



Universidad Autónoma de Querétaro
Facultad de Química

Análisis proteómico de embriones de pez cebra expuestos al alterador
endócrino 17- α -etinilestradiol

Tesis

Que como parte de los requisitos para obtener el
grado de

Maestro en

Ciencias Ambientales

Presenta

Q. I. Teresa Gutiérrez Espíndola

Querétaro, Qro. mayo de 2010.



Universidad Autónoma de Querétaro
Facultad de Química
Maestría en Ciencias Ambientales

ANÁLISIS PROTEÓMICO DE EMBRIONES DE PEZ CEBRA EXPUESTOS AL
ALTERADOR ENDÓCRINO 17- α -ETINILESTRADIOL

TESIS

Que como parte de los requisitos para obtener el grado de
Maestro en Ciencias Ambientales

Presenta:

Q. I. Teresa Gutiérrez Espíndola

Dirigido por:

Dr. José Luis Gallegos Pérez

SINODALES:

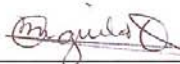
Dr. José Luis Gallegos Pérez
Presidente


M. en C. Miguel Ángel Rico Rodríguez
Secretario


M. en C. Gustavo Pedraza Aboytes
Vocal


Dr. Mamadou Moustapha Bah
Suplente


M. en C. Juan Ciro Rivera Solís
Suplente

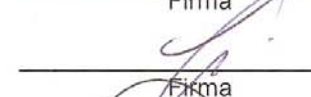

Q.B. Magali Elizabeth Aguilar Ortiz
Director de la Facultad de Química

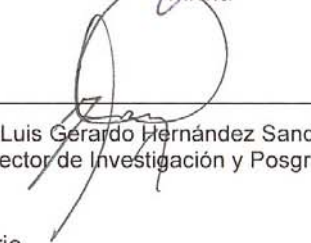

Firma


Firma


Firma


Firma


Firma


Dr. Luis Gerardo Hernández Sandoval
Director de Investigación y Posgrado

Centro Universitario,
Querétaro, Qro.
Noviembre de 2009
México

RESUMEN

La contaminación de cuerpos de agua tales como lagos, ríos, mares y mantos freáticos debido a compuestos químicos naturales o sintéticos denominados como Alteradores Endócrinos (conocidos comúnmente como EDCs por sus siglas en inglés, *Endocrine Disruptors Chemicals*), es una grave preocupación en países desarrollados. En México, lamentablemente no se cuenta con la infraestructura adecuada para poder evaluar estos compuestos de manera rutinaria para el agua destinada a consumo o actividades humanas. Aunque son inciertos los efectos adversos de potenciales EDCs a niveles de población y ecosistema, existe un acuerdo general de que los EDCs tienen un impacto potencial a la reproducción y desarrollo en humanos y fauna. El 17- α -etinilestradiol (EE₂), un esteroide sintético, es de los más comúnmente utilizados en Europa y América en los anticonceptivos orales. El EE₂ es excretado al medio ambiente a través de la orina y las heces, se ha observado que este compuesto permanece biológicamente activo provocando feminización y otras respuestas endócrinas anormales en las poblaciones de peces. El objetivo de este trabajo fue determinar experimentalmente si embriones del modelo biológico pez cebra (*Danio rerio*) expuestos a EE₂ muestran cambios en su expresión proteómica. Los embriones se expusieron a partir del tercero al sexto día después de la fertilización a diferentes concentraciones de EE₂. La expresión proteica de embriones expuestos a los tratamientos se comparó contra la de un control de embriones no expuestos. Electroforesis Diferenciales en Gel (del inglés, Difference Gel Electrophoresis, DIGE), Análisis Proteómico "shotgun" y Western-Blot fueron las técnicas utilizadas para estudiar las diferencias en la expresión proteica. Se observó la inducción vitelogenina, un conocido biomarcador de exposición a estrógenos ambientales, a concentraciones elevadas de EE₂. Se analizaron también los grupos de proteínas encontradas en embriones expuestos a diferentes concentraciones de EE₂. Se espera que los resultados obtenidos en este proyecto, conduzcan a una futura investigación utilizando el modelo biológico pez cebra para determinar si las diversas fuentes de agua podrían ser consideradas "seguras" y destinarlas para el uso en actividades humanas o incluso como agua potable.

Palabras clave: Alteradores endócrinos, 17- α -etinil estradiol, pez cebra, proteómica, espectrometría de masas.

SUMMARY

Contamination of water bodies such as lakes, rivers, seas, and aquifers due natural of synthetic chemical compounds known as Endocrine Disruptor Chemicals (EDCs) is a major concern in developed countries. Unfortunately in Mexico there is not the proper infrastructure to evaluate these compounds in routine analysis in water for human activities or consumption. Even the EDC effects at population and ecosystem level are uncertain, there is a general agreement about EDCs have a high impact on reproduction and development in human and fauna. 17- α -ethinyl-estradiol (EE₂), a synthetic steroid, is one of the most commonly used oral contraceptive pills in Europe and America. EE₂ is excreted to the environment by urine and feces by individuals; and it has been observed that this compound remains biologically active provoking feminization and other abnormal endocrine responses in fish population. The objective of this work was to experimentally determine if zebrafish (*Danio rerio*) embryos, a biological model, exposed to EE₂ show changes in their proteomic expression. Embryos were exposed from day 3 to 6 after fertilization to different concentrations of EE₂. Treatment protein expression was compared versus a control of non-exposed embryos. Difference Gel Electrophoresis (DIGE), shotgun proteomics and Western Blot were the techniques used to study the protein expression differences. Vitellogenin, a well known protein biomarker for exposure to environmental estrogens, was observed to be induced in embryos exposed to a high concentration of EE₂. Groups of proteins found in embryos exposed to different concentrations of EE₂ were also analyzed. It is hoped that results obtained in this project can lead to a future research using the biological model zebrafish to determine if water sources could be considered "safe" to be used in human activities or even as potable water.

Keywords: Endocrine disruptors, 17- α -ethynil estradiol, zebrafish, proteomics, mass spectrometry

DEDICATORIAS

A Dios y a la Virgen de Guadalupe que siempre guiaron mi camino

A mis padres, Gabriel Gutiérrez y Magdalena Espíndola, que han sido un claro ejemplo a seguir de fortaleza, entrega y sabiduría. Quiero agradecerles su infinito apoyo en mi formación personal, profesional y por la maravillosa familia que me han dado, reciban mi admiración y respeto. Que Dios los cuide y Bendiga por siempre.

A ti hermana Moni, que siempre has impulsado la formación profesional en la familia. Recuerdo que cuando éramos niños, nos premiabas con viajes y regalos nuestras buenas calificaciones. Eres grande!

A mis hermanos Víctor, Pablo, Honorio†, Abraham, Gabriel, Nancy, Elvira, Álvaro y Xóchilt, somos un gran equipo y tenemos que ganar todas las batallas que se nos presenten.

A mis sobrinos: Uriel, mi ahijada Nury, Pauli, Geli, Víctor, Alan, Xanti, Elisa, Miriam, Melissa, Abraham, Isaac, Hiram, Irene, mi ahijadito Osvaldo, Dianita, mi adorada Meztli, mi princesa Dariana y mi príncipe azul Saúl; quisiera dejarles como mensaje que todo esfuerzo tiene su recompensa.

A mi querida tía Vicky, que siempre ha estado integrada a mi familia. Cuando sea más grande me gustaría tener su carácter tan alegre.

A ti esposo mío, que desde el primer momento me diste la seguridad y confianza para iniciar este proyecto. Hoy que ha culminado, sé que ha valido la pena todo el tiempo y esfuerzo invertido. Agradezco tu apoyo como asesor, compañero y amigo, pero principalmente como esposo comprensivo, tolerante, paciente y amoroso. Te amo José Luis, gracias por llegar a mi vida.

A nuestro angelito.

A mi querida suegra, María Gallegos Pérez, por su apoyo y cariño. Reciba mi admiración.

A Mauri que iniciamos juntos este camino, agradezco tu amistad, el apoyo incondicional para realizar todo tipo de trámites escolares y también recibe mi admiración. A Fabi y Rodolfo que me llevaron a casa después de clase, además

de ser muy divertidos. A Norita, por tu amistad y a todos mis compañeros de la Maestría : Marthita , Minerva, Martha, Ruth, Gabi, César y Jorge.

A mis queridos compañeros del Instituto de Fisiología Celular de la UNAM, José Luis, Vladimir, Jorge, Isabel, Samantha y Silvia, por sus aportaciones, sugerencias e ideas en el presente trabajo, además de hacerme sentir como en casa.

A mis dos amigas del alma, Rocío Macías y Delfi Gómez, que compartieron los momentos más importantes de mi vida.

A mi nueva familia Gallegos Pérez, tía Remedios, tía Elena y a mis primos Mago, Perla, Chava y familia

Y por último a todos mis amigos y amigas que no menciono pero que están en mi corazón.

AGRADECIMIENTOS

A mi director de Tesis el Dr. José Luis Gallegos Pérez, por su valioso apoyo en el diseño, desarrollo y culminación de este proyecto.

A mis Maestros sinodales: M. en C. Miguel Ángel Rico, M. en C. Gustavo Pedraza Aboytes, M. en C. Juan Ciro Rivera y al Dr. Mustapha Bah, por las aportaciones que tuvieron en el presente trabajo

A la UAQ, que me permitió realizar mis estudios en la especialidad de Instrumentación Analítica y que cambió mi vida para siempre. Posteriormente la Maestría, donde espero poder aportar algo a mi Universidad con este proyecto y en un futuro poder aplicarlo en un proyecto real y obtener resultados.

Al Dr. Ernesto Maldonado Olvera por haberme integrado en su grupo de investigación y haberme dado la oportunidad y libertad en la realización de este proyecto

A la máxima casa de estudios de México, la UNAM por haberme brindado la oportunidad de tener un lugar como alumna y hacerme sentir parte de ella.

Al INMEGEN por la gran oportunidad que me brindó en la parte experimental que requirió la tecnología más avanzada de este proyecto

A Karla Grisel, por compartirme su experiencia y conocimientos además de haberme tenido mucha paciencia; al Dr. Juan Pablo Reyes por sus sugerencias en el tratamiento de mis muestras; a la Dra. Nora Gutiérrez, por su apoyo en la parte experimental de los geles DIGE; al Dr. David Velázquez Fernández, a Hilda, Lissya, Daniel, Gaby por su invaluable amistad.

ÍNDICE

RESUMEN	ii
SUMMARY	iii
DEDICATORIAS	v
ÍNDICE DE TABLAS.....	4
ÍNDICE DE FIGURAS	5
I. INTRODUCCIÓN	8
II. REVISIÓN DE LITERATURA	11
2.1 Alteradores endócrinos	11
2.1.1 Clasificación de los alteradores endócrinos	12
2.2 Sistema Endócrino	12
2.2.1 La acción de las hormonas a través de receptores	13
2.2.2 Homeostásis.....	13
2.2.3 Mecanismos de acción de las hormonas en células blanco	14
2.2.4 Alteradores endócrinos en humanos, vida salvaje y agua.....	15
2.2.5 Toxicología	17
2.2.6 Toxicogenómica	22
2.2.7 Proteómica y Toxicoproteómica	22
2.2.8 Pez cebra, como modelo biológico.....	24
2.2.9 Biomarcadores	27
2.2.10 Electroforesis bidimensional en gel	30
2.2.11 Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución (CLAR)	30
2.2.12 Espectrometría de Masas de Péptidos y Proteínas.....	31
2.2.13 Identificación de proteínas por medio de Espectrometría de Masas .	35
2.2.14 Aproximación Proteómica.....	38

2.2.15 Ontología Génica (Gene Ontology, GO).....	41
HIPÓTESIS	43
OBJETIVOS	44
OBJETIVO GENERAL	44
OBJETIVOS PARTICULARES.....	44
III. METODOLOGÍA	45
3.1 Selección de la población de estudio	45
3.2 Exposición de los organismos a 17- α -etinilestradiol	46
3.3 Cuantificación por el método del Ácido Bicinconínico	46
3.4 Cuantificación por el método 2D Quant	46
3.5 Electroforesis en gel bidimensional.....	47
3.6 Western Blot.....	47
3.7 Gel de electroforesis diferencial con tinción fluorescente (2-D Fluorescence Difference Gel Electrophoresis, 2-D DIGE).....	48
3.8 Espectrometría de Masas de Péptidos y Proteínas	48
3.9 Proteómica Shotgun.....	49
Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución (CLAR)	49
3.10 Digestión de proteínas a partir de muestras de geles o de muestras con proteínas en solución	49
IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	50
4.1 Prueba inicial de separación utilizando Electroforesis en gel bidimensional	50
4.2 Western Blot.....	52
4.3 DIGE	55
V. CONCLUSIONES	78
VI. PERSPECTIVAS	79
VII. BIBLIOGRAFÍA	80

VIII. ANEXOS	87
7.1 Protocolo para la extracción de proteína en embriones de pez cebra	87
7.2 Protocolo para la cuantificación de proteína mediante el Método del Ácido Bicinconínico.....	88
7.3 Protocolo para la cuantificación de proteína mediante el método 2-D Quant kit	90
7.4 Isoelectroenfoco de proteínas.....	91
7.5 Protocolo para la separación por electroforesis de primera dimensión (separación por carga).....	91
7.6 Protocolo para la separación electroforética en la segunda dimensión (separación por peso molecular).....	92
7.7 Protocolo para Western Blot	93
7.8 Protocolo DIGE	97
7.9 Protocolo para experimentos de Proteómica Shotgun	100
7.10 Protocolo para la Digestión de Proteínas a partir de muestras de Geles o de muestras con proteínas en solución.....	103
7.11 Protocolo para la Identificación de Proteínas por medio de MALDI-TOF/TOF	106

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla	Título	Página
A	Diseño experimental para CyDye, utilizando estándar interno	98
B	Gradiente utilizado en CLAR para el fraccionamiento de proteínas intactas.	101

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura	Título	Página
1	Componentes Básicos de un Espectrómetro de Masas. Abreviaturas se describen en el texto.	33
2	Diferentes abordajes proteómicos.	36
3	Conceptualización de los experimentos de Mapeo de Huella Peptídica y EM/EM para la identificación de péptidos y proteínas.	37
4	Esquema que muestra la identificación de proteínas a partir de datos de Espectrometría de Masas.	39
5	Análisis de geles DIGE mediante software. Tomado de http://us.expasy.org/melanie/ .	40
6	Gel 2D de embriones control de 2-4dpf, tiras 3-10lineales con tinción de azul de Coomasie.	51
7	Gel 2D de embriones expuestos a 100 ng/L de 17- α -etinilestradiol de 2-4dpf, tiras 3-10 lineales teñidos con azul de Coomasie.	51
8	Western Blot, embriones 6dpf. Control positivo (hígado de hembra adulta), control negativo y embriones expuestos a diferentes concentraciones de 17- α -etinilestradiol	53
9	Western Blot, embriones 6dpf. Control negativo, embriones expuestos a diferentes concentraciones de 17 α -etinilestradiol	53
10	Control de Carga/Western Blot, embriones 6dpf. Control negativo, embriones expuestos a diferentes concentraciones de 17 α -etinilestradiol.	54
11	Imagen Primaria del Experimento DIGE. Tiras IPG 24 cm	56
12	Imagen secundaria del Experimento DIGE. Tiras IPG 24 cm	57
13	Imagen del análisis llevado a cabo de los geles DIGE para encontrar expresiones diferenciales de proteína.	57

14	Acetato con proteínas diferenciales.	58
15	Identificación numérica de proteínas diferenciales.	60
16	Resultados de MASCOT para proteínas identificadas en la muestra control.	62
17	Resultados de MASCOT para proteínas identificadas en la muestra de embriones expuestos a 10 ng/L de EE2.	63
18	Resultados de MASCOT para proteínas identificadas en la muestra de embriones expuestos a 100 ng/L de EE2.	64
19	Resultados de MASCOT para proteínas identificadas en la muestra de embriones expuestos a 500 ng/L de EE2.	65
20	Resultados de MASCOT para proteínas identificadas en la muestra de embriones expuestos a 1000 ng/L de EE2.	66
21	Resultados de MASCOT para proteínas identificadas en la muestra de embriones expuestos a 5000 ng/L de EE2.	67
22	Resultados de MASCOT para proteínas identificadas en la muestra de embriones expuestos a 10,000 ng/L de EE2.	68
23	Resultados de Scaffold comparando la	70
24	Diagrama de Venn de proteínas encontradas en los diversos tratamientos tomando como centro la concentración de 10 ng/L de EE2.	71
25	Diagrama de Venn de proteínas encontradas en los diversos tratamientos tomando como centro la concentración de 100 ng/L de EE2.	71
26	Diagrama de Venn de proteínas encontradas en los diversos tratamientos tomando como centro la concentración de 500 ng/L de EE2.	72
27	Diagrama de Venn de proteínas encontradas en los diversos tratamientos tomando como centro la concentración de 1000 ng/L de EE2.	72

28	Diagrama de Venn de proteínas encontradas en los diversos tratamientos tomando como centro la concentración de 5000 ng/L de EE2.	73
29	Diagrama de Venn de proteínas encontradas en los diversos tratamientos tomando como centro la concentración de 10,000 ng/L de EE2.	73
30	Resultado GO para la Función Biológica para la comparación de la muestra control con la muestra expuesta a 10000 ng/L de EE2.	76
31	Resultado GO para el Componente Celular para la comparación de la muestra control con la muestra expuesta a 10000 ng/L de EE2.	77
32	Resultado GO para la Función Molecular para la comparación de la muestra control con la muestra expuesta a 10000 ng/L de EE2.	77
33	Prefracionamiento de proteínas para experimento de Proteómica shotgun. Línea continua = señal a 214 nm, línea discontinua = señal a 280 nm.	103

I. INTRODUCCIÓN

La preocupación por la contaminación en mantos freáticos, aguas superficiales y mares debido a compuestos químicos naturales o sintéticos denominados como Alteradores Endócrinos, ha estimulado a algunos gobiernos nacionales, organizaciones internacionales, sociedades científicas, la industria química y grupos de interés público para establecer programas de investigación, organizar conferencias y grupos de trabajo y formar grupos de expertos y comités para direccionar y evaluar el tema relacionado con estos compuestos (Damstra, 2002, Damstra, y col., 2002).

Entre los múltiples problemas que ocasionan los alteradores endócrinos se encuentra la reducción en la fertilidad de machos, anormalidades en los órganos reproductivos; problemas de fertilidad en hembras, pubertad precoz, incremento en cáncer mamario, ovárico y prostático.

Estos compuestos están ampliamente distribuidos en el medio ambiente, algunos son persistentes y pueden ser transportados a través de largas distancias, cruzando fronteras y han sido encontrados en todas las regiones del mundo. Otros son rápidamente degradados en el ambiente o en el cuerpo humano o pueden estar presentes por sólo cortos períodos de tiempo pero en períodos críticos de desarrollo. Por ejemplo, la población de trucha en los Grandes lagos se vio disminuida debido a PCB's, DDT (Weseloh, y col., 2006), problemas por dioxinas en embriones de peces incluye edema en el saco del vitelo y pericarpio, hemorragia en las regiones de cabeza y cola, deformidades craneofaciales y síndrome de desgaste (Heiden, y col., 2006). El sistema cardiovascular y en particular el endotelio vascular del desarrollo embrionario ha sido identificado como un objetivo primario de toxicidad inducida por dioxinas (Mehta, y col., 2008); la exposición crónica a un ambiente con mezclas de contaminantes muestra alteración de comportamiento que podría afectar su salud evolutiva, el estrés

ambiental de esta naturaleza puede permitir reducciones en el tamaño de la población e incluso la extinción (Weiss, 1998)

El esteroide sintético 17- α -etinilestradiol (EE₂), uno de los más comúnmente utilizados en Europa y América en los anticonceptivos orales, tiene la particularidad de que después de ser excretado, permanece biológicamente activo provocando feminización y otras respuestas endócrinas anormales en las poblaciones de peces. El EE₂ es un fármaco potente y conocido modulador endócrino que está presente en el ambiente acuático y en efluentes provenientes de plantas de tratamiento (Rotchell and Ostrander, 2003). Es sabido que los estrógenos esteroidales son responsables, al menos en parte, de respuestas de feminización en algunas especies salvajes en reportes del Reino Unido (Jobling and Tyler, 2003). La concentración de EE₂ encontrada en efluentes y superficies de agua en Europa oscila entre 0.5 y 7 ng/L (Larson, 1999) y han sido reportadas concentraciones mayores a 50 ng/L (Fenske, y col., 2005). En USA, se demostró que diferentes ríos tienen concentraciones que van desde 5 ng/L hasta una concentración mayor a 273 ng/L (Kolpin, y col., 2002).

La escasez de infraestructura necesaria para monitorear y evaluar estos compuestos químicos manifiesta la necesidad de tener como objetivo particular su evaluación nacional e internacional. Debido a esta problemática, se ha estudiado el daño potencial causado por la presencia de alteradores endócrinos en un sistema biológico como el pez cebra. Este estudio es la base para proponer una prueba biológica en muestras de agua de presas de Querétaro y conocer si el agua puede ser utilizada de forma “segura” en actividades humanas o cualquier otra aplicación.

La tarea para endocrinólogos, toxicólogos, ambientalistas y agencias reguladoras es examinar colectivamente o en conjunto la llamada “Hipótesis ambiental endocrina”, la cual establece que “diversos grupos de químicos industriales y agrícolas en contacto con humanos y fauna tienen la capacidad de imitar u obstruir la función hormonal” (Norris and Carr, 2006).

La diversidad de químicos incluye hormonas naturales y sintéticas, fitoestrógenos, pesticidas y una amplia variedad de productos químicos industriales y dificulta la definición de un “típico” EDC por lo que cada caso deberá ser cuidadosamente evaluado ya que tienen características fisicoquímicas diferentes, algunos son persistentes y lipofílicos, captados en el tejido adiposo y secretadas a través de la leche; mientras que otros son hidrofílicos rápidamente degradados y estar presentes en cortos períodos de tiempo , pero en períodos críticos de desarrollo. Algunas mezclas complejas (por ejemplo: efluentes industriales, aguas residuales tratadas) contienen componentes “activos hormonalmente” pero la entidad química específica no ha sido completamente caracterizada; la simultanea presencia de hormonas naturales y estrógenos de plantas posee dificultades analíticas debido a que estos EDCs naturales pueden ser mas potentes que los EDCs ambientales. En general, los estudios de exposición para EDCs son similares a los de otros químicos tóxicos; uno de los mas importantes puntos que complican la evaluación de exposición a EDCs en humanos y vida salvaje es el nivel, control y duración de exposición relativa para el estado de desarrollo del organismo(Damstra, y col., 2002)

II. REVISIÓN DE LITERATURA

2.1 Alteradores endócrinos

El descubrimiento de efectos alteradores por acumulación de químicos antropogénicos en ambientes acuáticos y terrestres en mecanismos endócrinos asociados con el desarrollo y reproducción, permite la designación de esas sustancias como químicos o contaminantes alteradores endócrinos.

En mayo de 1997 la EDSTAC (Endocrine Disruptor Screening and Testing Advisory Comité), define a un Alterador Endócrino como una sustancia química exógena o mezcla que altera la función (es) del sistema endócrino causando efectos adversos al organismo, su progenie o (sub)poblaciones

La posibilidad de que algunos compuestos químicos pueden alterar el sistema endócrino en humanos y animales ha recibido considerable atención en la comunidad científica y pública. La alteración endócrina está en la agenda de muchos grupos de expertos, comités directivos y paneles de organizaciones gubernamentales, industria y academia por todo el mundo. Debido a que la alteración del sistema endócrino es un tópico muy delicado, conclusiones y observaciones científicas, son a menudo discusiones controversiales entre científicos, ambientalistas y autoridades.(Damstra, y col., 2002)

En las últimas dos décadas se ha incrementado el interés científico y el debate público acerca de los potenciales efectos adversos que pueden resultar de la exposición este grupo de compuestos químicos capaces de alterar el funcionamiento normal del sistema endócrino en la vida silvestre y en humanos. (Lintelmann, y col., 2003).

2.1.1 Clasificación de los alteradores endócrinos

Se identificaron un total de 996 compuestos o elementos y se ha sugerido que sean conocidos como potenciales Alteradores Endócrinos.

El grupo más grande son los químicos antropogénicos generales, que consiste en 539 químicos individuales, metabolitos o productos de degradación. La segunda categoría constituye los biocidas e incluye 225 químicos, metabolitos o productos de degradación. La tercera categoría comprende 62 químicos de origen natural (biogénicos) que tienen actividad hormonal. Las otras categorías son: farmacéuticas (58 sustancias); inorgánicas y complejos organometálicos (54) y productos de consumo (28).

La elaboración de esta lista estuvo a cargo del “MRC Institute for Environment and Health (IEH) for the Department for Environment, Food and Rural Affairs (Defra)” derivada de estudios publicados y revisión de artículos del 2000-2002 (IEH, 2005).

2.2 Sistema Endócrino

La especialidad de la endocrinología abarca el estudio de las glándulas y las hormonas que ellas producen. El sistema endócrino está evaluado primeramente por la medición de las concentraciones de hormonas, El término hormona, derivado del griego ὁρμῶν que significa “para poner en movimiento” describe acertadamente las acciones dinámicas de las hormonas que ellas provocan como respuestas celulares y regulan procesos fisiológicos a través de mecanismos de alimentación. Las clásicas glándulas endócrinas – pituitaria, tiroides, paratiroides, isletas pancreáticas y gónadas- se comunican en términos generales con otros órganos a través del sistema nervioso, hormonas y factores de crecimiento.

El sistema endócrino juega un papel esencial en la regulación del proceso metabólico a corto y a largo plazo, en el sistema reproductivo, sistema nutricional, de comportamiento, en el intestino, el sistema cardiovascular, la función del riñón y las respuestas a todas las formas de estrés. En el sistema endócrino, los desórdenes en los niveles de secreción de hormonas, deriva inevitablemente en enfermedad, tales efectos se pueden extender a los diferentes órganos y funciones que a menudo debilitan o amenazan la salud. La presencia de compuestos químicos ambientales que alteran el sistema endócrino es muy seria, sin embargo, el hecho de que los humanos y la vida salvaje están expuestos a estos compuestos, no necesariamente significa que se manifiesten alteraciones clínicas en el sistema endócrino debido a que mucho depende del nivel, tiempo y duración de exposición (Damstra, 2002, Damstra, y col., 2002).

2.2.1 La acción de las hormonas a través de receptores

Los receptores de hormonas están divididos en 2 grandes clases: membranales y nucleares.

a) Receptores de membrana: enlazados fundamentalmente a hormonas péptido y catecolaminas.

b) Receptores Nucleares: enlaza pequeñas moléculas que pueden difundirse a través de la membrana celular, tales como la hormona tiroidal, esteroides y vitamina D.

2.2.2 Homeostásis

En conjunción con el sistema nervioso e inmune, el sistema endócrino forma el principal mecanismo regulatorio que controla diferentes funciones esenciales en el cuerpo humano o animal. Los mensajeros del sistema endócrino

son las hormonas que son sintetizadas y excretadas en muy bajas cantidades de glándulas especializadas y transportadas al o a los órganos blanco vía el torrente sanguíneo. Las hormonas son transportadas en la sangre en el estado libre o ligadas para llevar proteínas y unirse al órgano blanco a hormonas receptoras especializadas en la superficie de la célula o dentro de la célula (receptores nucleares). Estos complejos hormona-receptor activan entonces diferentes células o funciones del órgano. El enlace entre hormona y receptor está basado en el principio “llave-candado”. Las hormonas regulan el crecimiento, el desarrollo, el mecanismo homeostático del organismo tales como la reproducción, el mantenimiento de niveles normales de glucosa o iones en la sangre, presión en la sangre, metabolismo general y otras funciones del sistema nervioso (Lintelmann, y col., 2003) el balance de las hormonas (homeostasis) en el organismo es esencial para prevenir desordenes funcionales. Este complejo sistema es muy sensible hacia influencias que alteran el desarrollo total del organismo (Matthiessen, 2003).

2.2.3 Mecanismos de acción de las hormonas en células blanco

Hormonas no esteroidales - Las hormonas no esteroidales (solubles en agua), no entran a la célula, pero se enlazan generalmente en la superficie de la célula y no cruzan la membrana celular, generando una señal química (segundo mensajero) dentro de la célula blanco. El mensajero secundario activa otros químicos intracelulares para producir la respuesta de la célula blanco (Norris and Carr, 2006).

Hormonas Esteroidales - El mecanismo secundario involucra hormonas esteroidales, los cuales pasan a través de la membrana plasmática o celular. Las hormonas esteroidales se enlazan, una vez dentro de la célula a los receptores intracelulares en el citoplasma o el núcleo, produciendo un complejo activado hormona-receptor. El complejo activado hormona-receptor se enlaza al ácido

desoxirribonucleico (DNA por su siglas en inglés) y activa genes específicos, incrementando la producción de proteínas (Norris and Carr, 2006).

2.2.4 Alteradores endócrinos en humanos, vida salvaje y agua

La Organización Mundial de la Salud (OMS) ha indicado que la presencia de compuestos estrogénicos en aguas residuales, representa uno de los mejores ejemplos de efecto y exposición a alteradores químicos endócrinos (EDCs) y define a los EDCs como “agentes exógenos que interfieren con la producción, liberación, transporte, metabolismo, vinculación, acción o eliminación de las hormonas naturales en el cuerpo (de humanos y/o especies de vida salvaje) responsables para el mantenimiento de la homeostasis y la regulación del proceso de desarrollo” (Environmental Health Bureau and Welfare, 1988).

Los riachuelos, la tierra y los mantos acuíferos cercanos a las granjas, se pueden contaminar por los desechos arrojados a las mismas llegando a ser un potencial de alteración endócrina a las especies del ecosistema, dependiendo del nivel de exposición, del tipo de desecho animal, del número de animales y de su estado reproductivo y la degradación de estos compuestos.

Las descargas industriales, de trabajo y domésticas contribuyen junto con una gran cantidad de excreta humana, detergentes y otras sustancias farmacéuticas a ser un potencial de contaminación para la superficie y las aguas subterráneas por hormonas esteroidales (Sarmah, y col., 2006).

2.2.4.1 Alteración endócrina en humanos

Los contaminantes orgánicos persistentes hechos por el hombre, son lipofílicos y altamente resistentes a la degradación. Debido a su persistencia, se han distribuidos en pequeñas cantidades alrededor del mundo, se bioacumulan en la cadena alimenticia y son almacenados en los tejidos grasos. La exposición a

estos compuestos ha sido asociada con muchos efectos adversos a la salud humana incluyendo daño al desarrollo neurológico, y a la función inmune y reproductiva, alteran el funcionamiento normal del sistema endócrino, además pueden tener impacto negativo particularmente durante la etapa fetal, neonatal y desarrollo infantil (Damstra, 2002). Aunque los casos no están claros en humanos parece que debido a la presencia en EDCs se ha presentado hipospadia (anormalidades en los órganos genitales) con un incremento al doble desde los 70's, las cuentas de espermatozoides disminuído y la incidencia de cáncer testicular se ha incrementado .(Iguchi, 1998)

La obesidad está recibiendo actualmente gran atención desde que esta es un riesgo potencial para los sistemas de salud mundial con enfermedades asociadas tales como diabetes y enfermedades cardiovasculares (Newbold, y col., 2007).

Estudios epidemiológicos y experimentales han demostrado alteraciones reproductivas intrauterinas y/o neonatal como una consecuencia de exposición a EDCs. El Dietilstilbestrol (DES) es el compuesto mejor documentado, este estrógeno sintético fue administrado a mujeres embarazadas en los 50's y 60's para prevenir abortos. Esto fue implicado en anormalidades urogenitales en niños expuestos en el útero y fue retirado del mercado. Las "hijas DES" son mujeres con alta incidencia a hipoplasia vaginal, aborto espontáneo, parto prematuro, malformación del útero anormalidades menstruales y baja fertilidad. Los "hijos DES" muestran síndrome de disgénesis testicular, el cual está caracterizado por hipospadias y baja calidad del semen (Guzman and Zambrano, 2007).

La exposición ocupacional de trabajadores en invernaderos, a pesticidas, fungicidas, y compuestos reguladores de crecimiento, tienen un efecto genotóxico o aberraciones cromosómicas (2000)

2.2.4.2 Alteración Endócrina en Animales

Raquel Carson (1962) fue la primer persona en despertar al público en general a las ramificaciones ecológicas de la alteración endócrina a través de su libro Primavera Silenciosa (Silent Spring) (Carson, 1962). Esta prevención permitió eventualmente prohibir el uso del insecticida DDT en Estados Unidos y el uso de dietilestilbestrol para el tratamiento de animales y humanos.

Las anormalidades causadas por químicos ambientales han sido reportadas en diversos organismos incluyendo, por ejemplo en cocodrilos en su desarrollo reproductivo debido a la contaminación por derrames de difocol y DDT, compuestos derivados de las actividades agrícolas alrededor del Lago Apopka, Florida. En este caso, las hembras mostraron anormalidades en la morfología de los ovarios y los machos jóvenes mostraron concentraciones de testosterona tres veces más bajas que los niveles normales además de un pene pequeño (Guillette, y col., 1994). Gaviotas, arenques, cormoranes de dos crestas que habitan cerca de los Grandes Lagos, muestran una capacidad crónica de reproducción que está caracterizada por alta mortalidad embriónica, de polluelos, edemas, retardo en el crecimiento y deformidades, además los cascarones de los huevos adelgazados causado por los altos niveles de DDT y sus metabolitos (Gilbertson, y col., 1991). Muchos de los mecanismos de esos defectos permanecen sin aclararse.

2.2.5 Toxicología

The Endocrine Disruptor Screening and Testing Advisory Committee (EDSTAC) fué formado para desarrollar estrategias para la evaluación de miles de productos e intermediarios, actualmente en uso o en desarrollo que tienen el potencial de exposición para humanos y/o medio ambiente.

La toxicología está interesada con efectos adversos de agentes físicos y químicos (tóxicos) en organismos vivos, estos agentes incluyen: drogas, químicos industriales, venenos de plantas y animales, luz, ruido y radiación.

Los efectos provocados por la exposición a estos agentes pueden oscilar desde la alteración de funciones a escala molecular hasta la muerte del organismo, además, en algunos casos, los efectos del agente pueden ser transmitidos a su progenie.

Muchas clases de tóxicos pueden actuar como químicos alteradores endócrinos, estos incluyen compuestos que imitan las hormonas naturales y así pueden enlazarse a sus receptores, resultando en cualquier función de activación o inhibición. Esos compuestos los cuales pueden ser endógenos o exógenos, pueden incrementar o disminuir la concentración de un compuesto endógeno por alteración de actividad de su enzima biosintética, por alteración de su metabolismo y excreción, así como también por unión a proteínas plasmáticas

Ciertos tóxicos pueden inducir apoptosis de células gonadales, resultando en la disminución de su función. Otros pueden influenciar en la migración de células germinales a las gónadas primordiales durante el desarrollo. Se requiere del conocimiento de exposición, toxicidad y de la relación dosis-respuesta para comprender el impacto del potencial de los EDCs. La manifestación de efectos fisiológicos causados por un tóxico, depende de la magnitud de exposición. Así, la relación dosis-respuesta puede indicar las características de exposición y el grado al cual un potencial EDC podría afectar funciones endócrinas, sin embargo, las relaciones dosis-respuesta para potenciales EDC's presentan algunos problemas, por ejemplo, muchos EDC's pueden tener efectos a concentraciones menores que aquellas que producen efectos tóxicos (Welshons 2003).

La evaluación del riesgo asociado a un EDC en particular ha generado controversias debido a que resulta difícil extrapolar interacciones ligando-receptor altamente controladas a una respuesta determinada al organismo, población y niveles de población, por ejemplo, un efecto estrogénico a un nivel del animal completo puede ser causado por múltiples mecanismos incluyendo acción directa en receptores de estrógenos, inducción de aromatasa, alteraciones en la afinidad de plasma de proteínas enlazantes a la hormona sexual para estradiol o cambios en el metabolismo del estradiol.

Para cuantificar los efectos y el impacto de los EDCs en una especie, se requiere de biomarcadores de exposición definidos así como también del conocimiento acerca del estado en que es más sensible a un contaminante, p. ej. en el estado embrionario, el estado larvático o fetal, juvenil o adulto. Los biomarcadores son de tipo bioquímico, citológico, histológico, fisiológico.

Debido al hecho que existen limitaciones experimentales en una especie individual de estudio, debe considerarse que animales están siendo expuestas a mezclas de EDCs con actividad similar biológica. Algunos de esos EDCs pueden estar trabajando a través del mismo mecanismo (ejemplo: dos químicos enlazados al mismo receptor) o a través de diferentes mecanismos (ejemplo: un químico afectando la síntesis de una hormona y un segundo químico afectando su metabolismo e inactivación) de aquí, que existan quizás efectos aditivos (o sinergismo) cuando un animal es expuesto a una mezcla de químicos. Además una mezcla de EDCs con diferentes acciones (estrogénicas y actividad antitiroidea) puede producir efectos únicos por la acción de un solo EDC.

2.2.5.1 Bioacumulación

La bioacumulación se refiere al almacenamiento y acumulación de contaminantes orgánicos e inorgánicos por un organismo viviente en cualquier hábitat. La bioacumulación resulta de complejas interacciones entre varias rutas de excreción, liberación pasiva y metabolización, para el pez, el proceso de bioacumulación incluye 2 rutas de absorción. La bioacumulación puede ser una consecuencia de bioconcentración resultante por la absorción a través de agallas, piel o pulmones después de la exposición a contaminantes como el agua, aire, suelo. Esto puede también resultar de fuentes de alimentación (bioaumento) y así la ingestión de EDCs o tóxicos puede ser bioaumentada varias miles de veces y ser transferidos a través de la cadena alimenticia o por alimentos atrapados por el predador más alto (o primer depredador). La bioacumulación puede resultar en efectos perjudiciales en organismos, incluso cuando los niveles ambientales son muy bajos (Streit, 1998). Por ejemplo: el pez *Killifish fundulus heteroclitus*, crónicamente expuesto a un ambiente con mezclas de contaminantes, muestra alteración de comportamiento que podría afectar su salud evolutiva (Weiss, 1998), el estrés ambiental de esta naturaleza puede permitir reducciones en el tamaño de la población e incluso la extinción (Segner, y col., 2003).

El Programa Internacional en Seguridad Química (Damstra, y col., 2002) propuso un criterio para evaluar EDCs e identificar agentes causales de enfermedades, este incluye la temporalidad y fuerza de la asociación, consistencia y plausibilidad biológica del efecto y la evidencia del recobro de dicho efecto. Estos criterios se han utilizado por años para evaluar el riesgo a humanos y han sido recientemente incorporados en métodos de evaluación de riesgo ecológico.

2.2.5.2 Exposición

En general, la cantidad de compuesto aplicado a un animal es llamada dosis externa, la cantidad dentro del organismo es llamada dosis interna y la cantidad que alcanza el órgano blanco es llamada dosis del órgano-blanco.

La toxicidad de un químico específico está basada en la duración y frecuencia de exposición, magnitud de exposición y ruta de administración, también como el sexo, tendencias y especies del recipiente.

La vida media biológica de un tóxico, definida como el tiempo para la concentración de plasma para disminuir a la mitad de su valor inicial depende de la proporción de absorción, metabolismo y excreción para ese compuesto.

Las rutas más comunes de exposición a tóxicos ambientales son: ingestión, absorción dérmica e inhalación.

El otro factor importante es el tiempo de exposición, y este incluye la duración y la frecuencia. La exposición de animales a xenobióticos puede estar dividida en 4 categorías:

Exposición aguda - menos de 24 horas

Subaguda - continua o exposición repetida por menos de 1 mes

Subcrónica - continua o exposición repetida por 1 – 3 meses

Crónica – continua o exposición repetida por más de 3 meses (Norris and Carr, 2006)

2.2.6 Toxicogenómica

La Toxicogenómica tiene el potencial para identificar biomarcadores sensibles que pueden predecir toxicidad. Esto puede clarificar el mecanismo molecular que conduce a los peligrosos efectos de las toxinas

Está relacionada con el uso de tecnologías genómicas para describir cambios en la expresión del gen resultante de la exposición a xenobióticos tanto en humanos, especies salvajes y peces . Esta tecnología permitirá la identificación de nuevos tóxicos así como también el descubrimiento de mecanismos a través de los cuales se origina su actividad biológica (Norris and Carr, 2006)

Aspectos relevantes

PRIMERO: La toxicogenómica permitirá mejorar la habilidad para realizar extrapolación entre especies debido a la habilidad para monitorear la activación de genes homólogos a través de especies.

SEGUNDO: El uso de la toxicogenómica permitirá el desarrollo de nuevos biomarcadores por la identificación de genes o patrones de genes de quienes la expresión es alterada por la exposición a tóxicos ambientales.

TERCERO : La toxicogenómica permitirá investigaciones para identificar cambios sutiles que pueden ser enmascarados por otras respuestas bioquímicas.

2.2.7 Proteómica y Toxicoproteómica

El término *proteoma* se refiere al conjunto de proteínas presentes en un organelo, una célula, un organismo o una muestra en particular delimitada que se analiza (Liebler, 2005). La palabra *proteómica* fue acuñada por Wilkins para definir el estudio que nos lleva a identificar las proteínas, las modificaciones que presentan y los lugares donde son expresadas, cómo están involucradas en las

rutas metabólicas y la forma que interactúan entre ellas (Sparkman O., 2006, Watson and Sparkman O., 2007)

El proteoma está definido como los genes expresados de una célula. La habilidad para comparar los cambios en el proteoma después de la exposición a tóxicos a través de especies ayuda en el proceso de identificación de un biomarcador y la comparación de efectos interespecies por cambios identificados en la expresión de proteínas. Así, podemos definir a la toxicoproteómica como “la aplicación de proteómica a la toxicología” donde se busca identificar proteínas y rutas críticas en sistemas biológicos que responden a exposiciones en medios químicos adversos y en medios ambientes estresantes. La toxicoproteómica se está utilizando para descubrir nuevos biomarcadores y firmas de toxicidad en órganos blanco tales como el hígado en procesos inflamatorios, mapeo proteico en suero, plasma y otros fluidos biológicos. Al mismo tiempo y en forma paralela se están llevando a cabo estudios proteómicos y transcryptómicos. También la toxicoproteómica busca descubrir nuevos biomarcadores y firmas en lesiones tisulares así como también lograr un mayor entendimiento acerca de la respuesta en cuanto a la expresión proteica durante toxicidad y enfermedad ambiental. La exposición tóxica altera el proteoma de las células expuestas, tejidos u organismos debido a alteraciones en la expresión del gen. (B. Alex, 2006)

La Toxicoproteómica es la tecnología de la medición de proteínas globales para la investigación toxicológica. El principal objetivo en toxicoproteómica es el descubrimiento de proteínas clave modificadas, la determinación de rutas afectadas, y el desarrollo de biomarcadores para la eventual predicción de toxicidad. Varias tecnologías proteómicas, serán examinadas por sus habilidades para identificar cambios de perfil de proteínas o aductos de proteínas resultantes de exposición química que conducen a la toxicidad (B. Alex, 2006).

2.2.8 Pez cebra, como modelo biológico

El pez cebra (*Danio rerio*) está siendo utilizado cada vez más como un sistema modelo para la evaluación del efecto de drogas. Es muy apropiado para estudios en genética, embriología, desarrollo, biología celular y estudiar enfermedades en humanos debido a que tienen homólogos cercanos de muchas proteínas humanas (Parng, y col., 2002), genes con homología a rutas apoptóticas en mamíferos (Inohara and Nunez, 2000), receptores de estrógenos que se encuentran expresados predominantemente en cerebro, pituitaria, hígado y gónadas. (Menuet, y col., 2002).

El pez cebra muestra características únicas incluyendo facilidad en el mantenimiento; su fertilización externa; el desarrollo desde la fertilización hasta la etapa reproductiva es en sólo 3 ó 4 meses; transparencia que permite evaluación al microscopio de todos los estadios de desarrollo y seguir con detalle las primeras divisiones celulares y la formación de las capas embrionarias (ectodermo, mesodermo y endodermo). En las primeras 24 horas de fertilización es posible observar la segmentación del cerebro ya que se han formado estructuras como el tubo neural, la notocorda y los somitos (precursores de músculo y esqueleto) para los 5 días de desarrollo se han formado órganos sensoriales como los ojos y los oídos, asimismo aparece el corazón, el hígado, los riñones y el páncreas además de los sistemas circulatorio, digestivo y nervioso son perfectamente funcionales. En este momento el pez es perfectamente capaz de responder a estímulos visuales, olfativos y mecánicos y comienza a nadar buscando alimento (Kimmel, y col., 1995). La cantidad de embriones que una sola pareja puede producir semanalmente es de 100-200 individuos, y esto facilita la disponibilidad de material biológico. El pez cebra es diploide y con ciclos generacionales cortos (de 2-3 meses) su tamaño adulto es de 3 centímetros y en una pequeña pecera se pueden albergar varios individuos. Debido a estas ventajas, los bioensayos del pez cebra son más baratos y más rápidos que los ensayos con ratón y son apropiados para explorar o monitorear las drogas a gran escala.

El pez cebra se utiliza también para estudiar los efectos de contaminantes, especialmente alteradores endócrinos que se enlazan a los receptores de estrógenos. Se ha demostrado en cierto número de estudios que la exposición de un pez a xenoestrógenos por corto tiempo, se pueden inducir respuestas tales como la vitelogenina. Experimentalmente, los efectos organizacionales pueden evaluarse por exposición a corto tiempo durante el período crítico de desarrollo o por tiempo de exposición largo durante el ciclo de vida completo. Se prefieren los peces con un relativo ciclo de vida corto a los peces con ciclos de vida completos, ya que es posible disminuir la duración de los estudios experimentales en las etapas de desarrollo y reproducción y de este modo las pruebas resultan ser más manejables y a menor costo.

Se ha investigado el efecto de estrógenos en pez cebra realizando estudios en ciclos de vida parciales, exponiéndolos durante etapas de desarrollo temprano a 15.4 ng/L de EE₂ a los 10, 20, 30 60 días post fertilización (dpf) observando que se induce significativamente la síntesis de vitelogenina (Andersen, y col., 2003). También durante el estado adulto se expusieron a una concentración nominal de 0, 10 y 25 ng/L de EE₂ por 24 días, teniendo un efecto adverso en los órganos reproductivos de machos y hembras (Van den Belt, y col., 2002)

El uso del pez cebra para pruebas ecotoxicológicas (Liedtke, y col., 2008) se recomienda en las guías de la Organización para la cooperación y desarrollo económico.

Temperatura y tiempo estándar de desarrollo: el tiempo de desarrollo estándar se define como las horas normalizadas después de la fertilización a 28.5°C, una temperatura óptima de incubación, sin embargo, los embriones se desarrollan normalmente si se mantienen entre 25 y 33 °C. Incubándolos por largos períodos arriba o debajo de esos extremos, pueden producir anomalías (Kimmel, y col., 1995).

La mayoría de las especies de peces cultivadas tienen el tipo gonocorístico de sexualidad y entre las especies gonocorísticas de teleóstodos, hay algunos que revelan hermafroditismo transitorio durante la etapa juvenil. En el Cyprinido *Danio rerio* (pez cebra), una especie común de pruebas en ecotoxicología, las gónadas comienzan a distinguirse como ovarios a los 10 – 12 días después de la incubación (HATCHING), independientemente de su sexo definitivo. Casi la mitad de los ovarios llegan a ser transformados en testículos cuando el pez alcanza los 23-25 días de edad. El proceso completo de inversión de sexo se completa normalmente cerca de los 40 días después de la incubación, pero este tiende a ser prolongado en el pez que tiene que sufrir un crecimiento retardado en su etapa temprana (Uchida, y col., 2002). En la reproducción el pez, se influncia el sexo con la alimentación de altas dosis de hormonas sexuales, este ha sido un método común para obtener cultivos monosexuales.

En todos los vertebrados, la reproducción ocurre bajo el control de un sistema complejo conocido como el eje (HPG) Hipotálamo-Pituitario-Gonadal. Una parte del cerebro, llamada hipotálamo, secreta una hormona liberadora de gonadotropina (GnRH). Esta hormona estimula a la glándula pituitaria para que libere 2 gonadotropinas: la hormona luteinizante (LH, controla la liberación del gameto) y la hormona estimulante del folículo (FSH, que regula la producción del gameto). Estas gonadotropinas posteriormente estimulan a las gónadas para que se produzcan esteroides sexuales, estrógenos en hembras y testosterona en machos, los cuales producen los cambios físicos que ocurren durante el desarrollo. Las glándulas adrenales también desempeñan un papel en la producción de los esteroides sexuales, pero su función generalmente es mucho menos importante que la de las gónadas.

2.2.9 Biomarcadores

Un biomarcador es una respuesta bioquímica, fisiológica, tóxica o de comportamiento provocada por exposición a un agente tóxico; el biomarcador puede ser también el agente tóxico o un metabolito de éste detectado en los tejidos, la respiración, heces u orina. Un biomarcador puede reflejar exposición, un efecto adverso o susceptibilidad a otro químico o a un agente patógeno. Ciertos biomarcadores han sido utilizados en trabajos con especies centinelas, estos incluyen inhibición de colinesterasa en sangre y cerebro (insecticidas, organofosforados y carbamatos), inducción/inhibición de citocromos P450 (de una variedad de inductores fenólicos, aromáticos, alcohólicos e hidrocarburos aromáticos polihalogenados e inhibición causada por metales y compuestos organometálicos), inmunosupresión/inmunoestimulación (metales e hidrocarburos aromáticos polinucleares/policlorados), cambios en el comportamiento (a partir de varios xenobióticos) y alteraciones en la función endócrina (de varios xenobióticos). Cada biomarcador puede ser medido con un cierto número de análisis y estos deben ser optimizados para cada especie.

Un biomarcador puede ser específico o completamente inespecífico por ejemplo, muchos animales responden al estrés incrementando su ritmo cardíaco y respiratorio. En contraste, la cotinina en orina o saliva es indicativo de exposición al humo de cigarro. De igual forma la disminución de la actividad de acetilcolinesterasa en sangre o cerebro es indicativo de exposición a un insecticida organofosforado o agente nervioso (por ejemplo el gas sarín utilizado en atentado en el metro de Tokio en 1995). En el caso de exposición a alteradores endócrinos en peces, se considera como biomarcador a la proteína vitelogenina. Los biomarcadores efectivos son específicos, fácil de medir, exactos y reproducibles (Norris and Carr, 2006).

2.2.9.1 Vitelogenina

En vertebrados ovíparos (peces), el vitelo es crítico para la regulación del desarrollo embrionario, proporcionando una variedad de nutrientes. Además de cantidades mínimas de proteínas transportadoras de vitaminas, y proteínas enlazantes de tiamina y riboflavina, albúmina, transferina, IgG y 2 α -glicoproteína, 2 clases de fosfoglicoproteínas: fosfovitas (Pvs) y lipovitelinas (Lvs) son las proteínas más encontradas en el vitelo. Estas dos fosfoglicoproteínas derivan de un precursor común de proteínas llamado vitelogenina (Vtg).

Las vitelogeninas son codificadas por un multigen familiar y constituyen las proteínas mayoritarias en el vitelo del pez. Estas suministran al embrión nutrientes esenciales incluyendo aminoácidos, lípidos, iones metálicos, fosfatos y carbohidratos. Es por eso que el proceso de síntesis y degradación de la vitelogenina son importantes para regular la ovogénesis y embriogénesis.

Las vitelogeninas del pez cebra son derivadas de 7 diferentes genes de vitelogenina y son clasificados en 3 tipos, basados en su secuencia primaria de aminoácidos: La TIPO I incluye la Vtg1, Vtg 4 a 7; la TIPO II contiene la Vtg2 y la TIPO III contiene la Vtg3. Debido a su alta expresión, 100 veces más grande que la Vtg2 y 1000 veces más grande que la Vtg3, la TIPO I es la forma predominante en el pez cebra.

Las vitelogeninas son cortadas proteolíticamente en cadenas pesadas (120 kDa) y ligeras (30-35 kDa y 6 kDa).

La producción de vitelogenina representa una clave del proceso estrogénico en ovíparos vertebrados que es esencial para la maduración de ovocitos. La vitelogenina es una fosfolipoproteína sintetizada en el hígado de los peces hembras bajo el control de diferentes hormonas, pero los estrógenos, típicamente el 17 β -estradiol, juega un papel dominante. La vitelogenina entra al flujo sanguíneo y alcanza al ovario donde es transformada en dos tipos mayores de proteínas de vitelo, lipovitelinas y fosfovitas, las cuales sirven como reserva de

alimento en el desarrollo del embrión. Estas proteínas del vitelo son las responsables del crecimiento de los ovocitos en el mes previo a la ovulación. Aunque el gen de la vitelogenina está también presente en el pez macho, pueden ser detectadas concentraciones poco importantes de vitelogenina, presumiblemente debido a la muy baja concentración de estradiol en el plasma. Sin embargo, la exposición de peces machos a diferentes concentraciones de estrógenos o xenoestrógenos naturales o sintéticos ha mostrado que la vitelogenina puede ser inducida considerablemente. Es por eso que la inducción de la vitelogenina puede servir como un biomarcador sensible para la exposición a estrógenos ambientales.(Lintelmann, y col., 2003)

Una forma de detectar la inducción de vitelogenina en nuestro modelo biológico fué utilizando la técnica de Western Blot, que es un método utilizado en biología molecular para la detección específica de proteínas de baja abundancia en una muestra o extracto. Para el desarrollo de esta técnica, la proteína extraída de las muestras de los grupos de estudio a comparar se cuantifica con una metodología que depende del tipo de muestra (p. ej. método del ácido Bicinconínico, método de Bradford o el comercialmente llamado 2D-Quant kit).

Una vez llevado a cabo lo anterior los geles de electroforesis son cargados con la misma cantidad de proteína para cada grupo de estudio y se procede a la separación electroforética en dos dimensiones. Las proteínas separadas son transferidas desde el gel de acrilamida hacia una membrana de nitrocelulosa donde son examinadas utilizando anticuerpos específicos para la proteína de interés, una vez formado el complejo proteína-anticuerpo, mediante el revelado se obtiene una señal que nos permite comparar semi-cuantitativamente sus niveles de presencia entre los diferentes grupos de estudio (Sambrook and Russell, 2001).

2.2.10 Electroforesis bidimensional en gel

Para la identificación de proteínas diferenciales entre los grupos de estudio, se utilizaron geles de acrilamida donde las proteínas son separadas con base a su punto isoeléctrico y a su peso molecular. Se realiza una comparación entre un control y las muestras expuestas a los diferentes tratamientos, buscando proteínas que se hayan expresado diferencialmente ya sea sub o sobre-expresadas. Estas proteínas son cortadas del gel y digeridas con la enzima tripsina antes de ser analizadas por medio de espectrometría de masas para su identificación cualitativa.

Otro método utilizado es el llamado gel de electroforesis diferencial (DIGE, por sus siglas en inglés de Differential In-Gel Electrophoresis) la cual es una tecnología semi-cuantitativa para experimentos proteómicos que involucran geles de electroforesis de 2 dimensiones. Combina resoluciones espectrales de colorantes fluorescentes (Cy2, Cy3 y Cy5) que han sido diseñados para hacerlos coincidir masa-carga. Proteínas idénticas marcadas (con Cy2, Cy3 y Cy5) de diferentes muestras, migrarán a la misma posición a pesar del colorante utilizado, con esto se pueden separar más de una muestra en un solo gel. Los diferentes colorantes poseen diferentes espectros de excitación y emisión por lo cual trabajan a las longitudes de onda correspondientes, es posible obtener imágenes que representan diferentes muestras que han corrido al mismo tiempo en el gel, de esta forma una misma proteína expresada por igual en 2 diferentes tratamientos debe de observarse con una intensidad similar

2.2.11 Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución (CLAR)

Esta técnica se utiliza cuando los analitos en la muestra no son volátiles o inestables térmicamente, para compuestos iónicos que sean solubles en agua, y compuestos de alto peso molecular tales como las proteínas. La fase estacionaria de elección más común es la denominada fase reversa que puede ser de C-4, C-8

o C-18 y de acuerdo a los analitos se determina cuál es la idónea para utilizarse. El principio básico establece que los analitos interaccionan con la fase estacionaria de manera que van siendo retenidos preferencialmente conforme mayor sea su hidrofobicidad avanzando lentamente en la fase móvil que en este tipo de cromatografía es de una mayor polaridad que la fase estacionaria. Esta técnica de separación acoplada a espectrometría de masas (EM) es actualmente de amplio uso en el área de proteómica ya que se combina la potencia de la separación cromatográfica con la información estructural que puede obtenerse de un experimento de EM. (Cunico, y col., 1998)

2.2.12 Espectrometría de Masas de Péptidos y Proteínas

La espectrometría de masas es una tecnología que permite producir iones a partir de moléculas orgánicas o inorgánicas, separarlos y clasificarlos en función de su relación masa/carga (m/z) y medir su intensidad. Los iones analizados pueden corresponder a moléculas enteras, aductos o fragmentos de moléculas.

Se utiliza también para la identificación de proteínas basándose en la búsqueda de ellas a partir de resultados experimentales de EM comparados contra bases de datos de proteínas conocidas para un organismo.

El análisis por EM consta de los siguientes pasos: Introducción de Muestra; Ionización; Separación por m/z ; y Detección. Un espectrómetro de masas está diseñado para llevar a cabo todas las tareas anteriores y actualmente existen varios modelos en el mercado. La Figura 1 muestra los componentes principales de un espectrómetro de masas y es posible observar que existen diversas opciones para el proceso de ionización de la muestra así como para la etapa de la separación por m/z y detección. En el inicio de la EM, se tenía que tener a la muestra en fase gaseosa para poder ionizarla ya sea mediante el uso de electrones de elevada energía (en la ionización electrónica; IE) o reacciones ión-molécula

(ionización química, IQ), sin embargo el poder de esta técnica era muy limitado cuando se intentaban analizar moléculas no volátiles o térmicamente inestables como por ejemplo la proteínas. Así buscando alternativas surgieron métodos de ionización a temperatura ambiente como lo son Bombardeo por Átomos Rápidos (FAB, del inglés Fast Atom Bombardment), la ESI: Ionización por electrospray; MALDI: Ionización por desorción con láser asistida por matriz; APCI: Ionización química a presión atmosférica; APPI: Fotoionización a presión atmosférica; DART: Análisis directo en tiempo real; DESI: Ionización por desorción con electrospray. Al mismo tiempo los analizadores de m/z y detectores han ido evolucionando para acoplarse a los diferentes métodos de ionización y a la necesidad de menores límites de detección en muestras biológicas que generalmente son pequeñas. Así, en búsqueda de mayor exactitud y precisión, equipos con analizadores de masa/carga basados en transformada Fourier (FT por sus siglas en inglés) tales como el ion ciclotrón/transformada de Fourier y el Orbitrap los cuales se han acoplado a trampas de iones bi- y tri- dimensionales (2D, 3D). Mención aparte merecen los equipos que integran la separación por movilidad iónica (ion mobility spectrometry, IMS) con la EM, estos equipos son capaces de separar los iones de acuerdo a su valores de m/z y además llevar a cabo una separación basándose en sus diferentes movilidades que son debidas a las diferencias en tamaño y forma.

La descripción detallada de las diversas opciones existente en un espectrómetro de masas para ionizar, separar y detectar iones queda fuera del alcance de esta tesis y se recomienda consultar referencias especializadas (Gross, 2004, Hoffmann, y col., 1999, Hoffmann and Stroobant, 2001, Sparkman O., 2006, Watson, 1997, Watson and Sparkman O., 2007).

Sin embargo, de forma muy breve analizaremos lo que es más utilizado en Proteómica para la identificación de proteínas.

Los dos métodos de ionización más utilizados en la actualidad que se aplican en proteómica son *MALDI* (del inglés Matrix-Assisted Laser/Desorption Ionization) y *ESI* (del inglés Electrospray Ionization). MALDI fue desarrollada por los investigadores alemanes F. Hillenkamp y M. Karas a finales de 1980 y actualmente, ha llegado a ser una piedra angular en el análisis de biomoléculas (Hillenkamp, y col., 1987, Holm, y col., 1987, Karas, y col., 1987, Karas and Hillenkamp, 1988).

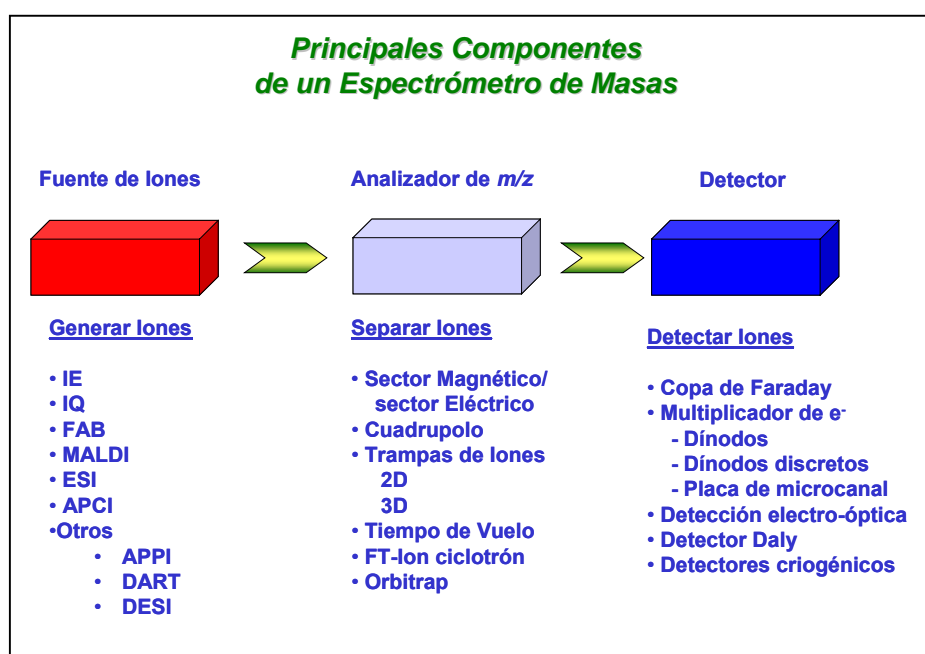


Figura 1. Componentes Básicos de un Espectrómetro de Masas. Abreviaturas se describen en el texto.

MALDI usa la absorción de radiación láser de una muestra que se encuentra mezclada con una matriz, ambas en fase sólida. La matriz absorbe energía del láser y la transfiere a la muestra lo que provoca que se formen iones con un número de cargas que van aproximadamente de 1 a 5 dependiendo del tamaño del péptido o proteína analizada. Una variante tecnológica de MALDI que

se ha utilizado de forma relativamente amplia para la búsqueda de biomarcadores es SELDI (del inglés Surface-Enhanced Laser Desorption Ionization). En esta variación la placa sobre la cual se deposita la muestra es una superficie modificada químicamente donde se lleva a cabo la unión selectiva de las proteínas de acuerdo a los mecanismos de interacción superficie-proteína. Estos mecanismos son determinados por los grupos funcionales que recubren la superficie de la placa donde se realiza el análisis. Este sistema es análogo a lo que se conoce como extracción en fase sólida en los métodos cromatográficos (Merchant and Weinberger, 2000). El objetivo de esta metodología es purificar y separar las proteínas de su matriz (suero, plasma, orina, saliva, etc..) antes de su ionización mediante el láser.

ESI, introducida por Fenn y colaboradores en 1984 (Yamashita and Fenn, 1984a, b, c), es una técnica de ionización suave en la cual los iones que están en solución son colocados en fase gaseosa a través de un mecanismo de desorción o de evaporación. La muestra es rociada a través de una diferencia de potencial elevada (3-8 kvolts) entre una punta de diámetro pequeño y el orificio de entrada en la interfase que permite enviar los iones al analizador de m/z .

La materia ionizada puede manipularse por medio de campos eléctricos y magnéticos. Por lo tanto, después de la fuente de ionización, los iones son sujetos a campos magnéticos y eléctricos a fin de separarlos. La aceleración, la energía y el *momentum* inducidos por campos magnéticos y eléctricos son dependientes de la carga del ión por lo cual los llamados analizadores de masa separan iones de acuerdo a su relación masa-carga (m/z) y no únicamente a su masa. En principio, todas las técnicas de ionización podrían acoplarse a cualquier analizador de m/z ; sin embargo, algunos acoplamientos trabajan mejor que otros debido a las características particulares de los propios analizadores, la técnica de ionización y el tipo de información que se está procesando. En general, los analizadores de m/z tienen algunas características en común como son: 1) el rango de masa (máximo m/z detectable); 2) el poder de resolución (capacidad para separar iones

de m/z adyacente); 3) la exactitud en la medición de masa; 4) la transmisión iónica y su sensibilidad (Carr and Annan, 1997, Jennings and Dolnikowski, 1990).

Si bien no vamos a abordar cada uno de los analizadores de m/z que existen, mencionaremos que los más comunes utilizadas en proteómica son: trampas iónicas (3D y lineales), tiempos de vuelo (TOF del inglés Time Of Flight), cuadrupolos, ion-ciclotrón transformada de Fourier (FT-ICR-MS) y Orbitrap-FTMS. Todos estos analizadores tienen sus propias características y pueden ser utilizados en diferentes combinaciones que permiten diversos tipos de análisis en el área de proteómica (Gross, 2004, Hoffmann, y col., 1999, Hoffmann and Stroobant, 2001, Sparkman O., 2006, Watson, 1997, Watson and Sparkman O., 2007).

2.2.13 Identificación de proteínas por medio de Espectrometría de Masas

La Figura 2 muestra las diferentes formas del abordaje proteómico donde se utilizan la EM como técnica para identificación de las proteínas.

El abordaje proteómico utilizando espectrometría de masas lo podemos dividir en dos aproximaciones diferentes, la primera de ellas es conocida como el abordaje de “abajo hacia arriba” y la segunda como “de arriba hacia abajo” (del inglés bottom-up y top-down). Para el abordaje “de abajo hacia arriba”, en primera instancia, se extrae el contenido proteico de las muestras de interés y se cuantifican usando una técnica estandarizada, la mezcla de proteínas se digiere mediante una reacción química o enzimática. Los péptidos obtenidos del producto de la digestión son separados de alguna manera (p. ej. mediante HPLC o electroforesis) y analizados por medio de Espectrometría de Masas, de esta forma los péptidos se separan y al mismo tiempo se determinan sus pesos moleculares. El mismo experimento se lleva a cabo *in silico* con todas las proteínas reportadas en una base de datos del organismo con el cual se esté trabajando (p. ej. pez cebra, ratón, humano etc...). Así, a través de algoritmos bioinformáticos se correlacionan los valores teóricos de m/z de las secuencias de los péptidos

producidos en la digestión *in silico*, con los valores determinados de forma experimental. Cuando ambos valores coinciden dentro de un cierto margen de error entonces se puede establecer que la secuencia peptídica proveniente de la base de datos es la que corresponde al valor de m/z que se determinó experimentalmente. De esta forma, a partir de las secuencias de péptidos determinadas es posible conocer las proteínas de donde provienen lo que al final del experimento nos lleva a una lista de posibles proteínas presentes en la muestra con un cierto error experimental asociado. A este procedimiento se le conoce como Mapeo de Huella Peptídica (PMF, del inglés peptide mass fingerprinting). Como se puede observar, la determinación de las proteínas presentes en la muestra depende en última instancia de la exactitud de los valores de m/z obtenidos experimentalmente para cada péptido ionizado. Por lo tanto la posibilidad de falsos positivos siguiendo esta metodología puede ser importante.

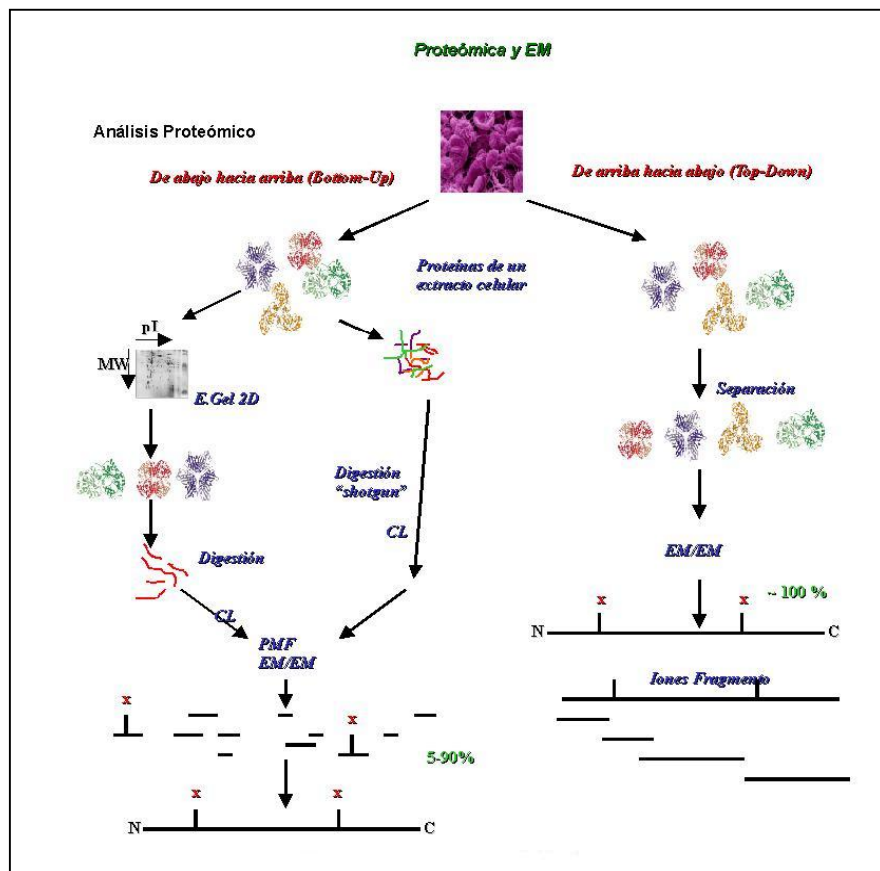


Figura 2. Diferentes abordajes proteómicos.

A fin de dar mayor certidumbre a estos resultados se agrega un segundo paso utilizando experimentos EM/EM. Así, para cada péptido ionizado se determina su valor de m/z experimental y además se envía a una celda de colisión que es una sección del espectrómetro de masas donde los péptidos ionizados son fragmentados mediante colisiones inelásticas con un gas inerte como puede ser helio, de esta manera se obtiene un patrón de fragmentación para el péptido ionizado en cuestión (experimento EM/EM) (Ver Figura 3). De igual manera que en PMF, los valores experimentales se comparan con los valores teóricos obtenidos del experimento *in silico*, con el fin determinar la secuencia de los péptidos ionizados. Dado que los patrones de fragmentación son como la huella digital para cada péptido, la identificación de las secuencias peptídicas son altamente confiables y como consecuencia de esto la identificación de las proteínas presentes en la muestra también lo son, con un bajo numero de falsos positivos.

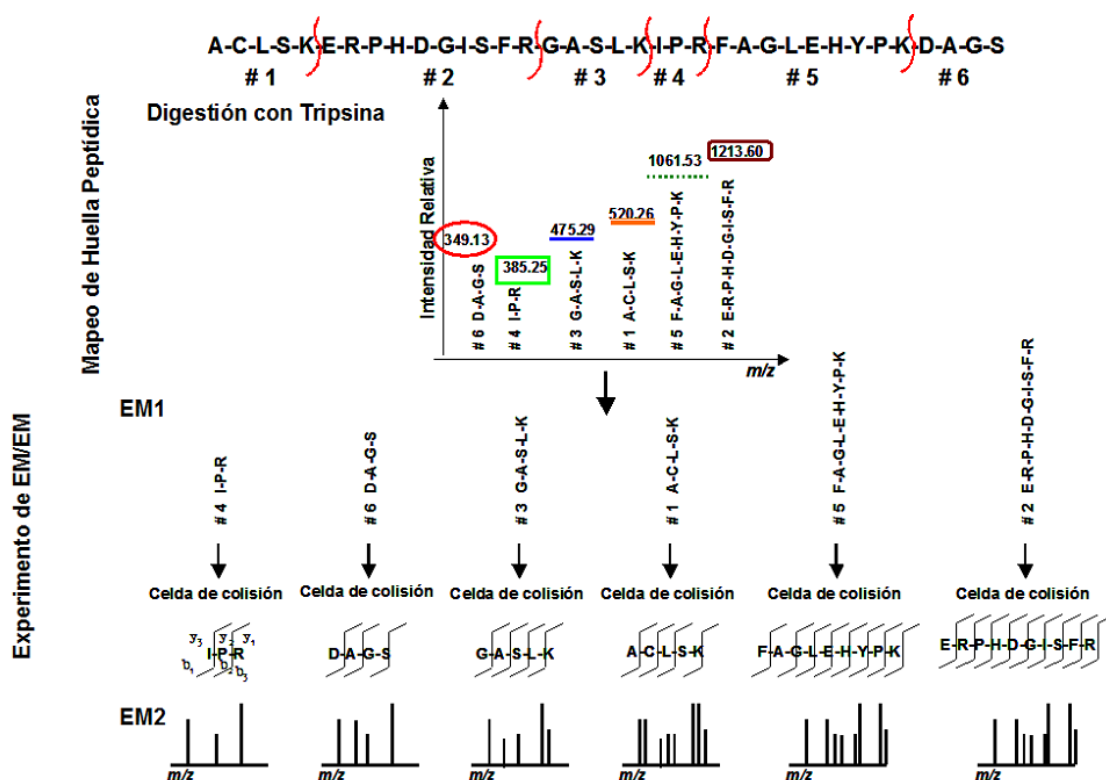


Figura 3. Conceptualización de los experimentos de Mapeo de Huella Peptídica y EM/EM para la identificación de péptidos y proteínas.

Para el manejo de los datos provenientes de los experimentos de EM y la comparación de los resultados experimentales con los teóricos así como la asignación de péptidos y proteínas existen diferentes algoritmos matemáticos desarrollados, entre ellos los más conocidos son Paragon, MASCOT, SEQUEST, Phenyx y xTANDEM entre otros (Liebler, 2005, Liebler and Editor, 2002, van der Greef, y col., 2004).

Como se comento antes, es necesario hacer notar que una vez digeridas las proteínas, se generan una gran cantidad de péptidos por lo que es esencial la separación de estos productos de digestión utilizando métodos cromatográficos, electroforéticos, etc. Idealmente, cada péptido individual debería de ser analizado, sin embargo en la actualidad, no es posible llevarlo a cabo experimentalmente de forma completa. Varias estrategias se han diseñado para resolver este problema; entre la más conocida está la aplicación de una cromatografía bidimensional que utiliza dos mecanismos de separación (generalmente intercambio iónico e hidrofobicidad en una fase reversa). Esta aproximación se le conoce como MUDPIT (del inglés MUltiDimensional Protein Identification Technology) y principalmente se aplica a muestras de proteínas altamente complejas provenientes de extractos celulares totales.

2.2.14 Aproximación Proteómica

Para este proyecto, la aproximación utilizada fue “de abajo hacia arriba” basada en geles bidimensional y es descrita con más detalle a continuación: En esta forma de abordaje proteómico, consecuentemente a la extracción y cuantificación de proteínas, se lleva a cabo su separación mediante geles de poliacrilamida de 1 y 2 dimensiones para favorecer la separación, primero con base al punto isoeléctrico y posteriormente de acuerdo al peso molecular.

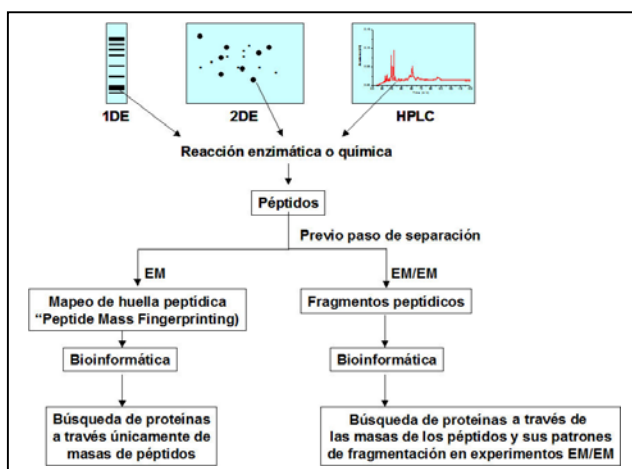


Figura 4. Esquema que muestra la identificación de proteínas a partir de datos de Espectrometría de Masas.

Los geles obtenidos son escaneados con el fin de comparar las imágenes de muestras que son controles y expuestas a tratamientos a fin de determinar regiones donde se observen proteínas expresadas diferencialmente ya sea sub- o sobre- expresadas. Así, de esta manera es posible llevar a cabo una comparación entre los diferentes tratamientos con el fin de encontrar las proteínas que se sobreexpresan o subexpresan. En ciertos casos la diferencia es muy evidente y es posible determinar estos grupos de proteínas de forma visual.

En la aproximación DIGE los geles son escaneados de forma que se detecte la fluorescencia de las proteínas que fueron marcadas durante el tratamiento de la muestra. Mediante el empleo de software, para cada spot encontrado en el gel que idealmente representa una proteína se obtiene una gráfica en tercera dimensión donde en el eje z representa la intensidad observada en la imagen para cada mancha (ver Figura 5). De esta manera, con las imágenes en tercera dimensión se obtiene un diferencial de proteínas determinando y diferenciando las manchas o spots correspondientes entre los grupos analizados. Así, se comparan con muestras que son controles y muestras expuestas al tratamiento a fin de determinar regiones donde se observen proteínas expresadas diferencialmente ya sea sub- o sobre- expresadas.

En ambos casos, las proteínas de interés son extraídas de los geles y posteriormente son digeridas con una enzima específica (generalmente tripsina) antes de ser analizadas vía espectrometría de masas para su identificación cualitativa. Estas proteínas diferenciales son las de mayor importancia en el análisis y son por lo tanto las que se identifican a fin de establecer su potencialidad como biomarcadores.

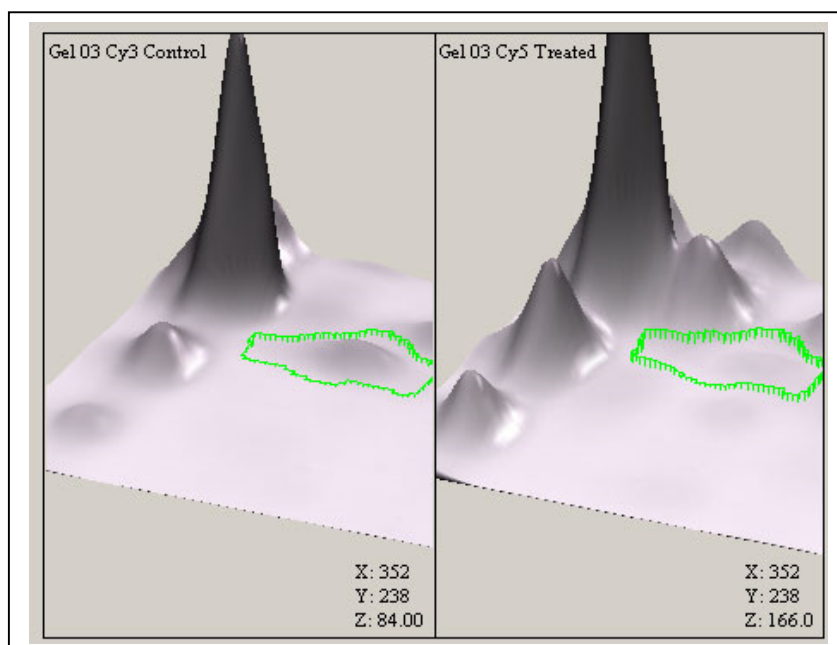


Figura 5. Análisis de geles DIGE mediante software. Tomado de <http://us.expasy.org/melanie/>.

Una variación al análisis anterior es la denominada técnica del “shotgun proteomics” donde el extracto de proteínas es directamente digerido sin previa separación (o con únicamente la remoción de proteínas más abundantes como la albúmina ya sea por gel de 1D o por cromatografía de afinidad), y analizado directamente por un sistema de EM acoplado a un sistema de CLAR. Este procedimiento, capaz de identificar cientos de péptidos en un solo experimento, permite analizar de forma automática los componentes de mezclas muy complejas

de péptidos y se presupone que se evita la pérdida de proteínas. Esta técnica se ha aplicado a la identificación directa de componentes de complejos macromoleculares e incluso al análisis de proteomas enteros sin necesidad de separar sus componentes mediante electroforesis. El inconveniente de esta metodología es que los péptidos abundantes son detectados con un gran nivel de confianza, mientras que las menos abundantes tienen menos reproducibilidad, es por eso que se realizaron en esta tesis múltiples réplicas biológicas y con ello se obtuvo un marcado aumento en la sensibilidad de la identificación de las proteínas.

2.2.15 Ontología Génica (Gene Ontology, GO)

La nomenclatura de genes ha sido utilizada con frecuencia para describir productos génicos (ácidos ribonucleicos y proteínas). Mientras la meta de la nomenclatura de genes es crear una única designación para los nombres de los genes, estos son frecuentemente no únicos aún dentro de la misma especie. Intentar agregarle información con significado biológico a los genes puede ser un problema. De hecho, muchas revisiones en su nomenclatura se han llevado a cabo conforme la función de los productos génicos se han ido conociendo. Con el fin de ayudar con la ambigüedad de nomenclatura, el uso de métodos ontológicos para estructurar el conocimiento biológico ha sido desarrollado desde hace varios años. Una de las principales ontologías en biología molecular es la conocida como Gene Ontology (GO) que produce un vocabulario estructurado, precisamente definido, común y controlado para describir el rol de los genes y sus productos en especies diferentes. Este comprende tres categorías mayores que describen los atributos del Proceso Biológico, la Función Celular y el Componente Celular para los productos génicos. Actualmente contiene 15323 frases para *Danio rerio* representando categorías de conceptos dentro de una Gráfica Dirigida no cíclica (DAG, del inglés Directed Acyclic Graph). Las categorías tienen múltiples

“padres” y múltiples “hijos” a lo largo de una rama y forman un vocabulario estándar junto con múltiples fuentes biológicas.

El proyecto de GO es una iniciativa bioinformática de gran envergadura para tratar de estandarizar la representación de genes y los atributos de sus productos génicos en especies y en bases de datos. El proyecto posee un vocabulario controlado de términos para describir las características de los productos de los genes y la manera de anotarlos. Los miembros de GO están estableciendo palabras aceptadas para describir las funciones moleculares, los procesos biológicos y los componentes celulares más que imponer un sistema homologado de denominaciones o número para los genes. Mediante esos términos se pueden vincular genes relacionados independientemente de sus confusas nomenclaturas. Actualmente a inicios de 2010 GO contiene 30223 términos con 99.2% definidos, los términos están divididos en 18792 para el proceso biológico, 2727 para el componente celular y 8705 para la función molecular. (Consortium, 2009, Consortium, 2000, Pearson, 2001)

HIPÓTESIS

La exposición de embriones de pez cebra a alteradores endócrinos induce la modificación en la expresión proteica del organismo.

OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL

Evaluar el efecto del alterador endócrino 17- α -etinil estradiol en la expresión de proteínas del pez cebra (*Danio rerio*) en etapa embrionaria utilizado como organismo modelo.

OBJETIVOS PARTICULARES

1. Evaluar cualitativamente la modificación en la expresión proteica en embriones de pez cebra expuestos a 17- α -etinil estradiol.
2. Evaluar la inducción del biomarcador vitelogenina por la exposición a 17- α -etinil estradiol en embriones de pez cebra.

III. METODOLOGÍA

3.1 Selección de la población de estudio

Se realizaron las cruces con adultos de pez cebra (*Danio rerio*) de cepas silvestres del Laboratorio de Biología del Desarrollo del Instituto de Fisiología Celular de la UNAM. Inmediatamente después de la fertilización de los ovocitos, se sacaron cuidadosamente de la pecera con ayuda de una red y a través del microscopio se realizó la selección de los mismos, colocando los ovocitos fertilizados en una caja de petri desechable (60 embriones por caja) que contiene una solución de agua de acuario con azul de metileno al 0.1 % y se incubaron a una temperatura de 28.5°C.

La proteína utilizada para cargar los geles de 2 dimensiones se obtuvo extrayéndola de embriones expuestos a una solución de 100 ng/L de 17- α -etinilestradiol disuelto en agua de acuario con azul de metileno al 0.1 %, desde el segundo día postfertilización (2dpf) hasta el 4dpf, con una temperatura de incubación a 28.5°C. En esta etapa los embriones aún presentan vitelo el cual se eliminó manualmente con ayuda del microscopio, ya que cuando se realizan los geles de 2D, la expresión de las proteínas es difusa por la presencia de lípidos que son abundantes en el vitelo.

Para las técnicas de Western Blot. DIGE y proteómica shotgun, la proteína se obtuvo de embriones expuestos a 10; 100; 500; 1,000; 5,000 y 10,000 ng/L de una solución de 17- α -etinilestradiol disuelta en agua de acuario con azul de metileno al 1%, desde el 3dpf hasta el 6dpf . En esta etapa el embrión ya no tiene vitelo.

3.2 Exposición de los organismos a 17- α -etinilestradiol

Inicialmente se realizó una solución patrón de 1 mg/mL de 17 α -etinilestradiol disuelto en alcohol etílico, las diluciones posteriores se realizaron en agua de acuario con azul de metileno al 0.1%, la concentración máxima de alcohol etílico durante la exposición de los embriones fue de 0.01% (Liedtke, y col., 2008)

Se expusieron aproximadamente 30 embriones de 3dpf en pequeñas cajas de petri desechables con 15 mL una solución de 17 α -etinilestradiol con azul de metileno al 0.1% a concentraciones de 10; 100; 500; 1,000; 5,000 y 10,000 ng/L de 17 α -etinilestradiol y se incubaron a 28.5°C. Estas muestras se utilizaron para correr los experimentos Western Blot y DIGE. Para la extracción de proteína de los grupos de estudio véase anexo 7.1.

3.3 Cuantificación por el método del Ácido Bicinconínico

Este método es compatible únicamente para cuantificar la proteína destinada a realizar la técnica de Western Blot ya que las proteínas se encuentran disueltas en la siguiente solución: Ringer libre de Calcio (NaCl 116 mM; KCl 2.9 mM y HEPES 5.0 mM a pH = 7.2) EDTA y 10 μ L/mL de Coctel Inhibidor de Proteasas (véase anexo 7.2).

3.4 Cuantificación por el método 2D Quant

La solución de extracción de las proteínas contiene: Urea 7.0 M; Thiourea 2.0 M; CHAPS 4.0%; Isopropanol 5.0%; Glicerol 2.5% y Ditiotreititol 1%; 10 μ L/mL de Coctel Inhibidor de Proteasas y 10 μ L/mL de mezcla de Nucleasas, sólo son

compatibles para este método de cuantificación y se aplica para las técnicas de Geles de 2 dimensiones, DIGE y Shot gun. (véase anexo 7.3)

3.5 Electroforesis en gel bidimensional

Se trabajó con embriones de desarrollo temprano, los cuales aún presentaban vitelo (fosfolipo-glicoproteínas, fuente nutricional para el desarrollo embrionario), éste se eliminó manualmente con la ayuda de una pipeta de punta delgada con la finalidad de evitar interferencia en esta aplicación proteómica (Link, y col., 2006). El experimento inició con embriones 2dpf que se expusieron hasta el 4dpf a una concentración de 100 ng/L de 17- α -etinilestradiol disuelto en agua de acuario y azul de metileno al 0.1 %. Se corrió una prueba en paralelo, donde únicamente se expusieron los embriones en agua de acuario y azul de metileno al 0.1 % que fué considerada como control (ver Figura 6.). En cada gel se cargó 100 μ g de proteína y se tiñó con azul de Coomasie (véase anexos 7.5 y 7.6). Después de realizar varios experimentos siguiendo el mismo protocolo, se observó que la eliminación del vitelo no se puede realizar de manera uniforme y reproducible, por lo que para los ensayos posteriores se utilizaron embriones con mayor tiempo de desarrollo y que no presentan vitelo.

3.6 Western Blot

Es importante señalar que previo a la realización de este experimento, se deberá correr un gel de acrilamida de una dimensión (1D) al 8%, para verificar que la proteína extraída de los embriones de pez cebra ha sido procesada correctamente y no ha sufrido degradación. En el gel de 1D se deberá observar claramente la separación de las bandas de proteína bien definidas, adicionalmente, cuantificar correctamente la proteína nos llevará a resultados confiables cuando se realice el revelado de los biomarcadores en el experimento

de Western Blot por lo tanto es vital escoger el método de cuantificación de proteína adecuado (véase anexo 7.7)

3.7 Gel de electroforesis diferencial con tinción fluorescente (2-D Fluorescence Difference Gel Electrophoresis, 2-D DIGE)

Los geles de acrilamida de 24 cm se dejaron polimerizar por 12 horas. Se utilizaron tiras para electroforesis de 24 cm, rango de pH de 3-10 lineales. A partir que se realiza el marcaje de las proteínas con los fluoróforos, se trabaja al abrigo de la luz para evitar el marcaje se vea afectado.(véase anexo 7.8)

3.8 Espectrometría de Masas de Péptidos y Proteínas

La identificación de proteínas fue llevada a cabo mediante la aproximación que utiliza a la EM para identificar péptidos y proteínas. Los productos de digestión ya sea provenientes de experimentos de electroforesis bidimensional o proteómica shotgun. Los espectros de masa fueron registrados utilizando un equipo MALDI-TOF 4800 Plus MALDI TOF/TOF Mass Analyzer de Applied Biosystems (US). El láser fue ajustado de forma que la intensidad del láser produjese la mejor señal en las muestras analizadas. La albúmina de suero bovino y la enolasa de levadura fueron utilizadas como controles positivos de identificación proteica. En cada caso se aceptó una identificación con cobertura de secuencia no menor a 55%. (véase anexo 7.11)

3.9 Proteómica Shotgun

Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución (CLAR)

El sistema cromatográfico consistió de un sistema de bombeo Waters Alliance 2690 acoplado a un detector de arreglo de diodos (Waters Alliance 2690) y un automuestreador equipado con un loop de 100 mL. La separación fue llevada a cabo con una columna de fase reversa Vydac C4 de diámetro de partícula de 300 micras, con un diámetro interno de 4.6 mm y una longitud de 50 mm. La fase móvil fue establecida mediante el uso de las siguientes soluciones (véase anexo 7.9).

La separación de proteínas a través de CLAR- se realizó con una columna de fase reversa C-4

A) Agua con 0.1% TFA (ácido trifluoroacético)

B) Acetonitrilo (ACN) con 0.1% TFA

Las muestras de proteínas fraccionadas son digeridas se desalan con la ayuda de puntas ZipTip C₁₈ y finalmente se coloca 0.8 µL de muestra en la placa de MALDI utilizando α-ciano-4-hidroxi-ácido cinámico como matriz y se lleva a cabo la identificación mediante EM, (véase anexo 7.9).

3.10 Digestión de proteínas a partir de muestras de geles o de muestras con proteínas en solución

Después de realizar la identificación de las proteínas diferenciales, estas manchas se cortaron del gel, se digirieron con tripsina por 16 horas a 37°C, se desalaron con puntas ZipTip (resina C-18 para retención en fase sólida). En el caso de las proteínas en solución, se utilizó la técnica de CLAR, (véase anexo 7.10).

IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1 Prueba inicial de separación utilizando Electroforesis en gel bidimensional

La etapa de exposición inicial de los embriones de pez cebra a 17- α -etinilestradiol utilizando una concentración de 100 ng/L, fue en el 2dpf concluyendo hasta el 4dpf y se corrió una prueba en paralelo, donde únicamente se expusieron los embriones en agua de acuario y azul de metileno al 0.01% que fue considerada como control. Todos los embriones sobrevivieron al término del experimento. En la Figura 6 y en la Figura 7, se pudo observar que no existen diferencias significativas entre los dos grupos de estudio (control y 100 ng/L de 17- α -etinilestradiol) esto es debido probablemente a la baja sensibilidad del método para esta concentración del compuesto, esto se deduce del experimento de Western Blot donde a una concentración de 500 ng/L del alterador endocrino sí se observa efecto en el organismo. Cabe aclarar que esta concentración inicial se eligió con base a referencias bibliográficas.

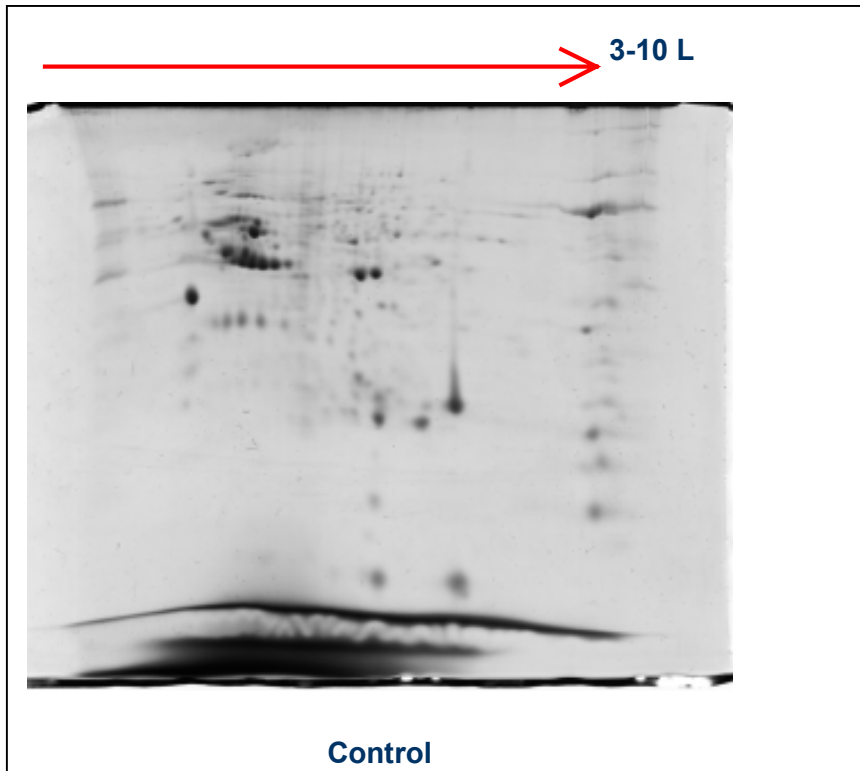


Figura 6. Gel 2D de embriones control de 2-4dpf, tiras 3-10lineales con tinción de azul de Coomasie.

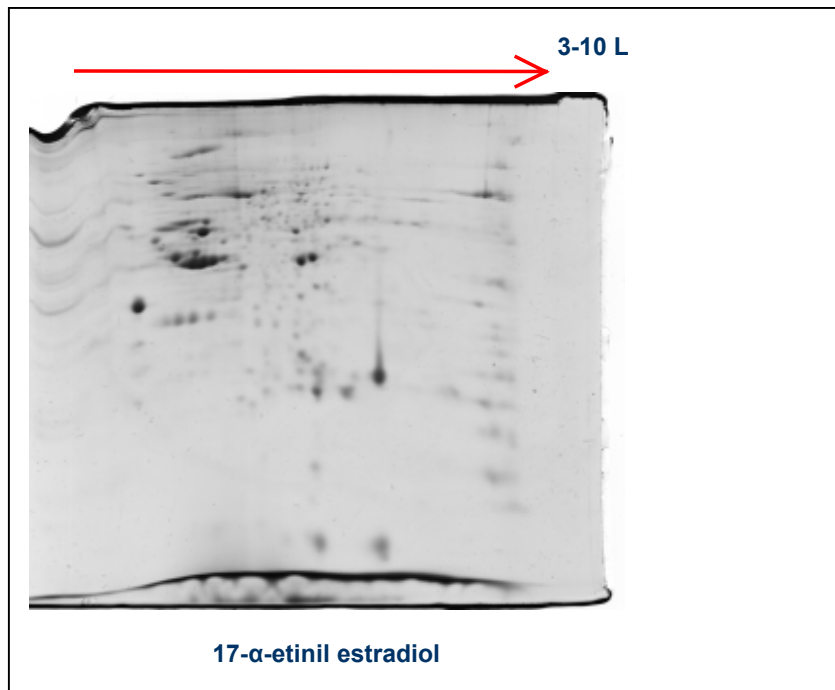


Figura 7. Gel 2D de embriones expuestos a 100 ng/L de 17-α-etinilestradiol de 2-4dpf, tiras 3-10 lineales teñidos con azul de Coomasie.

4.2 Western Blot

En este experimento, los embriones de pez cebra se expusieron a partir del 3dpf y se concluye hasta el 6dpf a una concentración de 10; 100; 500; 1,000; 5,000 y 10,000 ng/L de 17- α -etinilestradiol y también se corrió una prueba en paralelo, donde únicamente se expusieron los embriones en agua de acuario y azul de metileno al 0.01% que fue considerada como control. Se realizó un gel de acrilamida al 10% y en cada carril se pusieron 30 μ g de proteína extraída de cada grupo de estudio, Figura 6, (hígado de hembra adulta-control positivo;-embriones no expuestos al alterador endócrino-control negativo; 10; 100; 500; 1,000; 5,000 y 10,000 ng/L de EE₂), se realizó la transferencia de la proteína a la membrana de celulosa, y al probar el anticuerpo primario monoclonal (anti-vitelogenina) aparecieron claramente las bandas en aproximadamente 150 kDa lo que indica que este anticuerpo se enlaza con elevada afinidad a la vitelogenina de la muestras del pez cebra. En la Figura 8 se pudo observar que la intensidad de las bandas aumenta conforme la concentración de los tratamientos también aumenta. A partir de los 500 ng/L se comenzó a manifestar la presencia de esta proteína que es considerada como biomarcador. Para comprobar el control de carga, la membrana anterior se incubó con el anticuerpo monoclonal anti- α -tubulina, y aparecen bandas a 50 kDa que acredita el experimento, ver Figura 10.

El éxito de esta técnica de western blot dependió de la afinidad y especificidad de los anticuerpos utilizados y de la abundancia de la proteína blanco, además, la ventaja de trabajar con organismos de 6dpf con ausencia de vitelo y lípidos no interfirió en la definición de las bandas por lo que se pudieron observar claramente las variaciones en las intensidades de las mismas; es importante señalar que la cuantificación correcta de la proteína extraída es una pieza clave en la confiabilidad del resultado.

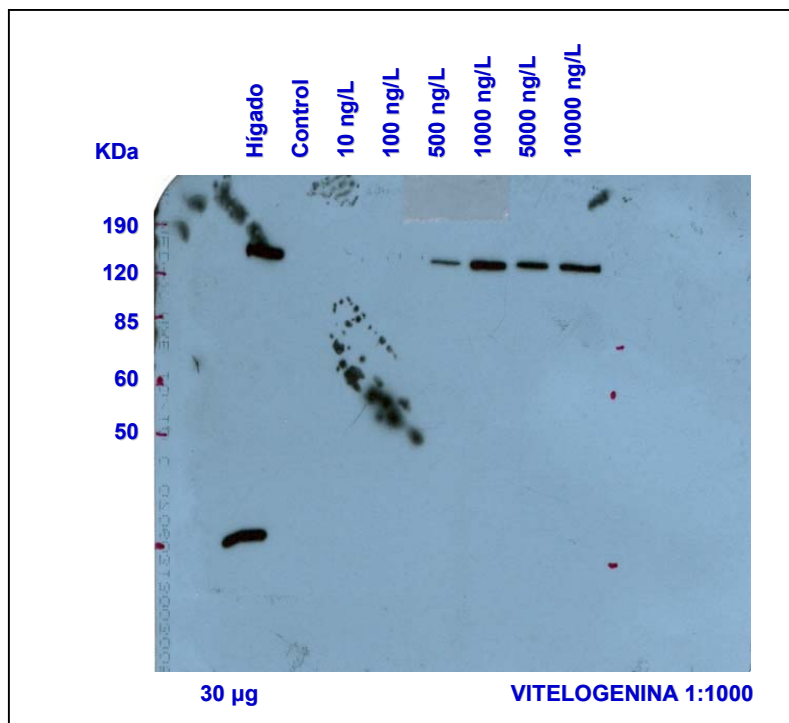


Figura 8. Western Blot, embriones 6dpf. Control positivo (hígado de hembra adulta), control negativo y embriones expuestos a diferentes concentraciones de 17- α -etinilestradiol.

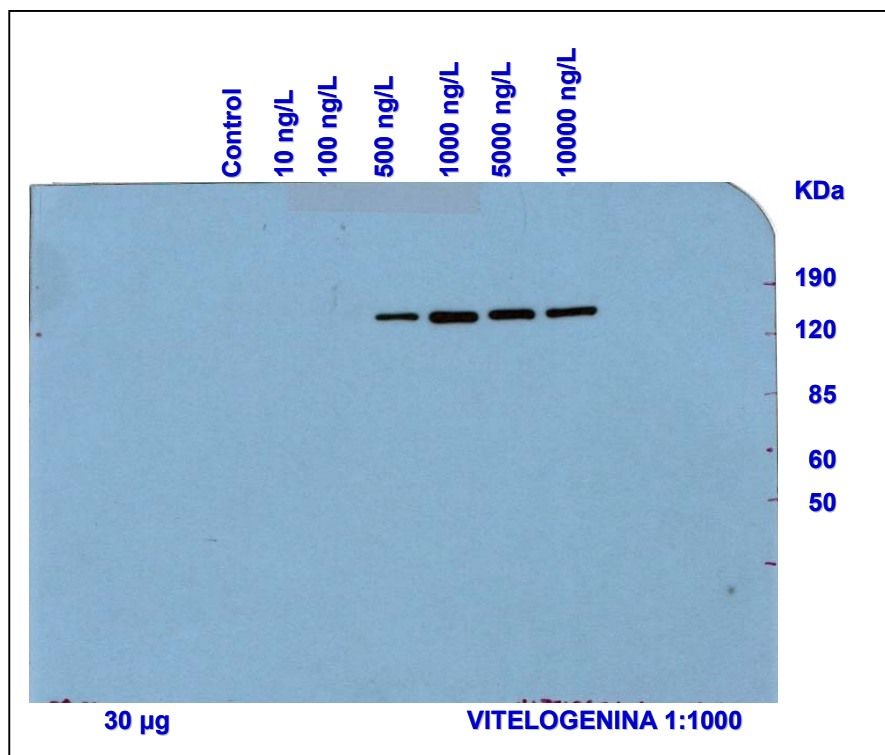


Figura 9. Western Blot, embriones 6dpf. Control negativo, embriones expuestos a diferentes concentraciones de 17 α -etinilestradiol.

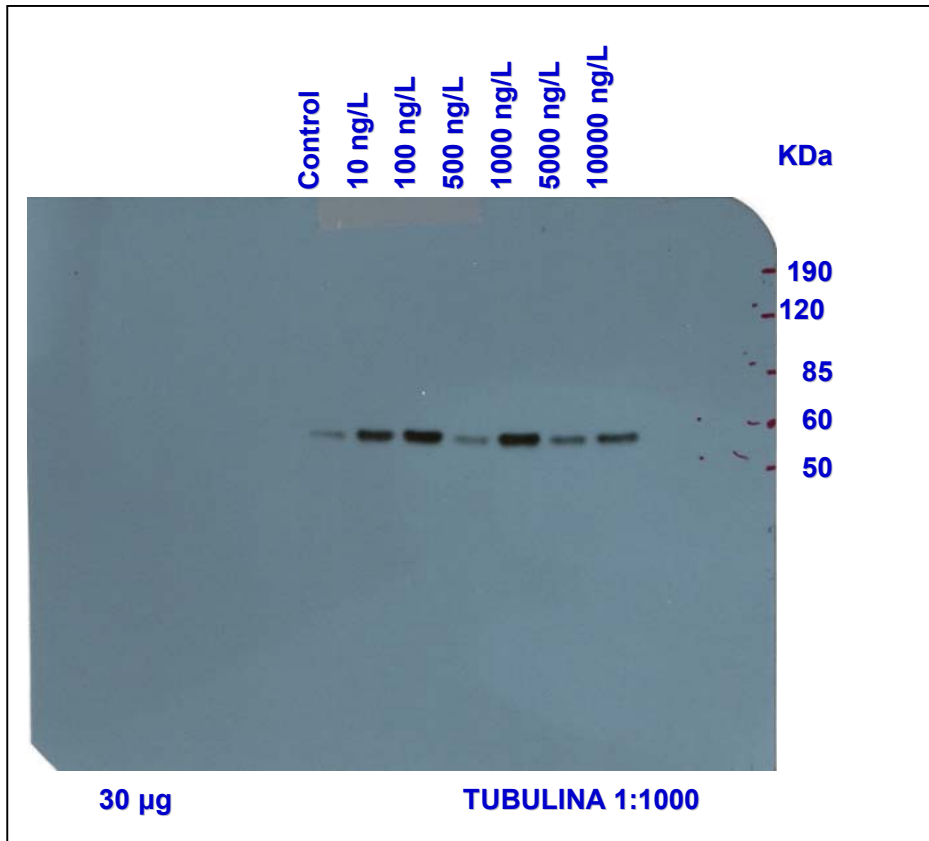


Figura 10. Control de Carga/Western Blot, embriones 6dpf. Control negativo, embriones expuestos a diferentes concentraciones de 17 α -etinilestradiol.

4.3 DIGE

Con la ayuda del software se realizó un análisis comparativo entre las imágenes primaria y secundaria, se puede observar en la Figura 11 y en la Figura 12 que las proteínas señaladas con el contorno de color verde, son las que permanecen sin cambio, en color rojo se indican las proteínas que disminuyen y las que aumentan de intensidad son las de color azul.

En la Figura 13 se observa la cantidad total de proteínas detectadas en el gel, en esta imagen también se indican las proteínas que se incluyen o excluyen para el análisis. Las proteínas que se consideraron diferenciales y que se extrajeron del gel para su análisis de identificación por espectrometría de masas, tuvieron el aspecto de una “loma” definida como lo muestra la imagen que está señalada con color rosa.

Una vez hecho el análisis de las proteínas diferenciales con el software, se escanea el gel de acrilamida que está teñido con el colorante Deep Purple, que a simple vista no se ve teñido, se recurre a una hoja transparente de acetato, obteniéndose la Figura 14.

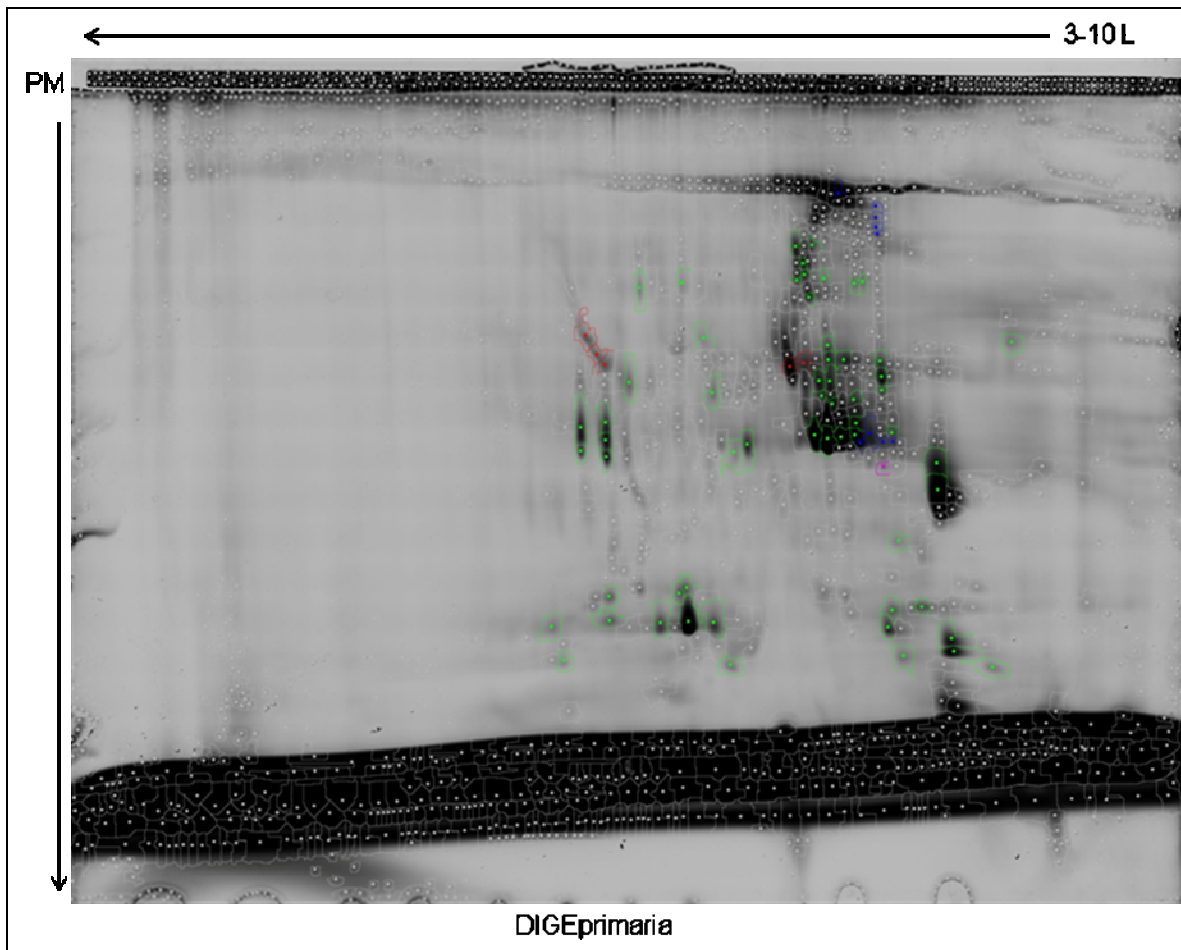


Figura 11. Imagen Primaria del Experimento DIGE. Tiras IPG 24 cm

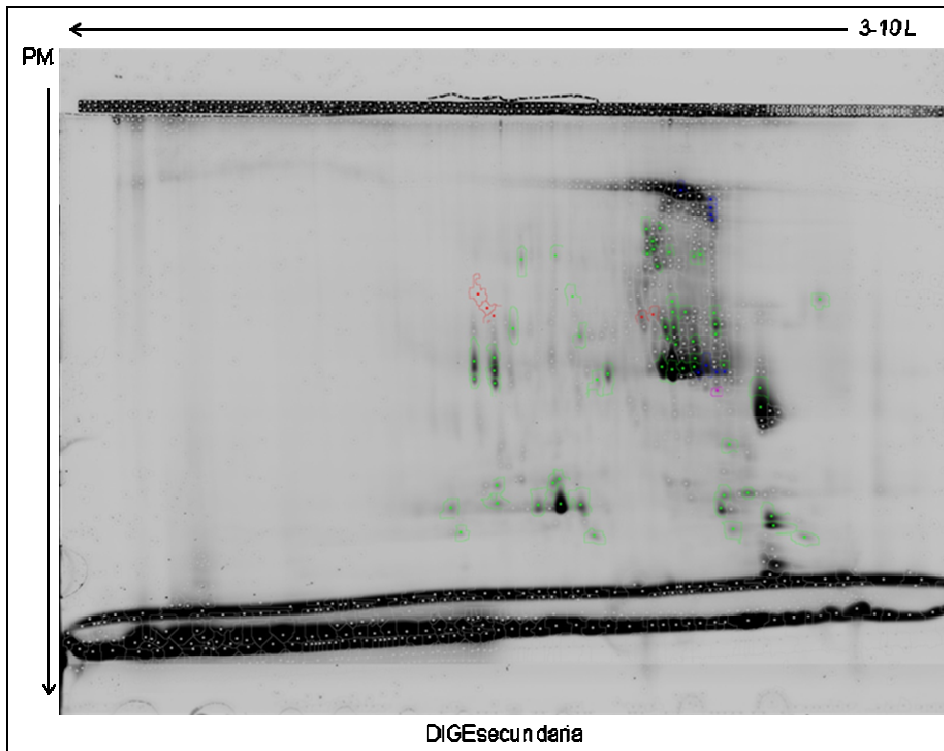


Figura 12. Imagen secundaria del Experimento DIGE. Tiras IPG 24 cm

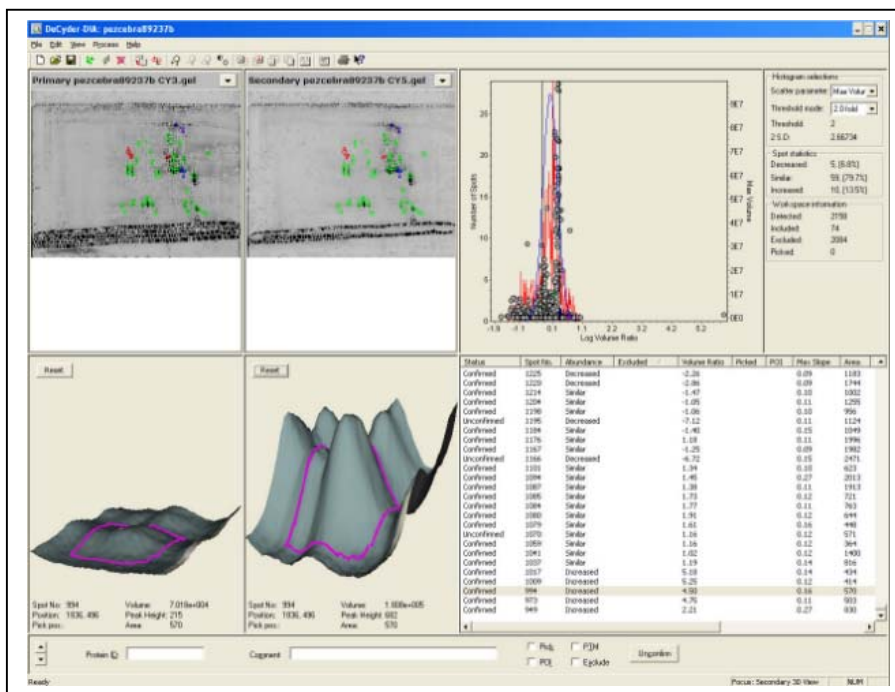


Figura 13. Imagen del análisis llevado a cabo de los geles DIGE para encontrar expresiones diferenciales de proteína.

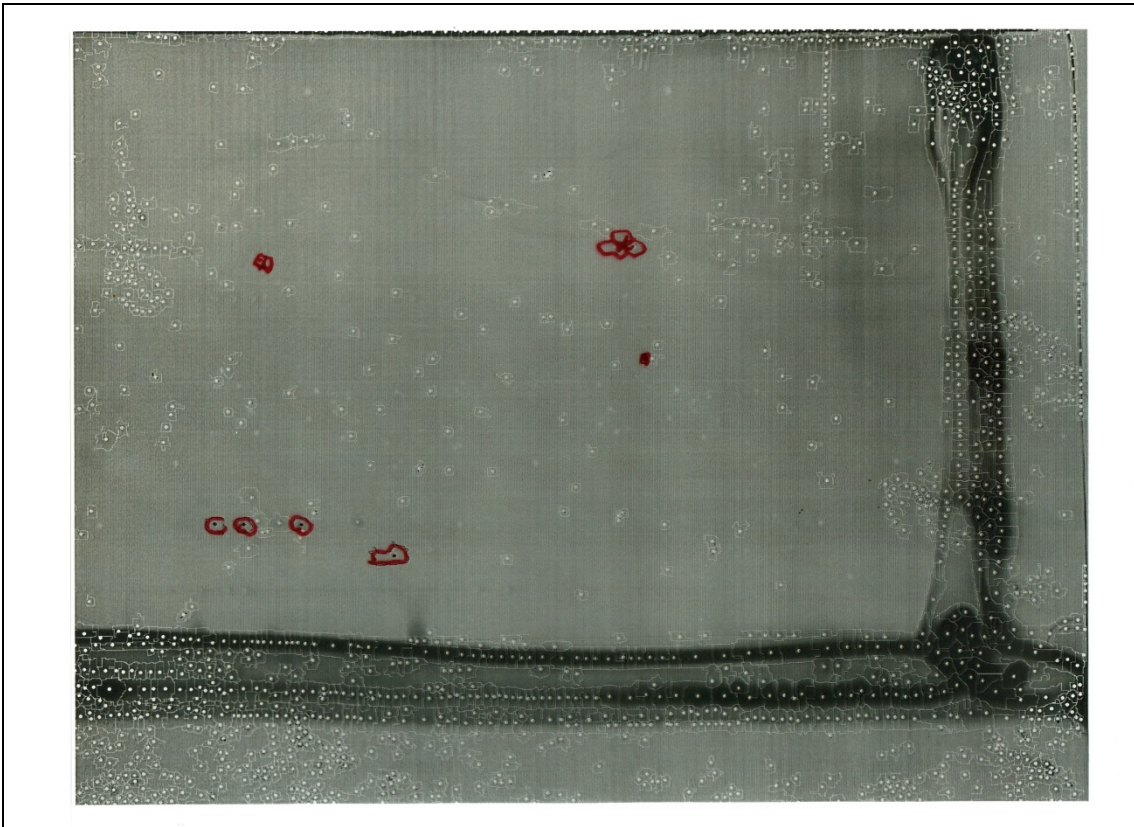


Figura 14. Acetato con proteínas diferenciales.

Las proteínas diferenciales se identifican con un número en la Figura 15 posteriormente se cortan cuidadosamente para extraerse, digerirse y ser procesadas para identificarse por medio de espectrometría de masas.

Se obtuvieron 11 proteínas diferenciales y solo se identificaron 6 proteínas mediante espectrometría de masas utilizando la base de datos para *Danio rerio* de UNIPROT.

Los resultados revelaron:

Aumento del spot 1 = proteína LZIC (leucine zipper and ICAT homologous domain contain protein) Q6DHH7

Disminución de spot 7 = Queratina citoesquelética

Aumento de spot 8 = Actina

Aumento de spot 9 = Actina

Aumento de spot 10 = Actina

Aumento de spot 11 = Actina 2 Q7ZVF9

Se observó que tanto en los geles 2D como en los geles DIGE, las proteínas del pez cebra son mayormente ácidas, en las la Figura 11 y 12 observamos proteínas aglomeradas donde no hubo una buena separación de las mismas. Para futuros experimentos, se sugiere utilizar tiras IPG de 24 cm con un rango de pH de 4 a 7 con el fin de lograr una mejor resolución en esa área y de esta manera obtener mejores resultados.

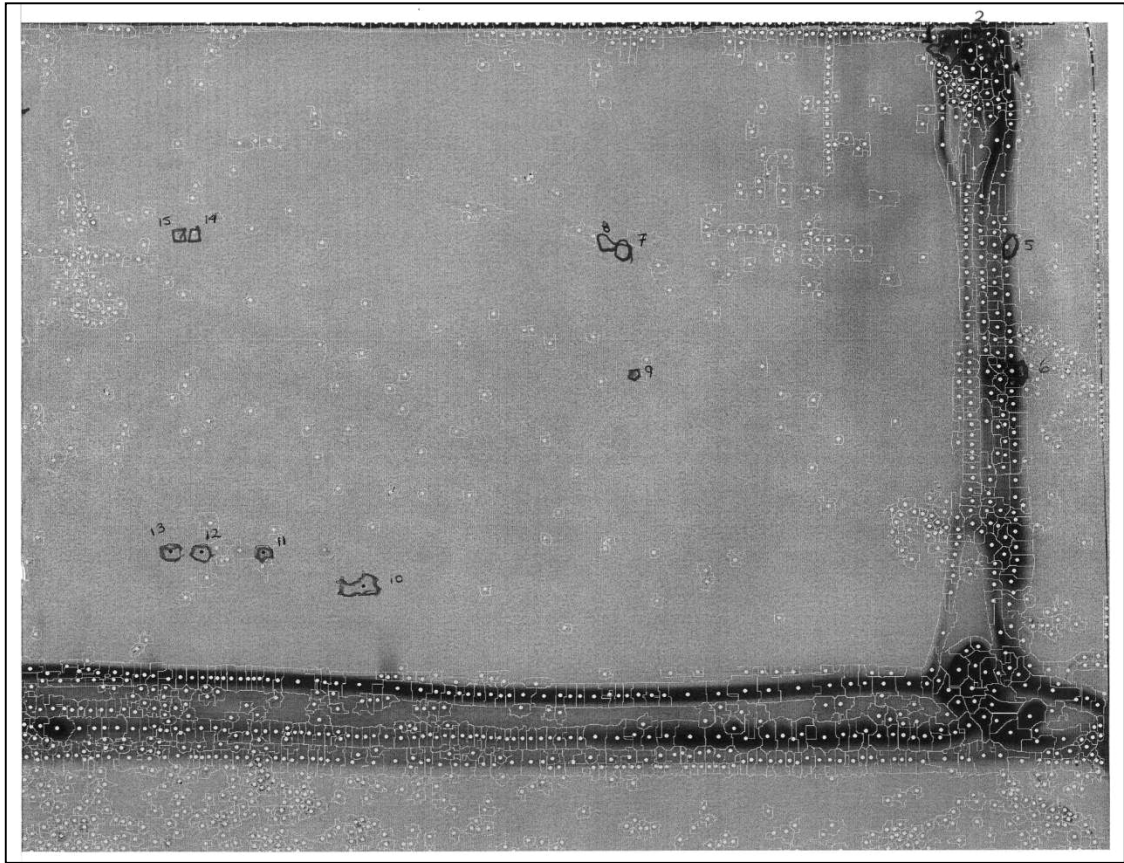


Figura 15. Identificación numérica de proteínas diferenciales.

4.4 APROXIMACIÓN PROTEÓMICA SHOTGUN

En este protocolo se propone una última etapa donde se lleva a cabo un análisis cualitativo de la expresión de proteínas en embriones de pez cebra expuestos a 10, 100, 500, 1000, 5000 y 10000 ng/L de 17- α -etinilestradiol

Después de separar los extractos de proteína de cada uno de los grupos de estudio mediante CLAR, las fracciones obtenidas se digirieron de acuerdo al protocolo y los productos de digestión se introdujeron en el equipo de EM para la identificación de las proteínas. En cada digerido se revisaron las 60 señales más abundantes y se analizaron mediante el uso del software MASCOT con una confianza no menor al 95% utilizando la base de datos para *Danio rerio* del International Protein Index, IPI, versión septiembre 2009. Para cada grupo de estudio se obtuvo una lista de proteínas identificadas para cada tratamiento y se procedió a su análisis.

Las figuras siguientes representan los resultados de proteínas identificadas mediante el uso del algoritmo de MASCOT a la muestra Control y todas las concentraciones a las que fueron expuestos los embriones del pez cebra, 10, 100, 500, 1000, 5000 y 10000ng/L de 17- α .etinilestradiol.

Control

{MATRIX} Mascot Search Results *{SCIENCE}*

```
User :
Email :
Search title :
Database : IPI_zebrafish zebrafish_362 (38433 sequences; 19099775 residues)
Timestamp : 24 Sep 2009 at 18:25:19 GMT
Significant hits: IPI00615483 Tax_Id=7955 Gene_Symbol=ttna Titin a
IPI00896863 Tax_Id=7955 Gene_Symbol=mll14b;LOC793247;LOC100150711
IPI00890560 Tax_Id=7955 Gene_Symbol=ttnb im:6911926
IPI00631543 Tax_Id=7955 Gene_Symbol=dync1h1 Dynein cytoplasmic 1
IPI00914465 Tax_Id=7955 Gene_Symbol=myst3 MYST histone acetyltran
IPI00864873 Tax_Id=7955 Gene_Symbol=LOC100002368 similar to helen
IPI00609122 Tax_Id=7955 Gene_Symbol=si:ch211-250g4.3 im:7151086
IPI00897421 Tax_Id=7955 Gene_Symbol=wu:fc23b07 wu:fc23b07
IPI00898408 Tax_Id=7955 Gene_Symbol=LOC557328 similar to XTimeles
IPI00898135 Tax_Id=7955 Gene_Symbol=LOC100150755 similar to conse
IPI00799105 Tax_Id=7955 Gene_Symbol=LOC100007078 hypothetical pro
IPI00506320 Tax_Id=7955 Gene_Symbol=sorbs2a sorbin and SH3 domain
IPI00866284 Tax_Id=7955 Gene_Symbol=hel_dr2 Replicase/helicase/en
IPI00834162 Tax_Id=7955 Gene_Symbol=CH211-1L10.1 novel protein si
IPI00505426 Tax_Id=7955 Gene_Symbol=quo Quo protein
IPI00898560 Tax_Id=7955 Gene_Symbol=DKEYP-86F8.4 similar to adlic
IPI00931270 Tax_Id=7955 Gene_Symbol=bxdc5 Ribosome production fac
IPI00512015 Tax_Id=7955 Gene_Symbol=LOC567357 similar to polydom
IPI00934162 Tax_Id=7955 Gene_Symbol=- 27 kDa protein
IPI00497779 Tax_Id=7955 Gene_Symbol=zgc:77174 Tudor domain-contai
IPI00512604 Tax_Id=7955 Gene_Symbol=tepl telomerase-associated pr
IPI00501717 Tax_Id=7955 Gene_Symbol=dscam Down syndrome cell adhe
IPI00863921 Tax_Id=7955 Gene_Symbol=myom3 myomesin family, member
IPI00877471 Tax_Id=7955 Gene_Symbol=brca2 Breast and ovarian canc
IPI00492212 Tax_Id=7955 Gene_Symbol=DKEY-245P14.6 Novel protein
IPI00899413 Tax_Id=7955 Gene_Symbol=LOC100149369 similar to predi
IPI00774862 Tax_Id=7955 Gene_Symbol=- 59 kDa protein
IPI00631393 Tax_Id=7955 Gene_Symbol=LOC796212 similar to helentro
IPI00508249 Tax_Id=7955 Gene_Symbol=LOC560270 Novel protein simil
IPI00570166 Tax_Id=7955 Gene_Symbol=DKEYP-98C11.2 DNA polymerase
IPI00628720 Tax_Id=7955 Gene_Symbol=LOC558599 similar to calmin,
```

Probability Based Mowse Score

Ions score is $-10 \cdot \log(P)$, where P is the probability that the observed match is a random event. Individual ions scores > 34 indicate identity or extensive homology ($p < 0.05$). Protein scores are derived from ions scores as a non-probabilistic basis for ranking protein hits.

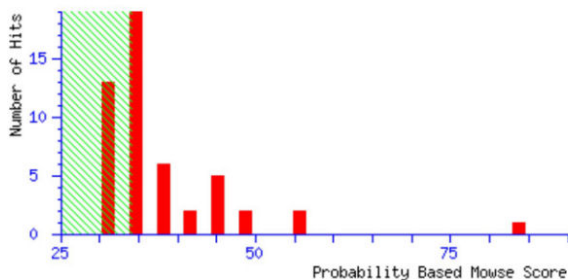


Figura 16. Resultados de MASCOT para proteínas identificadas en la muestra control.

10 ng/L

MASCOT Search Results

User :
Email :
Search title :
Database : IPI_zebrafish_zebrafish_362 (38433 sequences; 19099775 residues)
Timestamp : 24 Sep 2009 at 19:11:05 GMT
Significant hits: [IPI00615483](#) Tax_Id=7955 Gene_Symbol=ttna Titin a
[IPI00608557](#) Tax_Id=7955 Gene_Symbol=LOC567576 similar to spectrin
[IPI00634366](#) Tax_Id=7955 Gene_Symbol=LOC562960 similar to mCG10465
[IPI00508552](#) Tax_Id=7955 Gene_Symbol=zgc:63672 Zgc:63672
[IPI00897120](#) Tax_Id=7955 Gene_Symbol=rnf213 ring finger protein 21
[IPI00832484](#) Tax_Id=7955 Gene_Symbol=zgc:158787 Novel protein simi
[IPI00772654](#) Tax_Id=7955 Gene_Symbol=fbn2b Fibrillin 2
[IPI00650278](#) Tax_Id=7955 Gene_Symbol=mdm1 Isoform 1 of Nuclear pro
[IPI00897654](#) Tax_Id=7955 Gene_Symbol=LOC556060 similar to FtsJ hom
[IPI00808762](#) Tax_Id=7955 Gene_Symbol=LOC566592 hypothetical protei
[IPI00494861](#) Tax_Id=7955 Gene_Symbol=hel_dr5 Replicase/helicase/en
[IPI00498280](#) Tax_Id=7955 Gene_Symbol=LOC569779 Novel protein simil

Probability Based Mowse Score

Ions score is $-10 \cdot \log(P)$, where P is the probability that the observed match is a random event. Individual ions scores > 36 indicate identity or extensive homology ($p < 0.05$). Protein scores are derived from ions scores as a non-probabilistic basis for ranking protein hits.

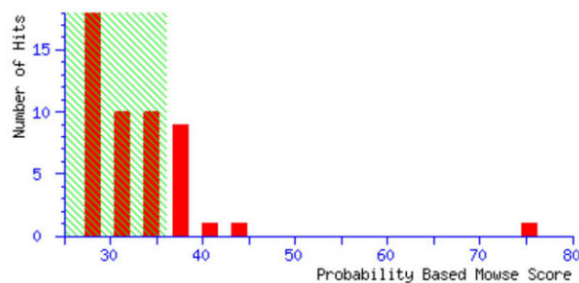


Figura 17. Resultados de MASCOT para proteínas identificadas en la muestra de embriones expuestos a 10 ng/L de EE₂.

100 ng/L

{MATRIX} Mascot Search Results *{SCIENCE}*

```
User :
Email :
Search title :
Database : IPI_zebrafish_zebrafish_362 (38433 sequences; 19099775 residues)
Timestamp : 24 Sep 2009 at 19:37:20 GMT
Significant hits: IPI00504207 Tax_Id=7955 Gene_Symbol=actc1b Actin, alpha 1, skelet
IPI00628880 Tax_Id=7955 Gene_Symbol=acta1b Actin, alpha 1b, skele
IPI00834037 Tax_Id=7955 Gene_Symbol=krt4 Type II basic cytoke
IPI00482295 Tax_Id=7955 Gene_Symbol=bactin1 Actin, cytoplasmic 1
IPI00484294 Tax_Id=7955 Gene_Symbol=krt5 Krt5 protein
IPI00499941 Tax_Id=7955 Gene_Symbol=zgc:77231 Zgc:77231
IPI00932853 Tax_Id=7955 Gene_Symbol=ttna Novel protein similar to
IPI00615483 Tax_Id=7955 Gene_Symbol=ttna Titin a
IPI00488248 Tax_Id=7955 Gene_Symbol=mylz3 Myosin, light polypepti
IPI00898135 Tax_Id=7955 Gene_Symbol=LOC100150755 similar to conse
IPI00771092 Tax_Id=7955 Gene_Symbol=evpl envoplakin, partial
IPI00485656 Tax_Id=7955 Gene_Symbol=ndpkz2 Nucleoside diphosphate
IPI00890560 Tax_Id=7955 Gene_Symbol=ttnb im:6911926
IPI00774113 Tax_Id=7955 Gene_Symbol=LOC100149997 similar to histo
IPI00613983 Tax_Id=7955 Gene_Symbol=LOC564284 similar to predicte
IPI00897241 Tax_Id=7955 Gene_Symbol=LOC100151574 similar to conse
IPI00900941 Tax_Id=7955 Gene_Symbol=LOC797837 similar to retrotra
IPI00490635 Tax_Id=7955 Gene_Symbol=hectd1 Novel protein with HEC
IPI00501538 Tax_Id=7955 Gene_Symbol=zgc:91930 Zgc:91930
IPI00898813 Tax_Id=7955 Gene_Symbol=LOC100148878 similar to RNase
IPI00499344 Tax_Id=7955 Gene_Symbol=LOC564967 similar to zinc-fin
```

Probability Based Mowse Score

Ions score is $-10 \cdot \log(P)$, where P is the probability that the observed match is a random event. Individual ions scores > 36 indicate identity or extensive homology ($p < 0.05$). Protein scores are derived from ions scores as a non-probabilistic basis for ranking protein hits.

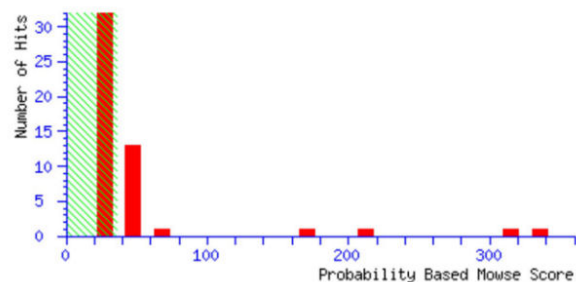


Figura 18. Resultados de MASCOT para proteínas identificadas en la muestra de embriones expuestos a 100 ng/L de EE₂.

500 ng/L

MATRIX *SCIENCE* Mascot Search Results

```
User :
Email :
Search title :
Database : IPI_zebrafish_zebrafish_362 (38433 sequences; 19099775 residues)
Timestamp : 24 Sep 2009 at 20:35:15 GMT
Significant hits: IPI00504207 Tax_Id=7955 Gene_Symbol=actc1b Actin, alpha 1, skelet
IPI00628880 Tax_Id=7955 Gene_Symbol=acta1b Actin, alpha 1b, skele
IPI00932853 Tax_Id=7955 Gene_Symbol=ttna Novel protein similar to
IPI00615483 Tax_Id=7955 Gene_Symbol=ttna Titin a
IPI00481175 Tax_Id=7955 Gene_Symbol=LOC569585 similar to AGAP0044
IPI00631543 Tax_Id=7955 Gene_Symbol=dync1h1 Dynein cytoplasmic 1
IPI00898818 Tax_Id=7955 Gene_Symbol=LOC794638 similar to ankyrin
IPI00896968 Tax_Id=7955 Gene_Symbol=LOC797628 similar to Ras GTPa
IPI00492212 Tax_Id=7955 Gene_Symbol=DKEY-245P14.6 Novel protein
IPI00503572 Tax_Id=7955 Gene_Symbol=myhz1.1 Novel myosin family p
IPI00898813 Tax_Id=7955 Gene_Symbol=LOC100148878 similar to RNase
IPI00882755 Tax_Id=7955 Gene_Symbol=si:ch211-181p13.1 Novel prote
IPI00858466 Tax_Id=7955 Gene_Symbol=myhz1.3 Novel myosin family p
IPI00932963 Tax_Id=7955 Gene_Symbol=LOC569585 227 kDa protein
IPI00496539 Tax_Id=7955 Gene_Symbol=apob apolipoprotein B
IPI00618715 Tax_Id=7955 Gene_Symbol=si:ch211-203h15.1 Novel prote
IPI00481899 Tax_Id=7955 Gene_Symbol=si:dkey-32e6.1 hypothetical p
IPI00770271 Tax_Id=7955 Gene_Symbol=LOC796959 similar to ankyrin
IPI00901726 Tax_Id=7955 Gene_Symbol=LOC100007304 similar to Dual
IPI00834162 Tax_Id=7955 Gene_Symbol=CH211-1L10.1 novel protein si
IPI00505410 Tax_Id=7955 Gene_Symbol=CH211-181P13.1 similar to Low
IPI00507427 Tax_Id=7955 Gene_Symbol=LOC559439 similar to HECT, UB
IPI00897473 Tax_Id=7955 Gene_Symbol=ryr2b ryanodine receptor 2b
IPI00509879 Tax_Id=7955 Gene_Symbol=LOC561043 similar to mannosid
IPI00915623 Tax_Id=7955 Gene_Symbol=spata17 Spermatogenesis-assoc
IPI00770450 Tax_Id=7955 Gene_Symbol=LOC560278 protein phosphatase
IPI00882629 Tax_Id=7955 Gene_Symbol=fancm Fanconi anemia M
IPI00503725 Tax_Id=7955 Gene_Symbol=LOC100148193 similar to Dynei
IPI00932446 Tax_Id=7955 Gene_Symbol=- 37 kDa protein
IPI00898135 Tax_Id=7955 Gene_Symbol=LOC100150755 similar to conse
IPI00491593 Tax_Id=7955 Gene_Symbol=eif3d Eukaryotic translation
IPI00502606 Tax_Id=7955 Gene_Symbol=slit3 Slit (Drosophila) homol
IPI00934017 Tax_Id=7955 Gene_Symbol=si:ch211-254d18.3 im:6912504
IPI00501333 Tax_Id=7955 Gene_Symbol=si:dkey-151c10.1 Novel protei
IPI00897601 Tax_Id=7955 Gene_Symbol=LOC100147861 similar to pol p
IPI00890470 Tax_Id=7955 Gene_Symbol=DKEY-53D10.1 hypothetical pro
IPI00481119 Tax_Id=7955 Gene_Symbol=setx senataxin
```

Probability Based Mowse Score

Ions score is $-10 \cdot \log(P)$, where P is the probability that the observed match is a random event. Individual ions scores > 37 indicate identity or extensive homology ($p < 0.05$).

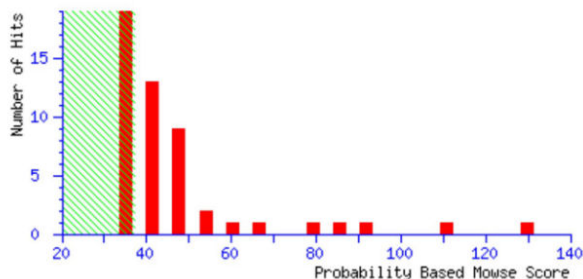


Figura 19. Resultados de MASCOT para proteínas identificadas en la muestra de embriones expuestos a 500 ng/L de EE₂.

1000 ng/L

MASCOT Mascot Search Results

User :
Email :
Search title :
Database : IPI_zebrafish zebrafish_362 (38433 sequences; 19099775 residues)
Timestamp : 24 Sep 2009 at 20:04:12 GMT
Significant hits:

IPI00868441	Tax_Id=7955	Gene_Symbol=si:dkey-67c22.2	Novel protein
IPI00510376	Tax_Id=7955	Gene_Symbol=si:ch211-20711.1	hypothetical protein LOC559431
IPI00499330	Tax_Id=7955	Gene_Symbol=zgc:56258	Novel protein
IPI00898895	Tax_Id=7955	Gene_Symbol=LOC794424	similar to pol polyprotein
IPI00934179	Tax_Id=7955	Gene_Symbol=LOC570113	385 kDa protein
IPI00513498	Tax_Id=7955	Gene_Symbol=vps13d	vacuolar protein sorting 13D
IPI00803327	Tax_Id=7955	Gene_Symbol=LOC563904	similar to voltage-dependent calcium channel alpha
IPI00609122	Tax_Id=7955	Gene_Symbol=si:ch211-250g4.3	im:7151086
IPI00627965	Tax_Id=7955	Gene_Symbol=-	1953 kDa protein
IPI00631543	Tax_Id=7955	Gene_Symbol=dync1h1	Dynein cytoplasmic 1 heavy chain 1
IPI00900960	Tax_Id=7955	Gene_Symbol=LOC100000122	similar to Zinc finger protein 294
IPI00627925	Tax_Id=7955	Gene_Symbol=lrkk2	leucine-rich repeat kinase 2
IPI00932853	Tax_Id=7955	Gene_Symbol=ttna	Novel protein similar to human titin
IPI00631393	Tax_Id=7955	Gene_Symbol=LOC796212	similar to helentron 2 helitron-like transposon r
IPI00618680	Tax_Id=7955	Gene_Symbol=atrx	Atrxl protein
IPI00897822	Tax_Id=7955	Gene_Symbol=LOC793680	similar to LReO_3
IPI00498290	Tax_Id=7955	Gene_Symbol=cacna1c	Calcium channel, voltage-dependent, L type, alpha 1
IPI00507319	Tax_Id=7955	Gene_Symbol=nbr1	108 kDa protein
IPI00862430	Tax_Id=7955	Gene_Symbol=aspm	Novel protein similar to vertebrate asp (Abnormal spin
IPI00496182	Tax_Id=7955	Gene_Symbol=ect2	Epithelial cell transforming sequence 2 oncogene
IPI00923192	Tax_Id=7955	Gene_Symbol=-	Protein
IPI00899158	Tax_Id=7955	Gene_Symbol=myo3b	myosin IIIB, partial
IPI00775314	Tax_Id=7955	Gene_Symbol=LOC798456	similar to tripartite motif protein 29
IPI00513403	Tax_Id=7955	Gene_Symbol=hel_dr1	Replicase/helicase/endonuclease
IPI00864873	Tax_Id=7955	Gene_Symbol=LOC100002368	similar to helentron 2 helitron-like transposo
IPI00899294	Tax_Id=7955	Gene_Symbol=LOC100150883	similar to pol polyprotein
IPI00898135	Tax_Id=7955	Gene_Symbol=LOC100150755	similar to conserved hypothetical protein
IPI00611999	Tax_Id=7955	Gene_Symbol=LOC562945	similar to rCG33069
IPI00489586	Tax_Id=7955	Gene_Symbol=st5	Fc11b09
IPI00491746	Tax_Id=7955	Gene_Symbol=LOC445411	Putative uncharacterized protein
IPI00898645	Tax_Id=7955	Gene_Symbol=efha2	EF-hand domain family, member A2
IPI00933009	Tax_Id=7955	Gene_Symbol=-	135 kDa protein

Probability Based Mowse Score

Ions score is $-10 \cdot \log(P)$, where P is the probability that the observed match is a random event. Individual ions scores > 35 indicate identity or extensive homology ($p < 0.05$). Protein scores are derived from ions scores as a non-probabilistic basis for ranking protein hits.

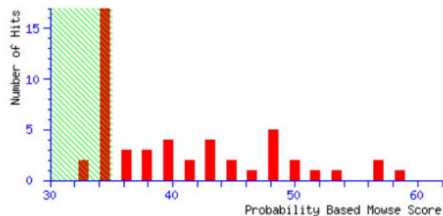


Figura 20. Resultados de MASCOT para proteínas identificadas en la muestra de embriones expuestos a 1000 ng/L de EE₂.

5,000 ng/L

(MATRIX) Mascot Search Results *(SCIENCE)*

```
User :
Email :
Search title :
Database : IPI_zebrafish_zebrafish_362 (38433 sequences; 19099775 residues)
Timestamp : 24 Sep 2009 at 21:24:17 GMT
Significant hits: IPI00615483 Tax_Id=7955 Gene_Symbol=ttna Titin a
IPI00890560 Tax_Id=7955 Gene_Symbol=ttnb im:6911926
IPI00498607 Tax_Id=7955 Gene_Symbol=vtilb Vesicle transport through interaction with t-SNAREs h
IPI00901129 Tax_Id=7955 Gene_Symbol=LOC799441 similar to F-box and leucine-rich repeat protein
IPI00863325 Tax_Id=7955 Gene_Symbol=suds3 Suppressor of defective silencing 3 homolog
IPI00882718 Tax_Id=7955 Gene_Symbol=syne1a similar to nesprin 1 isoform longer
IPI00484536 Tax_Id=7955 Gene_Symbol=si:ch211-157f15.1 envoplakin
IPI00898532 Tax_Id=7955 Gene_Symbol=LOC556023 similar to dynein, axonemal, heavy chain 2
IPI00639467 Tax_Id=7955 Gene_Symbol=LOC555621 similar to lysosomal trafficking regulator, parti
IPI00804919 Tax_Id=7955 Gene_Symbol=ankrd13a Novel protein similar to human ankyrin repeat doma
IPI00510203 Tax_Id=7955 Gene_Symbol=glcc11 Glucocorticoid induced transcript 1
IPI00484113 Tax_Id=7955 Gene_Symbol=ttna Novel protein similar to H.sapiens TTN, titin
IPI00498290 Tax_Id=7955 Gene_Symbol=cacna1c Calcium channel, voltage-dependent, L type, alpha 1
IPI00608557 Tax_Id=7955 Gene_Symbol=LOC567576 similar to spectrin repeat containing, nuclear en
IPI00804098 Tax_Id=7955 Gene_Symbol=LOC566740 similar to viral A-type inclusion protein, putati
IPI00486851 Tax_Id=7955 Gene_Symbol=zgc:77377 Junction-mediating and -regulatory protein
IPI00508242 Tax_Id=7955 Gene_Symbol=LOC566869 similar to cytoplasmic nuclear factor of activate
IPI00631543 Tax_Id=7955 Gene_Symbol=dync1h1 Dynein cytoplasmic 1 heavy chain 1
IPI00614320 Tax_Id=7955 Gene_Symbol=LOC560573 similar to Putative S-adenosyl-L-methionine-depen
IPI00897175 Tax_Id=7955 Gene_Symbol=nipb1 wu:fcl2g03
IPI00627162 Tax_Id=7955 Gene_Symbol=LOC795064 similar to Cryopyrin deletion 4
IPI00931123 Tax_Id=7955 Gene_Symbol=- 99 kDa protein
IPI00899856 Tax_Id=7955 Gene_Symbol=LOC100148064 similar to rCG46808
IPI00900048 Tax_Id=7955 Gene_Symbol=CH211-247B3.3 similar to novel immunoglobulin I-set domain
IPI00483190 Tax_Id=7955 Gene_Symbol=LOC557000 similar to Synaptonemal complex protein 2
```

Probability Based Mowse Score

Ions score is $-10 \cdot \log(P)$, where P is the probability that the observed match is a random event. Individual ions scores > 35 indicate identity or extensive homology ($p < 0.05$). Protein scores are derived from ions scores as a non-probabilistic basis for ranking protein hits.

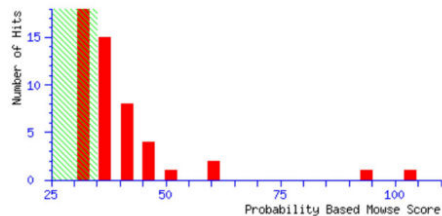


Figura 21. Resultados de MASCOT para proteínas identificadas en la muestra de embriones expuestos a 5000 ng/L de EE₂.

10,000ng/L

(MATRIX) Mascot Search Results

User	:	
Email	:	
Search title	:	
Database	:	IPI_rebrafish zebrafish_362 (38433 sequences; 19099775 residues)
Timestamp	:	24 Sep 2009 at 21:43:09 GMT
Significant hits:		
IPI00628880	Tax_Id=7955	Gene_Symbol=actalb Actin, alpha 1b, skeletal muscle
IPI00504207	Tax_Id=7955	Gene_Symbol=actclb Actin, alpha 1, skeletal muscle
IPI00932853	Tax_Id=7955	Gene_Symbol=ttna Novel protein similar to human titin
IPI00503326	Tax_Id=7955	Gene_Symbol=myo7a Myosin VIIa
IPI00511503	Tax_Id=7955	Gene_Symbol=ryr1a ryanodine receptor 1a
IPI00862430	Tax_Id=7955	Gene_Symbol=aspm Novel protein similar to vertebrate asp (Abnormal spin
IPI00615483	Tax_Id=7955	Gene_Symbol=ttna Titin a
IPI00897822	Tax_Id=7955	Gene_Symbol=LOC793680 similar to LReO_3
IPI00618250	Tax_Id=7955	Gene_Symbol=LOC559324 similar to mCG1046517, partial
IPI00909960	Tax_Id=7955	Gene_Symbol=LOC100000122 similar to Zinc finger protein 294
IPI00898783	Tax_Id=7955	Gene_Symbol=LOC559683 similar to chromosome 2 open reading frame 21, pa
IPI00901871	Tax_Id=7955	Gene_Symbol=DKEYP-77C8.2 similar to Nesprin-2
IPI00890560	Tax_Id=7955	Gene_Symbol=ttnb im:6911926
IPI00882718	Tax_Id=7955	Gene_Symbol=syn1a similar to nesprin 1 isoform longer
IPI00774587	Tax_Id=7955	Gene_Symbol=myhc4 186 kDa protein
IPI00799951	Tax_Id=7955	Gene_Symbol=LOC557062 similar to formin-like 1
IPI00503572	Tax_Id=7955	Gene_Symbol=myhz1.1 Novel myosin family protein
IPI00554335	Tax_Id=7955	Gene_Symbol=zgc:63491 Zgc:63491
IPI00487244	Tax_Id=7955	Gene_Symbol=DKEY-162B3.2 Novel protein
IPI00490614	Tax_Id=7955	Gene_Symbol=sgdh23 cadherin 23
IPI00588554	Tax_Id=7955	Gene_Symbol=vtg6 Vtg6 protein
IPI00905723	Tax_Id=7955	Gene_Symbol=smc3s3 similar to deleted in lung and esophageal cancer
IPI00504040	Tax_Id=7955	Gene_Symbol=smc4 Structural maintenance of chromosomes family member SM
IPI00806766	Tax_Id=7955	Gene_Symbol=cecp290 Centrosomal protein of 290 kDa
IPI00509126	Tax_Id=7955	Gene_Symbol=vps13d 492 kDa protein
IPI00627925	Tax_Id=7955	Gene_Symbol=lrk2 leucine-rich repeat kinase 2
IPI00654500	Tax_Id=7955	Gene_Symbol=cwf1912 Cwf1912 protein
IPI00897827	Tax_Id=7955	Gene_Symbol=LOC100150267 similar to additional sex combs like 2
IPI00773475	Tax_Id=7955	Gene_Symbol=LOC797308 similar to novel pim oncogene family protein
IPI00608392	Tax_Id=7955	Gene_Symbol=LOC565591 similar to FAT tumor suppressor homolog 1
IPI00899212	Tax_Id=7955	Gene_Symbol=LOC561816 similar to pol polyprotein
IPI00503996	Tax_Id=7955	Gene_Symbol=DKEY-31K3.2 similar to human immunodeficiency virus type I
IPI00854296	Tax_Id=7955	Gene_Symbol=DKEY-183G1.6.2 similar to novel pim oncogene family protein
IPI00901426	Tax_Id=7955	Gene_Symbol=LOC100006890 similar to thioredoxin domain containing 11
IPI00510376	Tax_Id=7955	Gene_Symbol=si:ch211-207i1.1 hypothetical protein LOC559431
IPI00511449	Tax_Id=7955	Gene_Symbol=zgc:112364 Zgc:112364
IPI00631853	Tax_Id=7955	Gene_Symbol=LOC556141 similar to myosin VIIA
IPI00502767	Tax_Id=7955	Gene_Symbol=rrp12 Ribosomal RNA processing 12 homolog
IPI00487003	Tax_Id=7955	Gene_Symbol=LOC555303 hypothetical LOC555303
IPI00897416	Tax_Id=7955	Gene_Symbol=LOC100005188 similar to bent CG32019-PD
IPI00933921	Tax_Id=7955	Gene_Symbol=- 137 kDa protein
IPI00497296	Tax_Id=7955	Gene_Symbol=LOC570526 similar to Synaptopodin-2
IPI00507719	Tax_Id=7955	Gene_Symbol=DKEYP-117H8.1 Centrosomal protein of 135 kDa
IPI00803079	Tax_Id=7955	Gene_Symbol=LOC797363 similar to Kinesin-like protein KIF19
IPI00898311	Tax_Id=7955	Gene_Symbol=LOC100148168 similar to DNA mismatch repair protein
IPI00863043	Tax_Id=7955	Gene_Symbol=lyst lysosomal trafficking regulator
IPI00501181	Tax_Id=7955	Gene_Symbol=LOC565592 similar to Androgen-induced proliferation inhibit
IPI00609748	Tax_Id=7955	Gene_Symbol=- 130 kDa protein
IPI00486574	Tax_Id=7955	Gene_Symbol=hdlbp High density lipoprotein-binding protein
IPI00619694	Tax_Id=7955	Gene_Symbol=ahctf1 AT hook containing transcription factor 1
IPI00860077	Tax_Id=7955	Gene_Symbol=prpf4b PRP4 pre-mRNA processing factor 4 homolog B
IPI00491594	Tax_Id=7955	Gene_Symbol=slit2 Slit2
IPI00481175	Tax_Id=7955	Gene_Symbol=LOC569585 similar to AGAP004440-PA
IPI00491944	Tax_Id=7955	Gene_Symbol=LOC565697 similar to polycystic kidney disease protein 1
IPI00505914	Tax_Id=7955	Gene_Symbol=wdr67 WD repeat domain 67
IPI00501333	Tax_Id=7955	Gene_Symbol=si:dkey-15i10.1 Novel protein similar to vertebrate plecti
IPI00499747	Tax_Id=7955	Gene_Symbol=- Novel protein similar to vertebrate dedicator of cytokine
IPI00897251	Tax_Id=7955	Gene_Symbol=LOC563001 similar to chromosome 17 open reading frame 27
IPI00631543	Tax_Id=7955	Gene_Symbol=dync1h1 Dynein cytoplasmic 1 heavy chain 1
IPI00486512	Tax_Id=7955	Gene_Symbol=igsf9 immunoglobulin superfamily, member 9-like
IPI00613922	Tax_Id=7955	Gene_Symbol=LOC569720 similar to MGC80493 protein
IPI00481864	Tax_Id=7955	Gene_Symbol=ddx54 ATP-dependent RNA helicase
IPI00897421	Tax_Id=7955	Gene_Symbol=wu:fc23b07 wu:fc23b07
IPI00499128	Tax_Id=7955	Gene_Symbol=CH211-278A6.1 similar to p130Cas-associated protein
IPI00897776	Tax_Id=7955	Gene_Symbol=wu:fa96e12 wu:fa96e12
IPI00934306	Tax_Id=7955	Gene_Symbol=lm:7159270 76 kDa protein
IPI00493416	Tax_Id=7955	Gene_Symbol=LOC571267 polymerase (DNA directed) nu
IPI00902134	Tax_Id=7955	Gene_Symbol=LOC560788 similar to Protein WNC1
IPI00854236	Tax_Id=7955	Gene_Symbol=LOC793836 similar to human immunodeficiency virus type I en
IPI00497951	Tax_Id=7955	Gene_Symbol=si:dkey-31d8.1 si:dkey-31d8.1
IPI00806678	Tax_Id=7955	Gene_Symbol=LOC100007695 similar to Ribonuclease inhibitor
IPI00483196	Tax_Id=7955	Gene_Symbol=LOC558958 similar to laminin, gamma 3
IPI00484779	Tax_Id=7955	Gene_Symbol=zgc:162128 Zgc:162128 protein
IPI00919751	Tax_Id=7955	Gene_Symbol=suv420h2 229 kDa protein
IPI00901058	Tax_Id=7955	Gene_Symbol=LOC570366 similar to syntxin 19
IPI00859309	Tax_Id=7955	Gene_Symbol=CH73-339D2.1 similar to piccolo
IPI00485267	Tax_Id=7955	Gene_Symbol=srrml Serine/arginine repetitive matrix 1

Probability Based Mowse Score

Ions score is $-10 \cdot \log(P)$, where P is the probability that the observed match is a random event. Individual ions scores > 36 indicate identity or extensive homology ($p < 0.05$). Protein scores are derived from ions scores as a non-probabilistic basis for ranking protein hits.

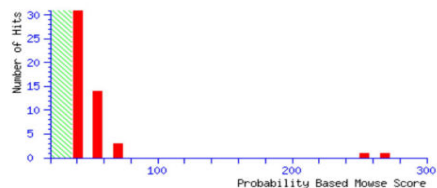


Figura 22. Resultados de MASCOT para proteínas identificadas en la muestra de embriones expuestos a 10,000 ng/L de EE₂.

También se utilizó el algoritmo de Scaffold para comparar y validar los resultados obtenidos en los diferentes tratamientos con una confianza al 95%. En la Figura 23 se observa que en la parte superior la actina es identificada con gran confiabilidad en tratamientos mayores-igual a 100 ng/L pero con excepción del tratamiento a 5000 ng/L/. De igual forma, un análisis cuantitativo basándose en los datos de los experimentos de EM/EM que se utilizaron para la identificación de proteínas (parte inferior en la Figura 23) muestra un incremento evidente en las mismas muestras donde se identificó positivamente la actina. Tanto en este análisis como el llevado a cabo por el algoritmo de MASCOT, se observa que la muestra tratada a 5000 ng/L presenta unos resultados pobres en cuanto al número de proteínas identificadas si se compara con las muestras correspondientes a tratamientos de 1000 y 10000 ng/L/. Dado que los experimentos de EM/EM se llevaron de forma secuencial pero no todos al mismo tiempo para todas las muestras, es posible que hubiese existido algún problema con esta muestra en particular. Sin embargo este análisis refuerza lo observado en DIGE de una sobreexpresión de actina adicionalmente a la observada de vitelogenina mediante el western blot.

Adicionalmente cada uno de los grupos de datos de las proteínas identificadas se compararon entre sí a fin de determinar cuales de ellas se compartían y analizar si existía alguna relevancia biológica o si se observaba alguna relación en cuanto a incrementos o decrementos en la expresión de proteínas de acuerdo a las concentraciones en los diferentes tratamientos. Las siguientes figuras muestran los diagramas de Venn expandido para la comparación del número de proteínas compartido entre el grupo control con los demás grupos de tratamiento, los números en *itálicas* indican la concentración del tratamiento comparado (en ng/L).

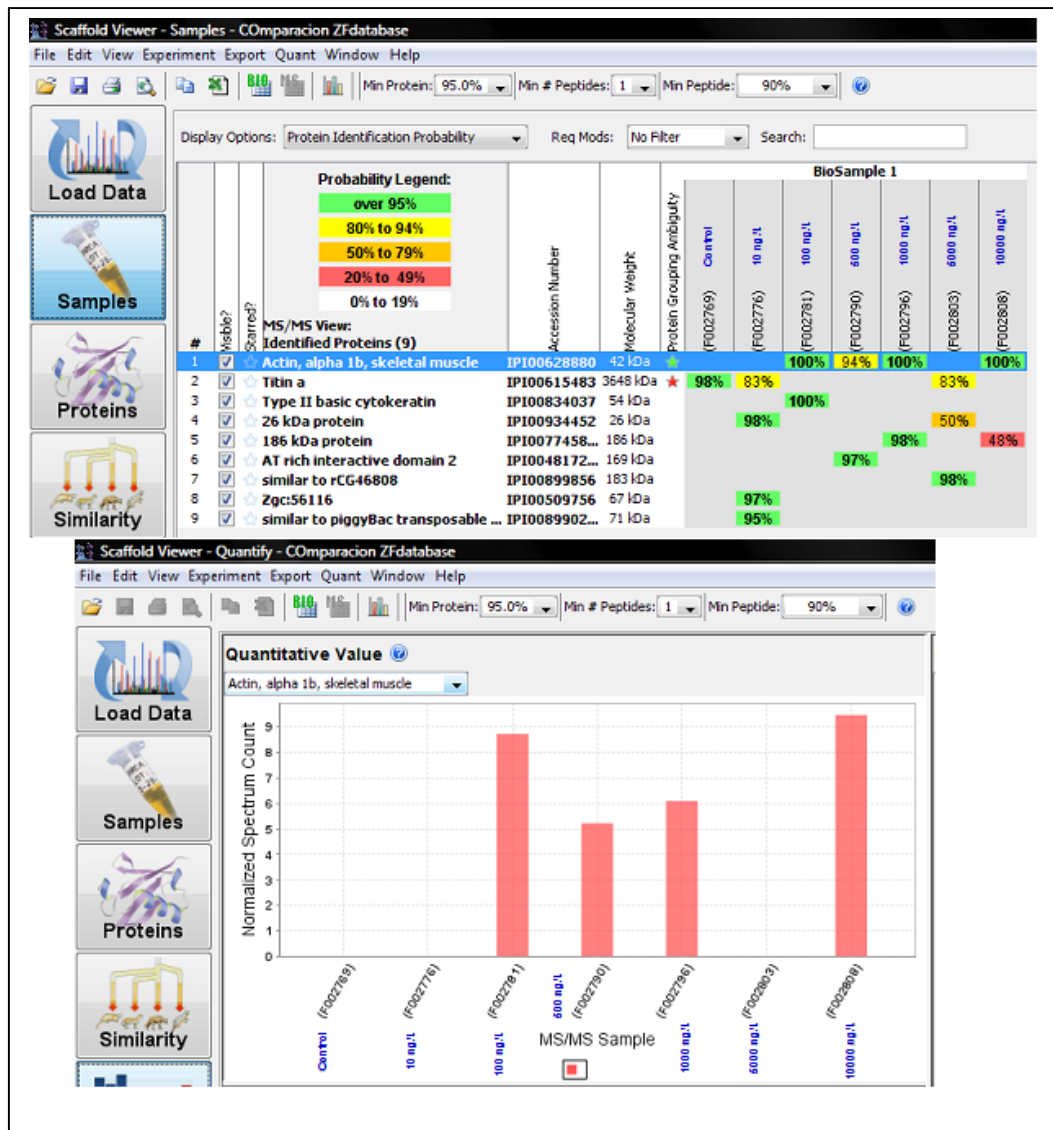


Figura 23. Resultados de Scaffold comparando la muestra control con los diferentes tratamientos.

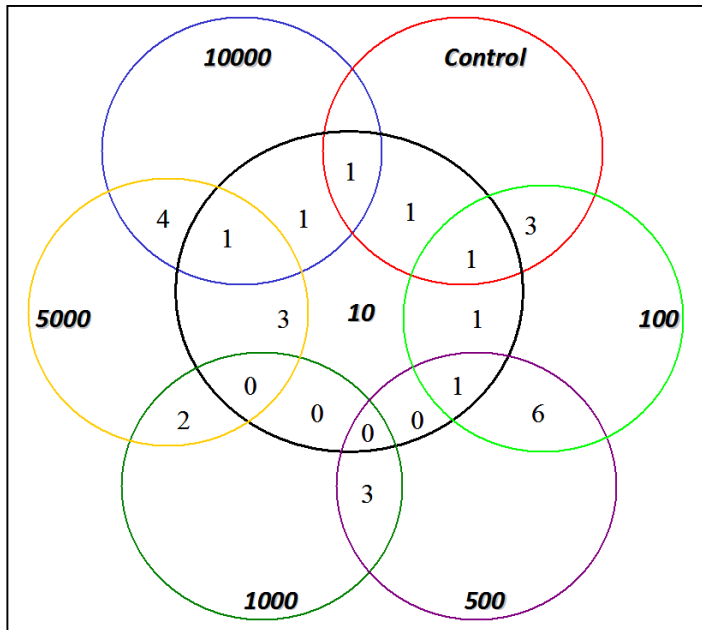


Figura 24. Diagrama de Venn de proteínas encontradas en los diversos tratamientos tomando como centro la concentración de 10 ng/L de EE₂.

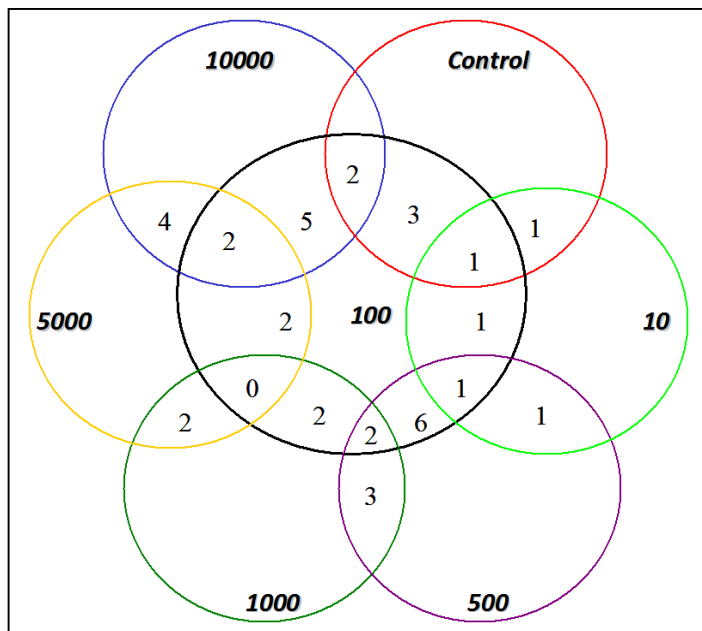


Figura 25. Diagrama de Venn de proteínas encontradas en los diversos tratamientos tomando como centro la concentración de 100 ng/L de EE₂.

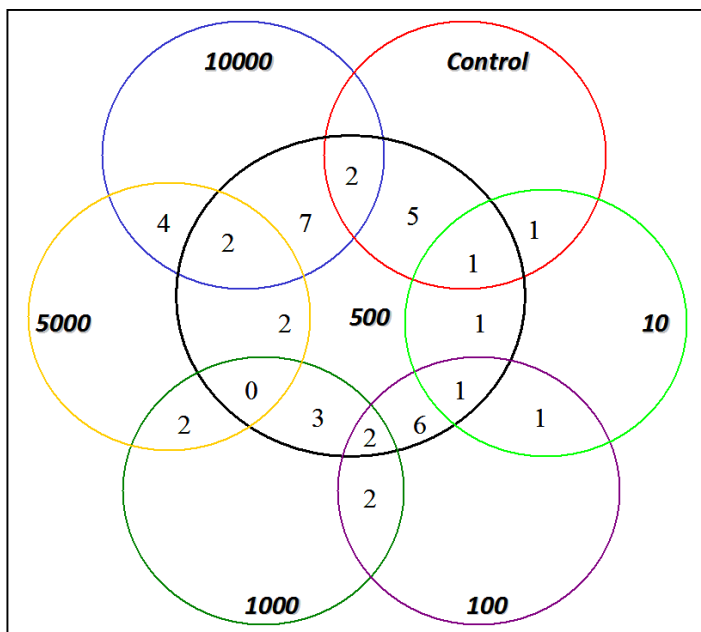


Figura 26. Diagrama de Venn de proteínas encontradas en los diversos tratamientos tomando como centro la concentración de 500 ng/L de EE₂.

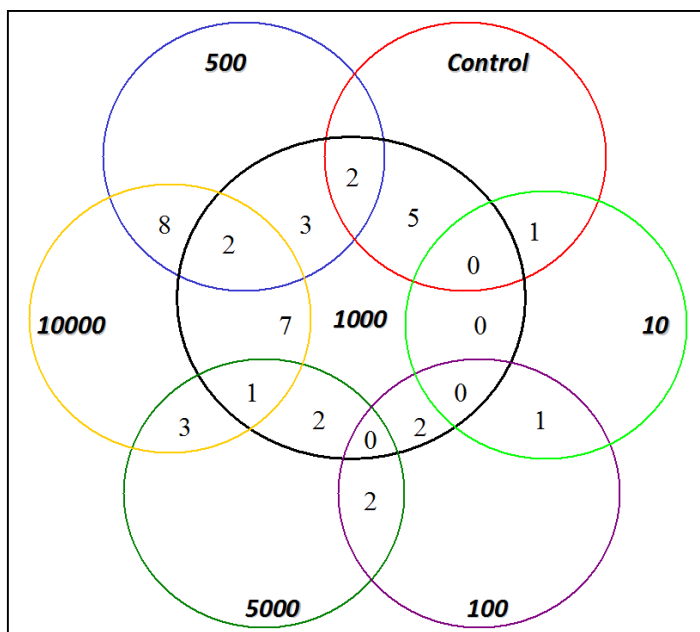


Figura 27. Diagrama de Venn de proteínas encontradas en los diversos tratamientos tomando como centro la concentración de 1000 ng/L de EE₂.

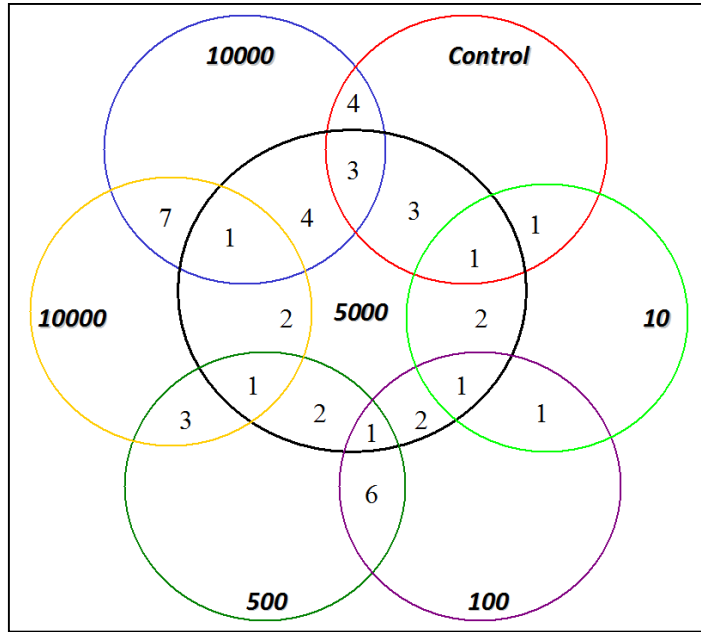


Figura 28. Diagrama de Venn de proteínas encontradas en los diversos tratamientos tomando como centro la concentración de 5000 ng/L de EE₂.

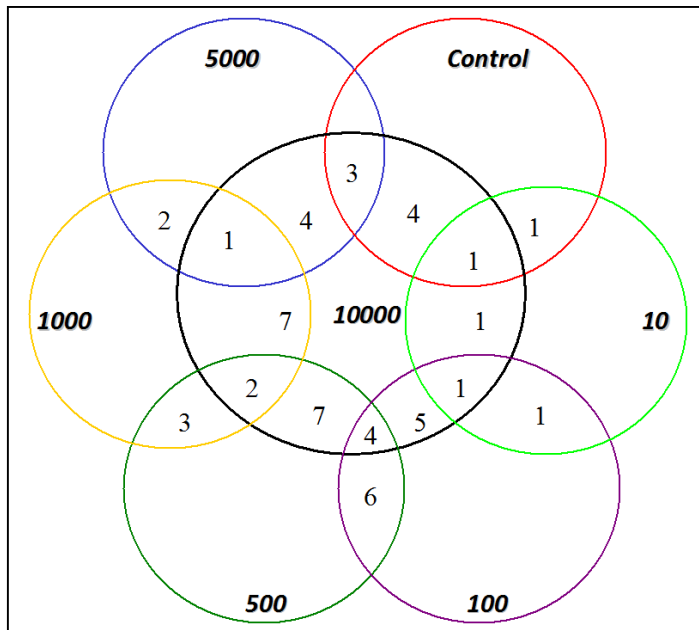


Figura 29. Diagrama de Venn de proteínas encontradas en los diversos tratamientos tomando como centro la concentración de 10,000 ng/L de EE₂.

En resumen podemos decir que los resultados obtenidos en ambos experimentos, DIGE y de Shotgun, confirman la inducción o cambio de expresión de la Actina, sin embargo, en las listas de proteínas que se realizaron para shotgun, no se observan proteínas que se pudieran relacionar entre los grupos de estudio por lo cual, se sugiere realizar repeticiones de los experimentos.

En las proteínas identificadas por MASCOT de la Figura 22, en el grupo de estudio de 10,000 ng/L, se observa la presencia de la vitelogenina (Vtg 6), sin embargo, en el experimento de Western Blot, con una concentración menor de exposición de los embriones de 500 ng/L, se detectó la vitelogenina. Posiblemente porque el método de Western Blot es altamente específico y con límite de detección menor. Por otro lado en el experimento de shotgun, la vitelogenina posiblemente no es identificada a concentraciones menores debido a problemas de supresión iónica durante la identificación de los péptidos ionizados en espectrometría de masas.

A partir de estos resultados es posible pensar que dado que la actina forma parte el citoesqueleto de las células exista entonces una mayor proliferación celular debido al alterador endócrino.

Así mismo se llevó a cabo una comparación entre grupos vía Gene Ontology (GO) u Ontología Génica. En este análisis los genes de las proteínas que se detectaron expresadas en este análisis se agrupan de acuerdo 1) la función molecular, 2) el proceso biológico y 3) la localización en componentes celulares de los productos génicos. A partir de la proteína identificada, es posible conocer la anotación del gene del cual se ha identificado que proviene. Así, fue posible llevar a cabo el análisis del GO.

Se llevó una comparación entre la muestra control y la muestra del tratamiento a una concentración de 10000 ng/L de EE₂, en este análisis se puede observar que en cuanto a la función biológica (ver Figura 30), el proceso celular en ambos grupos de proteínas dio un resultado prácticamente similar, no así en cuanto a la respuesta a estímulos. De la misma forma se llevan a cabo los análisis para el proceso biológico y la localización en componentes celulares. En estos ejemplos mostrados se hicieron a un nivel 2 mediante el uso del software Gene Class Expression que se encuentra en línea y por cortesía del del Laboratorio de Genética Molecular e Bioinformática de la Universidad de Sao Paolo, en Brasil.

Se observa que estadísticamente no se tiene la fortaleza para alcanzar a ver las diferencias entre las muestras control y los embriones expuestos a las diferentes concentraciones del alterador endócrino 17- α -etinilestradiol, ya que el estadístico de prueba Z no es mayor al valor esperado para un 95% de confianza. Se sugiere realizar mayor número de experimentos con varias repeticiones e incluso la exposición a mayores concentraciones.

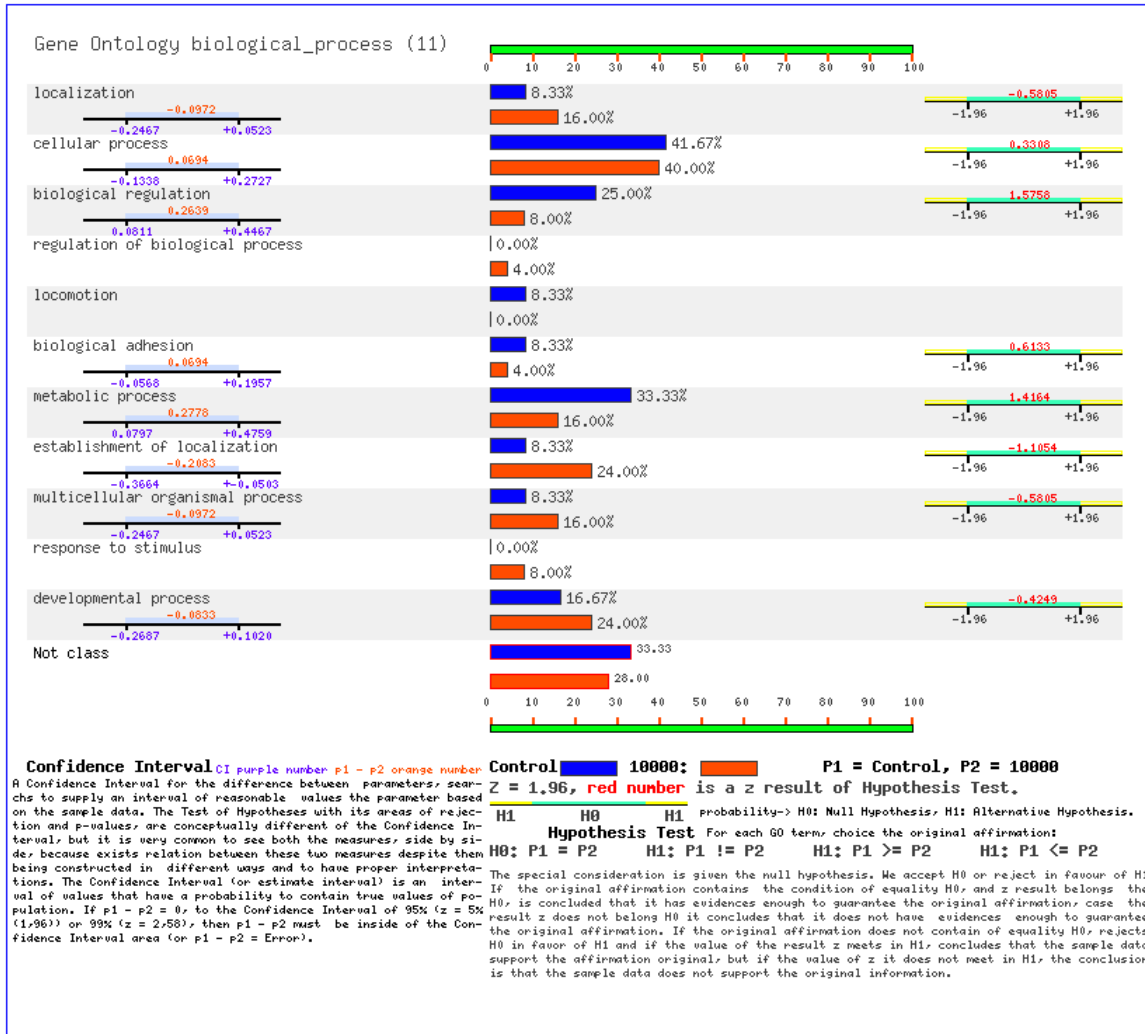


Figura 30. Resultado GO para la Función Biológica para la comparación de la muestra control con la muestra expuesta a 10000 ng/L de EE₂.

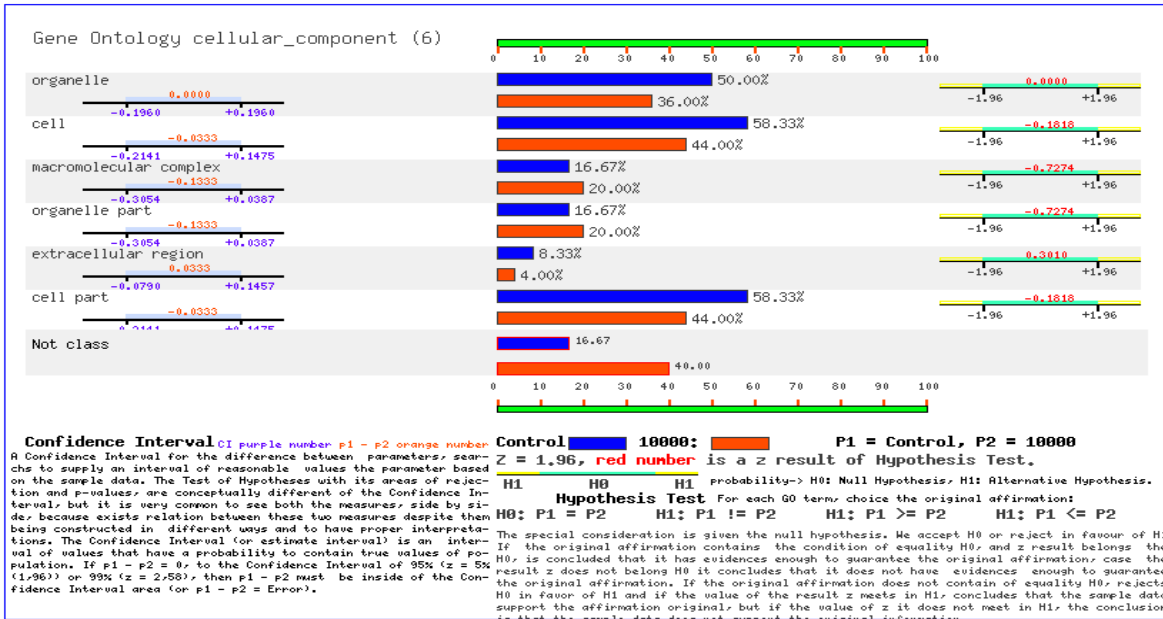


Figura 31. Resultado GO para el Componente Celular para la comparación de la muestra control con la muestra expuesta a 10000 ng/L de EE₂.

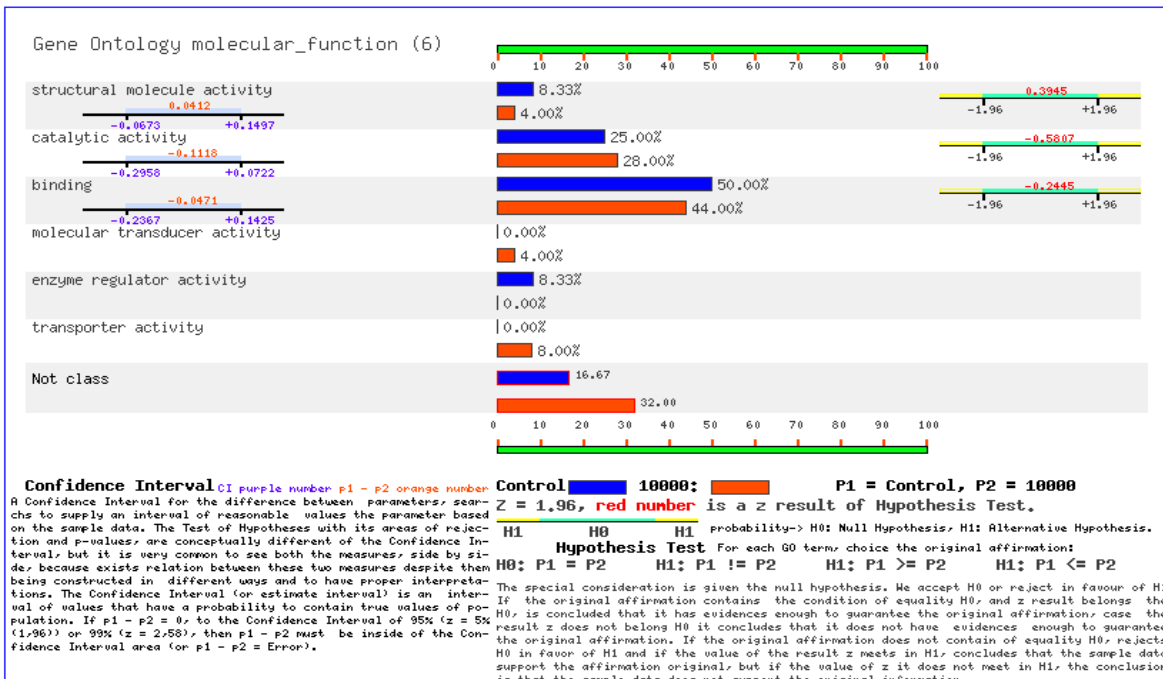


Figura 32. Resultado GO para la Función Molecular para la comparación de la muestra control con la muestra expuesta a 10000 ng/L de EE₂.

V. CONCLUSIONES

Como conclusiones de los resultados obtenidos en el presente proyecto, la exposición a EE₂ en el estado embrionario en el pez cebra, altera los niveles de vitelogenina en el organismo.

El pez cebra demostró ser una poderosa herramienta utilizada como modelo de un sistema vertebrado expuesto a un alterador endócrino. Con él se desarrollaron protocolos para estudios moleculares y proteómicos.

Se obtuvo información importante acerca de la sobreexpresión de algunas proteínas que pueden ser de valor como biomarcadores de presencia de alteradores endócrinos en agua tal como la vitelogenina o la actina. En particular con la vitelogenina se comprobó que se puede detectar en estadios tempranos de desarrollo del pez cebra expuesto a los EDCs.

El hallazgo de estas proteínas candidato a biomarcadores permiten visualizar el uso del pez cebra como monitor biológico para evaluar fuentes de abastecimiento de agua para consumo o para uso en actividades humanas.

Fue posible establecer un panorama de una línea de investigación futura relacionada a la toxico-proteómica con futuras aplicaciones que pueden impactar de forma directa en la salud del ser humano.

VI. PERSPECTIVAS

Si bien los experimentos básicos se llevaron a cabo faltaron repeticiones de los experimentos para la validación de las proteínas candidato como biomarcadores.

Es necesario analizar otros EDCs bajo las mismas condiciones experimentales a fin de conocer si la expresión proteica es similar o se modifica dependiendo del agente estudiado. La combinación de EDCs para estudiar los efectos sinérgicos es aconsejable llevar a cabo.

Con los resultados preliminares obtenidos, se podría comenzar a implementar alguno de estos protocolos y metodologías químico-biológicas en los laboratorios prestadores de servicios e instituciones estatales involucradas en el monitoreo de estos agentes contaminantes y así, de acuerdo a los niveles encontrados en los cuerpos de agua, destinarlos al consumo humano riego, industria, etc. o pasar el agua a procesos más rigurosos de tratamiento.

VII. BIBLIOGRAFÍA

Andersen, L.; Holbech, H.; Gessbo, A., et al., Effects of exposure to 17alpha-ethinylestradiol during early development on sexual differentiation and induction of vitellogenin in zebrafish (*Danio rerio*). *Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol* **2003**, 134, (3), 365-74.

B. Alex, M., Toxicoproteomics in Liver Injury and Inflammation. *Annals of the New York Academy of Sciences* **2006**, 1076, (Living in a Chemical World: Framing the Future in Light of the Past), 707-717.

Carr, A. S.; Annan, S. R., *Overview of Peptide and Protein Analysis by Mass Spectrometry*. John Wiley @ Sons, Inc.: 1997.

Carson, R., *Silent spring*. Houghton Mifflin: Boston,, 1962; p 368 p.

Consortium, G. O., The Gene Ontology. In 2009.

Consortium, T. G. O., Gene ontology: tool for the unification of biology. *Nat. Genet.* **2000**, 25, (1), 25-29.

Cunico, R. L.; Gooding, K. M.; Wehr, T., *Basic HPLC and CE of biomolecules*. Bay Bioanalytical Laboratory: Richmond, CA, 1998; p 388.

Damstra, T., Potential effects of certain persistent organic pollutants and endocrine disrupting chemicals on the health of children. *J. Toxicol., Clin. Toxicol.* **2002**, 40, (4), 457-465.

Damstra, T.; Barlow, S.; Bergman, A., et al. *Global Assessment of the State-of-the-Science of Endocrine Disruptors*; World Health Organization: 2002.

Environmental Health Bureau, M. o. H.; and Welfare, J. *Introduction to an interim report from the study group on Health Effects of endocrine disrupting chemicals*; 1988.

Fenske, M.; Maack, G.; Schafers, C., et al., An environmentally relevant concentration of estrogen induces arrest of male gonad development in zebrafish, *Danio rerio*. *Environ Toxicol Chem* **2005**, 24, (5), 1088-98.

Gilbertson, M.; Kubiak, T.; Ludwig, J., et al., Great Lakes embryo mortality, edema, and deformities syndrome (GLEMEDS) in colonial fish-eating birds: similarity to chick-edema disease. *J Toxicol Environ Health* **1991**, 33, (4), 455-520.

Gross, J. H., *Mass spectrometry: a textbook*. Springer: Berlin ; New York, 2004; p xviii, 518.

Guillette, L. J., Jr.; Gross, T. S.; Masson, G. R., et al., Developmental abnormalities of the gonad and abnormal sex hormone concentrations in juvenile alligators from contaminated and control lakes in Florida. *Environ Health Perspect* **1994**, 102, (8), 680-8.

Guzman, C.; Zambrano, E., [Endocrine disruptor compounds and their role in the developmental programming of the reproductive axis]. *Rev Invest Clin* **2007**, 59, (1), 73-81.

Heiden, T. K.; Carvan, M. J., 3rd; Hutz, R. J., Inhibition of follicular development, vitellogenesis, and serum 17beta-estradiol concentrations in zebrafish following chronic, sublethal dietary exposure to 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin. *Toxicol Sci* **2006**, 90, (2), 490-9.

Hillenkamp, F.; Bahr, U.; Karas, M., et al., Mechanisms of laser ion formation for mass spectrometric analysis. *Scanning Microscopy, Supplement* **1987**, 1, (Phys. Aspects Microsc. Charact. Mater.), 33-39.

Hoffmann, E. d.; Charette, J. J.; Stroobant, V., *Spectrométrie de masse*. Dunod Ed.: Paris, 1999; p ix, 400.

Hoffmann, E. d.; Stroobant, V., *Mass spectrometry : principles and applications*. 2nd ed.; Wiley: Chichester ; New York, 2001; p xii, 407.

Holm, R.; Karas, M.; Vogt, H., Polymer investigations with the laser microprobe. *Anal. Chem.* **1987**, 59, (2), 371-373.

IEH *Chemicals Purported to be Endocrine Disruptors: A compilation of Published Lists*; MRC Institute for Environment and Health: Leicester, UK., 2005.

Iguchi, T., [Environmental endocrine disruptors]. *Nippon Rinsho* **1998**, 56, (11), 2953-62.

Inohara, N.; Nunez, G., Genes with homology to mammalian apoptosis regulators identified in zebrafish. *Cell Death Differ* **2000**, 7, (5), 509-10.

Jennings, K. R.; Dolnikowski, G. G., Mass analyzers. *Methods Enzymol.* **1990**, 193, (Mass Spectrom.), 37-61.

Jobling, S.; Tyler, C. R., Endocrine disruption, parasites and pollutants in wild freshwater fish. *Parasitology* **2003**, 126 Suppl, S103-8.

Karas, M.; Bachmann, D.; Bahr, U., et al., Matrix-assisted ultraviolet laser desorption of non-volatile compounds. *Int. J. Mass Spectrom. Ion Processes* **1987**, 78, 53-68.

Karas, M.; Hillenkamp, F., Laser desorption ionization of proteins with molecular masses exceeding 10,000 daltons. *Anal. Chem.* **1988**, 60, (20), 2299-2301.

Kimmel, C. B.; Ballard, W. W.; Kimmel, S. R., et al., Stages of embryonic development of the zebrafish. *Dev Dyn* **1995**, 203, (3), 253-310.

Kolpin, D. W.; Furlong, E. T.; Meyer, M. T., et al., Pharmaceuticals, hormones, and other organic wastewater contaminants in U.S. streams, 1999-2000: a national reconnaissance. *Environ Sci Technol* **2002**, 36, (6), 1202-11.

Lander, B. F.; Knudsen, L. E.; Gamborg, M. O., et al., Chromosome aberrations in pesticide-exposed greenhouse workers. *Scand J Work Environ Health* **2000**, 26, (5), 436-42.

Liebler, D. C., *Proteomics in Cancer Research*. Wiley-Liss: USA, 2005; p 201 pp.

Liebler, D. C.; Editor, *Introduction to Proteomics: Tools for the New Biology*. Humana Press: Totowa, NJ., 2002; p 210 pp.

Liedtke, A.; Muncke, J.; Rufenacht, K., et al., Molecular multi-effect screening of environmental pollutants using the MolDarT. *Environ Toxicol* **2008**, 23, (1), 59-67.

Link, V.; Shevchenko, A.; Heisenberg, C. P., Proteomics of early zebrafish embryos. *BMC Dev Biol* **2006**, 6, 1.

Lintelmann, J.; Katayama, A.; Kurihara, N., et al., Endocrine disruptors in the environment (IUPAC technical report). *Pure Appl. Chem.* **2003**, 75, (5), 631-681.

Matthiessen, P., Historical perspective on endocrine disruption in wildlife. *Pure Appl. Chem.* **2003**, 75, (11-12), 2197-2206.

Mehta, V.; Peterson, R. E.; Heideman, W., 2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo-p-dioxin exposure prevents cardiac valve formation in developing zebrafish. *Toxicol Sci* **2008**, 104, (2), 303-11.

Menuet, A.; Pellegrini, E.; Anglade, I., et al., Molecular characterization of three estrogen receptor forms in zebrafish: binding characteristics, transactivation properties, and tissue distributions. *Biol Reprod* **2002**, 66, (6), 1881-92.

Merchant, M.; Weinberger, S. R., Recent advancements in surface-enhanced laser desorption/ionization-time of flight-mass spectrometry. *Electrophoresis* **2000**, 21, (6), 1164-77.

Newbold, R. R.; Padilla-Banks, E.; Snyder, R. J., et al., Developmental exposure to endocrine disruptors and the obesity epidemic. *Reprod Toxicol* **2007**, 23, (3), 290-6.

Norris, D. O.; Carr, J. A., *Endocrine disruption : biological bases for health effects in wildlife and humans*. Oxford University Press: Oxford ; New York, 2006; p xiv, 477 p.

Pang, C.; Seng, W. L.; Semino, C., et al., Zebrafish: a preclinical model for drug screening. *Assay Drug Dev Technol* **2002**, 1, (1 Pt 1), 41-8.

Pearson, H., Los primeros esfuerzos para normalizar la nomenclatura gen'etica encuentran resistencia. *El País* 2001.

Rotchell, J. M.; Ostrander, G. K., Molecular markers of endocrine disruption in aquatic organisms. *J Toxicol Environ Health B Crit Rev* **2003**, 6, (5), 453-96.

Sambrook, J.; Russell, D. W., *Molecular cloning : a laboratory manual*. 3rd ed.; Cold Spring Harbor Laboratory Press: Cold Spring Harbor, N.Y., 2001; p 3 v.

Sarmah, A. K.; Northcott, G. L.; Leusch, F. D., et al., A survey of endocrine disrupting chemicals (EDCs) in municipal sewage and animal waste effluents in the Waikato region of New Zealand. *Sci Total Environ* **2006**, 355, (1-3), 135-44.

Segner, H.; Carroll, K.; Fenske, M., et al., Identification of endocrine-disrupting effects in aquatic vertebrates and invertebrates: report from the European IDEA project. *Ecotoxicol Environ Saf* **2003**, 54, (3), 302-14.

Sparkman O., D., *Mass Spectrometry Desk Reference*. 2nd ed.; Global View Publishing: Pittsburgh, PA., 2006; p 198.

Streit, B., Bioaccumulation of contaminants in fish. *Exs* **1998**, 86, 353-87.

Uchida, D.; Yamashita, M.; Kitano, T., et al., Oocyte apoptosis during the transition from ovary-like tissue to testes during sex differentiation of juvenile zebrafish. *J Exp Biol* **2002**, 205, (Pt 6), 711-8.

Van den Belt, K.; Wester, P. W.; van der Ven, L. T., et al., Effects of ethynylestradiol on the reproductive physiology in zebrafish (*Danio rerio*): time dependency and reversibility. *Environ Toxicol Chem* **2002**, 21, (4), 767-75.

van der Greef, J.; Stroobant, P.; van der Heijden, R., The role of analytical sciences in medical systems biology. *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2004**, 8, (5), 559-565.

Watson, J. T., *Introduction to Mass Spectrometry, Third Edition*. 3rd. edition ed.; Lippincott Williams & Wilkins: Philadelphia, PA., 1997; p 496 pp.

Watson, J. T.; Sparkman O., D., *Introduction to Mass Spectrometry: Instrumentation, Applications, and Strategies for Data Interpretation*. 4th. edition ed.; John Wiley & Sons Inc: USA, 2007; p 832 pp.

Weiss, B., A risk assessment perspective on the neurobehavioral toxicity of endocrine disruptors. *Toxicol Ind Health* **1998**, 14, (1-2), 341-59.

Weseloh, D. V.; Pekarik, C.; De Solla, S. R., Spatial patterns and rankings of contaminant concentrations in Herring Gull eggs from 15 sites in the Great Lakes and connecting channels, 1998-2002. *Environ Monit Assess* **2006**, 113, (1-3), 265-84.

Yamashita, M.; Fenn, J. B., Application of electrospray mass spectrometry in medicine and biochemistry. *Koenchu-Iyo Masu Kenkyukai* **1984a**, 9, 203-206.

Yamashita, M.; Fenn, J. B., Electrospray ion source. Another variation on the free-jet theme. *J. Phys. Chem.* **1984b**, 88, (20), 4451-4459.

Yamashita, M.; Fenn, J. B., Negative ion production with the electrospray ion source. *J. Phys. Chem.* **1984c**, 88, (20), 4671-4675.

VIII. ANEXOS

7.1 Protocolo para la extracción de proteína en embriones de pez cebra

- Los embriones se colocaron en un baño de hielo por un tiempo no mayor de 15 min (para evitar que se mueran).
- Se transfirieron a un tubo eppendorff que contiene 750 μ L de solución RBPI (solución fría de Ringer libre de calcio, urea, thiourea, chaps, isopropanol, glicerol, DTT)/Coctel Inhibidor de Proteasas/ Nucleasa Mix,
- Cuidadosamente se maceraron los embriones con la ayuda del polytron PT 1200E, evitando la formación de espuma. Si es así, centrifugar brevemente para eliminarla
- Se observó la formación de un botón oscuro
- Se tomaron 3 alícuotas de 200 μ L en tubos eppendorf de 1.5 mL, evitando tocar el botón indeseable. Con estas alícuotas se realizó la precipitación Metanol-Cloroformo como se indica a continuación:
- Para evitar goteo y errores al pipetear los solventes, se humedecieron las punta de la pipeta mínimo 5 veces y entonces se procedió a tomar el volumen deseado. Se agregó 600 μ L de metanol mas 150 μ L de cloroformo. Se vortexeó por lo menos de 10 seg (con esta operación se obtuvo una sola fase)
- Se agregó 450 μ L de agua milliQ, vortexeando vigorosamente 20 segundos aproximadamente
- Durante 1 hora se centrifugó a 15,000 rpm/ 4°C (sacando del equipo con mucha precaución para evitar que se mezclen las 2 fases)
- Evitando tocar la interfase, en la cual se encuentran las proteínas, se eliminó la fase superior
- Se agregó 450 μ L de metanol, vortexeando vigorosamente por 20 segundos
- Durante 15 minutos se centrifugó a 15,000 rpm/ 4°C y se eliminó completamente el sobrenadante

- El tubo eppendorff se mantuvo abierto para permitir secar las proteínas a temperatura ambiente durante 15 minutos
- Una vez transcurrido el tiempo, se adicionó 100 μ L de solución de resuspensión RBPI a cada uno de los 3 tubos
- Se vortexeó vigorosamente hasta disolver completamente la proteína
- El contenido de los 3 tubos se juntó en uno solo, mezclando perfectamente y se realizaron alícuotas de 100 μ L para evitar degradar la proteína por descongelamiento-congelamiento
- Se conservó a -80°C hasta determinar la concentración de proteína

7.2 Protocolo para la cuantificación de proteína mediante el Método del Ácido Bicinconínico

- Se etiquetaron por la parte lateral y en la tapa a los tubos eppendorf de 1.5 mL que se requieran para realizar esta determinación
- Considerar el blanco e incluirlo en la serie de tubos.
- Se adicionaron las cantidades que se indican tabla de: solución problema, albúmina de suero bovino (BSA), agua estéril y ácido bicinconínico (BCA)
- Previamente se preparó el MIXER a la temperatura indicada: 37°C
- Se colocaron los tubos perfectamente bien cerrados en el MIXER
- Transcurrido el tiempo de reacción se enfriaron los tubos eppendorf al chorro del agua, evitando la penetración de agua.
- Se colocaron los tubos en una gradilla y se realizó la lectura de absorbancia con el Espectrofotómetro ULTROSPEC II, LKB BIOCHROM, llevando a cabo las indicaciones siguientes:
- Encender el equipo por la parte de atrás
- Esperar que calibre las lámparas de Deuterio y Tungsteno
- Elegir la longitud de onda deseada con los botones (+ , -); oprimiendo el botón, sin soltar hasta obtener los 562 nm

- Presionar MODO : Absorbancia
- Se introdujo la celda con la solución blanco en el espectrofotómetro, orientando la parte lisa y la flecha en dirección al paso del haz de luz
- Presionar la tecla SET REFERENCE, y deberá aparecer la lectura de 0.000
- Se desechó la solución blanco. Se llenó la misma celda muestra y anotó la lectura
- Para realizar cada una de las mediciones, se enjuagó por lo menos 3 veces la celda con la solución en turno.
- Se regresaron las soluciones a cada uno de los tubos correspondientes, con la finalidad de que si existe alguna equivocación, se podrá volver a leer la serie de datos.
- La curva se calibración se realizó como se indica en la siguiente relación.

TUBO	PROBLEMA	ALBÚMINA BSA (1 mg/mL)	AGUA ESTÉRIL milliQ	BCA (1 mL)	MIXER 30 min/37°C	ABSORBANCIA (562 nm)
BLANCO	-	-	50 µL	1 mL	√	
1	-	5 µL	45 µL	1 mL	√	
2	-	10 µL	40 µL	1 mL	√	
4	-	20 µL	30 µL	1 mL	√	
5	-	30 µL	20 µL	1 mL	√	
6	-	40 µL	10 µL	1 mL	√	
7	Muestra	-	46 µL	1 mL	√	
8	Muestra	-	42 µL	1 mL	√	

7.3 Protocolo para la cuantificación de proteína mediante el método 2-D Quant kit

Ideal para técnicas electroforéticas, muchos de los reactivos utilizados en este método son incompatibles con otros ensayos de cuantificación. Las proteínas complejan al cobre en solución y el cobre restante es medido con un agente de color, con lo cual la intensidad de color será inversa a la cantidad de proteína en suspensión

- Se preparó la solución de trabajo de color: mezclando 100 partes de reactivo de color A por 1 parte de reactivo de color B
- Se preparó una curva estándar
- En tubos de 600 μL se adicionó 50 μL de PRECIPITANTE para cada uno de los tubos (incluye tubos que contienen su muestra) mas 50 μL de CO-PRECIPITANTE
- Se vortexeó e incubó de 2- 3 minutos a temperatura ambiente
- Durante 15 minutos se centrifugó a 15,000 rpm / 4 °C (coloque los tubos dentro de la centrifuga de manera que la visagra de la tapa quede hacia arriba. Esto facilitará la eliminación del sobrenadante)
- Cuidadosamente se sacaron los tubos de la centrifuga y se eliminó el sobrenadante
- Se centrifugó a 15,000 rpm por 15 minutos a 4 °C y rápidamente se eliminó el líquido remanente hasta que no fué visible con la ayuda del equipo Concentrador
- Se adicionaron 20 μL de SOLUCIÓN DE COBRE y vortexeó vigorosamente hasta disolver el precipitado de la proteína que se encontraba adherido en las paredes del tubo
- Tan rápido como sea posible. Se adicionó 100 μL de la solución de trabajo de color a cada uno de los tubos y se vortexeó
- Se incubó a temperatura ambiente de 15 – 20 minutos
- En un tiempo máximo de 40 minutos se leyó la absorbancia a 480 nm para la serie de tubos

- En el nanodrop se colocó un volúmen de 4 μ L de muestra, estimando la concentración de proteína por comparación con su curva estándar
 - NOTA: La absorbancia de la solución de ensayo, disminuye con el incremento de concentración de proteína

7.4 Isoelectroenfoque de proteínas

- Se tomó la cantidad de proteína correspondiente a 100 μ g y se resuspendió en el Buffer de Rehidratación con DTT, más 1.25 μ L de anfolitas.
- Se llevó a un volumen total de 125 μ L ya que es el ideal para tiras de 7 cm.
- En la gradilla de rehidratación se colocó la muestra evitando la formación de burbujas.
- Tomar la tira por un extremo, separar cuidadosamente la película protectora y jalarla de una sola vez con ayuda de unas pinzas. Se deslizó la tira IPG encima de la muestra, inmediatamente después se adicionó 4 mL de aceite mineral sobre la tira esparciendo a lo largo del carril para evitar que se evapore la muestra.
- Cerrar la gradilla y dejar rehidratar la tira durante 15 hrs a temperatura ambiente. Una prueba que las tiras se rehidratan correctamente es el ensanchamiento del gel.

7.5 Protocolo para la separación por electroforesis de primera dimensión (separación por carga).

- La charola de porcelana se colocó en el IPGphor3 de manera que embone adecuadamente y en los carriles se colocaron las tiras rehidratadas eliminando el exceso de aceite mineral
- Se colocaron pequeños trozos de papel filtro humedecidos con 150 μ L de agua milliQ en los extremos de las tiras hidratadas, de tal forma que exista contacto entre el gel y los electrodos

- A cada uno de los carriles se adicionó 7 mL de aceite mineral y se colocaron los electrodos de tal manera que queden en el extremo de la tira y además hagan contacto con los electrodos (+) y (-) de IPGphor3
- Se estableció conexión con el equipo e inició el isoelectroenfoco de las proteínas

7.6 Protocolo para la separación electroforética en la segunda dimensión (separación por peso molecular).

Pesar 50 mg de ditioneol y disolver en 5 mL de solución de equilibrio (urea 6M, Tris pH=8.0 75 mM; glicerol 29.3%; SDS 2%; azul de bromofenol 0.002%)

- En un tubo falcon se colocó la tira hidratada y enfocada y se adicionó 2.5 mL de la solución anterior y se mantuvo en agitación constante durante 15 minutos. Transcurrido el tiempo de reacción, eliminar la solución
- Aparte, se pesaron 125 mg de Iodoacetamida y se disolvieron en 5 mL de solución de equilibrio protegiendo de la luz y se adicionaron 2.5 mL de esta solución a los tubos anteriores que contienen la tira. Transcurrido el tiempo de reacción se eliminó la solución con la finalidad de evitar la difusión de las proteínas
- Se sujetó la tira con la ayuda de las pinzas y se cortaron los extremos transparentes, deslizando lentamente la tira entre las 2 placas hasta la superficie del gel separador, evitando la formación de burbujas. El extremo (+) se colocó junto al Marcador de Peso Molecular.
- La tira se fijó al gel separador adicionando agarosa, eliminando las burbujas formadas con la ayuda de una jeringa
- Se corrió el gel lentamente con un voltaje inicial de 30V, aumentando gradualmente 10V hasta alcanzar 90V
- Al término de la corrida, el gel se tiñó con azul de coomasie

7.7 Protocolo para Western Blot

- Los embriones se maceraron en una solución Ringer libre de Calcio, EDTA e Inhibidor de Proteasas con la ayuda de un Polytron en un baño de hielo, se centrifugó 15 minutos/13,400 rpm/4°C; separando el sobrenadante conservándolo a -20°C para posteriormente cuantificar mediante el método del ácido bicinconínico
- Se realizó un gel de una dimensión para verificar que la separación de las bandas de proteína fué correcta y uniforme, entonces se procedió a realizar el protocolo para Western Blot
- En un gel de acrilamida al 8% se cargó en los dos carriles externos, 6µL de Marcador de peso molecular y 30 µg de muestra en los carriles internos. La separación de las proteínas se realizó en un tiempo aproximado de 2.5-3 horas iniciando con un voltaje de 30V y se aumenta gradualmente hasta finalizar la corrida.
- Para llevar a cabo la transferencia de proteínas a la membrana, se mantuvo baja la temperatura del buffer dentro de la cámara renovando periódicamente un recipiente con hielo dentro de la cámara
- En una charola se humedecieron con solución Buffer de Transferencia: las esponjas, la placa de vidrio con el gel, la membrana y el papel filtro. Para eliminar la propiedad hidrofóbica de la membrana de nitrocelulosa, se sumergió en metanol absoluto por 5 minutos
- En el cassette se colocó el material en el siguiente orden: esponja, papel filtro, gel de acrilamida, membrana de nitrocelulosa, papel filtro y esponja. Esta operación se realizó manteniendo el material sumergido en el buffer de transferencia
- Las condiciones de la transferencia fueron a 4°C con agitación constante, 0.5 Amperes y 200 Volts, durante 2 horas

- La transferencia de las proteínas a la membrana se verificó realizando una tinción con Rojo Ponceau, enjuagando posteriormente con agua destilada
- La membrana se transfirió a un pequeño recipiente, y se bloqueó durante 1 hora, con 10 mL de solución PBS 1x Tween-20 0.15% con 5 % leche, manteniendo agitación constante y a 4°C
- Transcurrido el tiempo, se desechó la solución y se incubó durante toda la noche con el ANTICUERPO PRIMARIO (Anti Vitelogenina 1:1000) *Mouse anti-zebrafish Vtg Monoclonal antibody, JE-2A 6*

Preparación: 10 mL de solución PBS 1x Tween-20 0.15% con 5 % leche

10 µL del anticuerpo primario Antivitelogenina

- Se lavó 5 veces en períodos de 5 minutos con solución de PBS 1x Tween-20 0.15% en agitación constante a 4°C, en el cuarto frío
- Se incubó durante 1 hora con el anticuerpo secundario (Anti-ratón 1:1000) *Stabilized Goat Anti-Mouse IgG (H+L) Peroxidase Conjugated*

Preparación: 10 mL de solución PBS 1x con 5 % leche

10 µL del anticuerpo secundario Anti-ratón

- Se realizaron 3 lavados en períodos de 5 minutos con solución de PBS 1x Tween-20 0.15% en agitación constante a 4°C, en el cuarto frío
- Finalmente se lavó 1 vez, durante 10 minutos con solución de PBS 1x Tween-20 0.15% en agitación constante a temperatura ambiente
- Para realizar la Inmunotinción, se adicionaron 2 mL de Super Signal ® West Pico Stable Peroxide Solution + 2mL de Super Signal ® West Pico Luminol/ Enhance Solution en un recipiente y se protegió de la luz. Rápidamente, se sumergió la membrana en la solución anterior e incubó durante 5 minutos a temperatura ambiente con agitación constante

- Al término de la reacción, se sacó la membrana y se enjuagó brevemente con solución de PBS 1x.
- La membrana se cubrió con plástico adherente, evitando la formación de burbujas y se pegó en la hoja del cassette cerrando inmediatamente para continuar con el revelado. El tiempo de reacción es de 20 minutos para la reacción del Luminol
- En el cuarto de revelado se sacó cuidadosamente la película Kodak cortando un extremo de la película para identificar la posición de las proteínas colocándola sobre la membrana y cerrando el cassette de revelado, inicialmente se dió un tiempo de 10 minutos de exposición y dependiendo de la intensidad en la aparición de las bandas de la proteína de interés, se decidieron los tiempos de exposición de las películas siguientes
- La película se sumergió completamente en la solución reveladora, agitando lentamente, hasta la aparición de las bandas de interés; la película se retiró de la solución en el momento que la intensidad de las bandas no cambia y se enjuagó brevemente en agua
- De inmediato se sumergió en la solución fijadora agitando lentamente hasta que la película se oscureció poco a poco. Finalmente se enjuagó con agua, se dejó secar la película e identificó
- PARA DESNUDAR LA MEMBRANA : Se incubó la membrana en solución Stripping Buffer durante 30 minutos a 50°C con agitación constante
- Se lavó 2 veces a temperatura ambiente con PBS 1x por 10 minutos, con agitación constante
- El bloqueo se realizó con solución de PBS 1x Tween-20 0.15% con 5 % de leche sin grasa

- Durante toda la noche se incubó con el ANTICUERPO PRIMARIO: ANTITUBULINA 1:1000 *Monoclonal Anti- α -Tubulin Clone DM 1A, Mouse Ascites Fluid*

Preparación: 10 mL de solución PBS 1x Tween-20 0.15% con 5 % de leche

10 μ L del anticuerpo primario ANTITUBULINA

- Se lavó 5 veces por períodos de 5 minutos cada uno con solución de PBS 1x Tween-20 0.15% a 4°C y agitación constante
- Durante 1 hora se incubó a 4°C con agitación constante con el ANTICUERPO SECUNDARIO:ANTI-RATÓN 1:1000 *Stabiliced Goat Anti-Mouse IgG (H+L) Peroxidase Conjugated*

Preparación: 10 mL de solución 1x Tween-20 0.15% con 5 % de leche

10 μ L del anticuerpo secundario ANTI-RATÓN

- Se realizaron 3 lavados por períodos de 5 minutos cada uno con solución de PBS 1x Tween-20 0.15% a 4°C y agitación constante
- Finalmente se lavó 1 vez con solución de PBS 1x Tween-20 0.15% a temperatura ambiente con agitación constante durante 10 minutos y se realizó la inmunotinción y el revelado de la membrana

7.8 Protocolo DIGE

Cada vial de CyDye se reconstituyó en DMF anhidra de alta calidad (especificación de $\leq 0.005\%$ agua; 99.8% de pureza y el frasco deberá estar abierto en un tiempo menor a 3 meses). Cy2- amarillo; Cy3-rojo y Cy5-azul

- Se tomó un volumen aproximado de DMF de su frasco original y depositó en un tubo eppendorf de 600 μ L, después de 5 minutos se añadió el volumen indicado en la hoja de especificaciones, obteniendo una concentración de 1mM
- Se vortexeó vigorosamente por 30 segundos y centrifugó a 12,000 rpm durante 30 segundos.
- Esta solución Stock de CyDye se mantuvo a -20°C al abrigo de la oscuridad. Estable por 2 meses después de preparado o fecha de caducidad del envase

Preparación de solución CyDye para el marcaje de proteínas

- Se mantuvo en hielo y al abrigo de la luz, posteriormente se vortexeó vigorosamente
- En un tubo de 600 μ L se colocó 3 μ L de DMF mas 2 μ L de la solución stock anterior para obtener una concentración de 400 pmol de CyDye en 1 μ L. Observe la siguiente tabla:

Vol. (μ L) del stock de CyDye 1mM	Vol. (μ L) DMF Dimetilformamida	Volumen total (μ L)	Concentración final de CyDye (pmol/ μ L)
1	4	5	200
2	3	5	400
2	2	4	500
1	-	1	1,000

- Esta solución de trabajo sólo estable sólo por una semana a -15°C a 30°C
- Adicionar 1 μ L a cada muestra de 50 μ g

Tabla A. Diseño experimental para CyDye, utilizando estándar interno

	GEL 1			Gel 2		
	control	500 ng/L	STD interno	control	10,000 ng/L	STD interno
Muestra precipitada (metanol-cloroformo)	50 µg	50 µg	(25 µg)control + (25 µg)500ng/L	50 µg	50 µg	(25 µg)control + (25 µg)10,000ng/L
Solución de resuspensión	15 µL	15 µL	15 µL	15 µL	15 µL	15 µL
Vortexear y ajustar pH a 8.0 con ayuda de papel indicador						
Cy2			1mL			1µL
Cy3	1mL			1µL		
Cy5		1µL			1µL	
Vortexear, centrifugar y mantener en hielo durante 30 min en la oscuridad a temperatura ambiente						
Lisina 10 mM (mezclar por pipeteo)	1µL	1µL	1µL	1µL	1µL	1µL
Mantener en hielo por 10 min en la oscuridad						
Volúmen total	GEL 1 = 51 µL			GEL 2 = 51 µL		
Para tiras de 24 cm, el volúmen total deberá ser de 450 µL						
Buffer Rehidratación	450 – 51 = 399 µL			450 – 51 = 399 µL		
Preparar 1mL de Buffer de Rehidratación para las 2 tiras de 24 cm Anfolitas 12.5 µL (pharmalyte 4-6.5 for IEF) + DTT 300 mM 60 µL						
Hidratar las tiras durante toda la noche en la oscuridad (15 horas aprox.) y al día siguiente realizar el Isoelectroenfoque						

Solución DIGE de resuspensión: 7M Urea; 2M Thiourea; 30mM Tris; 4% CHAPS; pH = 8.5

- Se realizó el isoelectroenfoque de las tiras y al finalizar se conservaron a -80°C en un tubo de plástico cubierto con papel aluminio evitando que el gel de la tira toque la pared del tubo.
- Lentamente se descongelaron a temperatura ambiente hasta que se observó la desaparición de la capa blanca de hielo de las tiras

- Se disolvió 300 mg de DTT en 30 mL de solución de equilibrio (a cada tira se adicionó 15 mL de esta solución), durante 15 minutos se incubó con agitación constante. Eliminar la solución al término de la reacción
- Se disolvieron 750 mg de IAA en 30 mL de solución de equilibrio (a cada tira se adicionó 15 mL de esta solución), durante 15 minutos se incubó con agitación constante. Se eliminó la solución al finalizar la reacción
- La tira se colocó entre las dos placas hasta tocar el gel de acrilamida. Todo se realizó al abrigo de la luz
- Se requirió preparar 9 L de Laemmli 1x para el llenado de la cámara de electroforesis
- Condiciones iniciales de la corrida: 18 mA; 1 w; 21°C ↓ (hasta 10°C); Pump ON; Continuous RUN; 50 V iniciales ; 70V a las 2 horas; 90 V a las 4 horas....y se queda toda la noche a este voltaje hasta el día siguiente.

Preparación de la cámara para Geles de 24 cm

- Todos las placas de vidrio se lavaron perfectamente y enjuagaron con agua y alcohol etílico.
- La cámara se colocó en posición horizontal y se vació la solución de acrilamida al 10% por la parte lateral
- Se agregó la solución desplazante (para evitar que el gel polimerice en el ducto e impida un flujo correcto de la solución)
- El nivel del líquido quedó ligeramente abajo del borde de los vidrios
- Con la ayuda de una pipeta desechable se adicionó solución saturada de butanol-agua, con la finalidad de que el gel polimerice uniformemente, aproximadamente 6 horas
- A las placas con gel se les dejó una pequeña cantidad de agua milli Q, con la finalidad de que la tira se deslice fácilmente
- Las tiras hidratadas se colocaron en el gel, al abrigo de la luz y se utilizó una regla para deslizarlas hasta el nivel del gel de acrilamida
- Se adicionaron 3 mL de agarosa con la ayuda de una pipeta de 1 mL, con la punta acortada

- Se agregaron 9 L de solución Laemmli 1x hasta el nivel indicado en la cámara
- La cámara se cubre para proteger de la luz
- Las condiciones de corrida fueron: de inicio 10 °C /18 mA/ 1 W/ bomba encendida/ 50; aumentar gradualmente 20 V cada 2 horas hasta 90V(durante toda la noche). Al día siguiente se continuó aumentando cada 2 horas hasta llegar a 150 V
- Se sacaron los geles de la cámara y colocaron en el cassette para escanearlos
- Para la conservación de los geles, se colocaron en una charola de aluminio en solución de ÁCIDO ACÉTICO 7.5% : ALCOHOL ETÍLICO 10%, durante toda la noche
- Al día siguiente, se lavaron 2 veces por períodos de 30 minutos cada uno con agitación constante, con una solución de lavado 35 mM de NaHCO₃ , 300 mM de Na₂CO₃ pH entre 10.0 y 11.0
- Durante el primer lavado se observó la producción de CO₂, y para el segundo lavado se garantizará que la reacción se lleva a cabo a un pH alcalino
- Se tiñó al abrigo de la luz, durante 1 hora con agitación constante con solución colorante Deep Purple Total Protein Stain (GE Healthcare) 1:200. Proteger de la luz y esta solución sólo se utilizó una sola vez
- El gel se lavó con una solución de ÁCIDO ACÉTICO al 7.5%, por media hora con agitación constante. El gel se escaneó y se conservó en agua milli Q hasta cortar las proteínas diferenciales de interés

7.9 Protocolo para experimentos de Proteómica Shotgun

- Este procedimiento inicia a partir de la proteína ya extraída y purificada
- Una vez obtenido el pellet, se reconstituyó con 49 µL de solución de Urea 6M en BICAM 50 mM
- Se adicionaron 7 µL de acetonitrilo al 10%

- El proceso de reducción se llevó a cabo con 2 μ L de DTT (ditiotreitól) 200 mM .
- Durante 30 minutos se incubó 60°C. Transcurrido el tiempo de reacción, se dejó enfriar
- La alquilación se realizó adicionando 8 μ L de IAA (Iodoacetamida) 110 mM y se dejó reaccionar por 1 hora en la oscuridad
- Se verificó que el pH se encontrara en 8.0
- Una vez obtenido el pH deseado, se adicionaron 40 μ L de agua 0.1% TFA y la solución se transfirió a un vial para HPLC

La separación de proteínas se llevó a cabo por medio de cromatografía de líquidos de alta resolución (HPLC) por sus siglas en inglés. Esta técnica se utiliza cuando los analitos en la muestra no son volátiles o inestables térmicamente, para compuestos iónicos que sean solubles en agua, y compuestos de alto peso molecular; aún en el caso de poder formar derivados que sean posible introducir vía CG es siempre una mejor opción trabajar con la muestra tratada lo menos posible

- La fase estacionaria de elección fue la denominada fase reversa C₄, también puede ser C-8 o C-18 y de acuerdo a los analitos se determina cuál es la idónea para utilizarse. Debido a los estudios que se desean determinar se propuso el uso de la Espectrometría de Masas acoplada a las técnicas cromatográficas debido a que será posible tener una mayor especificidad en las determinaciones
- Se trabajó con el siguiente gradiente: A = agua 0.1% TFA B = ACN 0.1% TFA

Tabla B. Gradiente utilizado en CLAR para el fraccionamiento de proteínas intactas.

	Tiempo	Flujo	%A	%B	%C	%D	Curva
1		0.20	98.0	2.0	0.0	0.0	6.0
2	5.0	0.20	98.0	2.0	0.0	0.0	6.0
3	35.0	0.20	2.0	98.0	0.0	0.0	6.0
4	40.0	0.20	2.0	98.0	0.0	0.0	6.0
5	45.0	0.20	2.0	98.0	0.0	0.0	6.0
6	50.0	0.20	98.0	2.0	0.0	0.0	6.0

- Cada minuto se recolectó una muestra en tubo eppendorff de 600 μ L
 - Es recomendable dejar inicialmente unos 5 minutos en condiciones iniciales del gradiente para lograr un buen desalado
-
- o Las fracciones obtenidas que contienen las proteínas, se evaporaron a sequedad y se reconstituyeron con 20 μ L de la solución de digestión siguiente: 0.2 M BICAM; 0.5 M Urea; 4.0 % de Acetonitrilo y contiene al menos 400 ng de tripsina
 - o Opcionalmente se puede adicionar 1 μ L de RAPIGEST al 3%
 - o La digestión se realizó por 12 – 16 horas a 37°C, en el termoblock
 - o Al finalizar la reacción, el pH se ajustó a 3.0 con solución TFA 50%: AGUA 50%

Se inyectaron 100 μ g de proteína en el CLAR-fase reversa, utilizando una columna C₄, aproximadamente al tiempo de retención de 15 minutos se pueden observar señales de proteína, se inició la colecta de las fracciones de 400 μ L cada una (verFigura 33). Las proteínas con presencia de aminoácidos aromáticos se observan a 280 nm y las proteínas con aminoácidos mayormente alifáticos a 214 nm. Las fracciones obtenidas se evaporaron, se digirieron con tripsina durante 16 horas a 37°C y se desalaron mediante las puntas ZipTip. La identificación a través de EM se llevó a cabo utilizando experimentos de MALDI-TOF/TOF. La muestra se preparó colocando 5 repeticiones de 0.8 μ L del digerido en la placa de MALDI y antes de que se evaporara la muestra, sobre ella se colocó 0.8 μ L de matriz α -ciano-4-hidroxi-ácido cinámico y se esperó que seicara a temperatura ambiente.

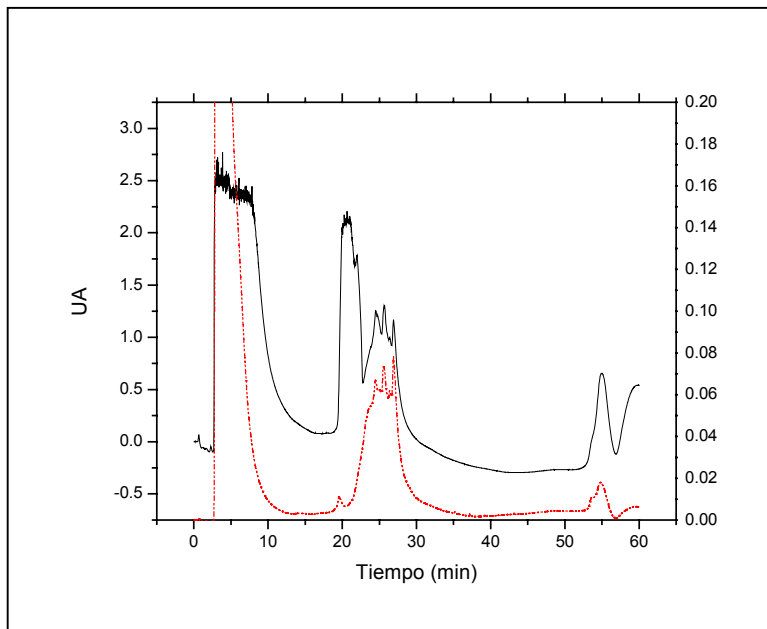


Figura 33. Prefraccionamiento de proteínas para experimento de Proteómica shotgun. Línea continua = señal a 214 nm, línea discontinua = señal a 280 nm.

7.10 Protocolo para la Digestión de Proteínas a partir de muestras de Geles o de muestras con proteínas en solución

- Se cortaron las bandas o manchas de proteínas (aproximadamente de 1mm^3 o 2mm^3) con la punta de una micropipeta; fueron colocados en tubos eppendorf y removido el exceso de líquido
- Se agregaron $500\ \mu\text{L}$ de la solución acetonitrilo 50%- NH_4HCO_3 50mM a cada corte del gel e incubaron a 50°C durante 5 minutos
- Se eliminó el sobrenadante y se repitió el paso anterior hasta limpiar el Coomassie de la muestra (es recomendable agitar con el vortex después de agregar la solución para evitar que los pedazos del gel se adhieran al tubo).
- Se adicionó $100\ \mu\text{L}$ de acetonitrilo al 100% y durante 5 minutos se dejaron deshidratar las piezas del gel a temperatura ambiente (un indicativo que las piezas del gel se han deshidratado será por su apariencia color blanco opaco y la reducción significativa de su tamaño original). Mantener los tubos cerrados

- El sobrenadante se removió, los tubos se mantuvieron destapados por 10-15 minutos protegiéndolos con toallitas kimwipe del polvo y contaminación, hasta secado completo del gel.
- Se añadieron 15 μL de solución de tripsina (25 $\text{ng}/\mu\text{L}$) y se permitió que las piezas del gel se rehidrataran en menos de 10 minutos, agitando ocasionalmente con la ayuda del vortex. Es importante que la cantidad de tripsina cubra completamente el gel.
- El excedente de solución de tripsina se eliminó casi por completo y se añadieron 20 μL de bicarbonato de amonio 50mM (o un volumen suficiente para cubrir el gel hidratado en el paso anterior). Se llevó a cabo la reacción de digestión durante toda la noche a 37°C (aproximadamente 16 horas)
- Después de la digestión, se añadieron 20 μL de bicarbonato de amonio 50mM y se incubó la muestra por 10 minutos, mezclando ocasionalmente con el vortex. Con la finalidad de colocar el gel en el fondo del tubo, se centrifugó por 30 segundos.
- Con la ayuda de una pipeta se colectó cuidadosamente el sobrenadante y se transfirió a otro tubo de centrifuga nuevo de 0.5 mL. CONSERVAR esta solución ya que contiene la proteína de interés.
- Se agregó 20 μL de solución de extracción a las piezas de gel y el tubo se incubó por 10 minutos, mezclando ocasionalmente con vortex. Con una pipeta se colectó cuidadosamente el sobrenadante y se combinó con el extracto anterior
- Repetir 3 veces el paso anterior, juntando todos los extractos en el mismo tubo
- Se redujo el volumen del extracto a 20 μL , evaporando en una centrifuga con vacío a temperatura ambiente. Evite secar completamente.
- Sólo en caso necesario se ajustará el volumen de la muestra a 20 μL con ácido acético al 1%

PROCESO DE DESALADO DE LAS MUESTRAS

- Se utilizaron puntas ZipTip C₁₈/ Tip Size: P10/ Millipore
- El proceso de lavado se realizó aspirando y expulsando 10 μL de la solución indicada con la pipeta y la punta ZipTip

- Primeramente se lavó la punta 5 veces con acetonitrilo 100%, secando la punta con una toallita kimwipe al final de la operación.
- Se lavó 15 veces con solución de equilibrio. Secar la punta al final.
- En un tubo eppendorf de 600 μ L, nuevo, se colocaron 20 μ L de la muestra y se hicieron 2 lavados de 10 μ L cada una. 50 lavados realizados.
- En un tubo eppendorf de 1.5 mL se lavó la muestra 20 veces con solución de equilibrio
- Finalmente se enjuagó 20 veces con solución de extracción.
- Una vez obtenida la muestra digerida y desalada (aproximadamente 10 μ L), se toma un volumen de 0.8 μ L y se coloca en la placa de MALDI limpia
- Antes de que seque la muestra, se colocó encima 0.8 μ L de matriz α -ciano-4-hidroxi-ácido cinámico
- Se dejó secar a temperatura ambiente y se lee en el Espectrómetro de Masas

PREPARACIÓN DE SOLUCIONES PARA DIGESTIÓN DE PROTEÍNAS

- Acetonitrilo 50%

Preparación: 75 mL de acetonitrilo + 75 mL de agua milliQ

- Bicarbonato de Amonio 50mM

Preparación: 0.19765 g de Bicarbonato de Amonio, disolver con agua milliQ en un volumen de 50 mL

- Acetonitrilo 50%- Bicarbonato de Amonio 50 mM

Preparación: 0.19765 g de Bicarbonato de Amonio, disolver con acetonitrilo 50% en un volumen de 50 mL

- Solución de Tripsina 25 ng/ μ L

Preparación: Agregar 175 mL de bicarbonato de amonio 50 mM (NH_4HCO_3) a un stock de 200 nmol/ μ L

- Buffer de Extracción 50%(v/v) acetonitrilo, 5% (v/v) ácido fórmico

Preparación: Mezclar 25 mL de acetonitrilo + 2.5 mL de ácido fórmico.
Aforar a 50 mL con agua milliQ

PREPARACIÓN DE SOLUCIONES DE LIMPIEZA DE PROTEÍNAS CON ZipTip (proceso de desalación)

- Solución de Equilibrio: Ácido Trifluoroacético 0.1% (TFA)

Preparación: Agregar 50 µL de TFA y aforar a 50 mL con agua milliQ

- Solución de Elución: Acetonitrilo 50%-TFA 0.1%

Preparación: Agregar 50 µL de TFA y aforar a 50 mL con acetonitrilo al 50%

- Solución de Reconstitución de muestras: agua 95%- acetonitrilo 5%

Preparación: Mezclar 47.5 mL de agua milliQ + 2.5 mL de acetonitrilo

7.11 Protocolo para la Identificación de Proteínas por medio de MALDI-TOF/TOF

- o Existen en la literatura varios reportes acerca de la forma de preparar la muestra para los experimentos de MALDI, el mas común es el llamado “dried droplet method”, por lo que se siguió el siguiente proceso:
- o Se colocó sobre la placa de MALDI, 0.8 µL de la muestra en solución
- o Antes de que seque la gota, encima de ella se colocaron 0.8 µL de la matriz (α -ciano-4-hidroxi-ácido cinámico, 10 mg/mL) disuelta en 50% acetonitrilo y 0.1% de ácido trifluoroacético
- o Se dejó secar a temperatura ambiente

- Para una muestra más homogénea, se pueden mezclar previamente en un vial, volúmenes iguales de matriz y muestra antes de colocar la gota sobre la placa MALDI
- CALIBRACIÓN – Se colocaron las muestras de calibración en los sitios adecuados de la placa, sin olvidar anotar los números de referencia
- Se siguió el protocolo para lograr una correcta calibración de la placa
- Se verificó, utilizando los mismos calibradores como muestra, la exactitud de la calibración (no debe ser mayor a 20 ppm)
- MUESTRAS PROBLEMA – Se colocaron ordenadamente las muestras en 5 posiciones continuas sobre la placa.
- Si la cantidad de muestra es suficiente, se pudo colocar un spot adicional sobre la placa, con la finalidad de verificar la calidad de la muestra
- Se siguió el procedimiento para obtener los espectros de masas y los de EM/EM
- En general se debe tener cuidado de NO saturar la señal (número de cuentas) y ajustar el láser de manera que existe una buena relación señal/ruido
- ANÁLISIS DE DATOS – A partir del software apropiado (MASCOT a través de Protein Pilot), se seleccionaron las muestras analizadas y se ajustaron los parámetros de búsqueda.