



CENTRO DE INVESTIGACIONES BIOLÓGICAS
DEL NOROESTE, S.C.

Programa de Estudios de Posgrado

**CARACTERIZACIÓN PARCIAL DE VITELOGENINA DE
Chelonia mydas agassizii Y VALIDACIÓN DE UN ENSAYO
INMUNOENZIMÁTICO (ELISA) PARA SU DETECCIÓN EN
PLASMA COMO POTENCIAL BIOMARCADOR DE
XENOESTRÓGENOS**

T E S I S

Que para obtener el grado de

Maestro en Ciencias

Uso, Manejo y Preservación de los Recursos Naturales
(Orientación en Biología Marina)

p r e s e n t a

Itzel Sifuentes Romero

La Paz, B.C.S. Junio del 2004



COMITÉ TUTORIAL Y REVISOR

Dra. Susan C. Gardner (Director)

Programa de planeación ambiental y conservación
Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, S.C (CIBNOR)
La Paz, B.C.S., México

Dra. Celia Vázquez Boucard (Tutor)

Programa de planeación ambiental y conservación
Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, S.C (CIBNOR)
La Paz, B.C.S., México

Dr. Roldán A. Valverde (Tutor)

Departamento de Biología
Xavier University of Louisiana
Nueva Orleans, LA, E.U.A

COMITÉ SINODAL

Dra. Susan C. Gardner	Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste
Dra. Celia Vázquez Boucard	Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste
Dr. Roldán A. Valverde	Xavier University of Louisiana
Dr. Humberto Mejía (suplente)	Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste

RESUMEN

Las siete tortugas marinas que existen en el mundo son consideradas amenazadas o en peligro de extinción, incluyendo a la tortuga prieta *Chelonia mydas agassizii*. Indudablemente ciertas actividades humanas como la sobre pesca y la pesca incidental han sido la causa de este colapso. En los últimos años ha incrementado la preocupación por ciertos productos químicos que son liberados al ambiente como pesticidas y detergentes. Estos compuestos conocidos como xenoestrógenos tienen la habilidad de mimetizar la acción de la hormona 17 β -estradiol (E₂). El impacto de estos contaminantes en el éxito reproductivo de la fauna silvestre es considerado crítico especialmente en organismos en peligro de extinción. La vitelogenina (VTG) es una proteína compleja que se sintetiza en todos los vertebrados ovíparos siendo los estrógenos el principal estímulo para su síntesis y secreción. Esta producción está normalmente restringida a hembras adultas, sin embargo, su síntesis puede ser inducida en machos y hembras inmaduras por la exposición a xenoestrógenos, características que hacen de esta proteína un biomarcador ideal. El presente trabajo reporta la caracterización de VTG de *C. mydas agassizii* y la subsecuente validación de un ensayo inmunoenzimático (ELISA) para su detección en plasma. La VTG se purificó de plasma de machos inducidos con E₂ por medio de cromatografía de intercambio iónico. La proteína aislada, ausente en el plasma de macho antes de la inducción (control), se identificó como VTG por su naturaleza glico-lipo-proteica y por la homología de su secuencia de aminoácidos con VTG de otros vertebrados. Se caracterizó como un dímero de aproximadamente 500 kDa compuesto de dos monómeros de igual peso molecular de aproximadamente 200 kDa. La VTG purificada se utilizó como antígeno en la elaboración de anticuerpos policlonales cuyo alto título y especificidad se comprobó por ELISA y Western blot respectivamente. La sensibilidad del ELISA desarrollado se estimó entre 15 ng/ml y 2 μ g/ml, el coeficiente de variación entre y dentro del ensayo fue menor al 8 y 10%, respectivamente, indicando su precisión. Se encontró paralelismo entre la curva estándar y las curvas generadas con diluciones de plasma inducido, además se determinó 1:5000, como la dilución en la que el efecto matriz se reduce. Se observó reacción cruzada del antisuero generado con VTG de *Caretta caretta* y *Eretmochelys imbricata*, lo cual amplía la aplicabilidad del ensayo con otras especies de tortuga marina. El empleo de este ensayo como parte de un programa de valoración del estado de salud de la tortuga prieta *C. mydas agassizii*, podrá contribuir al entendimiento de los factores que están influyendo en la lenta recuperación de esta especie y dar una pauta para atacar el problema desde otra perspectiva.

Palabras clave: vitelogenina, *Chelonia mydas agassizii*, biomarcador, xenoestrógenos, ELISA.

Vo.Bo.

Susan C. Gardner
DIRECTORA DE TESIS

ABSTRACT

The seven sea turtle species that exist worldwide are considered either threatened or endangered including the black turtle, *Chelonia mydas agassizii*. Certainly, human interference like over fishing and incidental catch are the cause of this collapse. In the past years there has been an increasing concern about several chemical products released into the environment, including pesticides and detergents. These compounds known as xenoestrogens, have the potential to mimic the action of the steroid hormone 17 β -estradiol. The impact of these common pollutants on the reproductive success of wildlife may be considerable especially in endangered species such as the black turtle. Vitellogenin (VTG) is a complex protein that is produced in the liver in response to estrogen stimulation in oviparous vertebrates. It is normally found in adult females during egg production and absent in males and juveniles. However, juveniles and males can produce VTG in response to xenoestrogens. Therefore VTG, may be useful as a biomarker of exposure to estrogenic compounds. This thesis reports the purification and characterization of *C. mydas agassizii* VTG with the subsequent development of a specific ELISA for VTG measurement in turtle plasma. Plasmatic VTG was purified from E₂-induced males using ion exchange chromatography. The isolated protein, absent in male turtle plasma before induction, was identified as VTG by its glico-lipo-protein nature and its homology with other vertebrate VTG amino acid sequence. It was characterized as a 500 kDa dimer composed by two 200 kDa monomers. The purified protein was used as antigen for polyclonal antibody production. The high titer and specificity was proven with ELISA and Western blotting, respectively. The sensitivity of the assay was estimated between 15 ng/ml and 2 μ g/ml, inter and intra-assay coefficients of variation were less than 8 and 10%, respectively, indicating its precision. Plasma dilution curves from E₂ induced male turtle showed parallelism with the standard curve. Matrix effect was reduced at dilution 1:5000. Additionally cross reactivity of the antibody with other sea turtle VTG (*Caretta caretta* and *Eretmochelys imbricata*) was observed, extending the applicability of the assay. Applying this assay as part of a black turtle health assessment program, could help in an understanding of different factors that are contributing with the slow recovery of this specie and give a trace to face the problem from another perspective.

Keywords: vitellogenin, *Chelonia mydas agassizii*, biomarker, xenoestrogens, ELISA

DEDICATORIA

A mi mamá

Blanca R. Romero Tristán

Por tu inmenso amor, por tus bendiciones y porque cada día que pasa me enseñas a valorar lo hermosa que es la vida.

A mi papá

Rafael Sifuentes Martínez

Porque crees en mí, porque se que siempre y en todo momento tengo tu apoyo y todo tu gran amor.

A mi hermana

Nayeli Sifuentes Romero

Porque en ti he encontrado a una gran amiga, por todo lo que hemos vivido juntas y por todo lo que nos hace falta vivir.

A mi novio

Roberto C. Vázquez Juárez

Porque “a veces” decir te quiero no es suficiente y simplemente porque sin ti nada de esto hubiera sido posible.

AGRADECIMIENTOS

La realización de este trabajo no hubiera sido posible sin la ayuda de un gran número de personas que con su apoyo hicieron posible el logro de esta nueva meta en mi vida.

Quisiera agradecer a la Dra. Susan Gardner por creer en mi y por darme la libertad de llevar este trabajo hasta donde fue posible. Gracias también por el apoyo brindado para la asistencia en dos ocasiones al congreso internacional del SETAC, por la beca otorgada para el término de la tesis y sobre todo por la amistad y apoyo a lo largo de estos años.

Quisiera agradecer también y con mucho cariño a la Dra. Celia Vázquez, por todo lo que me enseñó, por recibirme en su laboratorio, pero sobre todo por su amistad y cariño que me demostró en momentos difíciles de mi vida.

Gran parte de este trabajo fue posible gracias a la valiosa ayuda brindada por Arturo Sierra Beltrán, por haberme enseñado tantas cosas, por sus valiosos comentarios que enriquecieron mucho el manuscrito de tesis y sobre todo por el interés mostrado en este trabajo. Muchas Gracias.

Gracias a Antonio y Beatriz Resendiz, por confiar en mi y por permitirme utilizar las instalaciones de la Estación de Conservación e Investigación en Bahía de los Ángeles para la inducción de las torutgas. Gracias, porque siempre que necesité palabras de aliento, Toño tenía las perfectas para alimentar mi autoestima (Maravilloso!!!!).

Una parte importante de la tesis fue el trabajo en el laboratorio el cual no hubiera sido posible sin la ayuda de varias personas. Adriana Rojas, por hacerme la vida mas fácil en laboratorio; Alfonso Anguiano (El ponchito), por la paciencia que me tuvo al principio; Alejandro Amador, por ayudarme en todo lo que le fue posible; María de Jesús Romero (La Chula) por su amistad y por su gran apoyo. A mi gran amiga Silvia Luna por compartir conmigo no solo experiencias de laboratorio sino también experiencias de vida, gracias por la confianza y cariño que supiste sembrar en mi.

Quisiera agradecer también a Ernesto Quiróz por su asistencia en el manejo de los conejos para la elaboración de los anticuerpos y a Lilia Ibarra por los servicios de cromatografía prestados en la purificación de las proteínas.

Al CONACyT por haberme otorgado la beca No. 166269. Al Posgrado del CIBNOR por haberme permitido la realización de esta tesis, así como por haberme brindado apoyo económico para el término de ésta.

A la Dra. Thelma Castellanos, Directora del Posgrado del CIBNOR por todo su apoyo y comprensión, gracias también a todo su equipo que me asistió en todo lo que les fue posible. Así mismo, al personal del centro de cómputo, Manuel Melero y Horacio Sandoval y al personal de la biblioteca Ana María Talamantes y Antonio Díaz.

Muchas gracias a la Dra. Lucía Ocampo porque fue ella quien me abrió las puertas a la investigación, al CIBNOR y a la Paz y también por todo su apoyo cuando decidí dejar las langostas para ir por las tortugas.

Gracias al grupo tortuguero del CIBNOR, Héctor, Sianon, Amaury, Berta y especialmente a Arturo y Paloma que compartieron conmigo experiencias maravillosas en las salidas a campo pero sobre todo porque fueron ellos los que me alentaron a ser parte de este grupo.

De manera especial quiero mencionar a Roxana, Manuel, Poncho y Rafa sin su cariño y apoyo terminar esta tesis hubiera sido muy difícil. En verdad estoy muy agradecida con ustedes, los quiero mucho.

Quiero agradecer también a Ricardo, Mauri, Ale y Abril por todo el apoyo que encontré en ustedes, por hacerme sentir en familia y por darme el hermoso regalo de su confianza y cariño.

A toda mi familia tíos, primos, sobrinos, por todo el apoyo que he recibido de ustedes y porque se que aunque están lejos siempre están pensando en mí.

A Carlos porque siempre me apoyaste, porque tu amor ha sido un gran motivo para seguir adelante y seguir creciendo día con día. Porque además de ser mi novio y mi amigo has sabido ser un gran maestro.

A mis padres y a mi hermana porque simplemente sin su amor y su confianza el haber logrado esta meta no hubiera significado nada.

Este logro no es mío únicamente se los debo a todos y cada uno de ustedes. Muchísimas Gracias a todos.

ÍNDICE

RESUMEN	iii
ABSTRACT.....	iv
DEDICATORIA	v
AGRADECIMIENTOS.....	vi
ÍNDICE.....	viii
LISTA DE FIGURAS	x
LISTA DE TABLAS.....	xii
LISTA DE ABREVIATURAS.....	xiii
I. INTRODUCCIÓN.....	1
II. ANTECEDENTES.....	3
2.1. Tortugas marinas.....	3
2.1.1. Migraciones y utilización del hábitat.....	3
2.1.2. Taxonomía.....	4
2.2. Tortuga prieta, <i>Chelonia mydas agassizii</i> (Bocourt, 1868).....	5
2.2.1. Distribución.....	5
2.2.2. Pesquería.....	5
2.2.3. Situación actual.....	6
2.3. Compuestos Endócrino Alterantes (EDC).....	7
2.3.1. Xenoestrógenos.....	8
2.4. Biomarcadores.....	11
2.5. Vitelogenina.....	12
2.5.1. Métodos para detectar y cuantificar VTG.....	15
2.6. Ensayo inmunoenzimático (ELISA).....	16
III. OBJETIVOS.....	18
3.1. Objetivo general.....	18
3.2. Objetivos particulares.....	18
IV. METODOLOGÍA.....	19
4.1. Inducción hormonal con 17 β -estradiol (E ₂).....	19
4.2. Identificación de las proteínas inducidas.....	21
4.2.1. Determinación de proteínas totales.....	21
4.2.2. Electroforesis en gel de poliacrilamida (PAGE).....	21
4.3. Purificación de las proteínas inducidas.....	21
4.3.1. Precipitación con MgCl ₂ /EDTA.....	21
4.3.2. Cromatografía de filtración en gel.....	22
4.3.3. Cromatografía intercambio iónico DEAE.....	22
4.5. Caracterización parcial de la vitelogenina.....	24
4.5.1. PAGE en condiciones desnaturalizantes (SDS-PAGE).....	24
4.5.2. Secuenciación de aminoácidos.....	24
4.5.3. Electroelución.....	25

4.4. Elaboración de anticuerpos	25
4.6. Caracterización de anticuerpos policlonales anti-VTG de tortuga prieta	27
4.6.1. Titulación: abundancia y avidéz	27
4.6.2. Western Blot: especificidad	28
4.7. Validación del ensayo inmunoenzimático (ELISA)	29
4.7.1. Concentración de antígeno y anticuerpo	29
4.7.2. Curva estándar	29
4.7.3. Paralelismo	29
4.7.4. Precisión del ensayo	29
4.7.5 Efecto matriz	30
4.8. Reacción cruzada con otras especies	30
4.8.1. ELISA	30
4.8.2 Western Blot	30
4.9 Análisis de las muestras inducidas	31
V. RESULTADOS	32
5.1. Inducción hormonal con 17 β -estradiol	32
5.2. Identificación de las proteínas inducidas	33
5.3. Purificación de las proteínas inducidas	34
5.3.1. Precipitación con MgCl ₂ /EDTA	34
5.3.2. Cromatografía de filtración en gel	35
5.3.3. Cromatografía intercambio iónico DEAE	36
5.4. Caracterización parcial de la vitelogenina	40
5.4.1. Gel de poliacrilamida en condiciones desnaturalizantes (SDS-PAGE)	40
5.4.2. Secuencia de aminoácidos	41
5.4.3. Electroelución	43
5.5. Caracterización de los anticuerpos policlonales anti-VTG de tortuga prieta	44
5.5.1. Titulación: abundancia y avidéz	44
5.5.2. Western Blot: especificidad	46
5.6. Validación del ensayo inmunoenzimático (ELISA)	47
5.6.1. Concentración Ag:Ac	47
5.6.2. Curva estándar	48
5.6.3. Paralelismo y precisión del ensayo	49
5.6.4. Efecto matriz	50
5.7. Reacción cruzada con otras especies	51
5.7.1. ELISA y Western Blot	51
5.8. Análisis de muestras inducidas	53
VI. DISCUSIÓN	55
6.1. Inducción hormonal con 17 β -estradiol	56
6.2. Purificación	58
6.3. Caracterización parcial	60
6.4. Secuencia de aminoácidos y electroelución	61
6.5. Caracterización de antisuero anti-VTG de <i>C. mydas agassizii</i>	62
6.6. Validación del ensayo inmunoenzimático (ELISA)	64
6.7. Concentración VTG en las muestras inducidas	67
6.8. Aplicaciones	68
6.9. Perspectivas	69
VII. CONCLUSIONES	71
VIII. REFERENCIAS	72

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Concentración de proteínas totales de plasma de macho de <i>C. mydas agassizii</i> después de la inducción con 17 β -estradiol	32
Figura 2. Respuesta a la inducción hormonal con 17 β -estradiol en plasma de macho de <i>C. mydas agassizii</i> visualizado por electroforesis en gel de poliacrilamida (PAGE) al 6%.....	33
Figura 3. PAGE (6%) de plasma de macho antes y después de la inducción hormonal. Tinción con negro de Sudán para lípidos (a) y tinción con ácido periódico-Shift para glúcidos (b)..	34
Figura 4. PAGE (7%) de proteínas del plasma inducido precipitadas con MgCl ₂ /EDTA ..	35
FFigura 5. Perfil de elución del plasma de macho inducido separado por cromatografía de filtración en gel de Sepharosa.....	35
Figura 7. Perfil de elución de la cromatografía DEAE-1.	36
Figura 8. PAGE (6%) de los resultados de la cromatografía DEAE-1	37
Figura 9. Perfil de elución de la cromatografía DEAE-2.	37
Figura 10. PAGE (6%) de los resultados de la cromatografía DEAE-2.....	38
Figura 11. Perfil de elución del plasma control e inducido de <i>C. mydas agassizii</i> , separado por cromatografía de intercambio iónico (DEAE-3).	39
Figura 12. PAGE (6%) de los resultados de la cromatografía DEAE-3.....	39
Figura 13. SDS-PAGE (10%) de plasma control e inducido de <i>C. mydas agassizii</i>	40
Figura 14. SDS-PAGE (8%) de los resultados de la cromatografía DEAE-3.....	41
Figura 15. SDS-PAGE (8%) de las proteínas inducidas purificadas por electroelución....	43
Figura 16. Curva de titulación de los antisueros anti-VTG de <i>C. mydas agassizii</i> (Ac1, Ac3, Ac4).....	45
Figura 17. Curva de titulación del Ac2.....	46
Figura 18. Western Blot con el Ac2 (a) y Ac3 (b).....	47
Figura 19. Determinación de la concentración óptima de Ag:Ac a partir de la cual se generó la curva estándar.	48

Figura 20. Curva estándar para la cuantificación de VTG de <i>C. mydas agassizii</i>	49
Figura 21. Curvas paralelas generadas a partir de distintas diluciones de plasma inducido y vitelogenina pura.....	50
Figura 22. Evaluación del efecto matriz en diferentes diluciones de plasma inducido.....	51
Figura 23. Reacción cruzada con plasma inducido de <i>C. caretta</i> y <i>E. imbricata</i>	52
Figura 24. Western Blot del plasma de <i>C. caretta</i> y <i>E. imbricata</i>	53
Figura 25. Concentración de VTG en plasma de macho de <i>C. mydas agassizii</i> inducida hormonalmente con E ₂	54

LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Contenido de las inyecciones aplicadas de acuerdo al peso de los organismos. ..	19
Tabla 2. Calendario de inducción y colecta de sangre de los machos en cautiverio.	20
Tabla 3. Calendario de inmunizaciones y sangrado de los conejos.....	26
Tabla 4. Secuencia de aminoácidos de la porción N-terminal y péptidos internos de las fracciones de 200 y 116 kDa.....	42
Tabla 5. Alineamiento de la secuencia de la porción N-terminal de VTG (200 kDa) de <i>C. mydas agassizii</i> con VTG de otras especies de vertebrados.....	43

LISTA DE ABREVIATURAS

Ac	Anticuerpo
Ag	Antígeno
°C	Grados Celsius
CV	Coefficiente de variación
DDE	Dicloro-difenil-dicloroetileno
DDT	Dicloro-difenil-tricoloroetano
DEAE	Dietil-aminoetil
dH₂O	Agua destilada
E₂	17β-estradiol
EDC	Compuesto endócrino alterante (siglas en inglés)
ELISA	Ensayo inmunoabsorbente ligado a enzima (siglas en inglés)
<i>et al.</i>	y colaboradores (abreviación en latín)
g	Gramo
HPLC	Cromatografía líquida de alta resolución (siglas en inglés)
kDa	Kilodaltones
kg	Kilogramo (s)
M	Concentración molar
mA	Miliamperios
mg	Miligramo (s)
µg	Microgramo (s)
min	Minuto (s)
ml	Mililitro (s)
mM	Concentración milimolar
ng	Nanogramo (s)
nm	Nanómetro (s)
PAGE	Electroforesis en gel de poliacrilamida (siglas en inglés)
PCB	Bifenilos policlorados
pH	Potencial de hidrógeno
PMSF	Fluoruro de fenilmetilsulfonilo (siglas en inglés)
RIA	Radioinmunoensayo (siglas en inglés)
SDS	Dodecil sulfato de sodio (siglas en inglés)
SDS-PAGE	Electroforesis en geles de poliacrilamida en condiciones desnaturalizantes (siglas en inglés)
V	Voltios
VTG	Vitelogenina

I. INTRODUCCIÓN

En la actualidad, existen siete especies de tortuga marina, de las cuales seis se distribuyen en océanos y costas mexicanas. La tortuga verde del Pacífico este, *Chelonia mydas agassizii*, es considerada como una subespecie de *Chelonia mydas* y es conocida localmente como negra o prieta. Esta especie se distribuye desde las costas de California, E.U.A. hasta Perú, teniendo zonas de concentración importantes en el Golfo de California y costas de Michoacán, en México. Por muchos años la tortuga prieta fue una importante pesquería para los pueblos costeros del país cuya importancia creció de tal manera, que en la actualidad y debido a la sobrepesca, la pesca incidental y la pesca ilegal, la especie se encuentra en peligro de extinción.

Evidentemente la sobreexplotación ha sido una de las principales causas del decremento de esta especie, por lo que desde hace varios años se han realizado grandes esfuerzos de conservación para frenarlo. Sin embargo, hasta la fecha no se ha podido recuperar esta especie, por lo que probablemente existan otros factores que estén contribuyendo al decremento de sus poblaciones.

En los últimos años, la cantidad de desechos que se vierten a los océanos y costas, tanto industriales como domésticos, ha aumentado en gran medida. Esta contaminación no solamente ha deteriorado el hábitat de la tortuga marina, sino que también podría estar comprometiendo su desempeño fisiológico. Los contaminantes que han recibido mayor atención por sus efectos en la fauna silvestre, son los compuestos endócrino alterantes (EDC's, por sus siglas en inglés), que son sustancias capaces de alterar la función normal del sistema endócrino. Dentro de estos EDC's se encuentran los xenoestrógenos, los cuales poseen la habilidad de mimetizar la acción de diversas hormonas, particularmente el 17 β -estradiol, razón por la cual causan efectos severos en el sistema reproductivo. Un ejemplo de compuestos xenoestrogénicos son los insecticidas, herbicidas, derivados plásticos, PCB's (policlorados bifenilos) y metales pesados, entre otros.

La tortuga marina, debido a su comportamiento altamente migratorio y a la diversidad en el uso de hábitats, puede estar expuesta a una gran cantidad de sustancias xenoestrogénicas a lo largo de su ciclo de vida.

Para la detección de xenoestrógenos en organismos silvestres se requiere el uso de biomarcadores que produzcan respuestas específicas y predecibles a un estímulo estrogénico. La vitelogenina (VTG) es una fosfo-glico-lipo-proteína que se sintetiza en todos los vertebrados ovíparos, siendo los estrógenos el principal estímulo para su síntesis y secreción. Esta producción está restringida a hembras adultas. Sin embargo, la producción de VTG puede ser inducida en machos y hembras inmaduras por la exposición a xenoestrógenos. Estas características han hecho de la vitelogenina un buen biomarcador para detectar la exposición de organismos a compuestos xenoestrogénicos.

El presente trabajo pretende caracterizar parcialmente la vitelogenina de *C. mydas agassizii* y desarrollar un ensayo inmunoenzimático (ELISA), que permita cuantificar de manera específica y sensible los niveles de esta proteína en plasma de tortuga marina. Este ensayo puede ser utilizado como una herramienta para predecir la exposición de la tortuga a sustancias que pudieran estar afectando su desempeño reproductivo, contribuyendo así al decremento poblacional de la especie. Entre las principales ventajas de este tipo de ensayos en los que se utilizan biomarcadores se encuentran el ser sencillos de realizar, económicos y que requieren muestras no destructivas. Además, la detección de un biomarcador no solamente nos revela la exposición al tóxico, sino también un efecto del mismo.

El empleo de este ensayo como parte de un programa de valoración del estado de salud de la tortuga prieta *C. mydas agassizii*, podría contribuir al entendimiento de los factores que están influyendo en la lenta recuperación de esta especie, a pesar de los grandes esfuerzos de conservación que se han realizado desde hace varios años y podría dar una pauta para atacar el problema desde otra perspectiva.

II. ANTECEDENTES

2.1. Tortugas marinas

Las tortugas marinas pertenecen al grupo más antiguo de reptiles. Según el registro fósil, hicieron su aparición hace aproximadamente 200 millones de años, durante el periodo Jurásico (Márquez, 2002). Las tortugas marinas, como todos los reptiles, son organismos vertebrados de respiración pulmonar, poiquilothermos, con ciertos mecanismos metabólicos y de conducta que ayudan a la regulación térmica. Son organismos de lento crecimiento y maduración tardía. Son ovíparos, es decir su reproducción es por medio de huevos con cáscara calcificada, los cuales se conocen como del tipo amniota por poseer diferentes envolturas o membranas embrionarias (Márquez, 2002). La determinación sexual es dependiente de la temperatura, lo cual quiere decir que la proporción de sexos estará dada por condiciones ambientales responsables de disparar mecanismos hormonales que determinarán la diferenciación gonádica del embrión en desarrollo (Crews *et al.*, 1995; Wibbels, 2003).

A diferencia del resto de los reptiles, las tortugas marinas pasan su vida entera en ambientes marinos o estuarinos, saliendo a tierra únicamente para desovar. Por esta razón, estos quelonios han desarrollado adaptaciones morfológicas, fisiológicas y etológicas que le han permitido sobrevivir en este ambiente (Musick y Limpus, 1997). Dentro de las características morfológicas más notorias destacan la reducción de material óseo en el caparazón que les da mayor ligereza, además de que su forma mejora su eficacia hidrodinámica. Sus miembros están modificados en forma de aletas o remo ya que poseen falanges elongadas en las que las articulaciones móviles se han perdido, lo que impide la flexión y le da rigidez, esto les permite un fácil desplazamiento en el mar (Pritchard, 1997; Meylan y Meylan, 2000).

2.1.1. Migraciones y utilización del hábitat

La distribución geográfica de las tortugas marinas es muy amplia, siendo esta principalmente pantropical, habitando prácticamente todas las cuencas marinas alrededor

del mundo (Meylan y Meylan, 2000). Todas las especies presentan un comportamiento migratorio durante diferentes fases de su desarrollo, por lo que las migraciones están asociadas con el ciclo de vida. Gracias a la facilidad del marcaje de las hembras adultas en las playas de anidación, las migraciones con fines reproductivos que éstas realizan entre los sitios de alimentación y los de anidación son los mejor documentados. De esta forma, se conocen travesías que alcanzan varios miles de kilómetros (Resendiz *et al.*, 1998; Meylan y Meylan, 2000; Plotkin, 2003). También se considera como movimiento migratorio el traslado estacional que realizan en busca de alimento (Meylan y Meylan, 2000). En años recientes el estudio de las migraciones se ha visto enriquecido por el empleo de herramientas como la telemetría satelital, que permite conocer el curso real del recorrido (Papi *et al.*, 2000; Wallace *et al.*, 2000) y la genética molecular, que ha permitido identificar las colonias de origen de tortugas capturadas en mar abierto (Bowen *et al.*, 1995).

Debido a estos movimientos migratorios que realizan durante su ciclo de vida, las tortugas marinas utilizan hábitats muy variados, abarcando una gran diversidad de ecosistemas. De esta manera, hacen uso de hábitats terrestres, en donde tiene lugar la oviposición y el desarrollo embrionario, así como de hábitats marinos, donde llevan a cabo su desarrollo y alimentación, ya sea en aguas costeras (zona nerítica) o en mar abierto (zona pelágica) (Bolten, 2003).

2.1.2. Taxonomía

Existen en la actualidad siete especies de tortugas marinas las cuales se clasifican dentro de la clase de los reptiles, subclase Anápsida, orden Testudines y suborden Cryptodira. Éste último, se divide en dos familias: Dermochelyidae, cuyo único representante es *Dermochelys coriacea*, conocida como laúd o siete filos. La segunda familia es Cheloniidae, que agrupa a las seis especies restantes, golfina (*Lepidochelys olivacea*), lora (*Lepidochelys kempii*), carey (*Eretmochelys imbricata*), kikila o aplanada (*Natator depressus*), amarilla o caguama (*Caretta caretta*) y tortuga verde (*Chelonia mydas*) (Pritchard, 1997; Meylan y Meylan, 2000; Pritchard y Mortimer, 2000; Márquez, 2002)

Una octava especie, la tortuga prieta del Pacífico Este, *Chelonia mydas agassizii*, es reconocida como especie independiente por algunos autores tomando en cuenta datos de morfología (color, tamaño, estructuras craneales) y comportamiento, además del aislamiento geográfico (Pritchard, 1997 y 1999; Pritchard y Mortimer, 2000; Alvarado *et al.*, 1990). Sin embargo, investigaciones recientes basadas en estudios de sistemática molecular (secuenciación ADN nuclear y mitocondrial), exhiben resultados contradictorios que ponen en duda la separación de ésta como una especie independiente (Bowen y Karl, 1997; Karl y Bowen, 1999). Tomando en cuenta que este debate aun no concluye, en el presente trabajo se le considerará como *C. mydas agassizii*, una subespecie de *C. mydas*.

2.2. Tortuga prieta, *Chelonia mydas agassizii* (Bocourt, 1868)

2.2.1. Distribución

La tortuga verde del Pacífico Este, *C. mydas agassizii* conocida localmente como negra o prieta, se distribuye a lo largo de la costa del Pacífico este, desde California, E.U.A. hasta Perú y las Islas Revillagigedo (México), con áreas importantes de concentración en el Golfo de California y costas de Michoacán (México), Golfo de Fonseca (Salvador, Honduras, Nicaragua), Islas Galápagos (Ecuador) y en la península de Paracas (norte de Perú). Estas áreas de concentración se conocen como importantes zonas de alimentación y desarrollo (Clifton, 1995). Desde estas zonas, la tortuga prieta hace importantes migraciones de hasta 30,000 km hasta sus principales playas de anidación, las cuales se localizan en el estado de Michoacán (Maruata y Colola), aunque también hay reportes de anidaciones en las islas Revillagigedo, las islas Galápagos, el Golfo de Fonseca y la isla de Cañas, Panamá (Márquez, 2002; Clifton, 1995), también anidan en Costa Rica (Valverde, comp. pers).

2.2.2. Pesquería

En los aspectos histórico, económico y alimenticio, las tortugas marinas, incluyendo a la tortuga prieta, han tenido gran importancia regional y forman parte de la cultura de varios

pueblos costeros del país, en donde además de tener valor cultural, mágico y religioso, forman o formaron parte esencial de su dieta. A principios de este siglo, la explotación comercial de las tortugas marinas en México se mantuvo bajo un mínimo desarrollo, limitándose casi exclusivamente al consumo local (Clifton, 1995; Márquez, 2002).

Sin embargo, a partir de la segunda mitad de este siglo la importancia económica de las tortugas marinas aumentó rápidamente, de tal manera que en los años sesenta constituyeron una importante pesquería ribereña. En México, la captura de tortugas marinas se desarrolló de tal manera que durante casi dos décadas (1965-1982) contribuyó con más de la mitad de la producción mundial (Márquez, 2002).

2.2.3. Situación actual

Hoy en día, todas las especies de tortuga marina en el mundo están consideradas como amenazadas o en peligro de extinción, por lo que sin excepción se encuentran incluidas en el Apéndice I de los acuerdos del CITES (Convención Internacional para el Comercio de Especies de Flora y Fauna Silvestre Amenazada).

En el caso de la tortuga prieta, datos provenientes de sus zonas de anidación han mostrado un gran decremento en sus poblaciones en los últimos 30 años, donde en los años 60-70's de 500-1000 hembras llegaban a anidar en la playa de Colola por noche, para 1981 esta cifra decayó a 2000 hembras por año y más aun de 1983 a 1993 un promedio de alrededor de 500 hembras anidaban cada año, con cifras tan bajas como la registrada en 1988 de 100 hembras por año (Alvarado-Díaz, 2001, Clifton *et al.*, 1995). Es por esto que, según el criterio de clasificación de la UICN (Unión Internacional para la Conservación de la Naturaleza), esta tortuga está enlistada como “especie en peligro de extinción” (National Marine Fisheries Service and U.S. Fish and Wildlife Service 1998). De la misma forma, la NOM-059-ECOL-2001 la clasifica en la misma categoría (Diario Oficial de la Federación 2002).

Indudablemente, ciertas actividades humanas han sido la causa de este colapso, ya que por su amplia distribución geográfica, sus hábitos y características biológicas, son altamente vulnerables en todas sus fases de desarrollo. Las amenazas que esta especie enfrenta en la

actualidad, además de sus depredadores naturales, son la captura comercial, el saqueo de sus nidos, la explotación ilegal de adultos y la pesca incidental (Lutcavage *et al.*, 1997; Marcovaldi y Thomé, 2000; Márquez, 2002). Durante los últimos 20 años, se han desarrollado diversas estrategias para la recuperación de esta especie, incluyendo actividades de conservación y de investigación especialmente en zonas de anidación en el estado de Michoacán. Sin embargo, estos esfuerzos no han sido suficientes, ya que, si bien el número de hembras anidando ha ido en aumento en los últimos años, la población de tortuga prieta no ha alcanzado sus niveles históricos (Alvarado-Díaz *et al.*, 2001). Es claro entonces que, además de la alta depredación humana, existen factores alternos que están afectando gravemente a las tortugas, impidiendo la recuperación de la especie.

La descarga de desechos y contaminantes no biodegradables que se están vertiendo a los océanos y costas, ha ido en aumento a lo largo de los años. Existe una gran diversidad de contaminantes que son arrojados al ambiente como desechos agrícolas, industriales y domésticos. Éstos, además de estar deteriorando el hábitat natural de las tortugas, podrían estar afectando su desempeño fisiológico (Lutcavage *et al.*, 1997; Márquez, 2002).

2.3. Compuestos Endócrino Alterantes (EDC)

Desde hace varios años, se han acumulado evidencias que sugieren que muchos contaminantes ambientales pueden afectar la reproducción, crecimiento y sobrevivencia de los organismos al alterar la función normal del sistema endócrino (Campbell y Hutchinson, 1998; Crain *et al.*, 2000). Estos contaminantes son los llamados compuestos endócrino-alterantes o EDCs, por sus siglas en inglés. Estos compuestos han sido definidos como agentes exógenos que interfieren con la producción, liberación, transporte, metabolismo, función o eliminación de hormonas naturales en el cuerpo, las cuales son responsables del mantenimiento de la homeostasis y de la regulación de procesos de desarrollo (Kavlok y Datson, 1996; Crain *et al.*, 2000). Por otro lado, Ankley *et al.*(1998) los define como sustancias exógenas que pueden alterar el funcionamiento del sistema endócrino de un organismo y por consiguiente su salud o la de su progenie.

Los compuestos endócrino alterantes pueden actuar de diversas formas. Melachlan (2001), los resume de la siguiente manera:

1. Mimetizando el efecto de las hormonas al unirse a receptores intracelulares específicos y de esta forma: a) producir una respuesta normal o similar, o bien, aumentar o disminuir esta respuesta. A estos compuestos se les conoce como agonistas, b) bloquear el receptor inhibiendo por completo la respuesta celular, por lo que se les llama antagonistas y c) provocar una respuesta totalmente diferente.
2. Modificando la síntesis y función de los receptores hormonales.
3. Modificando la síntesis, transporte y excreción de las hormonas.
4. Transmitiendo mensajes moleculares a través de complejos proteicos que indirectamente activan la expresión de ciertos genes o alteran la división celular.

2.3.1. Xenoestrógenos

Los compuestos endócrino alterantes mayormente estudiados son aquellos químicos que mimetizan la acción de los estrógenos, ya que tienen la capacidad de unirse a receptores estrogénicos e iniciar respuestas similares a aquellas producidas por la hormona 17 β -estradiol (E_2). Este efecto agonista se da a pesar de tener estructuras moleculares tan diversas entre ellos y tan diferentes a los estrógenos. Debido a esto, son llamados xenoestrógenos, ecoestrógenos o estrógenos ambientales (Gillesby y Zacharewski, 1998; Palmer *et al.*, 1997; Jones *et al.*, 2000; Brion *et al.*, 2002).

Los estrógenos juegan un papel muy importante en la reproducción de las tortugas ya que regulan importantes procesos en las hembras, como el crecimiento y desarrollo del tracto reproductivo, el desarrollo de características sexuales secundarias y el ciclo estral. Alguna alteración en cualquiera de estos procesos puede causar severos efectos en la eficiencia reproductiva de un organismo (Palmer *et al.*, 1997).

Existe una gran cantidad de compuestos que pueden actuar como xenoestrógenos. Ejemplos de estos compuestos son:

- Fitoestrógenos (genistein, coumestrol)
- Herbicidas (alachlor, atrazine, noitrofen)
- Insecticidas (DDT, lindano, endosulfan, dieldrin, toxafen)
- Fungicidas (benomyl, mancozeb, tributyltin)
- Compuestos policlorobifenilos (PCB's)
- Dioxinas
- Plásticos (ftalatos)
- Metales pesados (plomo, mercurio, cadmio)
- Productos domésticos (detergentes y surfactantes)
- Productos farmacéuticos (dietilbestrol, etinilestradiol)
- Desechos industriales y domésticos, donde pueden existir mezcla de estos compuestos (DeRosa *et al.*, 1998; Jones *et al.*, 2000).

En contraste con los estrógenos naturales y fitoestrógenos, los xenoestrógenos no se pueden degradar o son difíciles de degradar, pudiendo ser aun más tóxicos sus metabolitos. Además, tienen un periodo de vida largo, permaneciendo en el ambiente (aire, suelo y agua) y en los organismos por varios años. Asimismo, tienen la capacidad de almacenarse en grasa y en tejido muscular, es decir, se pueden bioacumular y por lo tanto biomagnificar a lo largo de la cadena trófica (Facemire, 2000).

Estas características han provocado que, a pesar de que el uso de varios de estos compuestos haya sido prohibido desde hace varios años, éstos y sus metabolitos permanezcan en el ambiente, incluso en zonas donde nunca han sido utilizados, ya que se pueden trasladar de un lado a otro por medio del aire, agua y de los mismos animales (Zhu y Norstrom, 1994; Facemire, 2000).

Los efectos que este tipo de compuestos tienen sobre una gran variedad de organismos han sido bien documentados, existiendo evidencia en varios grupos de animales. En invertebrados, se ha observado malformación del tracto reproductivo en moluscos y langostas, inducción de vitelogenina en cangrejos y otros decápodos, así como efectos en el asentamiento y desarrollo de larvas de balanos (Depledge y Billingham, 1999). En anfibios se ha demostrado inducción de vitelogenina en respuesta a la exposición de varios compuestos como toxaphene, dieldrin, endosulfan, dietilbestrol y DDT (Palmer y Palmer, 1995; Palmer *et al.*, 1997). Al exponer a larvas de *Xenopus laevis* durante su desarrollo a compuestos como nonylphenol y estradiol se encontró una tasa de sexos sesgada donde la mayoría eran fenotipos femeninos (Kloas *et al.*, 1999). Quizá, el grupo de los peces sea el que mayormente se ha estudiado. Entre los efectos de compuestos xenoestrogénicos están: inducción de vitelogenina y muerte celular en hepatocitos de *Ameiurus nebulosus* (Holland *et al.*, 1999), inducción de VTG y reducción en los niveles de esteroides en *Cyprinus carpio* y *Stizostedion vitreum* capturados cerca de un planta de tratamiento de aguas negras (Folmar *et al.*, 1996 y 2000). También se han encontrado ovocitos en testículos, al igual que un incremento de VTG en plasma de *Platichthys flesus* colectados en un estuario contaminado por fábricas de gas y aceite (Allen *et al.*, 1999). Además, la exposición de *Fundulus heteroclitus* a mercurio provocó severos efectos en las crías, tales como una tasa de sexos sesgada y una reducción en el éxito reproductivo (Matta *et al.*, 2001). En aves se ha observado un adelgazamiento del cascarón del huevo y por lo tanto una alta mortalidad de las crías provocado por la exposición de pelícanos a PCB's. También se ha reportado un bajo éxito reproductivo en gaviotas expuestas a DDT, ya que se ha encontrado proporción de sexos sesgada (3.85 hembras por cada macho), así como malformación del aparato reproductivo en machos (Fry y Toone, 1981). Para el grupo de los reptiles está el caso de los caimanes del lago Apopka en Florida, que se vieron expuestos a altas concentraciones de DDT, DDE y otros compuestos después de un derrame químico. Esta exposición resultó en feminización de machos así como niveles de testosterona reducidos. En hembras se encontraron niveles de vitelogenina que doblaban la cantidad normal, además de malformaciones en el aparato reproductivo en ambos sexos (Guillette, 1994).

En especial, algunos reptiles como las tortugas y cocodrilos son más susceptibles a este tipo de sustancias, ya que su determinación sexual es dependiente de la temperatura. Esta susceptibilidad, se debe al papel tan importante que tienen los estrógenos y andrógenos durante el desarrollo gonadal en el embrión y que se disparan de acuerdo a condiciones ambientales. Si algún compuesto capaz de mimetizar la acción de estas hormonas está presente ocurre una feminización o masculinización de la mayoría de los embriones en desarrollo y, de esta forma, una tasa de sexos sesgada al exponer los huevos a alguna clase de xenobiótico como los PCB's, lo que se ha visto en crías de tortugas de agua dulce y caimanes (Crews *et al.*, 1995; Guillete *et al.*, 2000).

Es por esto que el impacto que estos contaminantes tienen sobre el éxito reproductivo de los organismos, debe ser considerado crítico especialmente en especies en peligro de extinción como la tortuga prieta.

2.4. Biomarcadores

Cuando los organismos son altamente migratorios, como es el caso de las tortugas marinas, se torna difícil predecir si han sido expuestos a contaminantes, al menos que se analicen directamente sus tejidos. Esto es debido a que el lugar donde han sido colectados no necesariamente está recibiendo una descarga directa de desechos químicos. Este tipo de análisis, al mismo tiempo que son muy costosos, requieren de muestras de tejidos como hígado, músculo o riñón los cuales únicamente se pueden obtener de organismos muertos. Además, si el contaminante en cuestión es detectado en el organismo, es difícil de determinar la relevancia de esta presencia si no se tiene un amplio conocimiento de la toxicología del compuesto (Tillit *et al.*, 1998).

Esto ha llevado al desarrollo de una serie de bioensayos de dosis-respuesta, que han permitido la obtención de información de los efectos que ciertos contaminantes inducen en un organismo. A estas respuestas inducidas ya sean bioquímicas, fisiológicas o histológicas se les conoce como indicadores biológicos, bioindicadores o biomarcadores (Tillit *et al.*, 1998). Un biomarcador ideal será aquel que no sólo demuestre la presencia del compuesto en los tejidos, sino que también demuestre un efecto biológico. Al mismo tiempo, éste

debe responder a dosis bajas ya que de ésta forma se pueden predecir efectos letales o irreversibles (Palmer y Palmer, 1995; Tillit *et al.*, 1998).

El método óptimo para detectar la presencia de un xenoestrógeno en un organismo silvestre es utilizando biomarcadores en ensayos que sean económicos y sensibles. Un ensayo de esta naturaleza debe contar con las siguientes características: a) requerir muestras pequeñas y de fácil obtención (no destructivas), b) medir una respuesta fisiológica a un amplio espectro de xenoestrógenos, c) medir una respuesta a través de rutas bioquímicas conocidas y d) ser cuantitativo (Palmer y Palmer, 1995; Ankley *et al.*, 1998).

En el caso de los xenoestrógenos se requieren de biomarcadores que respondan específica y predeciblemente a un estímulo estrogénico. Una de las respuestas más importantes y sensibles a este tipo de estímulos es la inducción de la expresión de ciertas proteínas, como la vitelogenina (Palmer y Palmer, 1995; Palmer *et al.*, 1997).

2.5. Vitelogenina

La vitelogenina (VTG) es la molécula precursora del vitelo. Es una proteína muy importante ya que la nutrición del embrión en desarrollo se basa en los compuestos energéticos derivados de ella, los cuales son incorporados a los folículos en crecimiento que más tarde constituirán el vitelo del huevo. La VTG se sintetiza en todos los vertebrados ovíparos y se ha clasificado como una fosfo-glico-lipo-proteína, ya que transporta importantes cantidades de material lipídico (principalmente triglicéridos), carbohidratos y grupos fosfato (Gapp *et al.*, 1979; Ho *et al.*, 1982; Gavaud, 1986; Carnevali y Belvedere, 1991; Jones *et al.*, 2000; Hamman *et al.*, 2003).

La VTG también es una proteína acarreadora de calcio, esto debido a que su presencia facilita la solubilidad de esta proteína tan compleja en el plasma. Además, como el calcio se une a la VTG en regiones que más tarde se convertirán en fosfovitas, también posee la función de nutriente para el embrión en desarrollo (Vargas, 2000).

Los estrógenos (17 β -estradiol) son el principal estímulo para la síntesis y secreción de VTG, la cual está normalmente restringida a hembras adultas durante la maduración folicular antes de la ovulación. Por lo tanto, durante esta etapa las hembras poseen cantidades elevadas de VTG (Ho *et al.*, 1982, Hamman *et al.*, 2003), por lo que sus niveles son un indicador de maduración y estado reproductivo (Mañanós *et al.*, 1994).

El proceso de síntesis de VTG se da de la siguiente manera: el 17 β -estradiol es producido en el ovario como una respuesta a gonadotropinas. El estradiol es liberado al torrente sanguíneo para ser transportado al hígado por proteínas sanguíneas específicas (Gapp *et al.*, 1979; Ho *et al.*, 1982, Gavaud, 1986). Los hepatocitos poseen proteínas de ligado o receptores altamente específicos al 17 β -estradiol; la unión de los estrógenos con el receptor promueven la síntesis de mRNA y subsecuentemente la síntesis de VTG. Una vez sintetizada la VTG tiene que pasar aún por una serie de modificaciones postraduccionales, hasta alcanzar la forma final que es vertida al torrente sanguíneo. Es decir, en pasos subsecuentes de los que aún no se tiene suficiente información para reptiles, la VTG es lipidada, glicosilada y fosforilada para su exportación hacia los ovarios por el torrente sanguíneo (Ho *et al.*, 1982; Wang y Williams, 1982). El ovocito en desarrollo toma la VTG y por medio de diversos procesos proteolíticos la transforma en lipovitelina y fosfovítina, que constituyen la fuente de nutrientes del embrión en desarrollo (Palmer *et al.*, 1997).

Estudios recientes con anfibios, peces y reptiles han sugerido que el papel de los estrógenos como principal estímulo en la inducción y regulación de la síntesis de VTG podría estar influenciada por otros esteroides como estrona o glucocorticoides, hormonas tiroideas y hormona del crecimiento. No se sabe si estos cofactores actúan en la inducción del receptor, expresión génica y/o en modificaciones post-transcripcionales (Gavaud, 1986).

En tortugas se han realizado estudios de purificación y caracterización de VTG en los que se muestra como una proteína relativamente estable. Aparentemente, la VTG está compuesta por dos polipéptidos de igual tamaño teniendo un peso molecular aproximado

entre 210 y 220 kDa (Gapp *et al.*, 1979; Selcer y Palmer, 1995; Heck *et al.*, 1997; Irwin *et al.*, 2001; Herbst *et al.*, 2003). Su peso molecular se estima alrededor de los 400-500 kDa en estado nativo, circulando en el torrente sanguíneo como un homodímero (Heck *et al.*, 1997).

Poco se sabe del gen o los genes involucrados en la vitelogénesis. En invertebrados la VTG está codificada por una familia de genes como en la mosca de la fruta, *Drosophila melanogaster* (Hovemann *et al.*, 1981). En vertebrados, para *Xenopus laevis* se conocen cuatro genes que dan lugar a tres formas de VTG de 197, 188 y 182 kDa respectivamente (Carnevalio y Belvedere, 1991). Para *Gallus gallus* tres diferentes VTG han sido purificadas y sus respectivos genes aislados (Wang y Williams, 1982).

En tortugas marinas probablemente existan diferentes formas de VTG e incluso pueden existir varios genes involucrados en su expresión y síntesis, tal como ha sido demostrado para anfibios, peces, aves y otros reptiles. Sin embargo, hasta ahora no existen estudios en tortugas marinas que hayan caracterizado diferentes formas de VTG o los genes involucrados en su producción.

En años recientes se descubrió que la producción de vitelogenina puede ser inducida en machos y en hembras inmaduras de varios vertebrados por la exposición a estrógenos ambientales o xenoestrógenos (Heppell *et al.*, 1995; Allner *et al.*, 1999; Cheek *et al.*, 2001; Brasfield *et al.*, 2002, Hamman *et al.*, 2003). Una característica que poseen estos compuestos es su inherente capacidad de unión con el receptor de estrógenos en el hígado y estimular la transcripción de ciertos genes. Se sabe que tanto los machos como los organismos juveniles expresan el receptor de estrógenos en el hígado al igual que la maquinaria genética que se requiere para la síntesis de esta proteína. De esta forma, tanto machos como juveniles son capaces de producir niveles cuantificables de VTG cuando son expuestos a compuestos xenoestrogénicos (Gillesby y Zacharewski, 1998; Jones *et al.*, 2000).

2.5.1. Métodos para detectar y cuantificar VTG

La valiosa información que se puede obtener al detectar y medir los niveles de VTG ha llevado a utilizar varios métodos para su detección y cuantificación. Se han empleado métodos electroforéticos utilizando densitometría para detectar y determinar cualitativamente la presencia de VTG (Allner *et al.*, 1999). También existen métodos no específicos que miden los niveles de VTG, como por ejemplo, la cuantificación de fósforo o calcio total en suero (Heck *et al.*, 1997; Kramer *et al.*, 1998; Brasfield *et al.*, 2002). Estos métodos son relativamente sencillos de realizar y son baratos, ya que no se requiere de reactivos muy especializados. Sin embargo, se sabe que los niveles de estos parámetros no representan niveles reales de vitelogenina (Jones *et al.*, 2000).

Los métodos inmunoquímicos son los más utilizados y varían desde radioinmunoensayos (RIA) o ensayos inmunoenzimáticos como ELISA y Western blotting. Los dos primeros permiten la cuantificación de VTG mientras que el Western blotting únicamente permite determinar su presencia (Jones *et al.*, 2000). Estos métodos se basan en el uso de anticuerpos específicos anti-VTG por lo que generalmente no existe interferencia con otras proteínas. Una alta especificidad, particularmente generada con anticuerpos monoclonales, reduce la aplicabilidad del ensayo pudiendo ser incluso hasta especie-específico. Sin embargo, los anticuerpos policlonales, pueden ser utilizados para detectar VTG de especies cercanas, ampliando el rango de utilidad del ensayo (Jones *et al.*, 2000).

En años recientes, el ELISA ha sido el método preferido para la cuantificación de VTG ya que ofrece ciertas ventajas sobre el RIA: es un ensayo con un protocolo relativamente sencillo y fácil de validar, no utiliza compuestos radioactivos (lo que lo hace ser más económico y accesible), requiere de un bajo número de instrumentos y de cantidades de muestra muy pequeña (no destructiva), pero sobre todo, es un ensayo muy sensible, arrojando datos generalmente dentro del rango de ng/ml. Por estas razones el ELISA es el método más adecuado para realizar cuantificaciones de VTG en fauna silvestre (Specker y Anderson, 1994; Jones *et al.*, 2000).

2.6. Ensayo inmunoenzimático (ELISA)

Los ensayos inmunoenzimáticos (ELISA), son de las técnicas inmunoquímicas más poderosas. Estos emplean una gran variedad de métodos para detectar y cuantificar antígenos (Ag) o anticuerpos (Ac). Con el protocolo apropiado, este ensayo, puede ser muy rápido y fácil de realizar obteniendo información que sería difícil de determinar por medio de otra técnica. Existe una gran variedad de ELISA's, los cuales se pueden clasificar bajo distintos criterios (Harlow y Lane, 1988). En el presente trabajo se clasifican de acuerdo a la dinámica que se genera entre el antígeno y anticuerpo:

Se dice que un ELISA es directo, cuando la enzima esta acoplada directamente al primer anticuerpo dirigido al Ag a cuantificar, existiendo de esta forma ELISA directo competitivo y no competitivo. Cuando éste hace uso de un segundo anticuerpo que se encuentra acoplado a una enzima (peroxidasa o fosfatasa alcalina) que reacciona con el sustrato cromogénico (diaminobenzidina o paranitrofenilfosfato), el ELISA es indirecto.

ELISA indirecto no competitivo. En este ensayo no existe competencia entre el antígeno por el anticuerpo, también se le conoce como ELISA de captura de anticuerpo, porque es el antígeno el que se adsorbe a la placa. Las ventajas del ELISA no competitivo es que no necesita pasos previos de incubación (de antígeno-anticuerpo) y además se requiere de poca cantidad tanto de antígeno como de anticuerpo (Specker y Anderson, 1994).

ELISA indirecto competitivo. Este ensayo se basa en la competición del Ag que es adsorbido a la placa y el Ag que anteriormente es incubado con el Ac. De tal manera, que al agregar esta solución antígeno-anticuerpo a la placa, el Ag adsorbido no desplazará al que inicialmente estaba unida al Ac, impidiendo su unión en la placa. Este tipo de ELISA es muy sensible y utiliza poca cantidad de anticuerpo. Sin embargo, la desventaja es que se requiere de grandes cantidades de Ag purificado (Specker y Anderson, 1994).

ELISA tipo sándwich. Este es el tipo de ELISA más sensible de los tres, porque detecta el Ag haciendo uso de dos anticuerpos dirigidos a distintos epitopes del Ag, por lo cual en este ensayo se puede obtener además una alta especificidad. Sin embargo el requerir de dos

diferentes anticuerpos, generalmente un Ac-policlonal y otro monoclonal o dos monoclonales dirigidos a diferentes epitopes, representa una desventaja (Specker y Anderson, 1994).

La medición de niveles de VTG en machos por medio de ELISA se ha establecido como una fuente informativa en la detección de impactos ambientales potenciales asociados a nuevas drogas, pesticidas y otras sustancias químicas que actúan como xenoestrógenos (Heppell *et al.*, 1995; Kendall *et al.*, 1998; Cheek *et al.*, 2001). Este potencial de la VTG como biomarcador ha sido ampliamente evaluado en varias especies de peces: *Cyprinus carpio* (Folmar *et al.*, 1996), *Pimephales promelas* (Giesy, 2000), *Oncorhynchus mykiss* (Christiansen *et al.*, 2000; Tyler *et al.*, 2002) y *Danio rerio* (Brion *et al.*, 2002). En anfibios se ha evaluado en *Xenopus laevis* (Palmer y Palmer, 1995; Palmer *et al.*, 1997) y por último en reptiles para *Trachemys scripta* (Palmer y Palmer, 1995), *Chrysemys picta* (Irwin *et al.*, 2001) y *Sceloporus occidentales* (Brasfield *et al.*, 2002). Resultando en todos un ensayo confiable y sensible para predecir la exposición de los organismos a cierto tipo de contaminantes con capacidad xenoestrogénica.

III. OBJETIVOS

3.1. Objetivo general

Caracterizar parcialmente la vitelogenina de *Chelonia mydas agassizii* y validar un ensayo inmunoenzimático (ELISA) para su detección en plasma como potencial biomarcador de xenoestrógenos.

3.2. Objetivos particulares

1. Inducir la síntesis de vitelogenina en machos de tortuga prieta, *C. mydas agassizii*.
2. Identificar, purificar y caracterizar parcialmente la vitelogenina en plasma de machos inducidos.
3. Producir anticuerpos policlonales anti-vitelogenina de tortuga prieta.
4. Caracterizar los anticuerpos policlonales anti-vitelogenina de tortuga prieta.
5. Estandarizar y validar el ensayo inmunoenzimático (ELISA) para la detección de vitelogenina en plasma.
6. Evaluar la reacción cruzada del anticuerpo generado con otras especies de tortuga marina (*E. Imbricata* y *C. caretta*).

IV. METODOLOGÍA

4.1. Inducción hormonal con 17 β -estradiol (E₂)

Con el propósito de obtener muestras de sangre que contuvieran una concentración adecuada de VTG para su posterior purificación, se indujo la vitelogenénesis en dos machos de tortuga prieta *C. mydas agassizii* mantenidos en cautiverio. El protocolo de inducción se tomó de Heck *et al.* (1997).

La inducción se llevó a cabo en la Estación de Conservación e Investigación en Bahía de los Ángeles, B.C., de la Subsecretaría de Gestión para la protección ambiental, dirección general de Vida Silvestre, SEMARNAT. Las tortugas se mantuvieron en estanques circulares de 8 m de diámetro con agua de mar y fotoperiodo natural, se alimentaron una vez al día con pastos marinos de la región. Los organismos inducidos fueron dos machos marcados como 850 (macho 1) y 989 (macho 2). Antes y después de la inducción se obtuvo el peso de los organismos. A cada macho se le aplicó una serie de inyecciones intramusculares en la masa muscular anterior de las aletas frontales, alternando el lado del cuerpo en cada aplicación. Se utilizaron jeringas de 5 ml y agujas de 1.5 pulgadas. Las inyecciones se aplicaron cada tercer día durante dos semanas, con una solución de 17 β -estradiol (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO) a una dosis de 1 mg/kg de peso. El estradiol se diluyó en etanol al 95% y aceite de maíz comercial. La cantidad aplicada en cada inyección se calculó de acuerdo al peso de los organismos (Tabla 1).

Tabla 1. Contenido de las inyecciones aplicadas de acuerdo al peso de los organismos.

Tortuga	Peso	E₂	Etanol	Aceite
Macho 1	56.62 kg	56.6 mg	2.3 ml	2.4 ml
Macho 2	36.24 kg	36.2 mg	2.3 ml	1.6 ml

Las muestras de sangre se tomaron del seno cervical bilateral con ayuda de un vacutainer de 10 ml sin anticoagulante. Para evitar la degradación proteolítica, inmediatamente se adicionaron aprotinina (1.5 mg/ml de sangre, Sigma) y fluoruro de fenilmetilsulfonilo (PMSF, 1 mM concentración final, Sigma). Para que los inhibidores de proteasas se mezclaran con el total de la sangre, el tubo se invirtió suavemente varias veces. Inmediatamente después, los tubos se centrifugaron a 890 x g durante 15 minutos para separar el plasma, el cual se almacenó en alícuotas de 100 μ l a -70°C o en nitrógeno líquido para su posterior análisis.

Se tomó una muestra de sangre antes de la inducción a manera de control y cuatro muestras más durante y después de la inducción. Las inyecciones y la toma de muestras se realizaron de acuerdo al calendario presentado en la Tabla 2.

Tabla 2. Calendario de inducción y colecta de sangre de los machos en cautiverio.

Día	Fecha, 2002	Actividad	Muestra
-1	Octubre 4	Toma de muestra	Control (-)
0	Octubre 5	Inyección de E ₂	
4	Octubre 9	Inyección de E ₂	
7	Octubre 12	Inyección de E ₂ y toma de muestra	I muestra
10	Octubre 15	Inyección de E ₂	
13	Octubre 18	Inyección de E ₂	
17	Octubre 21	Toma de muestra	II muestra
24	Octubre 28	Toma de muestra	III muestra
28	Noviembre 11	Toma de muestra	IV muestra
189	Junio 16, 2003	Toma de muestra	V muestra

4.2. Identificación de las proteínas inducidas

4.2.1. Determinación de proteínas totales

Para la determinación de proteínas totales en el plasma, se utilizó el método de Lowry *et al.* (1951). Las muestras del plasma tomadas del macho 1 se diluyeron 1:2000 en agua destilada (dH₂O) previamente esterilizada y como estándar se utilizaron concentraciones conocidas (100, 80, 60, 40, 20 y 10 µg/ml) de albúmina de suero bovino (BSA, Sigma). Se corrieron cuatro replicas tanto de la muestra del plasma como de la curva estándar.

4.2.2. Electroforesis en gel de poliacrilamida (PAGE).

El plasma control e inducido se visualizaron por PAGE en condiciones nativas en un gel de una dimensión y discontinuo (gel concentrador 4% y gel de separación 6%). El plasma, se diluyó 1:10 en dH₂O previamente esterilizada y se mezcló con glicerol 10% y azul de bromofenol, cargando 50 µg de proteínas totales por pozo. Para determinar el peso molecular aparente se incluyeron marcadores de peso molecular: tiroglobulina, 669 kDa; ferritina, 440 kDa; catalasa, 232 kDa; lactato deshidrogenasa, 140 kDa y albumina 66 kDa (HMWC Kit standard, Amersham Pharmacia Biotech, Piscataway, NJ). Las muestras se corrieron en un amortiguador de corrimiento nativo (Tris base 25 mM, glicina 192mM, pH 8.3) a 100 V y 4°C, hasta que el frente de corrimiento alcanzó el final del gel. Los geles se tiñeron con tres técnicas diferentes, azul de Coomassie R250 (Bio-rad Laboratories, Hercules, CA) para teñir proteínas, negro de Sudán para lípidos (Sigma) y PAS (Periodic acid-Shift) para glúcidos (Sigma), y de esta manera determinar la naturaleza glico-lipo-proteica de la proteína.

4.3. Purificación de las proteínas inducidas

4.3.1. Precipitación con MgCl₂/EDTA

La precipitación consiste en la conversión de proteínas solubles a un estado insoluble. Para esto es necesario alterar la solubilidad proteica lo que se puede lograr alterando las propiedades del solvente haciendo uso de sales. En esta ocasión se utilizó el protocolo

diseñado por Wiley *et al.* (1979), en el que se utiliza $MgCl_2$ y EDTA para la precipitación de vitelogenina, con algunas modificaciones.

A 200 μ l de plasma de machos tratados se agregaron lentamente 400 μ l de EDTA 20 mM pH 7.7, se agitó suavemente y se agregaron 64 μ l de $MgCl_2$ 0.5 M, se agitó nuevamente y se dejó reposar toda la noche. El precipitado se centrifugó a 2500 x g durante 15 minutos, se recuperó el botón de sedimento y se disolvió en 50 mM TRIS-HCl, 1 M NaCl. La solución obtenida se dializó en 25 mM tris-HCl pH 7.5 con membranas Spectra Por 1 (Spectrum laboratorios, Inc. E.U.A) y se analizó por PAGE (7%).

4.3.2. Cromatografía filtración en gel

Consiste en una matriz que separa las proteínas por su peso molecular. Al ser las dos proteínas inducidas de alto peso molecular, se utilizó esta columna como fase previa a la cromatografía de intercambio iónico para eliminar del plasma las proteínas de pesos moleculares pequeños.

Se inyectó plasma de macho tratado (200 μ l) diluido 1:3 en amortiguador de equilibrio (25 mM Tris-HCl pH 7.5, PMSF 1 mM) en una columna de filtración en gel Sepharosa CL-2B (71 x 2.6 cm, volumen=377 ml) con un rango de exclusión de 70,000 – 40,000,000. Se utilizó gradiente isocrático, un flujo de 0.25 ml/min y un volumen total de corrida de 650 ml. Se colectaron fracciones de 1 ml las cuales fueron leídas con luz ultravioleta a una longitud de onda de 280 nm durante toda la corrida. Los picos resultantes se concentraron con un rotor Centrivap (Labconco) y se analizaron por PAGE. La temperatura se mantuvo a 4°C durante todo el procedimiento.

4.3.3. Cromatografía intercambio iónico DEAE

Esta técnica ha sido muy utilizada en la purificación de vitelogenina de otras especies, incluyendo tortugas (Selcer y Palmer, 1995; Vargas, 2000; Herbst *et al.*, 2003). Este sistema funciona gracias a que la superficie de la molécula de la VTG está altamente cargada. Esta carga está dada por el grado de fosforilación de la molécula lo que permite eluir la utilizando elevadas concentraciones de NaCl. Por lo tanto, entre mayor sea el contenido de fósforo en la VTG, mayor será la concentración de NaCl necesaria para la

elución (Vargas, 2000). Utilizando esta técnica se probaron 3 diferentes protocolos de corrimiento.

Gradiente lineal (DEAE-1). Las fracciones pertenecientes al pico A eluido de la columna de filtración en gel se inyectaron en una columna de intercambio iónico DEAE-Sepharosa CL-6B (130 x 16 mm, volumen=15 ml). El amortiguador de equilibrio fue 25 mM Tris-HCl pH 7.5, PMSF 1 mM y el amortiguador de elución (B) fue 500mM NaCl en amortiguador de equilibrio. La muestra se corrió en un gradiente lineal de 0-500 mM NaCl con un flujo de 0.5 ml/min y un volumen de gradiente de 129 ml. Se colectaron fracciones de 3 ml y se registró su absorbancia a 280 nm. La temperatura se mantuvo a 4°C durante toda la corrida. Las fracciones resultantes se dializaron en agua durante toda la noche en membranas Spectra Por 1, se concentraron y se analizaron por PAGE. Para cada uno de los picos resultantes se registró el porcentaje de amortiguador con que se había eluido (%B), esto para crear un gradiente escalonado que permitiera una mejor separación de las proteínas.

Gradiente escalonado (DEAE-2). Con el gradiente exacto de NaCl a la cual las fracciones obtenidas se habían desprendido de la columna, se creó un gradiente escalonado: 0, 65, 115, 165, 230, 250, 275, 300, 360 y 500 mM con un volumen de 40 ml cada uno. Esto con el fin de obtener una mejor separación de las proteínas del plasma. Las condiciones de corrimiento fueron las mismas que la anterior excepto por el gradiente escalonado. Las fracciones resultantes se dializaron en agua toda la noche en membranas Spectra Por 1, se concentraron y se analizaron por PAGE.

Gradiente lineal (DEAE-3). Se corrieron dos cromatografías de intercambio iónico con gradiente lineal, una con plasma control y la segunda con plasma inducido, aumentando el volumen de gradiente a 177 ml para evitar que los picos resultantes se traslaparan. Para evitar la pérdida o degradación de la proteína de 550 kDa, se agregó PMSF 1 mM concentración final directamente a la muestra e inmediatamente después de descongelarla. Los picos resultantes se dializaron en agua, se concentraron y se determinó la concentración de proteínas totales por el método de Lowry. Finalmente se analizaron por

PAGE y dodecil sulfato de sodio (SDS)-PAGE. Las fracciones que contenían la VTG se almacenaron en alícuotas a -20°C .

4.5. Caracterización parcial de la vitelogenina

4.5.1 PAGE en condiciones desnaturalizantes (SDS-PAGE).

El plasma control, el plasma inducido y la VTG purificada se corrieron en geles de acrilamida de una dimensión y discontinuo (gel concentrador 4% y gel de separación 8% y 10%) de acuerdo al método de Laemmli (1970). Las muestras se mezclaron con amortiguador desnaturalizante (62.5 mM Tris-HCl, pH 6.8, glicerol 10%, SDS 2%, azul de bromofenol 2.5%, β -mercaptoetanol 5%) en proporción 1:3 (muestra:amortiguador) y se calentaron a 90°C durante 10 minutos. Para determinar el peso molecular, se incluyeron marcadores de peso molecular: miosina, 205 kDa; galactosidasa, 116 kDa; fosforilasa B, 97 kDa; fructuosa-6-fosfato kinasa, 84 kDa y albúmina 66 kDa (Sigma). La electroforesis se corrió en presencia de amortiguador de corrimiento desnaturalizante (Tris base 25 mM, glicina 192 mM y SDS 0.1% pH 8.3) a 100 V y temperatura ambiente, hasta que el frente de corrimiento alcanzó el final del gel. Los geles se tiñeron con azul de Coomassie R250 (Bio-Rad) y con plata (Silver Stain Plus, Bio-Rad). El logaritmo del peso molecular de los marcadores se graficó contra la movilidad electroforética relativa y se utilizó una regresión lineal para calcular el peso molecular relativo de las muestras.

4.5.2. Secuenciación de aminoácidos.

Se obtuvo la secuencia de aminoácidos de la porción amino-terminal (N-terminal) y de algunos péptidos internos de dos de las fracciones inducidas identificadas por SDS-PAGE. Para obtener la secuencia N-terminal, la fracción obtenida de la purificación por intercambio iónico en gradiente lineal se separó en un SDS-PAGE (8%) y se transfirió a una membrana para secuencia Immobilion- P^{SQ} , polivinil difluoride (Millipore, Bedford, MA). La transferencia se realizó en un aparato para transferencia semi-seca Trans-Blot (Bio-Rad) a 10 V por 45 minutos en presencia de buffer Towbin (25 mM tris-base, 192 mM glicina y 20% metanol). Después de la transferencia, la membrana se tiñó por 5 minutos con azul de Coomassie R250 (Bio-Rad) modificado por la ausencia de ácido

acético. Las bandas correspondientes a las proteínas fueron cortadas y secuenciadas utilizando el método de la degradación de Edman. Para la secuenciación de péptidos internos, la misma muestra se separó en un SDS-PAGE (8%) el cual se tiñó con azul de Coomassie. Igualmente, las bandas correspondientes fueron cortadas, después digeridas con tripsina y purificadas por HPLC (cromatografía líquida de alta resolución) y se sometieron a un análisis de masas MALDI-TOF (matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight). De la misma forma, dos de los péptidos resultantes de cada una de las proteínas se sometieron a la degradación de Edman para obtener su secuencia amino terminal. Este procedimiento se realizó en el Protein and Nucleic Acid Facility de la Universidad de Stanford, California. Finalmente, se realizó un análisis de secuencias de aminoácidos similares en la base de datos del NCBI por medio del programa BLAST (Altschul *et al.*, 1997).

4.5.3. Electroelución.

El pico resultante de la cromatografía de intercambio iónico en gradiente lineal, se separó en un PAGE preparativo en gradiente (5-25%). Se cargaron 80 µl de muestra con 20 µl de dH₂O y 100 µl azul de bromofenol. Las bandas correspondientes a cada una de las proteínas inducidas se cortaron del gel, se partieron en pedazos pequeños y se sometieron a electroelución en buffer TRIS base 25 mM, glicina 192 mM, pH 8.3 durante 7 horas a 20 mA y 4°C, en una cámara de electroelución modelo 422 (Bio-Rad). Transcurrido el tiempo de elución, las muestras se dializaron en agua con membranas Spectra Por 1 durante toda la noche a 4°C, se concentraron y se analizaron por SDS-PAGE.

4.4. Elaboración de anticuerpos

Se generaron anticuerpos anti-VTG en 4 conejos New Zealand, mantenidos en el bioterio del CIBNOR. El antígeno utilizado se obtuvo mediante purificación de vitelogenina por precipitación con MgCl₂/EDTA (Sección 4.3.1). La muestra obtenida se corrió en un PAGE preparativo en condiciones nativas y se cortó la banda correspondiente a cada una de las proteínas. Los conejos 1 y 2 fueron inmunizados con la proteína de 500 kDa,

mientras que a los conejos 3 y 4 se les inyectó la proteína de 240 kDa. Los conejos fueron inmunizados con una dosis inicial de aproximadamente 50 µg de proteína en una emulsión preparada con adyuvante de Freund completo (Sigma) y NaCl 0.85%. Las inyecciones fueron subcutáneas y se aplicaron en dos diferentes sitios utilizando aproximadamente 1 ml por inyección. Como refuerzo se aplicaron dos inyecciones de 70 µg en adyuvante incompleto de Freund y NaCl 0.85% una semana después y un mes después de la primera aplicación.

Se obtuvo una muestra de sangre de los conejos antes de la inmunización como muestra testigo. Diez días después de la última inmunización se colectaron 2 ml de sangre, la cual se dejó coagular a temperatura ambiente y se centrifugó a 560 x g durante 10 minutos. Se verificó el título de los anticuerpos y se procedió al sangrado final (conejos 2 y 3). En los animales restantes (conejos 1 y 4), se aplicó otra serie de inmunizaciones. El calendario que se siguió para las inmunizaciones y el sangrado se presenta en la Tabla 3. Para el sangrado final, se colectaron 50 ml de sangre siguiendo el mismo procedimiento hasta la separación del plasma al cual se le adicionó azida de sodio (NaN₃ 15mM concentración final) para evitar su deterioro y se almacenó en alícuotas de 50 µl a -70°C.

Tabla 3. Calendario de inmunizaciones y sangrado de los conejos.

Dosis	Proteína de 550 kDa		Proteína de 280 kDa	
	Conejo 1	Conejo 2	Conejo 3	Conejo 4
1	29/04/03	23/07/03	29/04/03	01/05/03
2	06/05/03	30/07/03	06/05/03	08/05/03
3	29/05/03	22/08/03	29/05/03	02/06/03
Sangrado	09/06/03	02/09/03	09/06/03	10/06/03
4	16/06/03			12/06/03
5	26/06/03			19/06/03
6	16/07/03			24/07/03
Sangrado	25/07/03			04/08/03

4.6. Caracterización de anticuerpos policlonales anti-VTG de tortuga prieta

Al caracterizar un anticuerpo (Ac) se evalúan las características que determinarán su capacidad de reaccionar con un antígeno (Ag) dado, es decir se hace una evaluación de su abundancia, avidéz y especificidad.

La avidéz es la fuerza de unión entre el Ag y el Ac, la cual estará en función de dos factores, la heterogeneidad de los Ac en un suero dado que están dirigidos contra cada uno de los determinantes en un Ag y la heterogeneidad de los mismos determinantes del Ag. La especificidad es la capacidad del Ac de discriminar entre diferentes antígenos (Harlow y Lane, 1988; Roitt, 1998).

4.6.1. Titulación: abundancia y avidéz

Esta prueba mide la dilución del antisuero en la que una cantidad determinada de Ac se une a una cantidad dada de Ag; esto podría ser una modesta cantidad de anticuerpo de alta avidéz o una alta cantidad de Ac de una avidéz menor o cualquier combinación intermedia (Roitt, 1998).

La titulación de los antisueros obtenidos se evaluó por medio de ELISA indirecto no competitivo siguiendo el siguiente protocolo:

Fijación del antígeno. Las muestras de antígeno (plasma control e inducido) se diluyeron en amortiguador carbonato-bicarbonato 50 mM pH 9.6. Se incubaron 60 ng de proteínas totales por pozo en placas NUNC (96 pozos de alta adherencia) durante dos horas a 37°C. Como blancos, se agregaron 150 µl por pozo de amortiguador. Todas las muestras se corrieron por triplicado.

Lavado. Para remover las proteínas que no se adhirieron a la fase sólida, la placa se lavó cuatro veces con buffer de fosfato y sales (PBS) y Tween 0.05% pH 7.4 agregando 200 µl/pozo.

Bloqueo. Los sitios libres en la placa se saturaron con PBS-Tween 0.05%, leche descremada comercial 5% (200 µl/pozo) y se incubó durante 1 hora a 37°C. La placa se lavó de la misma forma que se hizo anteriormente.

Primer anticuerpo. Los antisueros generados para cada una de las dos proteínas se diluyeron en PBS-Tween 0.05% y leche descremada comercial 5% generando 9 diferentes diluciones (1:100, 1:500, 1:1000, 1:3000, 1:5000, 1:10000, 1:50000, 1:100000, 1:150000), se agregaron a la placa (150 μ l/pozo) y se incubaron durante toda la noche a 4°C. La placa se lavó de la misma forma que se hizo anteriormente.

Segundo anticuerpo. Se incubó el segundo anticuerpo contra inmunoglobulinas de conejo acoplados a la fosfatasa alcalina (Sigma) diluido en PBS-Tween 0.05% y 5% de leche descremada comercial por dos horas a 37°C.

Revelado. Finalmente la placa se lavó nuevamente y se incubó con el sustrato (paranitrofenilfosfato, Sigma) a temperatura ambiente durante 15 minutos. Las lecturas se realizaron a 405 nm cada 15 minutos durante 1 hora.

4.6.2. Western Blot: especificidad

Las proteínas separadas por SDS-PAGE (8%), se transfirieron a una membrana para inmunoensayo Immobilion-P (polivinil difluoruro) (Millipore) siguiendo el protocolo anteriormente descrito. Después de la transferencia, la membrana se lavó con PBS-Tween 0.05% pH 7.4 y se incubó con leche descremada comercial al 5% durante toda la noche a 4°C. La membrana se lavó 3 veces con PBS-Tween 0.05% por 10 minutos en agitación. El antisuero generado contra cada una de las dos proteínas se diluyó 1:3000 en PBS-Tween 0.05% y leche descremada comercial al 5% y se incubó a 37°C durante 3 horas en agitación. Después de lavada la membrana, el segundo anticuerpo anti-IgG de conejo acoplado a la peroxidasa se diluyó 1:3000 en PBS-Tween 0.05% y leche descremada comercial al 5% y se dejó incubar 1 hora a 37°C en agitación. Finalmente se lavó la membrana y se agregó el sustrato cromogénico, 10 ml de acetato de Sodio 0.1 M pH 5.4, 2.5 mg diaminobenzidina (Sigma) y 2.5 μ l de H₂O₂, se incubó hasta que se generó la banda de reacción y se detuvo con dH₂O.

A partir de la caracterización de los distintos antisueros generados, se seleccionó aquel que tuviera un mejor título (avidez) y presentara la mayor especificidad.

4.7. Validación del ensayo inmunoenzimático (ELISA)

4.7.1. Concentración de antígeno y anticuerpo

Se utilizaron 11 diluciones seriadas de VTG (2, 1, 0.5, 0.25, 0.12, 0.06, 0.03, 0.015, 0.007, 0.004 y 0.002 $\mu\text{g/ml}$) para recubrir los pozos en la microplaca. Como primer anticuerpo se utilizaron 4 diluciones distintas (1:6000, 1:3000, 1:1000, 1:500). El resto del procedimiento se realizó de acuerdo a lo descrito anteriormente. Se elaboró una gráfica en donde el eje de las X contenía la concentración de antígeno utilizada y en el eje Y la absorbancia obtenida a 405 nm después de media hora de incubación del sustrato. Se seleccionó la solución más concentrada de antígeno y más diluida de anticuerpo que alcanzara una unidad de absorbancia máxima que estuviera dentro del rango lineal del lector de placa (0-3) y a partir de la cual la pendiente fuera más pronunciada.

4.7.2. Curva estándar

Con base a los resultados obtenidos en el ensayo anterior, se elaboró una curva estándar con la proporción Ag:Ac seleccionada. Partiendo de una concentración inicial de 8 $\mu\text{g/ml}$ de VTG, se construyó una curva con las siguientes concentraciones: 2, 1, 0.5, 0.25, 0.12, 0.06, 0.03, 0.015, 0.007, 0.004 y 0.002 $\mu\text{g/ml}$. El anticuerpo anti-VTG se diluyó 1:3000 en PBS-Tween 0.05% y leche descremada comercial al 5%.

4.7.3. Paralelismo

Para que los resultados de un ELISA que cuantifique VTG sean válidos, es necesario que el comportamiento del Ac no varíe dependiendo de las concentraciones de VTG en la muestra. Esta característica se evalúa por medio de curvas paralelas. Para esto la curva estándar construida con VTG purificada se comparó con diluciones seriadas del plasma inducido a 4 concentraciones iniciales (1:30,000; 1:70,000; 1:100,000 y 1:140,000).

4.7.4. Precisión del ensayo

La precisión es una expresión de la reproducibilidad del ensayo. Una manera de indicar precisión es con los coeficientes de variación entre y dentro del ensayo.

Estos valores se obtuvieron corriendo la curva de referencia en 6 diferentes ocasiones (variación entre ensayo) y cada uno de los puntos de la curva se corrió por triplicado (variación dentro del ensayo). Estos coeficientes se calcularon de la siguiente manera:

$$CV = (\text{media}) / (\text{desviación estándar}) \times 100$$

4.7.5 Efecto matriz

El efecto matriz se refiere a la interacción del Ag con las moléculas de la matriz en que este diluida, la cual afectará su antigenicidad. Para determinar a qué dilución del plasma se reducía el efecto matriz, a seis diferentes diluciones del plasma control negativo (1:10, 1:100, 1:500, 1:1000, 1:5000 y 1:10000) se agregaron concentraciones conocidas de VTG (2, 1, 0.5, 0.25, 0.12, 0.06, 0.03, 0.015, 0.007, 0.004 y 0.002 µg/ml). Las curvas obtenidas se compararon con la curva de referencia diluida en amortiguador carbonato-bicarbonato.

4.8. Reacción cruzada con otras especies

4.8.1. ELISA

Se determinó si el anticuerpo anti-VTG de tortuga prieta reaccionaba de manera cruzada con VTG de otras dos especies de tortuga marina *Caretta caretta* y *Eretmochelys imbricata*. Para esto, se incubaron diluciones seriadas a partir de una dilución 1:30000 de plasma inducido y control de las tres especies, el resto del ELISA se realizó de acuerdo al protocolo anteriormente mencionado.

4.8.2 Western Blot

Se corrieron muestras del plasma control e inducido diluido 1:100 de *C. caretta* y *E. imbricata* en un SDS-PAGE (8%). Las proteínas se transfirieron a una membrana de inmunoblotting y se siguió el procedimiento anteriormente mencionado.

4.9 Análisis de las muestras inducidas.

Las cinco muestras tomadas en los días -1, 7, 17, 24, 28 y 189 después de la primera inyección de E₂, se analizaron por medio de el ELISA indirecto no competitivo validado para la cuantificación de VTG en plasma de Tortuga prieta *C. mydas agassizii*.

Las muestras se diluyeron 1:140,000 en amortiguador carbonato-bicarbonato 50 mM pH 9.6 y se adsorbieron en la placa por triplicado. El primer anticuerpo (Ac2) se utilizó a una dilución 1:3000. El resto del procedimiento se realizó de acuerdo a lo descrito anteriormente.

V. RESULTADOS

5.1. Inducción hormonal con 17 β -estradiol (E₂)

Durante el periodo de la aplicación de E₂ (4 inyecciones durante 13 días) se observó que ninguno de los dos machos inducidos mostró cambio en su comportamiento o alimentación. Tampoco hubo variación en los pesos de ambos animales, el cual se registró antes y después de la inducción. Conforme el tiempo de inducción avanzó, la apariencia del plasma colectado fue cambiando de translucido a opaco tomando una consistencia viscosa.

La cantidad de proteínas presentes en el plasma del macho 1 antes y después de la inducción se presentan en la Figura 1. Se observó un incremento paulatino en la concentración de proteínas totales a lo largo del tiempo. El plasma antes de la inducción presentó una concentración de 59 mg/ml y alcanzó en el día 28 de la inducción, una concentración de 147 mg/ml (más del doble en relación al control), existiendo entre ellas una diferencia significativa ($P < 0.05$). Además se observó que para el día 189 hubo una disminución significativa en la concentración de proteínas (98 mg/ml).

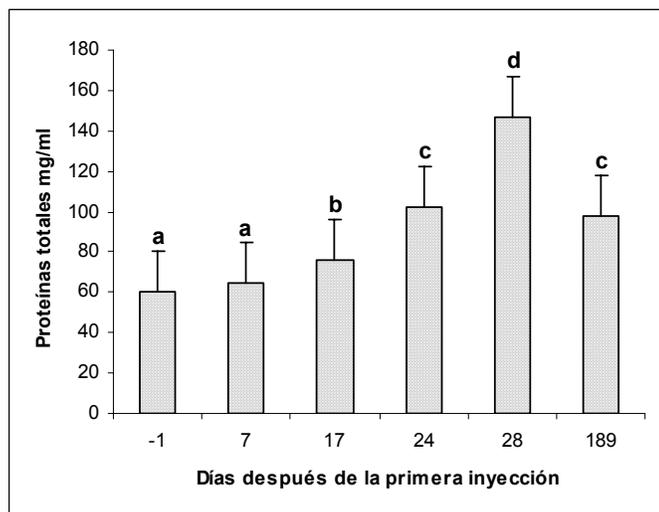


Figura 1. Concentración de proteínas totales de plasma de macho de *C. mydas agassizii* después de la inducción con 17 β -estradiol. Cada valor representa la media \pm DE de cuatro determinaciones. Las letras sobre las barras indican las diferencias significativas ($P < 0.05$).

Las muestras de plasma obtenidas antes, durante y después de la inducción, se visualizaron por electroforesis en gel de poliacrilamida en condiciones nativas (PAGE- 6%). En el perfil proteico del plasma inducido tomado a los 7, 17, 24, 28 días después de la primera inyección, se observó la presencia de dos bandas adicionales que corresponden a dos proteínas con un peso molecular aproximado de 500 y 240 kDa respectivamente (Figura 2). Estas proteínas se encuentran ausentes en el plasma de los machos antes de la inducción (día -1). Además, se observó que la concentración de las proteínas inducidas fue aumentando conforme transcurrió el tiempo de inducción.

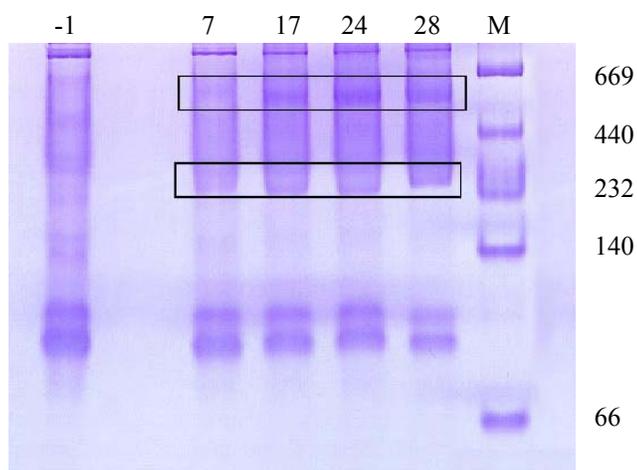


Figura 2. Respuesta a la inducción hormonal con 17β -estradiol en plasma de macho de *C. mydas agassizzi* visualizado por electroforesis en gel de poliacrilamida (PAGE) al 6%. Proteínas del plasma antes de la inducción (-1) y a los 7, 17, 24 y 28 días después de la primera inyección, teñidas con azul de Coomassie. Marcador de peso molecular (M) expresado en kilodaltons (kDa). En los recuadros se marcan las proteínas que aparecen en el plasma inducido y que están ausentes en el control, cuyo peso molecular aparente es de 500 y 240 kDa respectivamente.

5.2. Identificación de las proteínas inducidas

Las proteínas del plasma antes y después de la inducción se separaron en un PAGE (6%) y se tiñeron con tres diferentes colorantes: azul de Coomassie que detecta proteínas (Figura 2), negro de Sudán que detecta lípidos y ácido-periódico-Shift que detecta glúcidos (Figura 3 a y b).

La naturaleza lipo-glico-proteica de las dos fracciones proteicas del plasma inducido con estradiol fue puesta en evidencia, ya que reaccionaron con los tres colorantes.

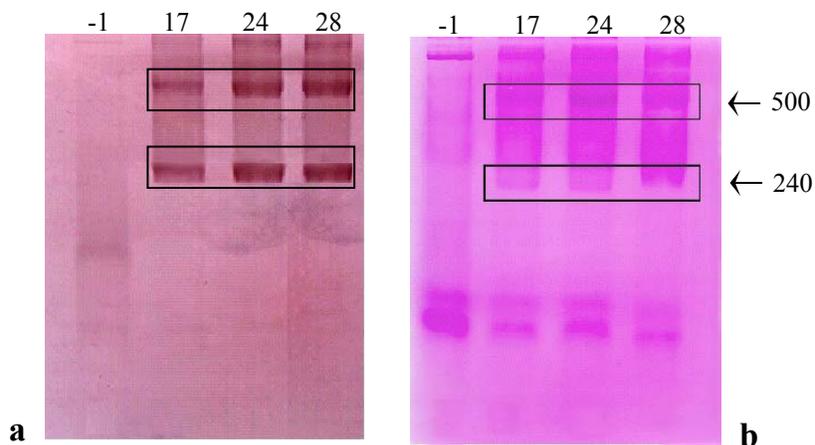


Figura 3. PAGE (6%) de plasma de macho antes y después de la inducción hormonal. Tinción con negro de Sudán para lípidos (a) y tinción con ácido periódico-Shift para glúcidos (b). Control (-1), días después de la primera inyección (17, 24, 28). En los recuadros se marcan las proteínas de 500 y 240 kDa.

5.3. Purificación de las proteínas inducidas

La estandarización de una metodología inmunoenzimática (ELISA) que nos permita cuantificar la vitelogenina en machos silvestres de *C. mydas agassizii*, no era posible sin la preparación de anticuerpos anti-VTG y la obtención de vitelogenina pura para determinar los valores de la curva estándar.

Para ello y con el fin de obtener las proteínas inducidas con un grado de pureza elevado, se ensayaron varios métodos de purificación.

5.3.1. Precipitación con $MgCl_2/EDTA$

La precipitación con $MgCl_2/EDTA$, resultó efectiva en la separación de las dos proteínas inducidas (500 y 240 kDa) del resto de las proteínas del plasma. Sin embargo, no se pudieron separar una de la otra, ya que ambas siempre precipitaban juntas (Figura 4-P2).

Se observó que al dejar en incubación con $MgCl_2/EDTA$ toda la noche, la banda de 500 kDa se perdía, precipitando únicamente la de 240 kDa (Figura 4-P1).

La eficiencia de purificación fue considerada aceptable ya que por cada ml de plasma inducido se obtuvieron 39.6 mg de VTG semipura.

Debido a que se obtenían distintos grados de pureza cada vez que se llevaba a cabo dicho protocolo, se intentaron otros métodos de purificación.

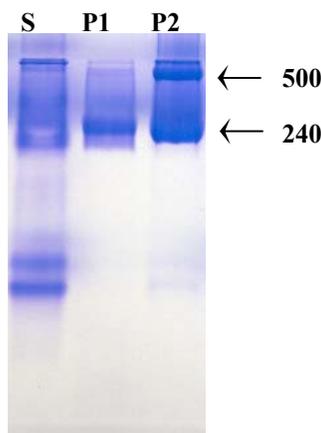


Figura 4. PAGE (7%) de proteínas del plasma inducido precipitadas con $MgCl_2/EDTA$. Sobrenadante (S), precipitado obtenido incubando durante toda la noche (P1) y durante 1 hora (P2).

5.3.2. Cromatografía de filtración en gel

El plasma de los machos tratados se corrió en una columna de filtración en gel (Sepharsa CL-2B) en la que las proteínas se separan por peso molecular. Se obtuvieron dos fracciones A y B (Figura 5).

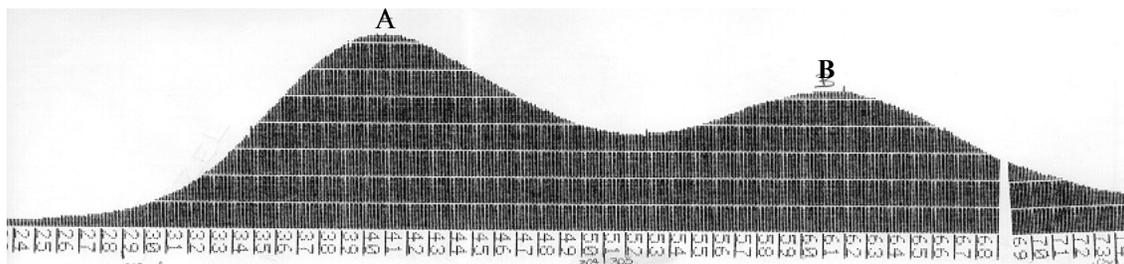


Figura 5. Perfil de elución del plasma de macho inducido separado por cromatografía de filtración en gel de Sepharosa. Se obtuvieron dos fracciones A y B.

Las fracciones obtenidas se concentraron y se visualizaron por PAGE (6%). Se observó que las proteínas inducidas eluyen en la fracción A junto con otras proteínas de alto peso molecular, mientras que las proteínas de bajo peso molecular eluyen en la fracción B, sin embargo en esta última fracción también se encontraban las proteínas inducidas (Figura 6).

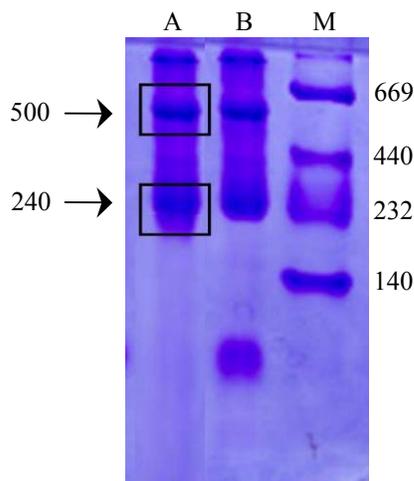


Figura 6. PAGE (6%) de la cromatografía de filtración en gel Sepharosa CL-2B. Fracciones de eluidas de la columna (A, B), marcador de peso molecular (M) expresado en kDa. Las proteínas inducidas (500 y 240 kDa) están presentes en las dos fracciones.

5.3.3. Cromatografía intercambio iónico DEAE

Gradiente lineal (DEAE-1). La fracción A eluida de la columna de filtración en gel se concentró y se corrió en una columna de intercambio iónico (DEAE-Sepharosa CL-6B) con gradiente lineal de 0-500mM NaCl. Se obtuvieron cuatro fracciones: 1A (proteínas que no se adhirieron a la columna), 1B, 1C y 1D, las cuales se eluyeron a 110, 275 y 360 mM de NaCl, respectivamente (Figura 7).

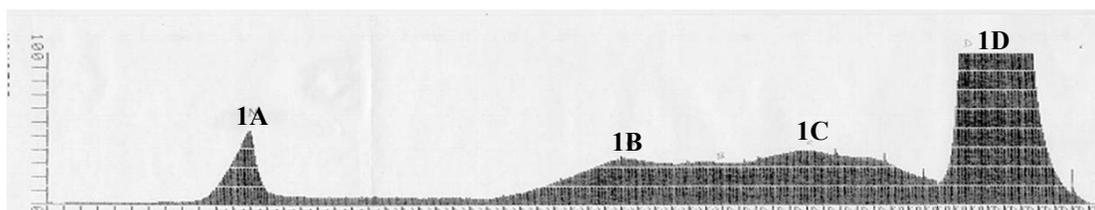


Figura 7. Perfil de elución de la cromatografía DEAE-1. Se eluyeron cuatro fracciones (1A, 1B, 1C, 1D). En el último se constató la presencia de las dos proteínas inducidas (500 y 240 kDa).

Las fracciones colectadas se dializaron, se concentraron y se visualizaron por PAGE (6%). Una de las proteínas inducidas (240 kDa) se identificó en la fracción D, la cual se eluye con la concentración mayor de sales (Figura 8). Sin embargo aparentemente la proteína de 500 kDa se perdía casi por completo.

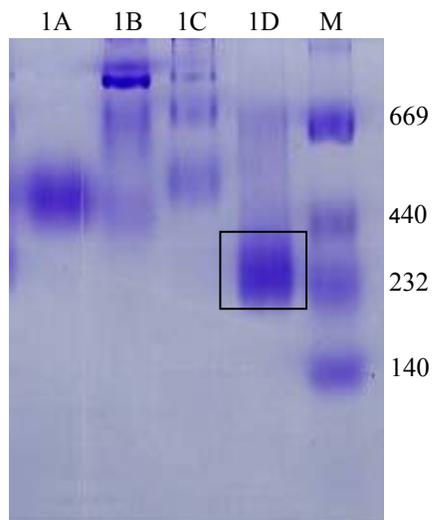


Figura 8. PAGE (6%) de los resultados de la cromatografía DEAE-1. Fracciones eluidas de la columna (1A, 1B, 1C, 1D), marcador de peso molecular (M). La proteína inducida de 240 kDa se remarca con un recuadro, la proteína de 500 kDa se pierde casi por completo.

Gradiente escalonado (DEAE-2). Con el porcentaje exacto del buffer de elución en el que cada fracción se desprendía de la columna, se creó el siguiente gradiente escalonado: 0, 65, 110, 160, 220, 230, 275, 300, 360 y 500 mM con un volumen de 40 ml cada uno. Con este protocolo de corrimiento, se obtuvieron 5 fracciones (Figura 9).

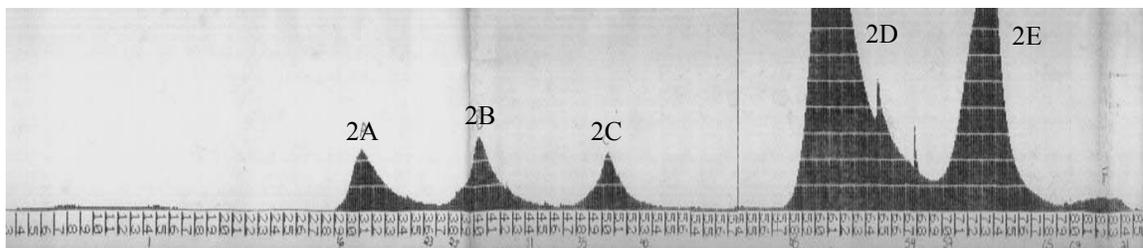


Figura 9. Perfil de elución de la cromatografía DEAE-2. Las fracciones 2D y 2E, eluidas a 300 y 360 mM de NaCl respectivamente, contienen ambas proteínas inducidas.

Las fracciones obtenidas se analizaron por PAGE en condiciones nativas (Figura 10). Las proteínas de 500 y 240 se observaron tanto en la fracción 2D como en la 2E. Además, se pudo observar que a pesar de que se eliminó la separación en la columna de filtración en gel, la concentración de la fracción de 500 kDa disminuye casi por completo, aun manteniendo la temperatura a 4°C y adicionando PMSF al buffer de elución.

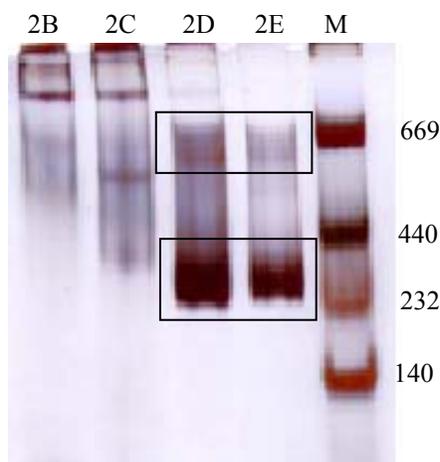


Figura 10. PAGE (6%) de los resultados de la cromatografía DEAE-2. Gel teñido con plata. Fracciones eluidas de la columna (2B, 2C, 2D, 2E). Marcador de peso molecular (M). En el recuadro se marcan las proteínas inducidas de 500 y 240 kDa.

Gradiente lineal (DEAE-3). Para evitar que las fracciones se traslaparan se aumentó el volumen de elución, corriendo en la columna de intercambio iónico una vez más con gradiente lineal. Para evitar la posible degradación de la proteína de 500 kDa se agregó PMSF directamente a la muestra. El plasma control se corrió bajo las mismas condiciones.

En el plasma de macho inducido se obtuvieron tres fracciones: 3A, que contiene a las proteínas que no se adhirieron a la columna, 3B y 3C las cuales se eluyen a 240 y 360 mM respectivamente (Figura 11).

Al comparar el perfil de de elución cromatográfico del plasma antes de la inducción con el de machos inducidos, se observó una notoria diferencia entre ambos perfiles de elución en donde la fracción 3C se encontraba presente en el plasma inducido no así en el plasma control (Figura 11).

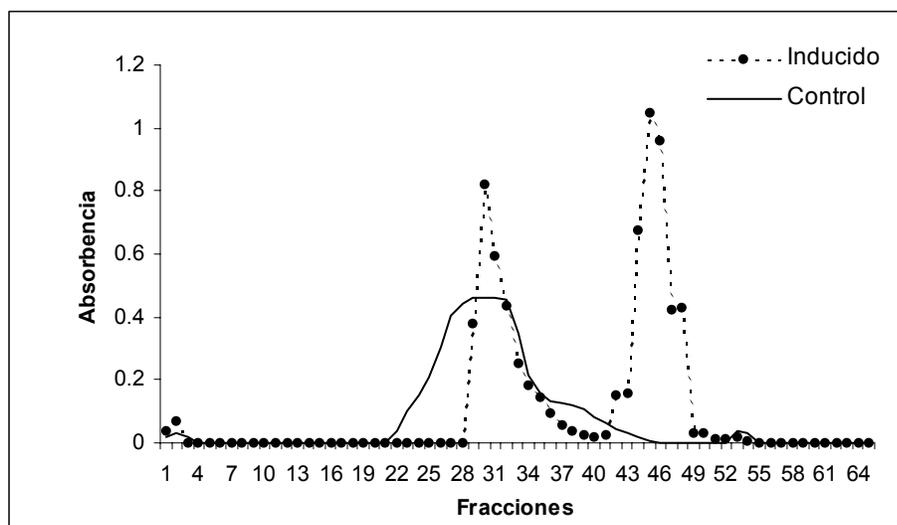


Figura 11. Perfil de elución del plasma control e inducido de *C. mydas agassizii*, separado por cromatografía de intercambio iónico (DEAE-3). La fracción 3C del plasma inducido se encuentra ausente en el perfil de elución del plasma control.

Lo anterior se corroboró en el PAGE nativo (6%), (Figura 12). En esta ocasión la fracción de 500 kDa se había logrado conservar sin que se degradara.

La eficiencia de purificación se consideró buena ya que de cada ml de plasma inducido con una concentración de 147 mg/ml de proteínas totales, se obtuvieron 51.20 mg de VTG.

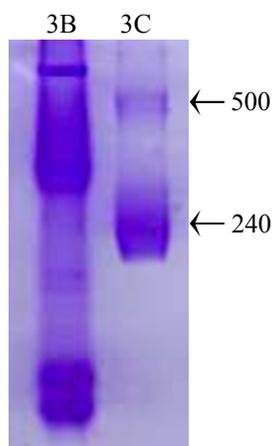


Figura 12. PAGE (6%) de los resultados de la cromatografía DEAE-3. Fracciones eluidas de la columna (3B y 3C). En la última se encuentran las dos proteínas inducidas de 500 y 240 kDa respectivamente.

El volumen correspondiente a la fracción 3C se dializó en agua, se concentró, se hicieron alícuotas y se almacenaron a -20°C . Esta muestra se utilizó posteriormente para caracterizar parcialmente la VTG y para estandarizar el ensayo inmunoenzimático (ELISA).

5.4. Caracterización parcial de la vitelogenina

5.4.1. Gel de poliacrilamida en condiciones desnaturizantes (SDS-PAGE)

Las proteínas del plasma control (C) e inducido (I) tomado el día 28 de la inducción, se separaron en un gel de electroforesis en condiciones desnaturizantes (SDS-PAGE, 10%). Se observó que en el perfil proteico de la muestra inducida aparecen cuatro bandas adicionales que se encuentran ausentes en el control, lo que indica que estas bandas corresponden a proteínas inducidas por 17β -estradiol. Se determinó el peso molecular aproximado de estas bandas siendo este 200, 151, 137 y 116 kDa respectivamente. Por el contrario, otras proteínas de alrededor de 60-66 kDa y otra de 170 kDa, disminuían su concentración en el plasma inducido (Figura 13).

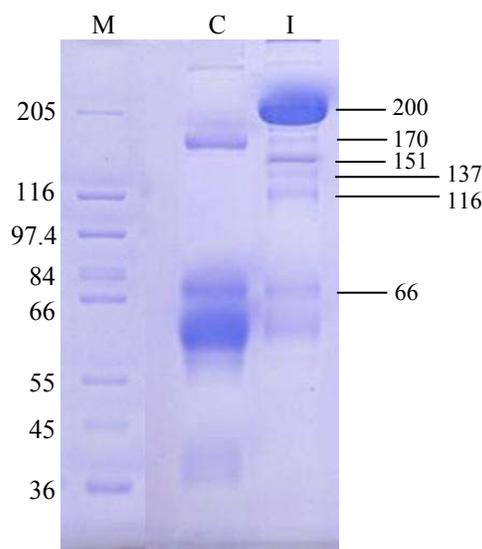


Figura 13. SDS-PAGE (10%) de plasma control e inducido de *C. mydas agassizii*. Control (C), inducido (I), marcador de peso molecular (M) expresado en kDa. Se observan cuatro bandas inducidas de 200, 151, 137 y 116 kDa, respectivamente.

Las fracciones 3B y 3C obtenidas de la cromatografía DEAE-3, se visualizaron también por SDS-PAGE, observándose en la fracción 3C exclusivamente las cuatro bandas inducidas identificadas anteriormente no así en la fracción 3B (Figura 14).

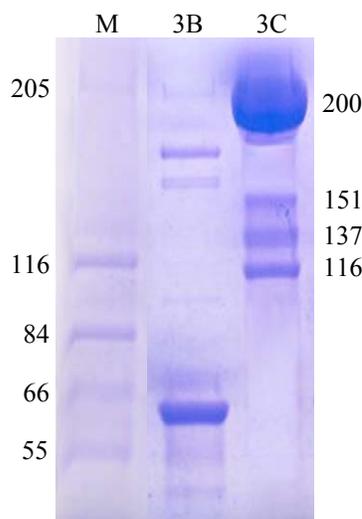


Figura 14. SDS-PAGE (8%) de los resultados de la cromatografía DEAE-3. Fracciones eluidas de la columna (3B y 3C), marcador de peso molecular (M) expresado en kDa. En la fracción 3C, se encuentran las cuatro bandas inducidas (200, 151, 137 y 116 kDa).

5.4.2. Secuencia de aminoácidos

Se obtuvo la secuencia de aminoácidos de la porción amino terminal (N-terminal) y de algunos de los péptidos internos de las proteínas de 200 y 116 kDa (Tabla 4).

La secuencia N-terminal de la proteína de 200 kDa se obtuvo por 10 ciclos de la degradación de Edman. Después de la digestión con tripsina, los péptidos resultantes se purificaron por HPLC y se sometieron a un análisis de masas MALDI-TOF, con el cual se identificaron dos picos (péptidos 1 y 2) con un perfil de masa mayor. De estos péptidos se obtuvo su secuencia N-terminal. Se lograron obtener 18 residuos del péptido 1 y 11 residuos del péptido 2.

Para la proteína de 116 kDa no se pudo obtener la secuencia de la porción N-terminal ya que ésta estaba bloqueada. Se procedió de manera similar a la proteína anterior, realizando una digestión con tripsina, seguida de cromatografía HPLC-MALDI-TOF. Se logró obtener

tres péptidos (péptidos 3, 4 y 5) de 18, 17 y 15 residuos respectivamente. Para los péptidos 1 y 3 se obtuvo el mismo perfil de masa y al secuenciarlos se encontró que sus secuencias eran idénticas (Tabla 4).

Tabla 4. Secuencia de aminoácidos de la porción N-terminal y péptidos internos de las proteínas de 200 y 116 kDa.

Proteína	Péptido	Secuencia de aminoácidos
200 kDa	N-terminal	E K Y D P E P D F S
	1	E L S D L E G A Q A V L V G F H L S
	2	L G L Q I I P F I S T
116 kDa	N-terminal	Bloqueado
	3	E L S D L E G A Q A V L V G F H L S
	4	A Y T Y D Y E S V F L S G L P D R
	5	V Y S L E A A E Y N G I W P R

La búsqueda de secuencias de aminoácidos similares a los obtenidos se realizó por medio del programa BLAST. No se encontró ninguna secuencia de VTG reportada para reptiles en la base de datos del NCBI, sin embargo se encontraron reportadas en la literatura las secuencias N-terminal de VTG de la tortuga verde, *Chelonia mydas* (Herbst *et al.*, 2003) y de la tuatara, *Sphenodon punctatus* (Brown *et al.*, 1997).

El resultado del alineamiento de la proteína de 200 kDa se muestra en la Tabla 5. La secuencia N-terminal resultó idéntica a la secuencia N-terminal de la VTG reportada para *Chelonia mydas* y similar en 8 aminoácidos a la secuencia de la VTG de *Sphenodon punctatus*. De igual manera se encontró similitud, aunque menor, con VTG de *Xenopus laevis*, *Larus argentatus* y *Gallus gallus*.

También se analizaron las secuencias de los péptidos internos para ambas fracciones en donde se encontró similitud también con VTG de *Gallus gallus* y *Xenopus laevis*.

Tabla 5. Alineamiento de la secuencia de la porción N-terminal de VTG (200 kDa) de *C. mydas agassizii* con VTG de otras especies de vertebrados. Los aminoácidos similares entre secuencias se presentan con fondo gris y los conservados en las 8 secuencias se marcan con fondo negro.

Especie	Secuencia de aminoácidos	Referencia/clave del GeneBank
Tortuga prieta, <i>C. mydas agassizii</i>	E K Y D P E P D F S	(Este trabajo)
Tortuga verde, <i>C. mydas</i>	E K Y D P E P D F S	(Herbst <i>et al.</i> , 2003)
Tuatara, <i>S. punctatus</i>	E K Y D I E P A F S	(Brown <i>et al.</i> , 1997)
Rana, <i>X. laevis</i> VTG B1	E K S Q Y E P F F S	(P19010)
Rana, <i>X. laevis</i> VTG A1	E R T Q I E P V F S	(P19010)
Gaviota, <i>L. argentatus</i>	Q K F D I D P G F S	(AAL01527)
Gallo, <i>G. gallus</i> VTG II	Q K F D I D P G F N	(P02845)
Gallo, <i>G. gallus</i> VTG III	Q K H D L E P V F S	(Q91025)

5.4.3. Electroelución

Las proteínas nativas de 500 y 240 kDa se purificaron por electroelución y se visualizaron por SDS-PAGE. Se observó que ambas proteínas tenían exactamente el mismo perfil electroforético, el cual se compone de cuatro bandas de 200, 151, 137 y 116 kDa, las mismas que se habían identificado en el plasma inducido y en la muestra purificada por cromatografía (Figura 15).

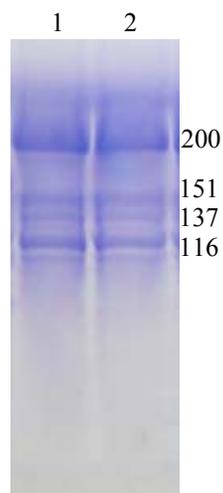


Figura 15. SDS-PAGE (8%) de las proteínas inducidas purificadas por electroelución. Elución obtenida de la proteína de 500 kDa (1) y elución obtenida de la proteína de 240 kDa (2).

5.5. Caracterización de los anticuerpos policlonales anti-VTG de tortuga prieta

5.5.1. Titulación: abundancia y avidéz

La titulación de los antisueros obtenidos se evaluó por medio de ELISA indirecto no competitivo con una cantidad fija de antígeno y varias diluciones del antisuero, esto con el fin de determinar la avidéz de los anticuerpos generados por los conejos inyectados con varias dosis de vitelogenina de *C. mydas agassizzi*. La avidéz de los anticuerpos representa la fuerza de unión entre el Ag y el Ac. Se evaluó el título de cada uno de los antisueros obtenidos, dos de ellos dirigidos contra la proteína de 500 kDa en su estado nativo (Ac1 y Ac2) y dos más contra la proteína de 240 kDa (Ac3 y Ac4).

En la figura 16 se muestran las curvas de titulación obtenidas para los Ac 1, 3 y 4. En donde se muestra que para los Ac1 y Ac3 la reacción fue positiva hasta la dilución 1:5,000, mientras que para el Ac4 la reacción fue positiva hasta la dilución 1:3,000, es decir, éste último presentó el título más bajo. Ninguno de estos tres antisueros presentó en su curva de calibración una zona de saturación, lo que indica que tanto la abundancia como la avidéz de éstos es baja.

La curva de titulación del Ac2 (Figura 17) fue la que mostró los mejores títulos ya que se pueden distinguir perfectamente tres zonas.

1. Zona I: se caracterizó por un exceso de anticuerpo (Ac) o una saturación del mismo. Es decir, no existen antígenos (Ag) libres que reaccionen con el Ac, lo que explica que aun aumentando la concentración del Ac, la reacción no aumenta más. Esta zona está representada por una asíntota y se alcanzó con una dilución 1:500.

Zona II: está representada por la pendiente, en donde la reacción disminuyó de manera proporcional a la concentración de Ac, obteniendo una reacción positiva hasta la dilución 1:50,000.

Zona III: se caracterizó por una falta de Ac, en esta zona no existe una cantidad suficiente de Ac capaz de detectar el Ag presente. Esta zona comenzó a partir de la dilución 1:100,000.

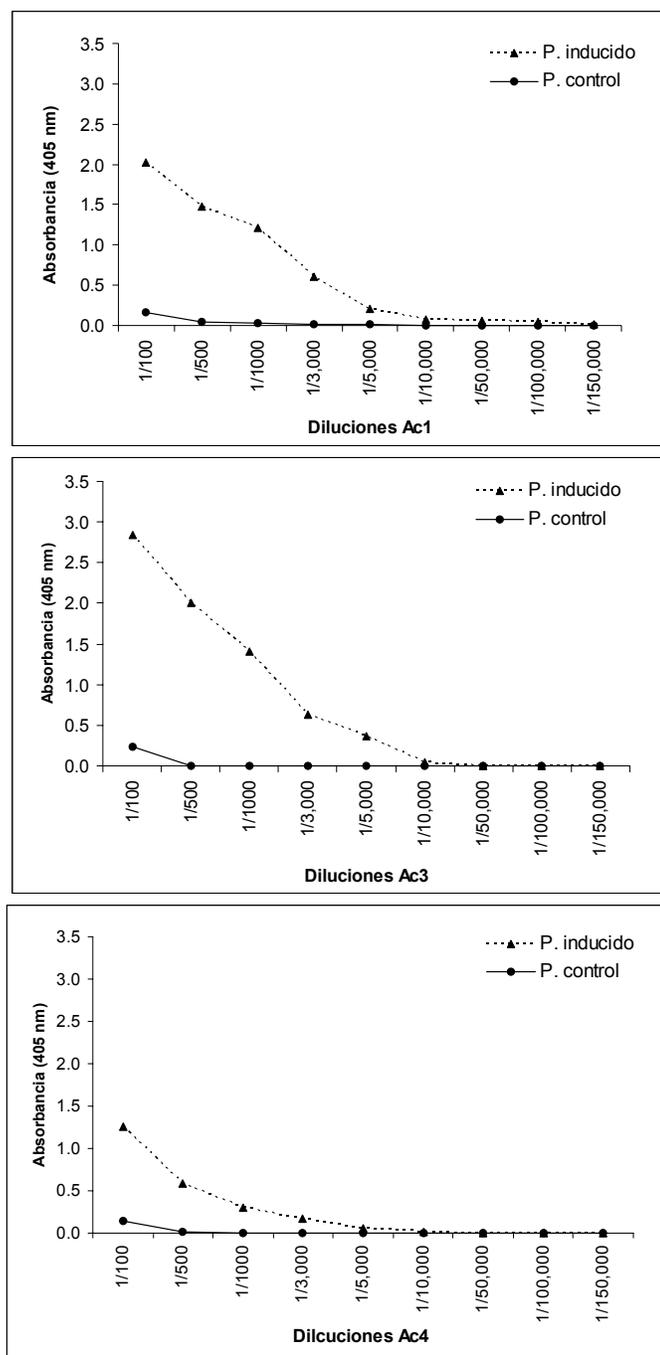


Figura 16. Curva de titulación de los antiseros anti-VTG de *C. mydas agassizii* (Ac1, Ac3, Ac4). Las nueve diluciones de los antiseros se evaluaron con plasma control e inducido.

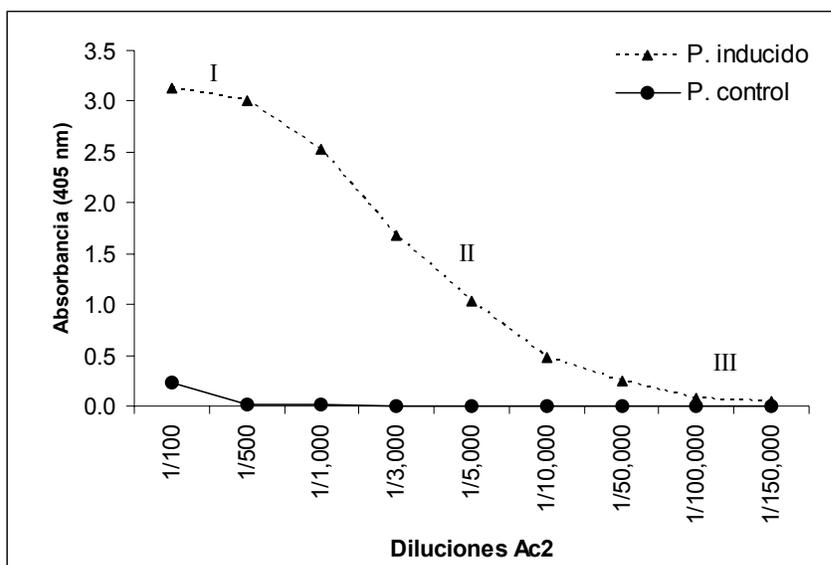


Figura 17. Curva de titulación del Ac2. Con números romanos se muestran las tres zonas que se presentaron en la curva. Se evaluó tanto el plasma inducido como el control.

5.5.2. Western Blot: especificidad

Para evaluar la especificidad de los antisueros obtenidos, se seleccionó el Ac2 dirigido contra la proteína de 500 kDa y el Ac3 dirigido contra la proteína de 240 kDa, ya que fueron estos dos los que presentaron el título más alto.

Los resultados obtenidos muestran que el Ac2 presenta una mejor especificidad ya que en el plasma inducido reacciona únicamente con las cuatro bandas pertenecientes a la VTG además que en el plasma control no hubo reacción. En cambio, el Ac3 presenta una ligera reacción en el control y con otras bandas entre los 200 y 151 kDa.

Sin embargo, en ambos Ac, hubo una marcada diferencia entre el plasma inducido y la VTG purificada, ya que en ésta última, solamente hubo reacción positiva con el monómero (200kDa) y la banda de 116 kDa (Figura 18).

Se utilizó el ensayo ELISA para evaluar la especificidad de los anticuerpos mediante el análisis del plasma control. Ninguno de los 4 antisueros mostró una reacción positiva con

el plasma control, es decir no hubo respuesta inespecífica con proteínas de éste, solamente a una dilución 1:100 (Figura 16 y 17).

Con base a estos resultados, se seleccionó el Ac2 para la estandarización del ELISA, ya que además de presentar el título más alto, también presentó una mayor especificidad.

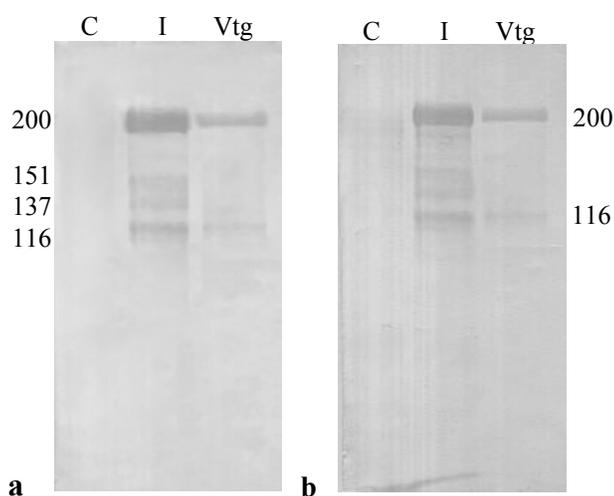


Figura 18. Western Blot con el Ac2 (a) y Ac3 (b). Plasma control (C), plasma inducido (I) y VTG purificada (Vtg).

5.6. Validación del ensayo inmunoenzimático (ELISA)

5.6.1. Concentración Ag:Ac

La figura 19 muestra las curvas generadas para determinar la concentración óptima de Ag:Ac. Se evaluaron 4 diferentes diluciones de Ac y 11 diluciones seriadas de Ag (VTG purificada).

Se seleccionó la combinación de 2 µg/ml de VTG y una dilución de Ac 1:3000. Esta combinación representa la solución más concentrada de antígeno y más diluida de anticuerpo en donde la absorbancia fue 2.6 y en donde se generó la pendiente más pronunciada. A partir de esta concentración de Ag:Ac se generó la curva estándar.

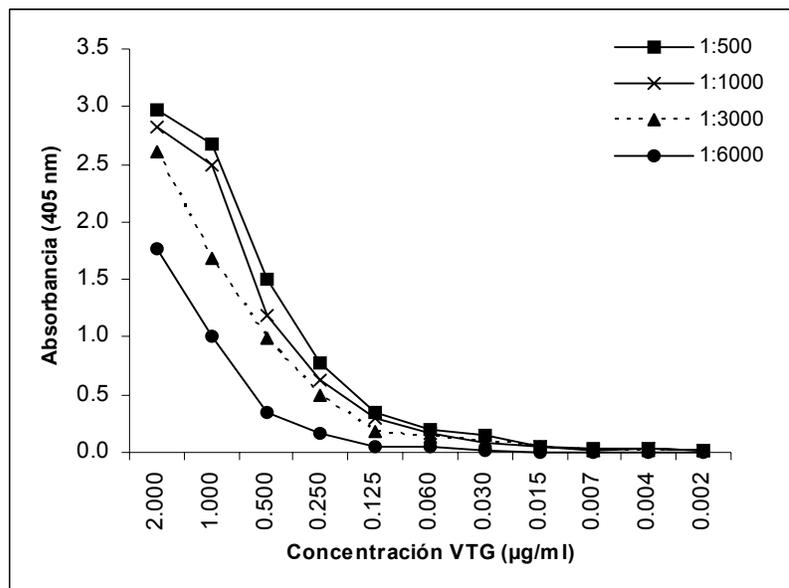


Figura 19. Determinación de la concentración óptima de Ag:Ac a partir de la cual se generó la curva estándar. Se evaluaron 4 diluciones de Ac (1:500, 1:1000, 1:3000 y 1:6000) contra 11 diluciones seriadas de VTG purificada (Ag).

5.6.2. Curva estándar

Utilizando 11 diferentes concentraciones de 0.002 a 2.0 µg/ml de VTG y una dilución de Ac de 1:3000, se realizó una curva estándar que se repitió en seis diferentes ensayos. Con los valores medios de las absorbancias obtenidas para cada concentración se determinó una curva estándar (Figura 20).

La sensibilidad del ensayo, se estimó entre 0.015 ng/ml y 2 µg/ml. Se hizo una regresión lineal para calcular la pendiente de la curva y construir una fórmula que permitiera estimar concentraciones de VTG en una muestra de plasma dada. La fórmula es:

$$y = 1.41127 x + 0.02459$$

Donde “y” es el valor de la absorbancia a 405 nm y “x” es la concentración de VTG (Figura 20).

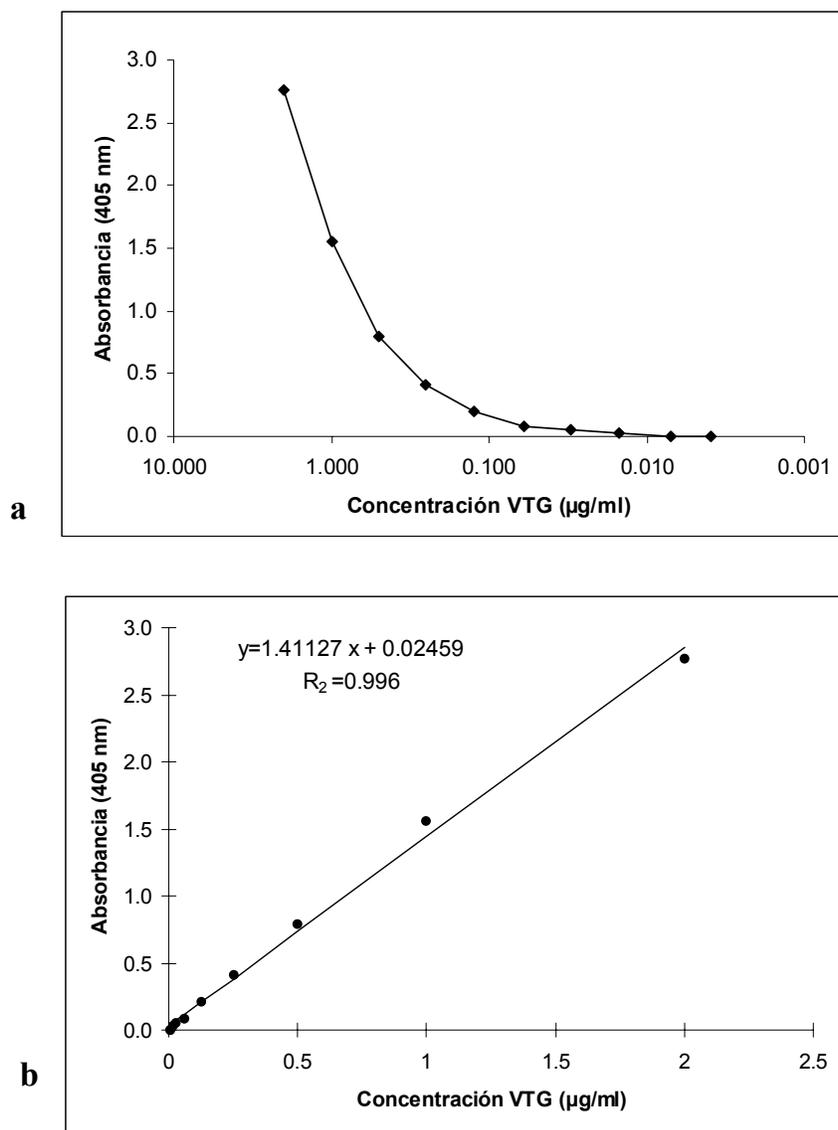


Figura 20. Curva estándar para la cuantificación de VTG de *C. mydas agassizii*. a) los puntos representan la media de los valores de las absorbancias obtenidas en seis ensayos. b) regresión lineal de la curva, en donde se presenta la ecuación que se utilizará en la cuantificación de VTG en una muestra dada.

5.6.3. Paralelismo y precisión del ensayo

Curvas paralelas. La aptitud del reactivo ligante (anticuerpo anti-VTG) al reaccionar solamente con la VTG, se constató comparando los resultados del análisis ELISA efectuado con la vitelogenina pura (curva estándar) y el plasma inducido en diferentes diluciones. Las

curvas obtenidas con el plasma inducido se linearizaron y se evaluó el paralelismo entre ellas y la curva estándar (CE) por medio de un análisis de covarianza (Figura 21). Este análisis demostró que no había diferencia significativa entre las pendientes de las curvas ($P>0.05$).

Coefficiente de variación (CV). El coeficiente de variación entre y dentro del ensayo que refleja la precisión del mismo, mostró que el análisis ELISA efectuado es altamente reproducible con un CV dentro del ensayo igual a 7.3% y entre ensayos igual a 9.4%.

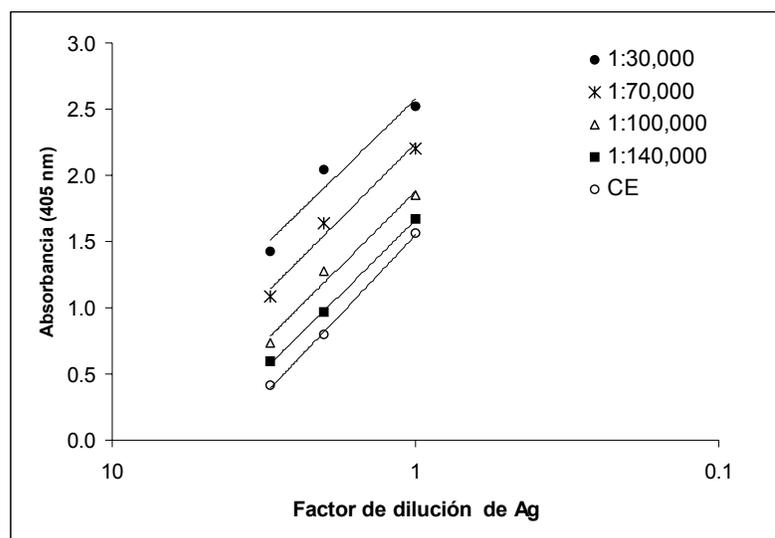


Figura 21. Curvas paralelas generadas a partir de distintas diluciones de plasma inducido y vitelogenina pura. Curva estándar (CE). El análisis de covarianza demostró que las curvas son paralelas ya que no hay diferencia significativa entre las pendientes ($P>0.05$).

5.6.4. Efecto matriz

La figura 22 muestra el resultado obtenido cuando concentraciones conocidas de VTG purificada se agregaron al plasma control en 6 diferentes diluciones. Para las diluciones más bajas (1:10, 1:100, 1:500, 1:1000) se observa claramente la inhibición de la reacción, en donde el Ac no reconoce a la VTG, por lo que no es posible su detección o cuantificación ya que las absorbancias obtenidas son mucho más bajas que aquellas de la curva estándar para la misma concentración de VTG. Este efecto también se observa en la curva generada a estas diluciones la cual no se comporta de manera similar a la curva

estándar es decir, estas curvas no son paralelas. En la dilución 1:5000 la curva generada es paralela a la curva estándar y además los valores de absorbancia entre ésta y la curva estándar no presentan diferencias significativas ($P>0.05$). Sin embargo, en la dilución 1:10000, las absorbancias son mayores a los de la curva estándar sobre todo a concentraciones bajas de VTG. Por esto se determinó que a una dilución 1:5000 se reduce el efecto matriz, por lo que se escogió esta dilución para el análisis subsecuente de las muestras.

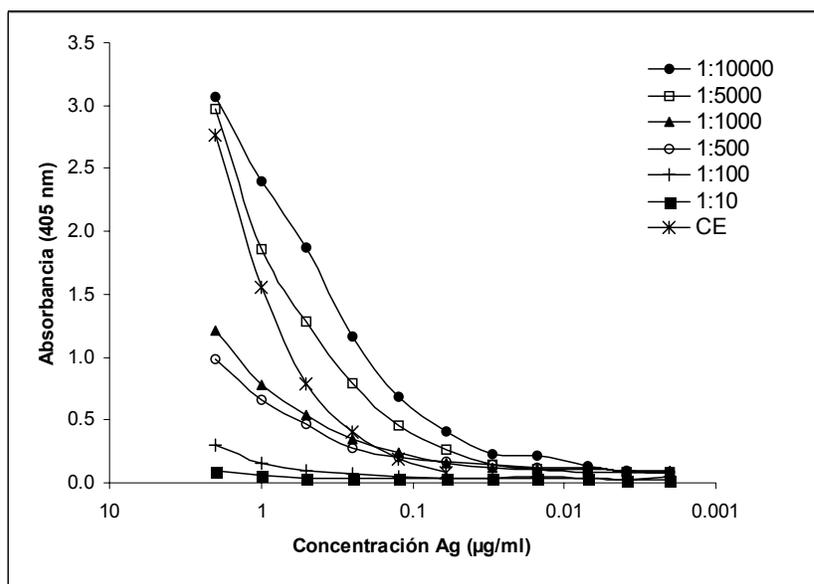


Figura 22. Evaluación del efecto matriz en diferentes diluciones de plasma inducido. Las seis diferentes diluciones del plasma inducido se compararon con la curva estándar (CE). Se determinó que a una dilución 1:5000 se reduce el efecto matriz.

5.7. Reacción cruzada con otras especies

5.7.1. ELISA y Western Blot

Se realizó un ensayo para determinar si el Ac anti-VTG de *C. mydas agassizii* reaccionaba positivamente con plasma inducido de otras dos especies de tortuga marina (*Caretta caretta* y *Eretmochelys imbricata*).

El resultado del ensayo ELISA mostró para ambas especies, una curva similar a la curva de titulación de *C. mydas agassizii*, en donde claramente a diluciones bajas el Ac reacciona

positivamente, incluso hay una saturación en las dos primeras diluciones (1:30,000 y 1:60,000). En contraste, el plasma control para ambas especies no reaccionó con el Ac, lo cual indica que no hay reconocimiento inespecífico de otras proteínas del plasma (Figura 23).

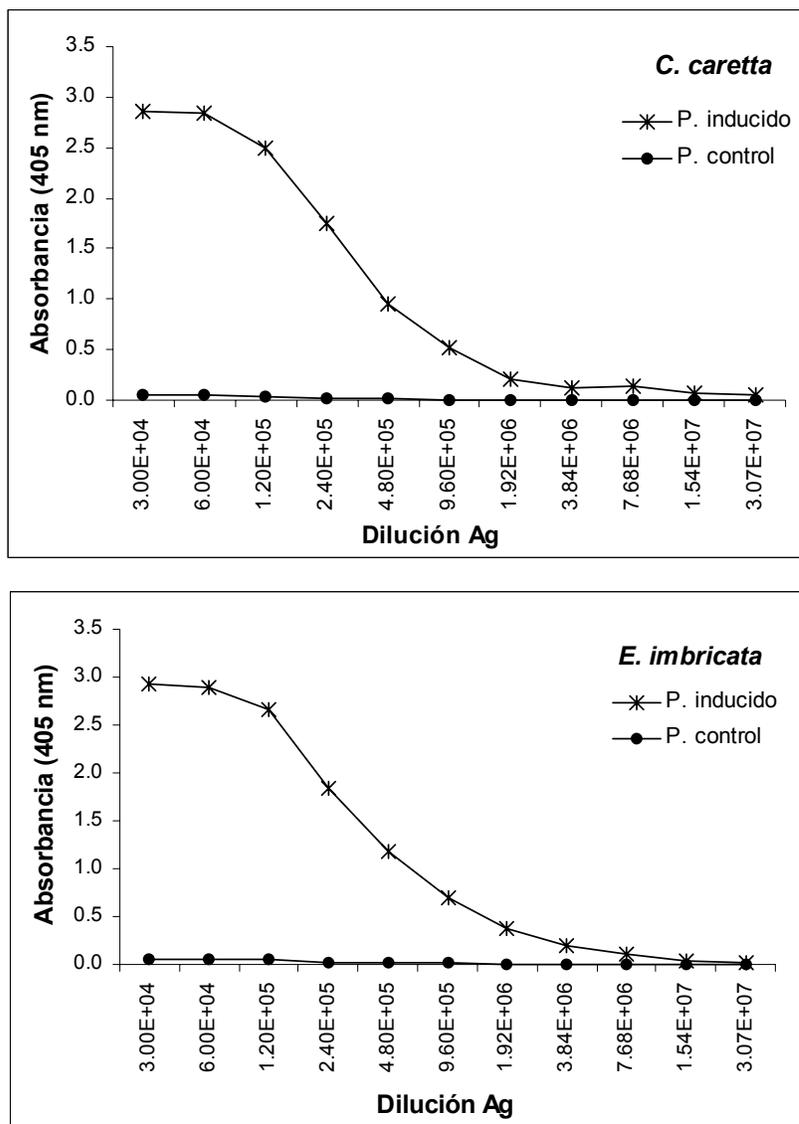


Figura 23. Reacción cruzada con plasma inducido de *C. caretta* y *E. imbricata*. El ensayo inmunoenzimático (ELISA) mostró su aplicabilidad con otras especies de tortuga marina para la detección de VTG.

Resultados similares se obtuvieron en el Western Blot (Figura 24), en donde se observa la reacción positiva que hubo con las bandas de 200, 137 y 116 kDa en el plasma inducido de *C. caretta* y *E. imbricata*.

Sin embargo no se observó reacción con la banda de 151 kDa. Por otro lado, no hubo reacción inespecífica con proteínas del plasma control de ambas tortugas.

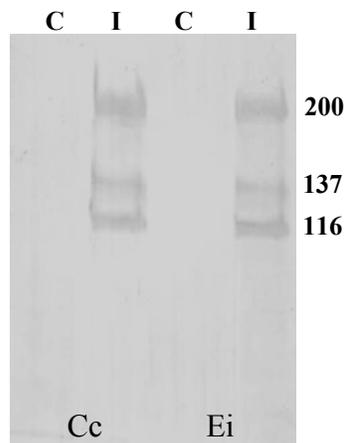


Figura 24. Western Blot del plasma de *C. caretta* y *E. imbricata*. Existe reacción cruzada con VTG de otras especies de tortuga sin que el Ac sea inespecífico con otras proteínas del plasma control.

5.8. Análisis de muestras inducidas

Las muestras colectadas durante la inducción en los días (-1, 7, 17, 24, 28 y 189) se analizaron por medio de ELISA para cuantificar la concentración de VTG inducida. Los resultados del ELISA mostraron un CV dentro del ensayo de 8.4%.

La concentración de VTG en el plasma del macho 1 antes y después de la inducción se presentan en la Figura 25. Se observó un incremento paulatino en la concentración de VTG a lo largo del tiempo. El plasma antes de la inducción no presentó concentraciones de VTG, sin embargo, 7 días después de la primera inyección presentó una concentración de 35 mg/ml y alcanzó, en el día 28, una concentración de 116 mg/ml (un aumento de más del doble). Además se observó que para el día 189 hubo una disminución en la concentración de VTG a 73 mg/ml.

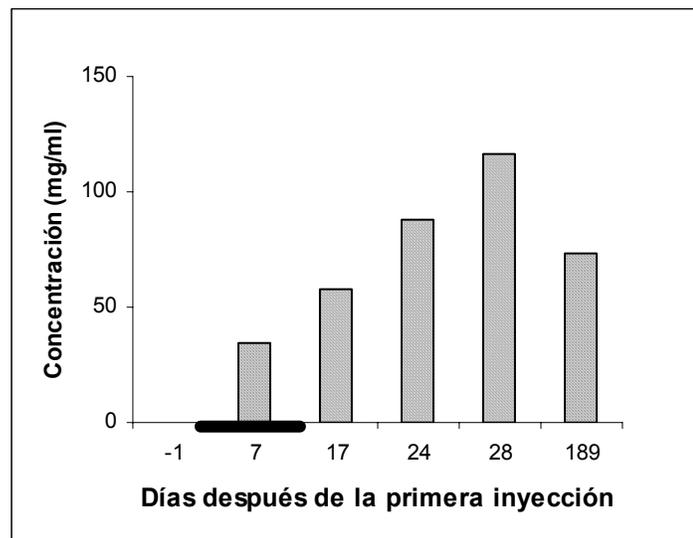


Figura 25. Concentración de VTG en plasma de macho de *C. mydas agassizii* inducida hormonalmente con E_2 . La barra oscura en el eje de las x representa el periodo de aplicación de las inyecciones.

VI. DISCUSIÓN

La tortuga prieta, *Chelonia mydas agassizii*, es una de las siete especies de tortuga marina que se distribuye en los océanos y costas mexicanas y como todas las demás, se encuentra en peligro de extinción (Cliffon *et al.*, 1995). Este decremento en sus poblaciones se ha atribuido principalmente a la sobreexplotación (Lutcavage *et al.*, 1997; Marcovaldi y Thomé, 2000; Márquez, 2002). Esto ha llevado a un intenso esfuerzo para su conservación desde hace 20 años, sin embargo, esta población no se ha recuperado a sus niveles históricos (Avarado-Díaz, 2001), por lo que se cree que existen factores alternos que estén contribuyendo a la lenta recuperación de la especie.

En los últimos años, la descarga de contaminantes y desechos no biodegradables a los océanos y costas ha ido en aumento, dañando de manera considerable el hábitat y el desempeño fisiológico de la fauna silvestre. Con base en observaciones científicas se sabe que existe una gran diversidad de compuestos tanto de origen antropogénico (etinilestradiol, DDT, PCB's) como de origen natural (fitoestrógenos) que tienen la habilidad de modular el sistema endócrino provocando efectos tanto a nivel de individuo como de población (Kendall *et al.*, 1998). Los compuestos endócrino alterantes, en especial los xenoestrógenos, han recibido gran atención sobre todo por el efecto adverso que han provocado en el desempeño reproductivo de varias especies de peces (Allen *et al.*, 1999; Holland *et al.*, 1999; Folmar *et al.*, 2000; Matta *et al.*, 2001), anfibios (Palmer y Palmer, 1995; Palmer *et al.*, 1997; Kloas *et al.*, 1999) y reptiles (Crews *et al.*, 1995; Guillete *et al.*, 1994, 2000). Por esto, la necesidad de desarrollar ensayos para detectar estos compuestos y monitorear su efecto es muy importante sobre todo para especies en peligro de extinción como la tortuga prieta.

Debido a la gran diferencia estructural de los xenoestrógenos, estos ensayos deben basarse en biomarcadores de estrogenicidad, los cuales usen una respuesta estrogénica predecible y específica como indicador de exposición a un agente xenoestrogénico (Palmer y Palmer, 1995).

La vitelogenina ha sido ampliamente utilizada como biomarcador de xenoestrógenos ya que reúne las siguientes características: se sintetiza bajo estímulo estrogénico, es específica de hembras adultas, sin embargo, se puede expresar en machos y juveniles por la exposición a xenoestrógenos; se puede detectar en volúmenes muy pequeños de plasma por lo que es una prueba no destructiva, se sintetiza como respuesta a un amplio espectro de compuestos xenoestrógenicos y por último su detección indica un efecto fisiológico no simplemente la presencia de un químico (Heppell *et al.*, 1995; Palmer y Palmer, 1995; Jones *et al.*, 2000).

Esto explica el gran interés en el estudio de esta proteína además del desarrollo de ensayos que la detecten y cuantifiquen en plasma de una gran variedad de especies.

En el presente trabajo se caracterizó parcialmente la vitelogenina de *C. mydas agassizii* y se desarrolló un ensayo inmunoenzimático para su detección en plasma y de esta manera poder utilizarla como biomarcador de compuestos xenoestrogénicos dentro de un programa de evaluación de la salud de la tortuga prieta.

6.1. Inducción hormonal con 17 β -estradiol

La inducción con 17 β -estradiol (E₂) en machos ha sido ampliamente utilizada para promover la síntesis de vitelogenina. Generalmente se utilizan machos en la inducción porque en ausencia de ovarios, la VTG sintetizada por el hígado, permanece mayor tiempo en el torrente sanguíneo, lo que permite obtenerla en cantidades importantes. Además que el plasma antes de la inducción se puede utilizar como control negativo debido a la ausencia de VTG (Specker y Anderson, 1994). Esta inducción se ha llevado a cabo en diferentes especies como peces (Lomax *et al.*, 1998; Johnsen *et al.*, 1999; Parks *et al.*, 1999; Brion *et al.*, 2002), anfibios (Palmer y Palmer, 1995; Palmer *et al.*, 1997), reptiles como en la tuatara, *Sphenodon punctatus* (Brown *et al.*, 1994, 1997), en la lagartija, *Anolis pulchellus* (Morales *et al.*, 1996), en las tortugas de agua dulce *Trachemys scripta* (Palmer y Palmer, 1995) y *Chrysemis picta* (Duggan *et al.*, 2001) y por último en dos especies de

tortuga marina *Lepidochelys kempii* (Heck *et al.*, 1997; Vargas, 2000) y *Chelonia mydas* (Herbst *et al.*, 2003).

En *Chelonia mydas agassizii*, la inducción con E₂ promovió la síntesis de dos proteínas de alto peso molecular (500 y 240 kDa) a los cuatro días de la primera inyección, estas proteínas se encuentran ausentes en el perfil proteico del plasma de los machos antes de la inducción lo que se determinó por gel de electroforesis en condiciones nativas. La concentración de proteínas totales fue incrementando paulatinamente durante el tratamiento con E₂ de 59 mg/ml antes de la inducción a 147 mg/ml después de este. Ocho meses después, las proteínas inducidas permanecían presentes, aunque su concentración comenzó a disminuir y el plasma había recobrado su apariencia translúcida. Estos resultados coinciden con los reportados para *Chelonia mydas* (Herbst *et al.*, 2003), en donde la concentración de proteínas totales en el plasma se incrementó de 50 mg/ml antes de la inducción con E₂ a 100 mg/ml después de ésta.

Ambas proteínas inducidas (500 y 240 kDa) presentaron una naturaleza glico-lipo-proteica. La naturaleza glico-lipo-proteica de la vitelogenina ha sido comprobada para un gran número de especies entre ellos insectos (Dhadialla y Raikhel, 1990), crustáceos (Serrano, 2004) y peces (Mañanós *et al.*, 1994). Estas características bioquímicas se deben a que la vitelogenina es la proteína precursora del vitelo, la fuente nutricional del embrión en desarrollo. Por esto, el detectar la presencia de fracciones lipídicas, glucosídicas y proteicas por medio de colorantes específicos se ha determinado como una forma confiable de identificar la vitelogenina.

El cambio de apariencia del plasma de los machos inducidos, el aumento en la concentración de proteínas totales y finalmente la presencia de dos proteínas de naturaleza glico-lipo-proteica después del tratamiento, nos hizo pensar que el 17 β -estradiol promovió la producción de dos proteínas en *C. mydas agassizii* bioquímicamente similares a VTG, tal y como se había observado en otras especies de vertebrados ovíparos (Ho *et al.*, 1982).

6.2. Purificación

Con el fin de obtener las proteínas inducidas con un grado de pureza elevado se ensayaron tres métodos de purificación: precipitación con $MgCl_2/EDTA$, cromatografía de filtración en gel y cromatografía de intercambio iónico.

La purificación de vitelogenina por precipitación ha sido probada en *Xenopus laevis* (Wiley *et al.*, 1979; Palmer *et al.*, 1997), *T. scripta* (Palmer y Palmer, 1995; Selcer y Palmer, 1995) y *S. punctatus* (Brown *et al.*, 1997) y en todas se ha obtenido un alto grado de pureza. Sin embargo, para *C. mydas agassizzi* aun haciendo modificaciones del protocolo en los tiempos de incubación con el $MgCl_2/EDTA$, no se pudieron separar las dos proteínas inducidas, ya que ambas siempre precipitaban juntas y además se observó que al dejar en incubación con $MgCl_2/EDTA$ por toda la noche, se perdía la banda de 500 kDa. La eficiencia de purificación fue de 39.6 mg de VTG semipura por cada ml de plasma inducido con una concentración de 147 mg/ml de proteínas totales indicando una eficiencia baja comparada con los datos de Wiley *et al.* (1979) quien logra recuperar mas del 95% de vitelogenina a partir de plasma inducido conteniendo 50 mg/ml de VTG.

Cabe señalar que este protocolo fue diseñado por Wiley *et al.* (1979), para la precipitación específicamente de vitelogenina de diversos vertebrados y logra obtenerla el 100% pura. Sin embargo, como se mencionó, en el presente trabajo no se logró separar las dos proteínas, ni tampoco obtener estas dos totalmente separadas del resto de las proteínas del plasma, por lo que se decidió probar otra metodología.

Se pensó en la cromatografía de filtración en gel como un paso previo a la cromatografía de intercambio iónico con el fin de utilizarla a manera de tamiz y poder eliminar proteínas de menor peso molecular, aumentando así la probabilidad de poderlas separar por medio de su carga. Sin embargo, los resultados de esta cromatografía no fueron por completo satisfactorios ya que si bien las proteínas de bajo peso molecular se eluían en una sola fracción (B), las proteínas inducidas se eluían en las dos fracciones resultantes (A y B). Si se seleccionaba una sola fracción se perdía una cantidad considerable de éstas, pero si se juntaban las dos fracciones el volumen resultante era muy grande y sin ninguna separación.

Por esta razón se decidió eliminar este paso e inyectar directamente el plasma inducido en la columna de intercambio iónico.

En la cromatografía de intercambio iónico las proteínas se separan de acuerdo a la carga, la cual dependerá en este caso, del grado de fosforilación de la molécula, lo que permite eluirlos utilizando elevadas concentraciones de NaCl. Debido a esto, se diseñaron tres protocolos de corrimiento haciendo cambios en el tipo y volumen de gradiente (DEAE-1, DEAE-2, DEAE-3). A pesar de las diferencias en el gradiente de cada una de las cromatografías, el resultado fue el mismo en los tres protocolos, es decir, no se lograron separar las dos proteínas inducidas y además, la proteína de 500 kDa en DEAE-1 y DEAE-2 se perdía casi por completo, no así cuando en DEAE-3 se agregó PMSF directamente a la muestra. Así mismo, en las tres cromatografías, las dos proteínas inducidas se eluyeron a la mayor concentración de NaCl, lo que indica el alto grado de fosforilación de ambas proteínas, una de las características principales que presenta la molécula de VTG (Gapp *et al.*, 1979; Ho *et al.*, 1982; Gavaud, 1986; Carnevali y Belvedere, 1991).

Los resultados obtenidos de las cromatografías realizadas, fueron el primer indicio de que las fracciones que se observaban en condiciones nativas (500 y 240 kDa) correspondían a proteínas con características bioquímicas tan similares que impiden su separación ya que aun probando diferentes protocolos de purificación estas fracciones no se separan, por lo que podríamos estar observando la misma proteína. Además, el hecho de perder la proteína de mayor peso molecular y encontrar únicamente la de menor peso molecular, indica que probablemente estas proteínas correspondan al dímero y al monómero de la vitelogenina, ya que al inyectar la muestra en ausencia de PMSF, la banda de 500 kDa (dímero) se desnaturaliza para formar la banda de 240 kDa (monómero), proteína única que se observa en los geles nativos de las eluciones obtenidas en las cromatografías, DEAE-1 y DEAE-2. Estudios previos que se han realizado con vitelogenina de otros reptiles y anfibios (Ho *et al.*, 1982; Carnevali y Belvedere, 1991) indican que la vitelogenina circula como un dímero de 400-500 kDa, lo cual coincide con los resultados observados para *C. mydas agassizzi*.

6.3. Caracterización parcial

La comparación del perfil proteico en SDS-PAGE del plasma control e inducido y la VTG purificada, mostró una banda de 200 kDa ausente en el plasma control, esto coincide con el peso molecular reportado de la VTG en otras especies como *Salvelinus alpinus* (Johnsen *et al.*, 1999), *X. laevis* (Palmer *et al.*, 1997), *S. punctatus* (Brown *et al.*, 1997), *T. scripta* (Selcer y Palmer, 1995) *L. kempii* (Heck *et al.*, 1997; Vargas, 2000) y *C. mydas* (Herbst *et al.*, 2003).

Adicionalmente se encontraron otras bandas de 151, 137 y 116 kDa, también ausentes en el plasma control. Estos resultados coinciden con los obtenidos en *L. kempii* (Heck *et al.*, 1997) y en *C. mydas* (Herbst *et al.*, 2003) en donde el patrón de bandas del plasma inducido es muy similar al observado para *C. mydas agassizii*, y se identifica a la banda de 200 kDa como el monómero de VTG, mientras que tres bandas dentro del rango de 200-116 kDa, son consideradas como productos de degradación de la VTG. Resultados similares también se han encontrado en el pez *Salvelinus alpinus* (Johnsen *et al.*, 1999) y la rana *X. laevis* (Palmer *et al.*, 1997). Estas bandas producto de degradación de la VTG quizás se deban a que esta proteína es muy inestable y puede ser susceptible a degradación con repetidas congelaciones y descongelaciones durante su manipulación en el laboratorio o después de los procesos de cromatografía y precipitación.

Sin embargo, la proteína de 116 kDa es consistente en todos los organismos anteriormente mencionados, además, se ha reportado que en la lagartija *Anolis pulchellus* existe un polipéptido de 116 kDa que se sintetiza en el hígado como una lipoproteína independiente y es liberada al torrente sanguíneo hacia los ovarios donde el ovocito en desarrollo toma esta lipoproteína para formar parte del vitelo sin ningún proceso de proteólisis posterior (Baerga-Santini y Hernández de Morales, 1991; Morales *et al.*, 1996). Un proceso similar ocurre en *Lacerta vivipara* (Gavaud, 1986 I y II) en donde se han caracterizado VTG de aproximadamente 220 y 110 kDa. Por esto, no se pudo descartar la posibilidad de que el hígado de *C. mydas agassizii* también sintetice más de una forma de vitelogenina.

Por otra parte, mientras que el 17 β -estradiol promovió la síntesis de estas cuatro proteínas (200, 151, 137 y 116 kDa), otros péptidos de 60-66 kDa y 170 kDa disminuyeron notablemente en el plasma inducido. Esto quiere decir que el estradiol juega un papel importante en la regulación de la síntesis proteica, promoviendo por un lado la síntesis de VTG y por otro inhibiendo la síntesis de otras proteínas. En estudios realizados con *C. picta*, encontraron que los niveles de proteínas totales en plasma no variaban durante el ciclo reproductivo de esta tortuga de agua dulce, mientras que la concentración de VTG si variaba, lo que sugiere un decremento compensatorio en la síntesis de otras proteínas plasmáticas durante la vitelogenesis (Gapp *et al.*, 1979). Selcer y Palmer (1995) también observaron que en el plasma de *T. scripta* el 17 β -estradiol promovía la síntesis de vitelogenina mientras que inhibía la síntesis de otras proteínas como la albumina (66 kDa) y otra más de 170 kDa que no fue identificada, sin embargo, las proteínas totales si aumentaban con respecto al tiempo de inducción, como en el caso de *C. mydas agassizii*. Esto indica que esta regulación de las proteínas esta dada efectivamente por el estradiol, sin embargo en condiciones de inducción no natural, la inhibición compensatoria de otras proteínas como la albumina no es evidente.

6.4. Secuencia de aminoácidos y electroelución

Con el fin de confirmar la identidad de las bandas de 200 y 116 kDa se determinó la secuencia de aminoácidos de la porción N-terminal y de algunos péptidos internos de estas dos proteínas. La secuencia N-terminal de la proteína de 200 kDa resultó idéntica a la secuencia N-terminal de la VTG reportada para *Chelonia mydas* (Herbst *et al.*, 2003), y similar en 8 aminoácidos a la secuencia de la VTG de la tuatara, *Sphenodon punctatus* (Brown *et al.*, 1997). La similitud encontrada con secuencias de vitelogenina de otros vertebrados (*Gallus gallus*, *Larus argentatus* y *Xenopus laevis*) va de 4 a 6 aminoácidos. El aminoácido 7 (prolina, P) y el 9 (fenilalanina, F) se encuentran conservados en las 5 secuencias de VTG reportadas en el NCBI hasta la fecha (mayo, 2004), sin embargo hasta ahora se desconoce la posible función de estos aminoácidos por la que se encuentren

conservados (Tabla 3). La comparación de las secuencias de los péptidos internos obtenidos, mostró similitud con secuencias de aminoácidos de vitelogenina de *Gallus gallus* y *Xenopus laevis*, lo que comprueba que las bandas que se visualizan en el SDS-PAGE, son producto de la degradación de la vitelogenina y no una proteína diferente que se sintetice también como respuesta al 17β -estradiol. Sin embargo aun quedaba la duda si estas bandas pertenecían a dos formas de VTG.

El hecho de haber encontrado un péptido interno de secuencia idéntica en las proteínas de 200 y 116 kDa, no era suficiente evidencia para descartar la posibilidad de dos formas de VTG que sean muy similares aun a nivel de secuencia de aminoácidos, por esta razón las proteínas nativas de 240 y 500 kDa se purificaron por electroelución y se analizaron por SDS-PAGE, de esta manera se sabría si estas dos proteínas corresponden a una forma de VTG en dos conformaciones o dos formas distintas de VTG. El resultado de este ensayo fue que para ambas proteínas, se obtuvieron las mismas cuatro bandas (200, 151, 137 y 116 kDa), lo que descarta que se traten de dos formas distintas de VTG.

Con la secuenciación de aminoácidos y la electroelución se pudo confirmar de manera concluyente que la VTG identificada para *C. mydas agassizii* en este trabajo es un homodímero de aproximadamente 500 kDa, es decir, que se compone de dos monómeros de igual peso molecular, en este caso de 200-240 kDa, el cual debido a su conformación se observa tanto en estado desnaturalizante como nativo. Además, se confirmó que las tres bandas restantes (151, 137 y 116 kDa) representan productos de degradación del monómero de la VTG debido a la inestabilidad de la misma. De esta manera también se descartó la posibilidad de que se trate de dos proteínas con características bioquímicas similares.

6.5. Caracterización de antisuero anti-VTG de *C. mydas agassizii*

Los cuatro antisueros generados (Ac1 y Ac2 para la proteína de 500kDa; Ac3 y Ac4 para la proteína de 240 kDa) mostraron títulos distintos, en donde el Ac1 y el Ac4 presentaron los títulos más bajos. Cabe señalar que estos dos antisueros resultaron de un mayor número de

inmunizaciones, es decir, seis inyecciones en lugar de tres como dictaba el protocolo tomado de Harlow y Lane (1988). Quizás este título más bajo pudo haber sido producto de un estrés en los animales debido a un exceso de manejo. Por lo que se recomienda aplicar una dosis inicial y dos refuerzos extras y sangrar 10 días después de la última inyección.

Por otro lado, el Ac2 tuvo el título más alto ya que su curva de titulación mostró tres zonas bien definidas caracterizadas por una zona de saturación del anticuerpo, representada por la asíntota en la curva; una zona en donde se muestra la relación proporcional que existe entre la cantidad de Ag y Ac (pendiente) y por último una zona donde el Ac es insuficiente para reaccionar con la cantidad estándar de Ag. Ésta representa una curva de titulación óptima donde se puede encontrar la dilución del antisuero que presenta la mejor relación entre la abundancia y la avidéz de los distintos anticuerpos presentes en el antisuero generado.

De igual forma el Ac2 mostró la mayor especificidad al reaccionar únicamente con las proteínas inducidas en el plasma después del tratamiento además de no reaccionar de manera inespecífica con proteínas del plasma control. Esta especificidad también se corroboró al analizar el plasma control por medio de un ELISA con el Ac2, en el cual se observó una respuesta inespecífica únicamente a una dilución 1:100 donde un exceso de anticuerpos pudo haber causado esta reacción positiva.

Por otra parte, el análisis de Western-blot para la especificidad, confirmó una vez más, que las dos fracciones utilizadas como antígenos en la elaboración de los antisueros (500 kDa, Ac1 y Ac2; 240 kDa, Ac3 y Ac4) se trataban de la misma proteína (VTG) en dos conformaciones, como dímero y monómero ya que los dos antisueros analizados (Ac2 y Ac3) reaccionaron exactamente con las mismas bandas. Después de evaluar las características de abundancia, avidéz y especificidad de los antisueros, se escogió el Ac2 para la validación del ELISA.

6.6. Validación del ensayo inmunoenzimático (ELISA)

Se demostró que el ELISA para la detección y cuantificación de VTG en plasma de *C. mydas agssizii* desarrollado en el presente trabajo es sensible y altamente reproducible.

La concentración de Ag:Ac óptima fue de 2 µg/ml de VTG y una dilución de Ac 1:3000. Ésta combinación representa la solución más concentrada de antígeno y más diluida de anticuerpo que alcanza una unidad de absorbancia máxima dentro del rango lineal del lector de placa (0-3) y a partir de la cual se generó la pendiente más pronunciada. Esta pendiente representa la proporción Ag:Ac que presenta el mayor cambio de absorbancia con el menor cambio de concentración de Ag. Es decir, es la parte de la curva que muestra mayor sensibilidad en el ensayo (Specker y Anderson, 1994). Con base en estos datos, se realizó una curva estándar con concentraciones conocidas de VTG, en donde se representó la parte más sensible del ensayo, es decir, la pendiente. Para corroborar si la concentración de VTG analizada y la absorbancia generada se relacionaban de manera lineal, se realizó una regresión lineal cuya R^2 fue de 0.996, lo que indica una buena correspondencia entre la absorbancia y la concentración. A partir de la linearización de la curva, se generó una fórmula matemática que permitirá la cuantificación de niveles VTG en muestras de plasma de tortuga prieta que se requieran analizar.

La sensibilidad del ensayo, definido como el rango de concentración de VTG que posee una respuesta lineal se estimó entre 15 ng/ml y 2 µg/ml con una R^2 de 0.996, estos datos son comparables con los obtenidos por Herbst *et al.* (2003) en un ELISA competitivo para tortuga verde, cuya sensibilidad se estimó dentro del rango de 0-2 µg/ml con una R^2 de 0.999. En ambos casos, esta alta sensibilidad del ELISA permite el uso de este ensayo cuando se requiere detectar bajas concentraciones de VTG. Esto podría indicar que a pesar de que el ELISA competitivo se considera más sensible y exacto, en realidad no existe una gran diferencia entre ambos. Herbst *et al.* (2003) y Boucard *et al.*, (2002) como parte de la validación del ELISA, realizan una comparación entre un ensayo competitivo y no competitivo y en ambos casos concluyen que los dos ensayos presentan las características de alta sensibilidad y precisión. Por lo que se podría hacer uso de los dos indistintamente,

sin embargo, el ELISA no competitivo, posee ciertas ventajas sobre el competitivo: permite el análisis de un número mayor de muestras ya que no requiere de pasos previos de incubación, lo que representa también menor tiempo y menor cantidad de reactivos (Herbst *et al.*, 2003; Specker y Anderson, 1994).

El paralelismo observado entre la curva estándar y las curvas generadas con diferentes diluciones de plasma inducido, mostró que no había diferencia significativa entre las pendientes de las curvas ($P > 0.05$), es decir, que la respuesta fue proporcional a la cantidad de antígeno adsorbido, lo que demuestra que puede haber concentraciones diferentes de vitelogenina pero el comportamiento del Ac hacia el Ag es el mismo, además confirma la ausencia de inespecificidad del Ac².

La precisión del ensayo se demostró con los coeficientes de variación (CV) dentro y entre ensayos los cuales fueron menores al 8 y 10% respectivamente, mientras que Herbst *et al.* (2003) reporta coeficientes de variación ligeramente mayores a los obtenidos en este trabajo (8.6 y 13.3%). Specker y Anderson (1994) mencionan que valores mayores al 10% para los CV aun son aceptables para que el ensayo sea reproducible. Esta reproducibilidad permite la comparación directa de muestras en el mismo ensayo y la comparación entre diferentes ensayos realizados en diferentes tiempos.

Durante el desarrollo de la curva estándar, se observó que la exactitud y precisión del ensayo se pueden ver afectados por problemas de degradación de la molécula de VTG lo que se manifestó en cambios en la pendiente de la curva estándar además de lecturas de absorbancias menores con la misma concentración de VTG en un lapso de dos a tres días (datos no mostrados). Estas observaciones sugieren que conforme la proteína se degrada se vuelve menos antigénica, quizás debido a que los determinantes antigénicos de la molécula se vean afectados por la degradación, lo que provoca que el antisuero pierda capacidad de reconocimiento de la molécula. La inestabilidad de la molécula de VTG ha sido reportada por varios autores, tanto en peces (Silversand *et al.*, 1993; Lomax *et al.*, 1998; Johnsen *et al.*, 1999), como en anfibios (Pamer y Palmer, 1995) y reptiles (Selcer y Palmer, 1995; Heck *et al.*, 1997; Vargas, 2000; Herbst *et al.*, 2003). Estos problemas de degradación, se

presentaron aunque la muestra contenía PMSF y estaba almacenada a -20°C , pero se lograron solucionar haciendo pequeñas alícuotas de VTG pura (10 μl) para ser descongeladas una sola vez. De esta manera se obtuvieron los resultados anteriormente presentados en donde el CV entre ensayos disminuyó notoriamente de un 35% a 9.6%.

El efecto matriz se refiere a la interacción que presenta el Ag con el resto de las moléculas presentes en la matriz en que se encuentre suspendida, la cual afectará de manera directa su antigenicidad. El propósito de evaluar este efecto, es intentar igualar el comportamiento de la VTG en la curva estándar con las muestras a evaluar con el fin de cuantificar de manera más exacta la VTG presente en cada muestra. En este ensayo se observó que a diluciones altas (1:10, 1:100, 1:500, 1:1000), el efecto matriz inhibe la reacción entre la VTG y el Ac2, lo cual se evidencia con la falta de paralelismo entre estas curvas y la curva estándar. No obstante en la dilución 1:10000, las proteínas de la matriz provocan el efecto contrario, en donde las absorbancias son mayores a los de la curva estándar sobre todo a concentraciones bajas de VTG, lo que sugiere un aumento en la antigenicidad de la VTG quizás debido a que los epitopes quedan más expuestos. Sin embargo se encontró que a la dilución 1:5000, la curva generada es paralela a la curva estándar y además los valores de absorbancia entre ésta y la curva estándar no presentan diferencias significativas ($P>0.05$). Con estos resultados se determinó que a una dilución 1:5000 el efecto matriz se reduce, por lo que se estableció que a esta dilución se deberá realizar el análisis las muestras.

La evaluación de la reacción cruzada del Ac2 se hizo por medio de Western-blot y ELISA. Los resultados mostraron que el Ac2 generado contra VTG de *C. mydas agassizii* posee alta avidéz y especificidad por VTG de otras tortugas marinas (*Eretmochelys imbricata* y *Caretta caretta*). Se generaron curvas de titulación similares a la obtenida en *C. mydas agassizii*, sin que se observara ninguna reacción inespecífica con proteínas del plasma control. Esta reacción cruzada entre especies cercanas se ha reportado en varias especies de peces como *Danio rerio* (Brion *et al.*, 2002) con diversas especies de la familia Cyprinidae, no así con peces no ciprinidos, por lo que sugiere que la molécula de VTG puede estar conservada en especies de la misma familia. En reptiles se ha encontrado también reacción cruzada entre un Ac anti-VTG generado para una tortuga de agua dulce (*T. scrypta*) con

VTG de tortuga marina, *L. kempii* (Vargas, 2000) y otra tortuga de agua dulce, *C. picta* (Irwin *et al.*, 2001). Aun más, este mismo Ac, se probó con un anfibio, *X. laevis* (Palmer *et al.*, 1997), generando en todos una reacción positiva, lo que indica que la molécula de VTG es altamente conservada entre diferentes especies de tortuga e incluso entre reptiles y anfibios. Sin embargo, para un ensayo de esta naturaleza, en el que se requiere una alta especificidad, no es recomendable utilizar Ac de organismos tan distantes ya que los resultados no serían del todo confiables. No obstante, como señala Brion *et al.* (2002), es posible utilizar el antisuero generado entre organismos de la misma familia.

Estos resultados indican que el ensayo inmunoenzimático validado para VTG de *C. mydas agassizii* se puede aplicar en la detección y cuantificación de VTG de otras especies de tortuga marina como *C. caretta* y *E. imbricata*, aumentando el potencial de aplicación de este ensayo. Resultaría interesante entonces, evaluar el Ac generado en este trabajo con el resto de las tortugas marinas pertenecientes a la familia Cheloniidae.

6.7. Concentración VTG en las muestras inducidas

El incremento paulatino en la concentración de VTG cuantificada en el plasma del macho inducido con E₂ corresponden con el incremento paulatino encontrado en la concentración de proteínas totales a lo largo del tiempo de inducción. Es interesante notar la proporción de VTG con respecto a la concentración de proteínas totales la cual va del 50 al 80%, de la muestra tomada el día 7 a la tomada el día 28 después de la primera inyección. Esta proporción quizás no sea tan notorio en los SDS-PAGE del plasma inducido, sin embargo se debe de tomar en cuenta que el ELISA es una técnica mucho más sensible.

Estos resultados coinciden con las observaciones hechas con respecto a la regulación de la síntesis de proteínas como la VTG y la albumina. En donde en condiciones naturales esta regulación es evidente (Gapp *et al.*, 1979), manteniendo una concentración de proteínas totales del plasma constantes a los largo del ciclo reproductivo de *C. picta*. No así en condiciones de inducción artificial en *T. scripta* (Selcer y Palmer, 1995) y *C. mydas*

agassizii, donde la proporción de VTG inducida es tan alta (80%), que a pesar de la disminución de otras proteínas plasmáticas, la concentración de proteínas totales aumenta.

Por otra parte, las concentraciones de VTG obtenidas para *C. mydas agassizii* no coinciden con las obtenidas para *C. mydas* (Herbst *et al.*, 2003), donde después de 11 inyecciones con una dosis de E₂ de 1 mg/kg de peso obtienen 38-40 mg/ml de VTG en contraste con 116 mg/ml de VTG para *C. mydas agassizii* después de 7 inyecciones con la misma dosis. Esta diferencia en concentraciones se deba quizás a la diferencia en el peso de los organismos inducidos, ya que Herbst *et al.* (2003) inducen un organismo juvenil de sexo indeterminado de 5 kg, mientras que en el presente trabajo se indujo un macho adulto de 60 kg. Pudiendo ser el primero una hembra joven cuyos ovarios comenzaron a introducir la VTG producida por lo que esta proteína no permaneció tanto tiempo en el plasma, sucediendo lo contrario en el macho de *C. mydas agassizii*, donde la VTG inducida permaneció un mayor tiempo en el plasma permitiendo su cuantificación, razón por la cual para la inducción de VTG en cantidades suficientes para su posterior purificación se utilizan machos y no hembras (Specker y Anderson, 1994).

6.8. Aplicaciones

La información tan valiosa que se puede generar a partir de la detección y cuantificación de VTG en plasma de vertebrados ovíparos a llevado al desarrollo y validación de un gran número de ensayos en distintas especies de peces, anfibios y reptiles (Parks *et al.*, 1999; Palmer *et al.*, 1997; Herbst *et al.*, 2003).

En este trabajo se expuso su potencial aplicación en la detección de compuestos xenoestrogénicos que puedan estar deteriorando el éxito reproductivo de *C. mydas agassizii* y de esta manera contribuyendo en la lenta recuperación de sus poblaciones. Irwin *et al.* (2001) empleó un ensayo de esta naturaleza como indicador de contaminación en estanques cercanos a zonas dedicadas a la agricultura y ganadería; por otra parte se han desarrollado ensayos con organismos modelos como *Danio rerio* (Brion *et al.*, 2002), *X. laevis* (Palmer

et al., 1997) y *T. scripta* (Palmer y Palmer, 1995) en bioensayos dosis-respuesta, para determinar la capacidad xenoestrogénica de diversos contaminantes.

Una segunda aplicación es el de evaluar los niveles de VTG durante las fases del ciclo reproductivo de las hembras y de esta forma poder identificar las diferentes etapas de la vitelogénesis (Duggan *et al.*, 2001), además se podría utilizar para la identificación de hembras maduras sexualmente (Vargas, 2000). Se ha propuesto que en peces que carecen de dimorfismo sexual (Lomax *et al.*, 1998), la identificación de esta proteína específica de hembras adultas podría servir para determinar el sexo de estos organismos.

Cualquiera que sea la aplicación del ensayo, debe de tomarse en cuenta lo siguiente: para el primer caso en que se busca una respuesta no natural, es importante tener como sujetos de estudio a juveniles o machos adultos en los que la síntesis natural de la VTG no distorsione los resultados llevando esto a una interpretación errónea. En el segundo caso, en donde se busca una respuesta natural, debe de tomarse en cuenta la posibilidad que existe de que la VTG detectada sea producto de una inducción por xenoestrógenos.

6.9. Perspectivas

La disrupción endocrina se ha convertido en los últimos años en un tema prioritario en la evaluación de efectos de contaminantes sobre la fauna silvestre, ya que se ha demostrado en un gran número de estudios científicos que estos contaminantes están afectando el desempeño fisiológico de los organismos impidiéndoles reproducirse y por lo tanto sobrevivir (Ankley *et al.*, 1998).

Desde el punto de vista ecológico y evolutivo, la eficiencia reproductiva es la clave de la supervivencia de una especie (Campbell y Hutchinson, 1998). Por lo tanto evaluar los factores que puedan estar afectando este éxito reproductivo en una especie en peligro de extinción como la tortuga prieta es muy importante.

Durante varios años se ha invertido mucho esfuerzo en comprobar los efectos adversos que estos contaminantes producen en los organismos y en evaluar biomarcadores de estrogenicidad capaces de detectar no solo la exposición del organismo al contaminante sino además un efecto de este. Sin embargo, la mayoría de estos estudios se han realizado bajo condiciones de laboratorio y son pocos los estudios que se han llevado al campo.

El propósito del presente trabajo fue desarrollar una herramienta que forme parte de un programa de evaluación del estado de salud de la tortuga prieta del cual se puede derivar información muy valiosa que contribuya al entendimiento de los factores alternos a la sobrepesca, que esten contribuyendo a la lenta recuperación de esta especie y de esta manera poder atacar el problema desde otra perspectiva.

VII. CONCLUSIONES

- Se confirmó el papel del 17β -estradiol (E_2) en la regulación de la síntesis de proteínas en plasma de *Chelonia mydas agassizii*.
- Se identificó la vitelogenina en *C. mydas agassizii* teniendo en cuenta tres criterios: 1) su inducción artificial en machos con E_2 , 2) su naturaleza glico-lipo-proteica y 3) la homología de su secuencia N-terminal con VTG de otros vertebrados ovíparos.
- Se estableció la cromatografía de intercambio iónico como una metodología adecuada para aislar vitelogenina de tortuga con una alta eficiencia.
- Se caracterizó la vitelogenina de *C. mydas agassizii* como un homodímero de aproximadamente 500 kDa que se compone de dos monómeros de igual peso molecular, en este caso de 200-240 kDa.
- Se elaboró un antisuero anti-VTG de *C. mydas agassizii* cuya avidéz y especificidad han sido óptimos para el desarrollo de un ensayo inmunoenzimático.
- Se desarrolló un ensayo inmunoenzimático ELISA para la detección y cuantificación de VTG en plasma de *C. mydas agassizii* siendo este último sensible, y altamente reproducible.
- Se determinó la aplicabilidad de este ensayo en otras dos especies de tortuga marina: *Eretmochelys imbricata* y *Caretta caretta*.
- Se comprobó la utilidad de este ensayo en la cuantificación de VTG al analizar las muestras de plasma de macho inducido con E_2 .

VIII. REFERENCIAS

- Allen** Y., A.P. Scott, P. Matthiessen, S. Haworth, J.E. Thain y S. Feist. Survey of estrogenic activity in United Kingdom estuarine and coastal waters and its effects on gonadal development of the flounder *Platichthys flesus*. *Environmental Toxicology and Chemistry*. 18(8):1791-1800.
- Allner** B., G. Wegner, T. Knacker, y P. Stahlschmidt-Allner. 1999. Electrophoretic determination of estrogen-induced protein in fish exposed to synthetic and naturally occurring chemicals. *The Science of the Total Environment* 233: 21-31., México. *Marine Turtle Newsletter*. 92:4-7.
- Altschul** S.F., T.L. Maden, A.A. Schaffer, J. Zhang, Z. Zhang, W. Miller y D.J. Miller. 1997. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Research*. 25:3389-3402.
- Ankley** G., E. Mihaich, R. Stahl, D. Tillit, T. Colborn, S. McMaster, R. Miller, J. Bantle, P. Campbell, N. Denslow, R. Dickerson, L. Folmar, M. Fry, J. Giesy, L.E. Gray, P. Guiney, T. Hutchinson, S. Kennedy, V. Kramer, G. LeBlanc, M. Mayes, A. Nimrod, R. Patino, R. Peterson, R. Purdy, R. Ringer, P. Thomas, L. Touart, G. Van der Kraak y T. Zacharewski. 1998. Overview of a workshop of screening methods for detecting (anti-) estrogenic/androgenic chemicals in wildlife. *Annual review. Environmental Toxicology and Chemistry* 17(1):68-87.
- Alvarado-Díaz**, 2001, C. Delgado-Trejo e I. Suazo-Ortuño. 2001. Evaluation of the black turtle Project in Michoacán, México. *Marine Turtle Newsletter*. 92:4-7.
- Alvarado**, J., A. Figueroa y R. Byles. 1990. Alternative conservation methods used for marine turtles in Michoacán. En: T.H. Richardson, J.I. Richardson y M. Donnelly (comps.), *Proceedings of the tenth annual symposium on sea turtle biology and conservation*. NOAA tech. Memo. NMFS-SEFC-278. p. 183-184.
- Bolten**, A.B. 2003. Variation in sea turtles life history patterns: neritic vs oceanic developmental stages. En: Lutz P.L., J.A. Musik y J. Wineken (editors). *The biology of sea turtles Vol. 2*. CRC Press Inc., Boca Ratón Florida. 243-257.

- Boucard**, C.G.V., P. Levy, H.J. Ceccaldi y C.H. Brogren. 2002. Developmental changes in concentrations of vitellin, vitellogenin, and lipids in hemolymph, hepatopancreas, and ovaries from different ovarian stages of Indian white prawn *Fenneropenaeus indicus*. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*. 281:63-75.
- Bowen**, B.W.F., F.A. Abreu-Grobois, G.H. Balasz, N. Kamezaki, C.J. Limpus y R.J. Ferl. 1995. Trans-Pacific migrations of the loggerhead sea turtles demonstrated with mitochondrial DNA markers. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 92:3731-3734.
- Bowen** B.W. y S.A. Karl. 1997. Population genetics, phylogeography and molecular evolution. En: Lutz P.L. y J.A. Musick (editors). *The biology of sea turtles Vol. 1*. CRC Press. Inc., Boca Ratón Florida. 29-59.
- Brasfield** S.M., L.P. Weber, L.G. Talent, y D.M. Janz. 2002. Dose-response and time course relationships for vitellogenin induction in male Fence lizards (*Sceloporus occidentalis*) exposed to ethinylestradiol. *Environmental of Toxicology and Chemistry*. 21(7):1410-1416.
- Brion**, F., B.M. Nielsen, J.K. Eidem, A. Goksoyr y J.M. Porcher. 2002. Development and validation of an enzyme-linked immunosorbent assay to measure vitellogenin in zebrafish (*Danio rerio*). *Environmental Toxicology and Chemistry*. 28(8):1699-1708.
- Brown**, M.A., A. Cree, C.H. Daugherty, B.P. Dawkins y G.K. Chambers. 1994. Plasma concentrations of vitellogenin and Sex steroids in female Tuatara (*Sphenodon punctatus*) from northern New Zealand. *General and Comparative Endocrinology*. 95:201-212.
- Brown**, M.A., A. Carne y G.K. Chambers. 1997. Purification, partial characterization and peptide sequences of vitellogenin from a reptile, the tuatara *Sphenodon punctatus*. *Comparative Biochemistry and Physiology part B*. 100:347-359.
- Campbell**, P.M. y T.H. Hutchinson. 1998. Wildlife and endocrine disrupters: requirements for hazard identification. *Annual review. Environmental Toxicology and Chemistry*. 17(1):127-135.
- Carnevali** O. y P. Belvedere. 1991. Comparative studies of fish amphibian and reptilian vitellogenesis. *The Journal of Experimental Zoology*. 259:18-25.

- Cheek**, A.O., T.H. Brouwer, S. Carrol, S. Manning, J.A. McLachlan y M. Brouwer. 2001. Experimental evaluation of vitellogenin as a predictive biomarker for reproductive disruption. *Environmental Health Perspectives*. 109(7):681-690.
- Christiansen**, L.B., K.L. Pedersen, B. Korsgaard y P. Bjerregaard. 2000. In vivo comparison of xenoestrogens using rainbow trout vitellogenin induction as a screening system. *Environmental Toxicology and Chemistry*. 19(7):1867-1874.
- Cliffton**, K., D.O. Cornejo y R.S. Felger. 1995. Sea Turtles of the Pacific coast of Mexico. En: Bjorndal, K.A. (editor). *Biology and conservation of sea turtles*. Smithsonian Institution.
- Crain**, D.A., A.A. Rooney, E.F. Orlando y L.J. Guillete, Jr. 2000. Endocrine Disrupting Contaminants and hormone dynamics: lessons from wildlife. En: Guillete L., D.A. Crain (editores) *Environmental endocrine disrupters. An evolutionary perspective*. Taylor and Francis. New York, N.Y. 1-21.
- Crews**, D., J.M. Bergeron y J.A. McLachlan. 1995. The role of estrogen in turtle sex determination and the effect of PCBs. *Environmental Health Perspectives*. 103(7):73-77.
- Dhadialla**, T.S. y A.S. Raikhel. 1990. Biosynthesis of mosquito vitellogenin. *The Journal of Biological Chemistry*. 265(17):9924-9933
- Depledge**, M.H. y Z. Billingham. 1999. Ecological significance of endocrine disruption in marine invertebrates. *Marine Pollution Bulletin*. 39(1-12):32-38
- DeRosa** C., P. Richter, H. Pohl y D.E. Jones. 1998. Environmental exposures that affects the endocrine system: Public health implications. *Journal of Toxicology and Environmental Health, Part B*. 1:3-26.
- Diario** Oficial de la Federación. 2002. Norma Oficial Mexicana NOM-059-ECOL-2001, Protección ambiental-Especies nativas de México de flora y fauna silvestres-Categorías de riesgo y especificaciones para su inclusión, exclusión o cambio-Lista de especies en riesgo, 6 de marzo de 2002.
- Duggan** A., M. paolucci, A. Tercyak, M. Gigliotti, D. Small e I. Callard. 2001. Seasonal variation in plasma lipids, lipoproteins, apolipoprotein A-I and vitellogenin in the

- freshwater turtle, *Chrysemis picta*. Comparative Biochemistry and Physiology. Part A. 130:253-269.
- Facemire**, Ch.F. 2000. Bioaccumulation, storage and mobilization of endocrine altering contaminants. En Guillete L., D.A. Crain (editores) Environmental endocrine disrupters. An evolutionary perspective. Taylor and Francis. New York, N.Y. 52-81
- Folmar**, L.C., N.D. Denslow, V. Rao, M. chow, D.A. Crain, J. Enblom, J. Marcino y L.J. Guillette Jr. 1996. Vitellogenin induction and reduced testosterone concentrations in feral male carp (*Cyprinus carpio*) captured near a major metropolitan sewage treatment plant. Environmental Health Perspectives. 104(10):1096-1101.
- Folmar**, L.C., N.D. Denslow, K. Kroll, E.F. Orlando, J. Emblom, J. Marcino, C. Metcalfe y L.J. Guillette Jr. 2000. Altered Serum sex steroids and vitellogenin induction in Walleye (*Stizostedion vitreum*) collected near a metropolitan sewage treatment plant. Archives of Environmental Contamination and Toxicology. 40:392-398.
- Fry**, D.M. y C.K. Toone. 1981. DDT induced feminization of gull embryos. Science. 213:922-923
- Gapp**, D.A., S.M. Ho y I.P. Callard. 1979. Plasma levels of vitellogenin in *Chrysemis picta* during the annual gonadal cycle:mesurment by specific redioimmunoassay. Endocrinology. 104(3):784-790
- Gavaud**, J. 1986. Vitellogenesis in the lizard *Lacerta vivipara* Jacquin. I. Purification and partial characterization of plasma vitellogenin. General and Comparative Endocrinology. 63:1-10.
- Gavaud**, J. 1986. Vitellogenesis in the lizard *Lacerta vivipara* Jacquin. II. Vitellogenin synthesis during the reproductive cycle and its control by ovarian steroids. General and Comparative Endocrinology. 63:11-23.
- Giesy**, J.P., S.L. Pierens, E.M. Snyder, S. Miles-Richardson, V.J. Kramer, S.A. Snyder, K.M. Nichols y D.A. Villanueve. 2000. Effects of 4-nonylphenol on fecundity and biomarkers of estrogenicity in fathead minnows (*Pimephales promelas*). Environmental Toxicology and Chemistry. 19(5):1368-1377.

- Gillesby**, B.E. y T. Zacharewski. 1998. Exoestrogens: mechanisms of action and strategies for identification and assessment. Annual Review. Environmental Toxicology and Chemistry. 17(1):3-14.
- Guillette**, L.J. Jr, T.S. Gross, G.R. Masson, J.M. Matter, H.F. Percival y A.R. Woodward. 1994. Developmental abnormalities of the gonad and abnormal sex hormone concentrations in juvenile alligators from contaminated and control lakes in Florida. Environmental Health Perspectives 102(8):680-688.
- Guillette**, L.J. Jr. 2000. Contaminant-associated endocrine disruption in reptiles. En: Sparling, D.W., G. Linder, Ch. A. Bishop (editors). Ecotoxicology of amphibians and reptiles. Society of environmental toxicology and chemistry (SETAC). Pensacola, Florida. 595-615.
- Hamman** M., C.J. Limpus y D.W. Owens. 2003. Reproductive cycles of males and females. En: Lutz P.L., J.A. Musik y J. Wineken (editors). The biology of sea turtles Vol. 2. CRC Press Inc., Boca Ratón Florida. 135-161.
- Harlow**, E. y D. Lane. 1988. Antibodies. A laboratory manual. Cold Spring Harbor Laboratory. Nueva York, EE.U.A. pp 726.
- Heck**, J., D. MacKensie, D. Rostal, K. Medler y D. Owens. 1997. Estrogen Induction of plasma vitelogenina in Kemp's Ridley sea turtle (*Lepidochelys kempi*). General and Comparative Endocrinology. 107:280-288.
- Heppell**, S.A., N.D. Denslow, L.C. Folmar y C.V. Sullivan. 1995. Universal Assay of vitellogenin as a biomarker for environmental estrogens. Environmental Health Perspectives. 103(7):9-15.
- Herbst**, L.H., L. Siconolfi-Baez, J.H. Torelli, P.A. Klein, M.J. Kerben e I. Schumacher. 2003. Induction of vitellogenesis by estradiol -17 β and development of enzyme-linked immunosorbent assays to quantify plasma vitellogenin levels in green turtle (*Chelonia mydas*). Comparative Biochemistry and Physiology Part B. 135:551-563
- Ho**, S.M., S. Kleis, R. Mcpherson, G.J. Heisermann y I.P. Callard. 1982. Regulation of vitellogenesis in reptiles. *Herpetologica*. 38(1):40-5

- Holland** B.T., G.H. Monteverdi y R.T. Di Giulio. Octylphenol induces vitellogenin production and cell death in hepatocytes. *Environmental Toxicology and Chemistry*. 18(4):734-739.
- Hovemann** B., R. Galler, U. Walldorf, Hans Küpper y E.K.F. Bautz. 1981. Vitellogenin in *Drosophila melanogaster*: sequence of the yolk protein I gene and its flanking regions. *Nucleic Acids Research*. 9(18):4721-4734.
- Irwin**, L.K., S. Gray y E. Oberdörster. 2001. Vitellogenin induction in painted turtle, *Chrysemis picta*, as a biomarker of exposure of environmental levels of estradiol. *Aquatic Toxicology*. 55:49-60.
- Johnsen** ., H.K., H. Tveiten, N.P. Willassen y A.M. Arnesen. 1999. Arctic charr (*Salvelinus alpinus*) vitellogenin: development and validation of an enzyme-linked immunosorbent assay. *Comparative Biochemistry and Physiology. Part B*. 124:355-362.
- Jones**, PD., W.M. De Coen, L. Tremblay y J.P. Giesy. 2000. Vitellogenin as a biomarker for environmental estrogens. *Water Science and Technology*. 42:1-14.
- Karl**, S.A. y Bowen B.W. 1999. Evolutionary significant units versus geopolitical taxonomy: molecular systematics of an endangered sea turtle (genus *Chelonia*). *Conservation Biology*. 13(5):990-999.
- Kavlok**, R.T. y G.P. Datson. 1996. Research needs for the Risk assessment of health and environmental effects of endocrine disruptors: a Report of the U.S. EPA-sponsored workshop. *Environmental Health Perspectives* 104:715-740
- Kendall**, RJ., A. Brouwer y J.P. Giesy. 1998. A risk-based field and laboratory approach to asses endocrine disruption in wildlife. En: Kendall, R., R. Dickerson, J. Giesy, W. Suk.(editores). *Principles and Processes for evaluating endocrine disruption in wildlife*. SETAC Press, Pensacola, Florida. 1-16.
- Kloas**, W., I. Lutz y R. Einspanier. 1999. Amphibians as a model to study endocrine disrutos: II estrogenic activity of environmental chemicals in vitro and in vivo. *The Science of the Total Environment*. 225:59-68.
- Kramer**, V.J., S. Miles-Richardson, S.L. Pierens y J.P. Giesy. 1998. Reporduction impairment and induction of alkaline-labile phosphate, a biomarker of estrogen

- exposure in fathead minnows exposed to waterborne estradiol. *Aquatic Toxicology*. 40:355-360.
- Laemmli**, U.K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of the bacteriophage T4. *Nature*. 227:680-685
- Lomax**, D.P., W.T. Roubal, J.D. Moore y L.L. Johnson. 1998. An enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for measuring vitellogenin in English sole (*Pleuronectes vetulus*): development, validation and cross-reactivity with other pleuronectids. *Comparative Biochemistry and Physiology. Part B*. 121:425-436.
- Lowry**, O.H., N.J. Rosebrough, A.L. Farr y R.J. Randall. 1951. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *Analytical Biochemistry*, 265-275
- Lutcavage**, M.E., P. Plotkin, B. Whiterington y P.L. Lutz. 1997. Human Impacts on Sea Turtle Survival. En: Lutz P.L. y J.A. Musick (editors). *The Biology of Sea turtles*. Vol. 1. CRC, Boca Ratón, Florida. 387-409.
- Mclachlan**, J. 2001. Environmental signaling: what embryos and evolution teach us about endocrine disrupting chemicals. *Endocrine Reviews*. 22(3):319-341.
- Mañanós**, E., J. Nuñez, S. Zanuy, M. Carrillo, F. Le Menn. 1994. Sea Bass (*Dicentrarchus labrax*) vitellogenin. II –Validation of an enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). *Comparative Biochemistry and Physiology. Part B*. 107: 217-223
- Marcovaldi**, M.A.G. y J.C.A. Thomé. 2000. Reducción de las amenazas a las tortugas. En: Eckert, K.L.; K.A. Bjorndal, F.A. Abreu-Grobois y M. Donnelly (editores). (Traducción al español). *Técnicas de Investigación y Manejo para la Conservación de las Tortugas Marinas Grupo Especialista en Tortugas Marinas UICN/CSE Publicación No 4*.
- Márquez**, 2002. *Las tortugas marinas y nuestro tiempo*. Fondo de cultura económica. 3ª edición. 198 pp.
- Matta**, M.B., J. Linse, C. Cairncross, L. Francendese y R.M. Kocan. Reproductive and transgenerational effects of methylmercury or Aroclor 1268 on *Fundulus heteroclitus*. *Environmental Toxicology and Chemistry*. 20(2):327-335.
- Meylan**, A.B. y P.A. Meylan, 2000. Introducción a la evolución, historias de vida y biología de las tortugas marinas. En Eckert, K.L.; K.A. Bjorndal, F.A. Abreu-

- Grobois y M. Donnelly (editores). (Traducción al español). Técnicas de Investigación y Manejo para la Conservación de las Tortugas Marinas Grupo Especialista en Tortugas Marinas UICN/CSE Publicación No 4.
- Morales**, M.H., C. Baerga-Santini y N. Cordero-López. Síntesis of vitellogenin polypeptides and deposit of yolk proteins in *Anolis pulchellus*. Comparative Biochemistry and Physiology. Part B. 114(2):225-231.
- Musick**, J.A. y C.J. Limpus. 1997. Habitat utilization and migration in juvenile sea turtles. En: Lutz P.L. y J.A. Musick (editors). The Biology of Sea turtles. Vol. 1. CRC, Boca Ratón, Florida. 387-409.
- National** Marine Fisheries Service and U.S. Fish and Wildlife Service. 1998. Recovery plan for U.S. Pacific populations of East Pacific Green Turtle (*Chelonia mydas*). National Marine Fisheries Service, Silver Spring, Maryland. 50 pp.
- Palmer**, B.D. y S.K. Palmer. 1995. Vitellogenin induction by xenobiotic estrogens in the red-eared Turtle and african clawed frog. Environmental Health Perspectives. 103 (4): 19-25.
- Palmer**, B.D., L.K. Huth, D.L. Pioto y K.W. Selcer. 1998. Vitellogenin as a biomarker for xenobiotic estrogens in an amphibian model system. Environmental Toxicology and Chemistry. 17(1):30-36.
- Papi**, F., P. Lushi, S. Akesson, S. Capogrossi y G.C. Hays. 2000. Open-sea migration of magnetically disturbed sea turtles. The Journal of Experimental Biology. 203:3435-3446.
- Parks**, L.G., A.O. Cheek, N.D. Denslow, S.A. Heppell, J.A. McLachlan, G.A. LeBlanc y C.V. Sullivan. 1999. Fathead minnow (*Pimephales promelas*) vitellogenin: purification, characterization and quantitative immunoassay for the detection of estrogenic compounds. Comparative Biochemistry and Physiology. Part C. 123:113-125.
- Plotkin**, P. 2003. Adult migration and habitat use. En: Lutz P.L., J.A. Musik y J. Wineken (editors). The biology of sea turtles Vol. 2. CRC Press Inc., Boca Ratón Florida. 243-257.

- Pritchard**, P.C.H. 1997. Evolution, Phylogeny and current status. En: The Biology of Sea turtles. Vol. 1. CRC, Boca Ratón, Florida. 387-409.
- Pritchard**, P.C.H. 1999. Status of the black turtle. Conservation Biology. 13(5):1000-1003.
- Pritchard**, P.C.H. y J.A. Mortimer. 2000. Taxonomía, morfología externa e identificación de las especies. En: En Eckert, K.L.; K.A. Bjorndal, F.A. Abreu-Grobois y M. Donnelly (editores). (Traducción al español). Técnicas de Investigación y Manejo para la Conservación de las Tortugas Marinas Grupo Especialista en Tortugas Marinas UICN/CSE Publicación No 4.
- Resendiz**, A., B. Resendiz, W.J. Nichols, J.A. Seminoff y N. Kamezaki. 1998. First confirmed east-west transpacific movement of a loggerhead sea turtle, *Caretta caretta*, released in Baja California, México. Pacific Science. 52(2):151-153.
- Roitt**, I. 1998. Inmunología, fundamentos. 9a edición. Editorial médica Panamericana. Buenos Aires, Argentina. Pp 497.
- Selcer** K.W. y B.D. Palmer. 1995. Estrogen downregulation of albumin and a 170 kDa protein in the turtle, *Trachemys scripta*. General and Comparative Endocrinology. 97:248-254
- Serrano**, P.V.V. 2004. Vitelogénesis de la langosta de agua dulce *Cherax quadricarinatus* (Von Martens, 1868; Decapoda: Parastacidae). Caracterización de las moléculas vitelinas y determinación del lugar de síntesis de la vitelogenina. Tesis de Doctor en Ciencias. Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste. La Paz, B.C.S., Mexico.
- Silversand**, C., S.J. Hyllner y C. Haux.. 1993. Isolation, Immunochemical detection and observations of the instability of vitellogenin from four teleosts. The journal of Experimental Zoology. 267:597-597.
- Specker**, J.L. y T.R. Anderson. 1994. Developing an ELISA for a model protein-vitellogenin. Biochemistry and Molecular Biology of Fishes. 3:567-578.
- Tyler**, C.R., R. Van Aerle, M.V. Nilsen, R. Blackwell, S. Madix, B.M. Nilsen, K. Berg, T.H. Hutchinson y A. Goksøyr. 2002. Monoclonal antibody enzyme-linked immunosorbent assay to quantify vitellogenin for studies on environmental

- estrogens in the Rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). Environmental Toxicology and Chemistry. 21(1):47-54
- Tillit** D.E., K.R. Solomon, E.M. Mihaich, G. Cobb, L. Towart y T.J. Kubiak. 1998. Role of exposure assessment in characterizing risks of endocrine-disrupting substances to wildlife. En: Kendall, R., R. Dickerson, J. Giesy, W. Suk.(editores). Principles and Processes for evaluating endocrine disruption in wildlife. SETAC Press, Pensacola, Florida. 39-68.
- Vargas**, P. 2000. Enzyme linked immunosorbant assay (ELISA) for the Kemp's Ridley sea turtle (*Lepidochelys kempii*: Garman 1880), vitellogenin. Tesis de Maestria en Ciencias. Texas A&M University, College Station, TX. 70.
- Wallace**, J.C., A. Resendiz, J.A. Seminoff y B. Resendiz. 2000. Transpacific migration of a loggerhead turtle monitored by satellite telemetry. Bulletin of Marine Science. 67(3):937-947.
- Wang**, S.Y. y D.L. Williams. 1982. Biosynthesis of the vitellogenins. Identification and characterization of nonphosphorylated precursors to avian vitellogenin I and vitellogenin II. Journal of Biology and Chemistry. 257:3837-3846.
- Wibbels**, T. 2003. Critical approaches to sex determination turtles. En: Lutz P.L., J.A. Musik y J. Wineken (editors). The biology of sea turtles Vol. 2. CRC Press Inc., Boca Ratón Florida. 103-134.
- Wiley**, H.S., L. Opresko y R.A. Wallace. 1979. New methods for the purification of vertebrate vitellogenin. Analytical Biochemistry. 97:145-152.
- Zhu**, J. y R.J. Norstrom. 1993. Identification of polychlorocamphenes (PCCs) in the polar bear (*Ursus maritimus*) food chain. Chemosphere 27:1923-36.