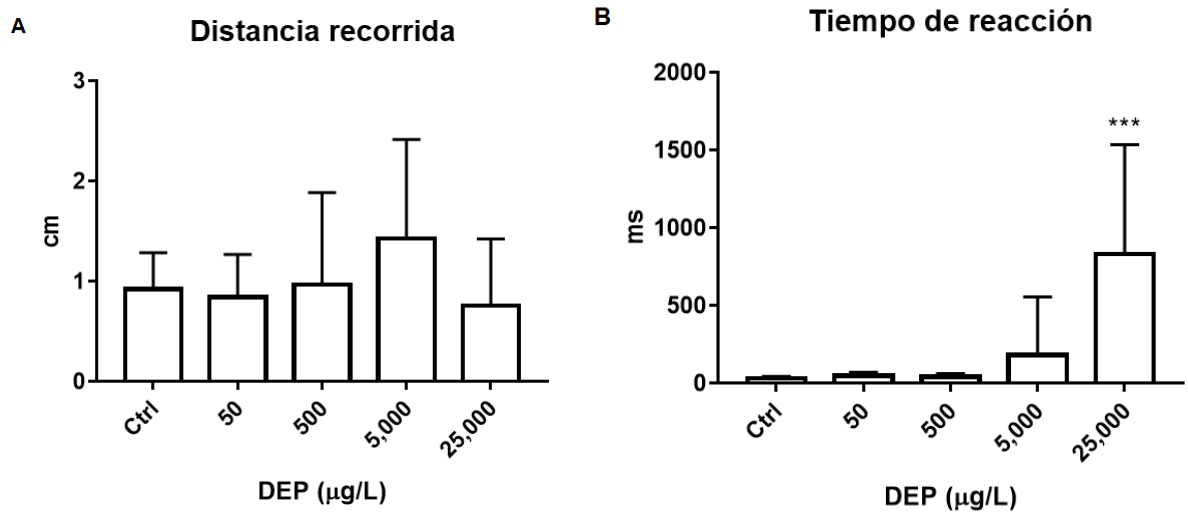


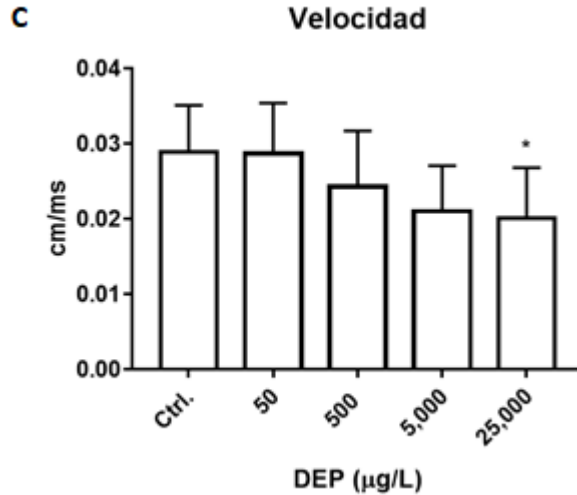
**Figura 11. Evaluación de la locomoción mediante el sistema a blanco y negro.** Se muestran las ilustraciones del desplazamiento hacia abajo y hacia arriba de las larvas controles y tratadas con DEP (n=3). La primera columna muestra la posición de las larvas antes de la evaluación y después de su adaptación al nuevo ambiente de la imagen. La segunda y cuarta columna muestran el desplazamiento hacia abajo; mientras que la tercera y quinta columna muestran el desplazamiento hacia arriba.

ii. Sistema de locomoción por respuesta evocada al tacto.

Este sistema se utilizó para evaluar el movimiento de la larva en respuesta a un estímulo de sensibilidad proporcionado por un agente externo, como es el toque del

tronco del pez con una aguja de insulina, el cual simula una amenaza para la larva. Empleando el software Kinovea (versión 0.9.5) se midió la distancia recorrida, el tiempo de reacción de las larvas y el tiempo para recorrer una distancia proporcionada (0.20 cm) una vez que estas fueron expuestas al estímulo. Los datos del análisis de la distancia recorrida de las larvas no mostraron diferencias significativas entre los grupos (**Fig. 12**), mientras que el tiempo de reacción se vio aumentado en el grupo de 25,000 µg/L (\*\*P<0.0004), es decir, las larvas con el tratamiento más agudo reaccionaron al estímulo externo de manera tardía en comparación con el control. En cuanto a la determinación de la velocidad (0.20 cm), las larvas tratadas a mayor dosis 25,000 µg/L realizaron el recorrido con una menor velocidad (\*P<0.0142).



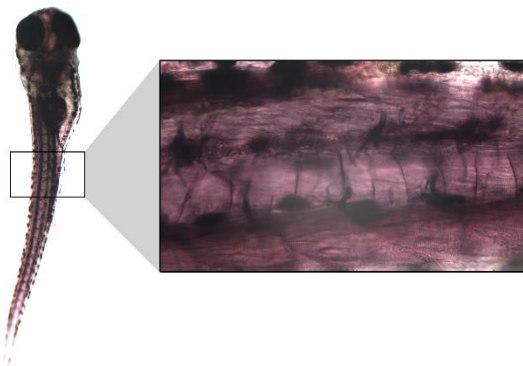


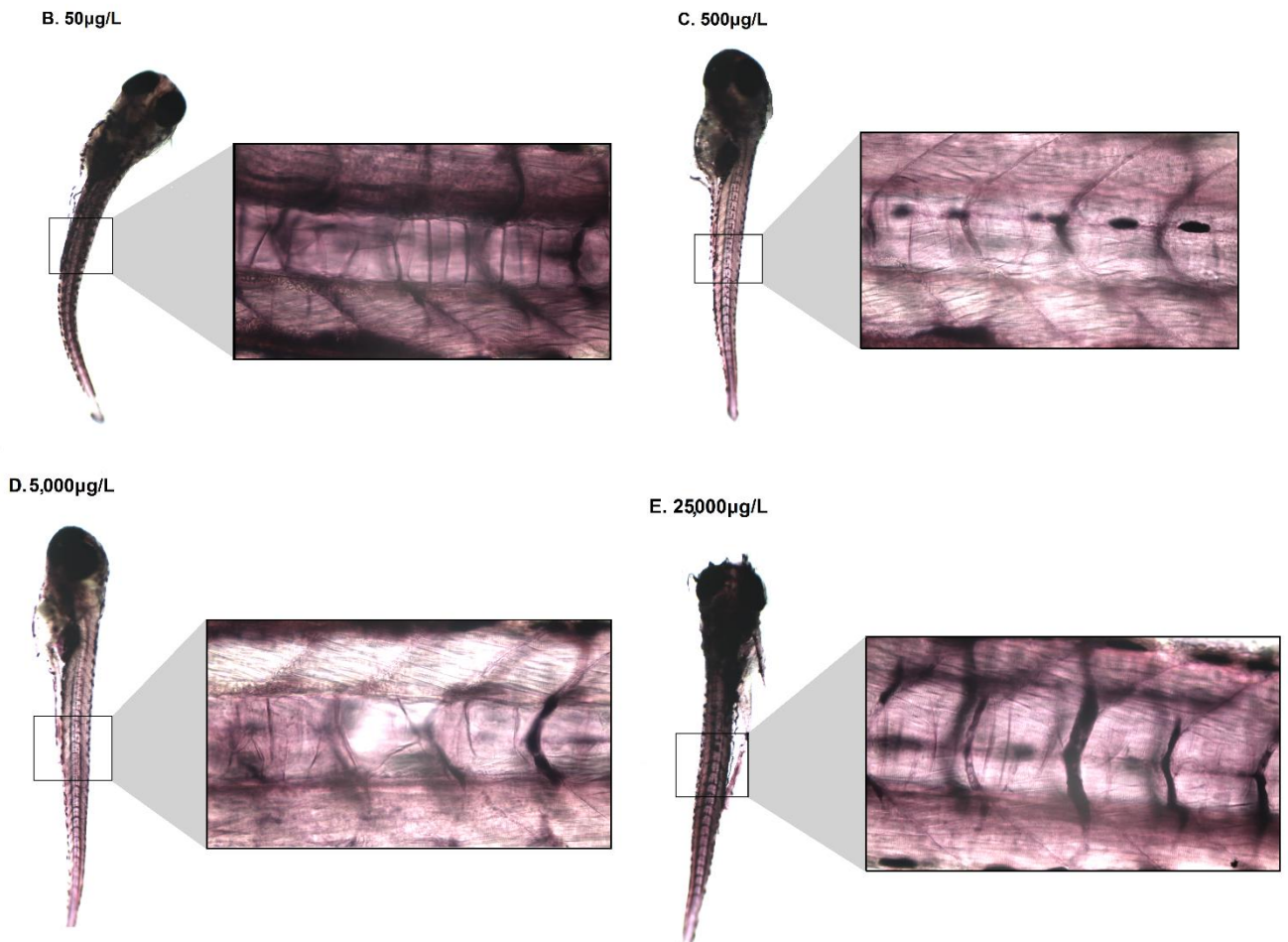
**Figura 12. Evaluación de la locomoción mediante una respuesta evocada al tacto.** Los gráficos muestran los diferentes parámetros evaluados en respuesta al estímulo externo (n=13). **A.** Distancia recorrida, **B.** Tiempo de reacción de las larvas al recibir el estímulo; **C.** Velocidad del movimiento (0.20 cm). Los datos fueron analizados con ANOVA de una vía (\*\*p<0.0004); (\*p<0.0142).

## 2. Efecto del DEP sobre la formación de fibras de mielina

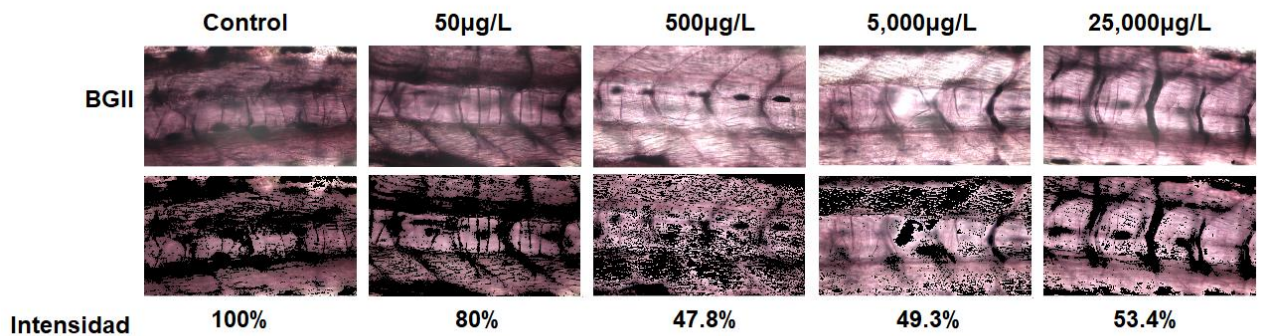
Las vainas de mielina de las larvas de pez cebra de 120 hpf fueron teñidas utilizando el colorante Black Gold II. La **Figura 13** muestra las fotografías de las larvas completas tanto del control y tratadas con DEP y el tronco se muestra en una imagen ampliada. Se realizó un análisis de imagen (Matlab, 2019) para determinar el porcentaje de intensidad teñida con BGII del área del tronco (**Fig. 14**), el cual mostro una disminución de la intensidad de tinción en todos los tratamientos con DEP: 50 µg/L (\*P<0.0196); 500 µg/L (\*\*P<0.018); 5000 µg/L (\*\*P<0.0009); 25000 µg/L (\*\*P<0.0013) (**Fig. 15**).

A. Control

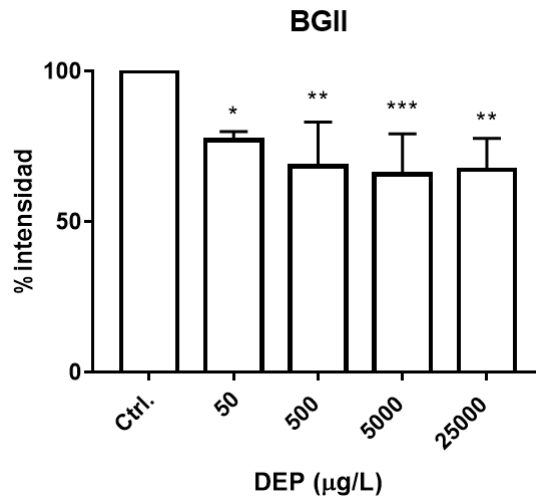




**Figura 13. Tinción con BGII.** Se muestran imágenes representativas de la tinción con BGII de larvas con o sin tratamiento con DEP.



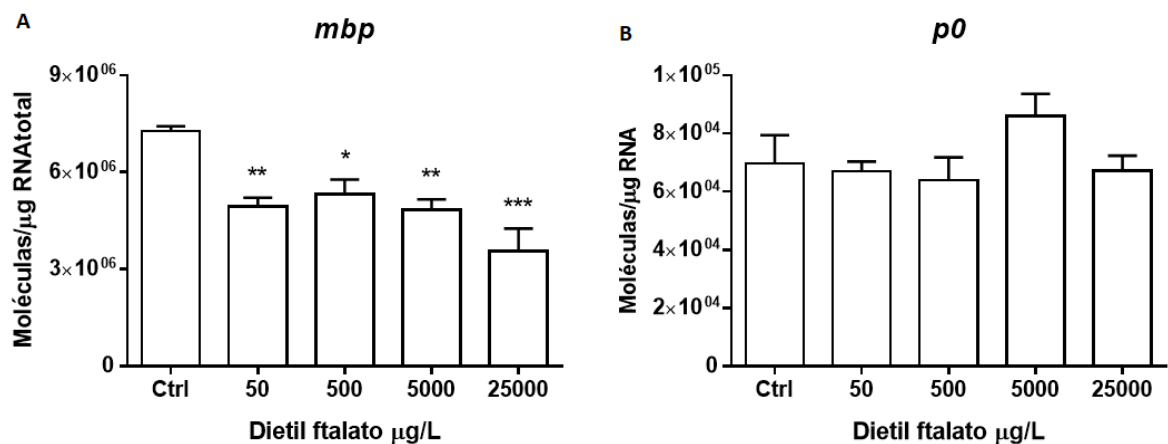
**Figura 14. Intensidad de mielina teñida con BGII.** Se muestran imágenes representativas del tronco de las larvas para cada tratamiento. La primera fila muestra los troncos teñidos con BGII, la segunda fila muestra los troncos con un enmascaramiento de la señal generada con el programa de Matlab. Se indica el porcentaje de intensidad de mielina para cada dosis.

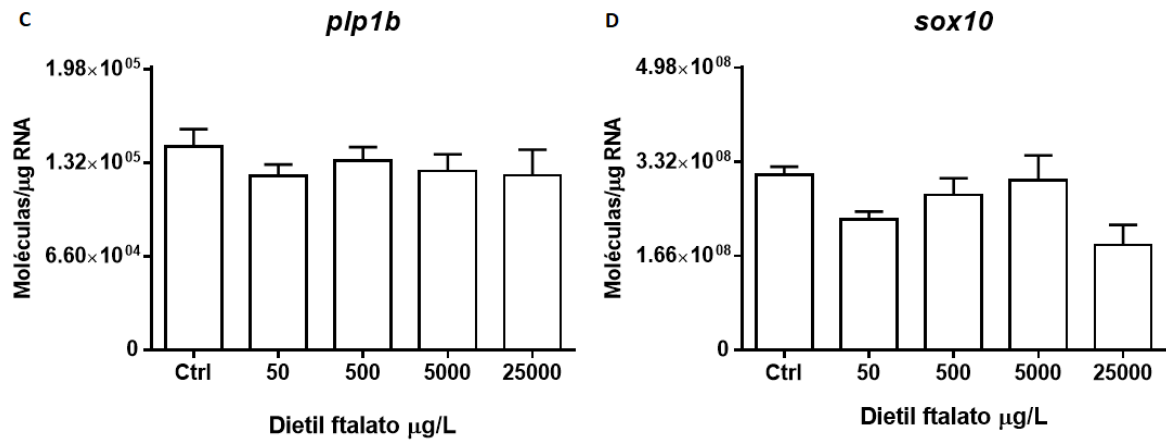


**Figura 15. Porcentajes de intensidad de la mielina con BGII.** Se muestran el porcentaje de intensidad de la tinción con BGII del tronco de las larvas control y tratadas con DEP (n=4). Los datos fueron analizados con ANOVA de una vía, se indica la significancia estadística \*P<0.0196; \*\*P<0.0018; \*\*\*P<0.0009.

### 3. Efecto del DEP sobre la expresión de *mbp*, *plp*, *p0* y *sox10*

Evaluamos la expresión génica de *mbp*, *plp*, *p0* y *sox 10* (**Fig. 16**), las cuales fueron determinadas en las larvas con tratamiento y en los controles (120 hpf) (n=20). Se observó una disminución de la expresión de *mbp* en todos los tratamientos con DEP (\*\*p<0.005); mientras que en la expresión de *p0*, *plp*, y *sox10* no se encontraron diferencias significativas





**Figura 16. Expresión de *mbp*, *p0*, *plp*, *sox10* en peces con o sin tratamiento con DEP.** Las gráficas muestran la expresión de **A.** *mbp*, **B.** *p0*, **C.** *plp*; **D.** *sox10*. Los datos fueron analizados con ANOVA de una vía \*\* $P < 0.0015$ ; \* $P < 0.0182$ ; \*\* $P < 0.0016$ ; \*\*\* $P < 0.0007$ .

## DISCUSIÓN

En el presente estudio se analizaron los efectos del DEP sobre el proceso de mielinización en el SN. Los peces fueron tratados con distintas concentraciones de DEP durante su etapa embrionaria y se evaluó la locomoción del pez cebra mediante un análisis de blanco y negro y un análisis evocado a una respuesta. Además, se analizó la formación de mielina mediante la tinción de BGII y la expresión de genes asociados a la mielinización.

El análisis de la locomoción de las larvas del pez cebra con el sistema a blanco y negro mostró una disminución en el desplazamiento en la mayoría de las larvas tratadas con las dosis más altas del DEP, limitándose a realizar un solo movimiento de desplazamiento, quedando en el mismo lugar sin movimiento alguno posteriormente. De igual manera, los resultados del análisis de locomoción con el sistema de una respuesta evocada al tacto mostraron un aumento del tiempo de reacción y una disminución de la velocidad únicamente en las larvas tratadas con las dosis de 25,000  $\mu\text{g/L}$  al DEP. Al respecto, existen algunos estudios similares que

muestran resultados contradictorios. Por un lado, los realizados por Tran *et al.*, 2021, quienes expusieron embriones de pez cebra a diferentes concentraciones de DEP (0.5, 5, 50, 500, 1000, 10,000 y 100,000  $\mu\text{g/L}$ ) desde las 4 hpf hasta las 120 hpf y evaluaron el movimiento de las larvas mediante pruebas de nado e interrupción del nado, los autores no encontraron diferencias entre los grupos tratados con DEP y el grupo sin tratamiento. Nuestros resultados coinciden con los datos obtenidos de Tran *et al.*, al no encontrar alteraciones del movimiento del pez cebra en las dosis de 50 y 500  $\mu\text{g/L}$  de DEP.

En contraste Pu *et al.* (2020) realizaron tratamientos con DEP en embriones de pez cebra a seis diferentes dosis (1500, 2000, 4000, 6000, 8000 y 10,000  $\mu\text{g/L}$ ) desde las 4 hpf hasta las 120 hpf y evaluaron el movimiento de los embriones a las 24 hpf. Ellos encontraron que el tratamiento con 8,000  $\mu\text{g/L}$  DEP disminuye el movimiento de las larvas mientras que la dosis máxima de 10,000 $\mu\text{g/L}$  indujo muerte temprana de las mismas. Los datos obtenidos de Pu *et al.*, aunque no son comparables con nuestros resultados por el tiempo de medición de la locomoción y dosis de DEP empleadas, muestran efectos del DEP en la locomoción de los peces. En conjunto, la evidencia sugiere que el DEP podría alterar la locomoción de los peces; sin embargo, es necesario realizar más estudios para evaluar su efecto en relación a la dosis y tiempo de exposición.

Para determinar el efecto del DEP en el proceso de mielinización, evaluamos las fibras de mielina de las larvas tratadas con DEP a 120 hpf mediante tinción con BGII. La tinción con BGII se ha empleado previamente para tinciones en áreas de medula espinal, tectum, telencéfalo en cortes de pez cebra (Larson *et al.*, 2010) y nuestro estudio analizó la tinción con BGII a su exposición con DEP en una larva completa (*whole-mount*) de acuerdo al protocolo de Farias-Serratos *et al.*, 2021. Nuestros resultados mostraron una disminución de la tinción a partir de la dosis de 50  $\mu\text{g/L}$  de DEP, lo cual indica una disminución en la cantidad de mielina en el sistema nervioso periférico dada por la exposición al DEP durante la etapa embrionaria, lo que podría afectar negativamente a procesos de conducción



nerviosa neuronal, en este sentido en nuestro estudio observamos afectaciones funcionales en el movimiento de los peces tratados únicamente con la dosis más alta de DEP; por lo que convendría realizar más estudios para determinar si los cambios observados en el depósito de mielina podrían inducir alteraciones de otros procesos biológicos asociados a sistema nervioso.

Posteriormente, el análisis de la expresión de genes asociados a la mielinización en sistema nervioso central y periférico: *mbp*, *plp*, *p0* y *sox10* mostraron una disminución de la expresión de *mbp* en las larvas tratadas con DEP a las diferentes dosis (50, 500, 5000, 25000 µg/L) y no se observaron cambios en *plp*, *p0* y *sox 10*.

La disminución en la expresión de *mbp* podría producir una alteración en la formación de la estructura de la vaina de mielina, generando una estructura inestable y funcional de la misma (Naffaa *et al.*, 2021). Nuestros resultados difieren de aquellos obtenidos por Xu *et al.*, en el año 2013, quienes determinaron la expresión de *mbp* en larvas tratadas con DEP a tres concentraciones (5, 50, 500µg/L) a 96 hpf y encontraron que en la dosis máxima de 500 µg/L, el DEP indujo un aumento de la expresión de *mbp*. Esta discrepancia de los datos de Xu *et al.* con los nuestros podrían ser porque los primeros expusieron a los embriones por solo 96 h, mientras que nosotros los llevamos hasta los 120 hpf; además, Xu reemplazó las soluciones con el DEP cada 12 h mientras que en esta tesis se realizó cada 24 h. A la fecha, no existe evidencia sobre los mecanismos que subyacen el efecto del DEP en la expresión de *mbp*; sin embargo, en estudios realizados con otro tipo de disruptores como el BPA encontraron una disminución de la expresión de *mbp* a nivel SNC, la cual se asoció con una reducción de la actividad de exploración en ratones tratados con 50 mg/kg de BPA durante 15 días (Luo *et al.*, 2017). Esta alteración de la expresión podría estar dada en parte por la interferencia de la señalización en parte de hormonas tiroideas, al disminuir la expresión de una de las isoformas de su receptor (TRβ1) produciendo una disminución de la proliferación, maduración y supervivencia celular en las células precursoras de oligodendrocitos (Tandon, *et al.* 2020). Además, se encontró que esta exposición al BPA causa

inhibición de la vía del desarrollo Notch, la cual es esencial para la formación de OL (Tandon *et al.*, 2020). Lo anterior realza la relevancia de estudiar los mecanismos de acción moleculares involucrados en los efectos del DEP a nivel de la regulación génica en el sistema nervioso.

Nuestro estudio es la primera investigación que evalúa el efecto del DEP sobre la formación de mielina y su actividad motora en pez cebra. Nuestro trabajo aprovecho las ventajas que tiene la tinción de BGII en larvas al brindar una visión más completa de éstas y no únicamente en cortes como se había realizado anteriormente, además, se puede visualizar la fibra de mielina de manera más completa. Nuestros hallazgos dan pauta a estudios posteriores para investigar los mecanismos que subyacen a los efectos del DEP sobre el proceso de mielinización en etapas embrionarias y adultas.

Por otro lado, entre las limitaciones de nuestro estudio se encuentran evaluar el efecto de la exposición a DEP en etapas adultas del pez y a exposiciones por un tiempo mayor a las 120 hpf, así como determinar los niveles de DEP durante el experimento. Sería interesante analizar el efecto sobre la exposición a DEP sobre la mielinización en etapas adultas y explorar los mecanismos moleculares implicados, esto debido a que el DEP podría estar afectando de manera diferente al sistema nervioso, en cuanto al tipo de células, vías de señalización, etc. y de tal manera posiblemente se encuentre un efecto diferente al encontrado en este trabajo; así como comparar los resultados de la tinción de mielina de BGII contra otra tinción, por ejemplo, el luxol fast blue y dar un seguimiento de la locomoción a las 48, 72 y 96 hpf para poder realizar una comparación con el cambio de exposición al DEP.

## CONCLUSIÓN

El tratamiento con DEP repercute en la locomoción de larvas de pez cebra con la concentración máxima del disruptor (25,000 µg/L), y disminuye la formación de mielina y la expresión de *mbp* en larvas de pez cebra tratados con todas las dosis del disruptor.

## BIBLIOGRAFÍA

Ackerman, S. D., & Monk, K. R. (2016). The scales and tales of myelination: using zebrafish and mouse to study myelinating glia. *Brain research*, 1641(Pt A), 79–91. <https://doi.org/10.1016/j.brainres.2015.10.011>

Ahlgren, S. C., Wallace, H., Bishop, J., Neophytou, C., & Raff, M. C. (1997). Effects of Thyroid Hormone on Embryonic Oligodendrocyte Precursor Cell Development in Vivo and in Vitro. *Molecular and Cellular Neuroscience*, 9(5-6), 420–432. doi:10.1006/mcne.1997.0631

ATSDR. Resumen de Salud Pública Dietil Ftalato: 84-66-2. (1995) (pp. 1-6). USA. Retrieved from [https://www.atsdr.cdc.gov/es/phs/es\\_phs73.pdf](https://www.atsdr.cdc.gov/es/phs/es_phs73.pdf)

Baas, D., Bourbeau, D., Sarliève, L.L., Ittel, M.-E., Dussault, J.H. and Puymirat, J. (1997), Oligodendrocyte maturation and progenitor cell proliferation are independently regulated by thyroid hormone. *Glia*, 19: 324-332. doi:10.1002/(SICI)1098-1136(199704)19:4<324:AID-GLIA5>3.0.CO;2-X

Barres BA, Schmid R, Sendtner M, Raff MC. (1993). Multiple extracellular signals are required for long-term oligodendrocyte survival; 118: 283–295

Barres, B. A., Hart, I. K., Coles, H. S. R., Burne, J. F., Voyvodic, J. T., Richardson, W. D., & Raff, M. C. (1992). Cell death and control of cell survival in the oligodendrocyte lineage. *Cell*, 70(1), 31–46. doi:10.1016/0092-8674(92)90531-g

Baumann, N., & Pham-Dinh, D. (2001). Biology of oligodendrocyte and myelin in the mammalian central nervous system. *Physiological reviews*, 81 2, 871-927.

Betardo-Cortés, Brenda et al. Características clínicas y demográficas de los pacientes con esclerosis múltiple. *Revista Médica del Instituto Mexicano del Seguro Social*, [S.l.], v. 54, p. S186-S190, ago. 2016. ISSN 2448-5667. Disponible en: <[http://revistamedica.imss.gob.mx/editorial/index.php/revista\\_medica/article/view/560/1056](http://revistamedica.imss.gob.mx/editorial/index.php/revista_medica/article/view/560/1056)>.

Billon, N., Tokumoto, Y., Forrest, D., & Raff, M. (2001). Role of Thyroid Hormone Receptors in Timing Oligodendrocyte Differentiation. *Developmental Biology*, 235(1), 110–120. doi:10.1006/dbio.2001.0293

Burgess, S. Zebrafish (El pez cebra). Recuperado 2020, de <https://www.genome.gov/es/genetics-glossary/Zebrafish-El-pez-cebra>

Calzà, L., Fernández, M., & Giardino, L. (2015). Role of the Thyroid System in Myelination and Neural Connectivity. *Comprehensive Physiology*, 1405–1421. doi:10.1002/cphy.c140035

Chen, L., Huang, C., Hu, C., Yu, K., Yang, L. and Zhou, B. (2012), Acute exposure to DE-71: Effects on locomotor behavior and developmental neurotoxicity in zebrafish larvae. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 31: 2338-2344. doi:10.1002/etc.1958

Creton, R. (2009). Automated analysis of behavior in zebrafish larvae. *Behavioural Brain Research*, 203(1), 127–136. doi:10.1016/j.bbr.2009.04.030.

Dugas, J. C., Ibrahim, A., & Barres, B. A. (2012). The T3-induced gene KLF9 regulates oligodendrocyte differentiation and myelin regeneration. *Molecular and cellular neurosciences*, 50(1), 45–57. <https://doi.org/10.1016/j.mcn.2012.03.007>

Engel, S. M., Miodovnik, A., Canfield, R. L., Zhu, C., Silva, M. J., Calafat, A. M., & Wolff, M. S. (2010). Prenatal phthalate exposure is associated with childhood

behavior and executive functioning. *Environmental health perspectives*, 118(4), 565–571. doi:10.1289/ehp.0901470

EPA. United States Environmental Protection and Toxic Substances. (2000). Registration eligibility decision for vinclozolin. No. 2740.

Farsetti, A., Desvergne, B., Hallenbeck, P., Robbins, J. and Nikodem, V. M. (1992). Characterization of myelin basic protein thyroid hormone response element and its function in the context of native and heterologous promoter. *J. Biol. Chem.* 267, 15784-15788.

Franco, M. R., Hernández Ramirez, R. U., Calafat, A. M., Cebrian, M. E., & Needham, L. L. (2011). Personal care product use and urinary levels of phthalate metabolites in Mexican women. *ELSEVIER*, 37(5). <https://doi.org/10.1016/j.envint.2011.02.014>

Fu & col. (2018). Acetylcholinesterase Is a Potential Biomarker for a Broad Spectrum of Organic Environmental Pollutants *Journal: Environmental Science & Technology*, Volume 52, Number 15, Page 8065. DOI: 10.1021/acs.est.7b04004

Gao, F.-B., Apperly, J., & Raff, M. (1998). Cell-Intrinsic Timers and Thyroid Hormone Regulate the Probability of Cell-Cycle Withdrawal and Differentiation of Oligodendrocyte Precursor Cells. *Developmental Biology*, 197(1), 54–66. doi:10.1006/dbio.1998.8877

García Fabila, M. & cols. (2018). Phthalates in foods of the mexican basic basket. *Revista Latinoamericana El Ambiente Y Las Ciencias*, 1180-1191. Retrieved from [http://cmas.siu.buap.mx/portal\\_pprd/work/sites/rlac/resources/LocalContent/86/2/9\(21\)-82](http://cmas.siu.buap.mx/portal_pprd/work/sites/rlac/resources/LocalContent/86/2/9(21)-82)

García Lara, Bianey, Enciso Donis, Israel, Wrobel, Katarzyna, & Wrobel, Kazimierz. (2018). Determination of Six Priority Phthalates and Di(Ethylhexyl)

Adipate in Maize Tortilla by Gas Chromatography - Tandem Mass Spectrometry in Multiple Reaction Monitoring Mode. *Journal of the Mexican Chemical Society*, 62(2), 270-281. <https://dx.doi.org/10.29356/jmcs.v62i2.359>

Gen MBP myelin basic protein [ Homo sapiens (human)]. (12 de octubre del 2019). Recuperado de <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene?Db=gene&Cmd=DetailsSearch&Term=4155>

Gen PLP1 proteolipid protein 1 [ Homo sapiens (human)]. (12 de octubre del 2019). Recuperado de <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/5354>.

Genuis, S. J., Beesoon, S., Lobo, R. A., & Birkholz, D. (2012). Human elimination of phthalate compounds: blood, urine, and sweat (BUS) study. *TheScientificWorldJournal*, 2012, 615068. doi:10.1100/2012/615068

Gore, A. C., Chappell, V. A., Fenton, S. E., Flaws, J. A., Nadal, A., Prins, G. S. Zoeller, R. T. (2015). EDC-2: The Endocrine Society's Second Scientific Statement on Endocrine-Disrupting Chemicals. *Endocrine reviews*, 36(6), E1–E150. doi:10.1210/er.2015-1010

Gardner, G. D. & Shoback D. (2012). *Endocrinología básica y clínica*. McGrawHill, 9na. Edición.

GeneCards. The Human Gene Database. MBP – Myelin Basic Protein. <https://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=MBP>

GeneCards. The Human Gene Database. PLP – Proteolipid Protein. <https://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=PLP1&keywords=PLP>

Hauser, R., & Calafat, A. M. (2005). Phthalates and human health. *Occupational and environmental medicine*, 62(11), 806–818. doi:10.1136/oem.2004.017590

Hotchkiss, A. K., Ostby, J. S., Vandenberg, J. G., & Gray, L. E. (2003). An environmental antiandrogen, vinclozolin, alters the organization of play behavior. *Physiology & Behavior*, 79(2), 151–156. doi:10.1016/s0031-9384(03)00093-3

Howe, K., Clark, M. D., Torroja, C. F., Torrance, J., Berthelot, C., Muffato, M., Collins, J. E., Humphray, S., McLaren, K., Matthews, L., McLaren, S., Sealy, I., Caccamo, M., Churcher, C., Scott, C., Barrett, J. C., Koch, R., Rauch, G. J., White, S., Chow, W., ... Stemple, D. L. (2013). The zebrafish reference genome sequence and its relationship to the human genome. *Nature*, 496(7446), 498–503. <https://doi.org/10.1038/nature12111>

Harry, JG., & Toews, A. D. (1998). Myelination, Dysmyelination, and Demyelination. *Handbook of Developmental Neurotoxicology*, 87–115. <https://doi.org/10.1016/B978-012648860-9.50007-8>

Juárez-Allen, L. Gómez, R. M. Fisiopatología de la hipertensión arterial en patología endócrina. (pp. 265-268). Recuperado de <http://www.saha.org.ar/pdf/libro/Cap.054.pdf>

Jung, S., Kim, S., Chung, A., Kim, H., So, J., Ryu, J., Park, H., & Kim, C. (2010). Visualization of myelination in GFP-transgenic zebrafish. *Developmental dynamics: an official publication of the American Association of Anatomists*, 239(2), 592-7.

Kalueff, A. V., Gebhardt, M., Stewart, A. M., Cachat, J. M., Brimmer, M., Chawla, J. S., Zebrafish Neuroscience Research Consortium (2013). Towards a comprehensive catalog of zebrafish behavior 1.0 and beyond. *Zebrafish*, 10(1), 70–86. doi:10.1089/zeb.2012.0861.

Kimmel, C.B., Ballard, W.W., Kimmel, S.R., Ullmann, B. and Schilling, T.F. (1995), Stages of embryonic development of the zebrafish. *Dev. Dyn.*, 203: 253-310. doi:10.1002/aja.1002030302

Knipper M, Bandtlow C, Gestwa L, Kopschall I, Rohbock K, Wiechers B, Zenner HP, Zimmermann U. (1998). Thyroid hormone affects Schwann cell and oligodendrocyte gene expression at the glial transition zone of the VIIIth nerve prior to cochlea function; 125: 3709–3718

Kuhlbrodt, K., Herbarth, B., Sock, E., Hermans-Borgmeyer, I., & Wegner, M. (1998). Sox10, a novel transcriptional modulator in glial cells. *The Journal of neuroscience: the official journal of the Society for Neuroscience*, 18 1, 237-50.

Kuhn, S., Gritti, L., Crooks, D., & Dombrowski, Y. (2019). Oligodendrocytes in Development, Myelin Generation and Beyond. *Cells*, 8(11), 1424. <https://doi.org/10.3390/cells8111424>

La Merrill, M. A., Vandenberg, L. N., Smith, M. T., Goodson, W., Browne, P., Patisaul, H. B., Guyton, K. Z., Kortenkamp, A., Cogliano, V. J., Woodruff, T. J., Rieswijk, L., Sone, H., Korach, K. S., Gore, A. C., Zeise, L., & Zoeller, R. T. (2020). Consensus on the key characteristics of endocrine-disrupting chemicals as a basis for hazard identification. *Nature reviews. Endocrinology*, 16(1), 45–57. <https://doi.org/10.1038/s41574-019-0273-8>

Landa Jiménez, M. A. (2013). *Detección y cuantificación automática de la frecuencia cardíaca en la larva del pez cebra* (maestría). Universidad Veracruzana, México. Recuperado de: <https://cdigital.uv.mx/bitstream/handle/123456789/46827/LandaJimenezMiguel.pdf?sequence=2&isAllowed=y>

Marta Axelstad, Julie Boberg, Christine Nellemann, Maria Kiersgaard, Pernille Rosenskjoeld Jacobsen, Sofie Christiansen, Karin Sørig Hougaard, Ulla Hass, Exposure to the Widely Used Fungicide Mancozeb Causes Thyroid Hormone Disruption in Rat Dams but No Behavioral Effects in the Offspring, *Toxicological Sciences*, Volume 120, Issue 2, April 2011, Pages 439–446, <https://doi.org/10.1093/toxsci/kfr006>



Martinovic-Weigelt, D., Wang, R., Villeneuve, D.L., Bencic, D.C., Lazorchak, J., & Ankley, G.T. (2011). Gene expression profiling of the androgen receptor antagonists flutamide and vinclozolin in zebrafish (*Danio rerio*) gonads. *Aquatic toxicology*, 101 2, 447-58.

Marycarmen Cruz-Hurtado, Ma de Lourdes López-González, Victor Mondragón & Adolfo Sierra-Santoyo (2019) In vitro phase I metabolism of vinclozolin by human liver microsomes, *Xenobiotica*, 49:8, 895-904, DOI: 10.1080/00498254.2018.1523485

Monaco, A., Grimaldi, M. C., & Ferrandino, I. (2016). Neuroglial alterations in the zebrafish brain exposed to cadmium chloride. *Journal of Applied Toxicology*, 36(12), 1629–1638. doi:10.1002/jat.3328

Naffaa V, Laprévote O, Schang AL. (2021). Effects of endocrine disrupting chemicals on myelin development and diseases. *Neurotoxicology*; 83:51-68. doi: 10.1016/j.neuro.2020.12.009. Epub 2020 Dec 29. PMID: 33352275.

National Research Council. (2008). *Phthalates and Cumulative Risk Assessment: The Tasks Ahead*. Washington, DC: The National Academies Press. <https://doi.org/10.17226/12528>

Nawaz, S., Kippert, A., Saab, A. S., Werner, H. B., Lang, T., Nave, K. A., & Simons, M. (2009). Phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate-dependent interaction of myelin basic protein with the plasma membrane in oligodendroglial cells and its rapid perturbation by elevated calcium. *The Journal of neuroscience: the official journal of the Society for Neuroscience*, 29(15), 4794–4807. doi:10.1523/JNEUROSCI.3955-08.2009

Park, J. S., Ryu, J. H., Choi, T. I., Bae, Y. K., Lee, S., Kang, H. J., & Kim, C. H. (2016). Innate Color Preference of Zebrafish and Its Use in Behavioral Analyses. *Molecules and cells*, 39(10), 750–755. doi:10.14348/molcells.2016.0173.

Preston, M. A., & Macklin, W. B. (2015). Zebrafish as a model to investigate CNS myelination. *Glia*, 63(2), 177–193. <https://doi.org/10.1002/glia.22755>

Pu, S., Hamid, N., Ren, Y., & Pei, D. (2019). Effects of phthalate acid esters on zebrafish larvae: Development and skeletal morphogenesis. *Chemosphere*, 246, 125808.

Raasakka, A., Ruskamo, S., Kowal, J., Han, H., Baumann, A., Myllykoski, M., ... & Kursula, P. (2019). Molecular structure and function of myelin protein P0 in membrane stacking. *Scientific reports*, 9(1), 1-15.

Rasband, M. N., & Macklin, W. B. (2012). Myelin structure and biochemistry. In *Basic neurochemistry* (pp. 180-199). Academic Press.

Schmued, Larry & Bowyer, John & Cozart, Matthew & Heard, David & Binienda, Zbigniew & Paule, Merle. (2008). Introducing Black-Gold II, a highly soluble gold phosphate complex with several unique advantages for the histochemical localization of myelin. *Brain research*. 1229. 210-7. 10.1016/j.brainres.2008.06.129.

Schneider, S., Kaufmann, W.S., Buesen, R., & Ravenzwaay, B.V. (2008). Vinclozolin--the lack of a transgenerational effect after oral maternal exposure during organogenesis. *Reproductive toxicology*, 25 3, 352-60.

Snell, R. (2007). *Neuroanatomía clínica* (6ª ed.). México: Editorial Panamericana.

Stolt, C. C., Rehberg, S., Ader, M., Lommes, P., Riethmacher, D., Schachner, M., Wegner, M. (2002). Terminal differentiation of myelin-forming oligodendrocytes depends on the transcription factor Sox10. *Genes & development*, 16(2), 165–170. doi:10.1101/gad.215802

Sugawara, N. (1974). Toxic effect of a normal series of phthalate esters on the hatching of shrimp eggs. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 30(1), 87–89. doi:10.1016/0041-008x(74)90249-x

Sztal, T. E., Ruparelia, A. A., Williams, C., & Bryson-Richardson, R. J. (2016). Using Touch-evoked Response and Locomotion Assays to Assess Muscle Performance and Function in Zebrafish. *Journal of visualized experiments : JoVE*, (116), 54431. <https://doi.org/10.3791/54431>

Tandon, A., Singh, S. J., Gupta, M., Singh, N., Shankar, J., Arjaria, N., Goyal, S., & Chaturvedi, R. K. (2020). Notch pathway up-regulation via curcumin mitigates bisphenol-A (BPA) induced alterations in hippocampal oligodendrogenesis. *Journal of hazardous materials*, 392, 122052. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2020.122052>

Tao, Y., Li, H., Gu, J., Shi, H., Han, S., Jiao, Y., Zhong, G., Zhang, Q., Akindolie, M.S., Lin, Y., Chen, Z., & Zhang, Y. (2019). Metabolism of diethyl phthalate (DEP) and identification of degradation intermediates by *Pseudomonas* sp. DNE-S1. *Ecotoxicology and environmental safety*, 173, 411-418.

Tomasi, T. E., Ashcraft, J., & Britzke, E. (2001). Effects of fungicides on thyroid function, metabolism, and thermoregulation in cotton rats. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 20(8), 1709–1715. doi:10.1002/etc.5620200813

Tosic M, Torch S, Comte V, et al. Triiodothyronine has diverse and multiple stimulating effects on expression of the major myelin protein genes. *Journal of Neurochemistry*. 1992 Nov;59(5):1770-1777. DOI: 10.1111/j.1471-4159.1992.tb11009.x.

Tran, C. M., Do, T. N., & Kim, K. T. (2021). Comparative Analysis of Neurotoxicity of Six Phthalates in Zebrafish Embryos. *Toxics*, 9(1), 5. <https://doi.org/10.3390/toxics9010005>

Triola, Mario F. (2009). *Estadística* (10<sup>a</sup> ed.). México, México: Pearson Educación.

Tseng, I. L., Yang, Y. F., Yu, C. W., Li, W. H., & Liao, V. H. (2013). Phthalates induce neurotoxicity affecting locomotor and thermotactic behaviors and AFD

neurons through oxidative stress in *Caenorhabditis elegans*. *PloS one*, 8(12), e82657. doi:10.1371/journal.pone.0082657

Westerfield, M. (2000). *The zebrafish book. A guide for the laboratory use of zebrafish (Danio rerio)*. 4th ed., Univ. of Oregon Press, Eugene.

Wong & col. (1995). Androgen Receptor Antagonist versus Agonist Activities of the Fungicide Vinclozolin Relative to Hydroxyflutamide. *Journal of Biological Chemistry*. [online] Available at: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7650017> [Accessed 4 Oct. 2019].

Xu, H., Shao, X., Zhang, Z., Zou, Y., Chen, Y., Han, S., Wang, S., Wu, X., Yang, L., & Chen, Z. (2013). Effects of di-n-butyl phthalate and diethyl phthalate on acetylcholinesterase activity and neurotoxicity related gene expression in embryonic zebrafish. *Bulletin of environmental contamination and toxicology*, 91(6), 635–639. <https://doi.org/10.1007/s00128-013-1101-9>

You, M., Dong, J., Fu, Y., Cong, Z., Fu, H., Wei, L., Chen, J. (2018). Exposure to Di-(2-ethylhexyl) Phthalate During Perinatal Period Gender-Specifically Impairs the Dendritic Growth of Pyramidal Neurons in Rat Offspring. *Frontiers in neuroscience*, 12, 444. doi:10.3389/fnins.2018.00444