

UNIVERSIDAD DEL MAR

===== **Puerto Ángel** =====

O A X A C A



**Transcriptómica comparativa de hígado y branquias del pez
plano *Achirus lineatus* en respuesta a la exposición a petróleo**

TESIS

Para obtener Título Profesional de
LICENCIADO EN BIOLOGÍA MARINA

PRESENTA

Ortega Rosas Daniel Antonio

Director

Dr. Jesús Alejandro Zamora Briseño

Codirector

Dr. Rolando Cardeña López

Ciudad Universitaria, Puerto Ángel, Oaxaca, México, 2021

DEDICATORIA

A mi familia

En memoria: A mi hermanita y amiga Rubí Azucena Ortega Rosas. Gracias por todo lo que me enseñaste y por los momentos inolvidables que pasamos. ¡Hasta siempre!

A mis padres Patricia Rosas Cuellar y Antonio Ortega Santillán, mi hermana Jazmín Itzamman Ortega Rosas una gran persona que siempre lucha con uñas y dientes por alcanzar sus objetivos; que en todo momento me han brindado su amor y apoyo incondicional, que me llevan a culminar una meta más.

AGRADECIMIENTOS

Primero, me gustaría expresar mi gratitud a mi mentor, el Dr. Jesús Alejandro Zamora Briseño, quien hizo posible este proyecto, proporcionando una valiosa experiencia y apoyo durante la realización de este trabajo. También quiero agradecer a la contribución de mi codirector de tesis, el Dr. Rolando Cardeña López, quien brindó mucha capacitación práctica, asistencia y que también sirvió como revisor. Me gustaría agradecer al M. en C. Carlos Eduardo González Penagos, que fue de gran apoyo por su hospitalidad y consejos mientras se realizaba este trabajo. Así también, a los Dres. Ma. Nieves Trujillo Tapia y Eustacio Ramírez Fuentes, que me ayudaron a completar esta tesis, a pesar de su apretada agenda. Agradezco a los miembros del laboratorio de Investigación de Inmunología y Biología Molecular del Centro de Investigación y Estudios Superiores del Instituto Politécnico Nacional (CINVESTAV-Mérida) por su ayuda y apoyo durante todo el proceso, especialmente a la Dra. Rossanna Rodríguez Canul por permitir la realización de este trabajo en su laboratorio. Agradezco a mi familia quien sin su ayuda esto no sería posible. Finalmente, agradezco a mis compañeros y amigos que me apoyaron durante este tiempo, especialmente a Lorena Velásquez Mejía, quien estuvo conmigo en las buenas y malas, a Mauricio Palma Romero y José Daniel Ortiz Mendoza mis amigos y consejeros de carrera.

Resumen

El petróleo es una mezcla compleja de compuestos químicos que causan efectos tóxicos en los organismos. Debido a su naturaleza hidrofóbica, los hidrocarburos aromáticos policíclicos al contacto con agua de mar se asocian con partículas y coloides presentes en la columna de agua, flocculan y sedimentan hacia la interfase agua-sedimento, interactuando con la biota, causando múltiples efectos negativos. Además, muchos de estos compuestos pueden bioacumularse, por ejemplo, en el tejido adiposo de los organismos. En este estudio se utilizó un enfoque transcriptómico para evaluar el efecto a corto plazo de la exposición a la fracción acomodada de agua (WAF) de petróleo ligero en la regulación transcripcional de branquias e hígado del pez plano *Achirus lineatus*, una especie distribuida en el Golfo de México. Los organismos se expusieron por un periodo de 48 h a una mezcla subletal de WAF (50%) proveniente de 1 g/L de petróleo crudo. Con un enfoque de RNA-seq se analizó el perfil transcriptómico de branquias e hígado, identificando 130,180 transcritos y 66,369 unigenes. El análisis de expresión diferencial reveló 1,073 DEG, para branquia, de los cuales 662 (61.69%) se sobre-expresaron y 411 (38.30%) se reprimieron. En hígado se identificó un total de 515 DEG, estando 306 (59.42%) sobre-expresados y 209 (40.58%) reprimidos. El análisis de enriquecimiento ontológico reveló varios términos de ontología génica sobre-representados y diversas vías metabólicas alteradas, tales como las relacionadas con el metabolismo de xenobióticos, redox, y los mecanismos de reparación del DNA. Es importante destacar que se observó la inducción de varios genes relacionados con la hipoxia, como el factor 1 alfa GLUT 1 y las enzimas glucolíticas, así como la regulación generalizada de múltiples vías de señalización involucradas en la respuesta de *A. lineatus* a la exposición a WAF. Estos hallazgos proporcionan información preliminar sobre los mecanismos moleculares que rigen los efectos de una exposición subletal y aguda a WAF en *A. lineatus*. Estos datos pueden ser útiles para el desarrollo de biomarcadores en estrategias de biomonitoreo de petróleo crudo.

Palabras clave: Transcriptómica, ecotoxicología, lenguado, petróleo.

Abstract

The petroleum is a complex mixture of chemical compounds, which can induce toxic effects in organisms. Due to their hydrophobic nature, polycyclic aromatic hydrocarbons in contact with seawater are associated with particles and colloids present in water column, flocculating and sedimenting to water-sediment interface. This makes possible their interaction with biota, causing multiple toxic effects. Moreover, several chemical components of crude oil are susceptible to bioaccumulation. Therefore, in this study we used a transcriptomic approach to identify the impact of the water accommodated fraction (WAF) of light crude oil (50% from 1 g/L) on the transcriptional regulation of gills and liver of flounder *Achirus lineatus*, a species distributed in the Gulf of Mexico. *De novo* RNAseq approach was applied to samples from flounders exposed to a sub-lethal WAF (50%) mixture for 48h. Using Illumina-based RNAseq strategy, 130,180 transcripts and 66,369 unigenes were reconstructed. Differential expression analysis revealed 1,073 differentially expressed genes (DEG) for gill, being 662 (61.69%) up-regulated and 411 (38.30%) down-regulated genes. In liver, a total of 515 DEG were identified, 306 (59.42%) up-regulated and 209 (40.58%) down-regulated genes. Gene ontology (GO) enrichment analysis revealed many enriched GO terms and several metabolic pathways associated to xenobiotic and redox metabolism, as well as DNA repair mechanisms. Interestingly, we observed the induction of several hypoxia-related genes, such as factor 1 alpha GLUT 1 and glycolytic enzymes, as well as a widespread regulation of multiple signaling pathways involved in the response of *A. lineatus* to WAF exposure. These findings provide preliminary information of the molecular mechanisms governing the effects of WAF on *A. lineatus*. This information could be useful for the development of biomarkers for biomonitoring strategies for crude oil.

Key words: Transcriptomic, ecotoxicology, flounder, petroleum.

ÍNDICE

ÍNDICE DE FIGURAS.....	VII
1. INTRODUCCIÓN.....	1
2. MARCO TEÓRICO.....	2
2.1 Petróleo.....	2
2.1.1 Química básica.....	2
2.1.2 Tipos de crudos.....	3
2.1.3 Contaminación y efectos.....	3
2.2 Bioindicador y biomonitor.....	6
2.3 Lenguados.....	7
2.3.1 Taxonomía y morfología.....	7
2.3.2 Distribución, hábitat y alimentación.....	8
2.3.3 Ciclo de vida.....	8
2.3.4 Bioindicadores.....	9
2.4 Mecanismos de detoxificación en peces.....	9
2.5 Transcriptómica como herramienta en la toxicogenómica.....	11
3. ANTECEDENTES.....	12
4. JUSTIFICACIÓN.....	15
5. HIPÓTESIS.....	15
6. OBJETIVOS.....	15
6.1 General.....	15
6.2 Particulares.....	15
7. MATERIALES Y MÉTODOS.....	15
7.1 Declaración de Ética.....	15

7.2	Diseño experimental y toma de muestras.....	16
7.3	Preparación de fracción acomodada de agua (WAF).....	17
7.4	Extracción de RNA.....	17
7.5	Construcción de bibliotecas de cDNA y secuenciación.....	18
7.6	Análisis bioinformático.....	18
7.6.1	Procesamiento de datos secuenciados y control de calidad.....	18
7.6.2	Ensamble <i>de novo</i> del transcriptoma.....	18
7.6.3	Anotación funcional y clasificación de unigenes.....	19
7.6.4	Análisis de expresión diferencial.....	19
7.6.5	Anotación de Ontología Génica (GO).....	19
7.7	Análisis de expresión génica y validación por PCR cuantitativa en tiempo real de transcripción inversa (RT-qPCR).....	20
8.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	22
8.1	Características generales del transcriptoma de <i>A. lineatus</i>	22
8.2	Anotación funcional de unigenes.....	23
8.3	Clasificación de los genes expresados diferencialmente (DGEs).....	23
8.4	Rutas metabólicas alteradas por la exposición a WAF.....	25
8.4.1	Genes sobre-expresados en branquia.....	26
8.4.2	Genes enriquecidos asociados con vías de señalización y mecanismos de regulación endocrina en branquias.....	32
8.4.3	Genes reprimidos en branquia.....	37
8.4.4	Genes reprimidos asociados con vías de señalización y mecanismos de regulación endocrina en branquias.....	38
8.4.5	Genes sobre-expresados en hígado.....	41
8.4.6	Genes reprimidos en hígado.....	42

8.5 Validación de DGE del análisis del transcriptoma mediante RT-qPCR.....	44
9. CONCLUSIÓN.....	45
10. LITERATURA CITADA.....	46
11. ANEXOS.....	74

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Diagrama de flujo	21
Figura 2. Resumen de los unigenes anotados del transcriptoma de <i>A. lineatus</i>	24
Figura 3. Descripción general del transcriptoma diferencial.....	28
Figura 4. Anotación funcional de secuencias ensambladas entre los DGE por tejido basadas en la categorización de Ontología Génica (GO).....	29
Figura 5. Anotación de vías KEGG de DGE entre branquia e hígado.....	31
Figura 6. Anotación KEGG de las vías de señalización de DGE entre branquia e hígado.....	34
Figura 7. Anotación KEGG del sistema endocrino de DGE entre branquia e hígado.....	39
Figura 8. Análisis de correlación entre la expresión de genes seleccionados en RNAseq y RT-qPCR de los DEG sobre-expresados.....	45

ÍNDICE DE ANEXOS

Anexo I. Resumen de la anotación funcional de los unigenes ensamblados.....	74
Anexo II. Genes y conjunto de primers utilizados para el análisis RT-qPCR.....	75
Anexo III. Principales familias de proteínas más sobre-expresadas y reprimidas para cada órgano evaluado.....	77
Anexo IV. Anotación KEGG de vías metabólicas de DGE en branquia. Re, genes reprimidos. Se, genes sobre-expresados.....	78
Anexo V. Anotación KEGG de vías metabólicas de DGE en hígado. Re, genes reprimidos. Se, genes sobre-expresados.....	80

1. INTRODUCCIÓN

El petróleo es una parte importante en la industria energética actual. A medida que es extraído, refinado, transportado, distribuido o consumido se generan numerosas descargas de contaminantes que impactan directamente al ambiente, tales como los producidos por los derrames de petróleo y las emisiones de gases contaminantes (Guédez *et al.*, 2003; National Research Council, 2003; Penã-Castro *et al.*, 2006). Lo que convierte a estas actividades en una de las mayores fuentes de contaminación de origen antropogénico de los océanos (Botello, 2005). Por tal motivo, comprender la naturaleza, distribución y comportamiento del petróleo en el medio marino es indispensable para comprender los efectos al medio.

El petróleo crudo es una mezcla compleja que consta de hidrocarburos (incluidos alcanos, cicloalcanos e hidrocarburos aromáticos) y no hidrocarburos (incluidos resina y asfalto), teniendo una fracción soluble en agua (WSF, por sus siglas en inglés), la cual incluye hidrocarburos aromáticos policíclicos (PAHs, por sus siglas en inglés), caracterizados por ser muy volátiles y con un periodo de vida corto en ambientes acuáticos y también por ser considerados como el tipo de hidrocarburos más tóxico (National Research Council, 2003; Maes, 2004). Por el contrario, la fracción acomodada (o soluble) en agua (WAF, por sus siglas en inglés) contiene hidrocarburos que son menos solubles y mucho más persistentes en ambientes acuáticos, como los hidrocarburos de cadena larga (Faksness *et al.*, 2015). En los ecosistemas acuáticos, tienen el potencial de formar una barrera en la interfaz aire-agua, afectando entre otras cosas la tasa de fotosíntesis y a su vez, disminuyendo los niveles de oxígeno en la columna de agua (Val & Almeida-Val, 1999). En ambientes acuáticos, los hidrocarburos provocan alteraciones estructurales y funcionales al ecosistema, llegando a sedimentarse en aguas intermareales y poco profundas (Hamoutene, 2002).

Comúnmente para evaluar el efecto de los contaminantes o el estado de un ecosistema se ocupan organismos biomarcadores (Holt & Miller, 2011). Estos organismos se caracterizan por ser organismos para los que se cuenta de suficiente información, deben ser sensibles a las alteraciones físicas y químicas a evaluar en el ambiente, además de poseer un ciclo de vida largo, alta fecundidad, entre otras características (Carvan *et al.*, 2007). En los últimos años, se han aplicado tecnologías de secuenciación de segunda generación en el campo de la ecotoxicología para evaluar la respuesta molecular a varios

compuestos tóxicos, facilitando la recopilación de gran cantidad de información molecular para la identificación de genes clave de interés toxicológico (Mehinto *et al.*, 2012).

En el presente estudio, se determinó la respuesta transcriptómica a corto plazo (exposición aguda) en hígado y branquias del pez plano *Achirus lineatus* como respuesta a la exposición a la fracción hidrosoluble de petróleo crudo.

2. MARCO TEÓRICO

2.1 Petróleo

2.1.1 Química básica

Debido a su naturaleza química, es frecuente que los términos petróleo crudo e hidrocarburos sean usados indistintamente, ya que estos últimos representan hasta un 97% del petróleo crudo, siendo el 3% restante compuestos con nitrógeno, azufre, oxígeno, además de sales minerales y metales pesados como níquel, vanadio y cromo, todo lo cual varía en función del tipo de petróleo crudo y de su origen (National Research Council, 2003; Botello, 2005). Sin embargo, la mayoría de los componentes del petróleo contienen entre 5 y 20 átomos de carbono; de los cuales pueden ser cadenas lineales, ramificadas (Parafinas), cadenas lineales con dobles enlaces (Olefinas), cíclicos con enlaces simples (Naftenos) y con anillos bencénicos (Aromáticos) de átomos de carbono (Iglesias, 2003). El estado físico de las parafinas depende de la cantidad de carbonos en la molécula; por ejemplo, las parafinas con < 5 carbonos son gases a temperatura ambiente, entre 5 y 15 carbonos son líquidos, con más de 15 carbonos se van haciendo más viscosas hasta el estado sólido cerúleo (Caba, 2004). Los compuestos aromáticos tienen una estructura de anillo derivado del benceno (C₆H₆) conteniendo dobles enlaces, lo que los hace muy estables en el ambiente, representando entre el 1 y el 20% del total de hidrocarburos en petróleo crudo (Iglesias, 2003). Entre estos últimos se encuentran los compuestos aromáticos policíclicos. Finalmente, existe una pequeña proporción de compuestos polares, es decir, compuestos cargados y que en general contienen elementos electronegativos como azufre, nitrógeno, oxígeno y diferentes metales: vanadio, níquel, sodio, etc. (Iglesias, 2003; National Research Council, 2003).

2.1.2 Tipos de crudos

Los crudos de petróleo se pueden clasificar de diferentes maneras. Una de estas es dependiendo de la profundidad y el tiempo que este permanezca bajo tierra, teniendo crudos joven-superficial, joven-profundo, viejo-superficial y viejo-profundo. El joven-superficial se caracteriza por tener compuestos de cadena larga que le otorgan mayor densidad y viscosidad y con un alto contenido en azufre. El joven-profundo y viejo-superficial presentan densidad, viscosidad y contenido de azufre moderados, debido a ruptura de moléculas a causa de temperaturas elevadas (en el caso de joven-profundo) y el paso del tiempo (para el caso de viejo-superficial). El viejo-profundo presenta viscosidad y densidad baja, así como un bajo contenido en azufre, debido a la gran cantidad de rupturas de cadenas de carbono y compuestos de azufre; otra forma de clasificarlos está basada en el contenido de azufre, teniendo crudo amargo con alto contenido en azufre ($> 1.5\%$) y crudo dulce con bajo contenido en azufre ($< 0.5\%$) (Iglesias, 2003).

Una medida primaria de clasificar al petróleo es comparando su densidad con la del agua, midiéndola en grados del Instituto Americano del Petróleo (API, por sus siglas en inglés). En esta escala el agua tiene 10°API , un crudo menos denso que el agua tiene API mayor que 10 y con mayor densidad que el agua tiene API menor. Por lo tanto, se suele catalogar en crudos ligeros si estos superan los 29°API , como crudos medios entre 22 y 29°API , crudos pesados entre 22 y 10°API y extrapesados con $\text{API} < 10^{\circ}$. Esta última propiedad es de suma importancia porque las fracciones hidrosolubles de los hidrocarburos suelen resultar ser las más tóxicas para los organismos acuáticos (Iglesias, 2003; National Research Council, 2003; Botello, 2005).

2.1.3 Contaminación y efectos

Varios procesos ocurren después de que el petróleo crudo ingresa al océano, que incluye propagación, evaporación, disolución, emulsificación, dispersión, absorción, sedimentación, descomposición biológica y fotooxidación (Jiang *et al.*, 2010). Estas sustancias oleosas serán parcialmente transferidas física y biológicamente descompuestas, y el resto se disolverá en el agua de mar. Por lo tanto, el petróleo crudo es muy inestable en el medio marino, pierde rápidamente las fracciones volátiles debido a la intemperie y se degrada tanto por foto como por biodegradación (Smith *et al.*, 2006). La mezcla turbulenta prolongada por el viento y las corrientes da como resultado la liberación de WAF compuesta

principalmente de BTEX (el acronimo de benceno, tolueno, etilbenceno y xileno), alquilación de homólogos de benceno, PAH, hidrocarburos de petróleo y algunas mezclas complejas no resueltas (UCM) mediante cromatograma (Faksness *et al.*, 2008).

Las sustancias principalmente tóxicas son algunos hidrocarburos aromáticos, como BTEX y PAH (Jiang *et al.*, 2010). Debido a su naturaleza hidrofóbica, los PAH se asocian con partículas y coloides presentes en la columna de agua, floculan y sedimentan (llegando a concentraciones de 100 a 10,000 veces mayores que regiones superiores de la columna de agua) interactuando con la biota, causando múltiples efectos, tal como su bioacumulación en el tejido adiposo de los organismos (Botello, 2005; Zhu *et al.*, 2016), siendo los organismos bentónicos expuestos a numerosos contaminantes, a través del contacto directo, como la absorción en branquias y otras superficies de membranas (Améndola-Pimenta *et al.*, 2020).

Los PAH en WAF son en su mayoría de 2 a 5 anillos (antraceno, fenantreno, pireno, benzo(a)pireno, venzo(a)antraceno, cristeno ,etc.) y los PAH con \pm 6 anillos (indeno(1,2,3-c,d)pireno, venzo(g,h,i)perileno, coroneno, etc.) son pequeños, porque el resto de PAH con más anillos no se pueden disolver en agua debido a su capacidad altamente lipofílica (Faksness *et al.*, 2008; Jiang *et al.*, 2010; Ortiz-Salinas *et al.* 2012), debido a esto, los de menor peso molecular muestran una mayor toxicidad aguda, mientras que los de mayor peso molecular presentan efectos carcinogénicos (Witt, 1995). Los PAH con $>$ 2 anillos tienen principalmente efectos tóxicos crónicos sobre el daño ambiental y daño al organismo, ya que se descomponen con dificultad (Jiang *et al.*, 2010). El BTEX y el naftaleno de 2 anillos y sus homólogos tienen efectos tóxicos agudos, debido a su alta concentración y solubilidad en agua y son fácilmente volátiles que no pueden permanecer mucho tiempo en el agua (Short, 2003). Los compuestos heterocíclicos de N, P, S en el petróleo también contribuyen a la toxicidad, como el tiofeno y sus homólogos alquilados, la quinolina, la acridina y otros componentes con alta solubilidad y toxicidad en agua; estos compuestos heterocíclicos se pueden acumular gradualmente en el proceso de meteorización del petróleo (Jiang *et al.*, 2010). Pero, en términos generales, los compuestos heterocíclicos son mucho menores que los BTEX y los PAH en el aceite, por lo que son relativamente poco tóxicos en la toxicidad total. La resina y el asfalto son difíciles de absorber por el organismo vivo, debido a su alto peso molecular (700–1000 de resina y 1000–10,000 de asfalto) (Jiang *et al.*, 2010). Por lo tanto, la toxicidad aguda para los organismos marinos depende de la