



**CENTRO DE INVESTIGACIÓN Y DE ESTUDIOS AVANZADOS
DEL INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL**

**UNIDAD MÉRIDA
DEPARTAMENTO DE RECURSOS DEL MAR**

Tesis de Doctorado

“Análisis transcriptómico, metabolómico e histológico del impacto de la exposición sub crónica a benzo(α)pireno en el hígado y las gónadas de la tilapia del Nilo”

Tesis que presenta

Nacira Anahí Albornoz Abud

Para Obtener el Grado de

Doctor en Ciencias

En la Especialidad de

Ciencias Marinas

Directoras de la Tesis:

Dra. Reyna Cristina Collí Dula

Dra. Rossana del Pilar Rodríguez Canul

RESUMEN

El benzo(a)pireno (BaP) es un hidrocarburo aromático policíclico modelo catalogado como carcinogénico. Diversos estudios ecotoxicológicos han reportado los efectos tóxicos del BaP en el desarrollo, reproducción y sobrevivencia en los organismos acuáticos, pero aún se desconocen los mecanismos metabólicos que conllevan a estas respuestas adversas en peces y sus posibles asociaciones con problemas reproductivos en peces machos. El objetivo de esta investigación fue explorar el efecto de una dosis ambientalmente relevante y subcrónica de BaP para determinar la presencia de daños a nivel morfológico, cambios en el perfil metabólico y molecular en el hígado y las gónadas de la tilapia del Nilo. Los daños en tejidos se analizaron mediante la técnica histológica con tinción de hematoxilina y eosina, también se analizaron los perfiles de metabolitos y rutas metabólicas afectadas mediante resonancia magnética nuclear de protón (^1H RMN) y mediante la secuenciación masiva de ARN (RNA-seq) se analizó la expresión de genes y el análisis de enriquecimiento de vías para conocer cambios en vías metabólicas y de señalización. Estos análisis se llevaron a cabo en diferentes tiempos de exposición (2, 8, 26 y 56 d) a dosis repetidas de BaP (3 mg/kg) en el hígado y gónadas de tilapias del Nilo. Los daños histológicos que se detectaron en el hígado, oscilaron desde focal hasta extendidos o difusos, como en el caso de la degeneración de grasa y la necrosis, así como también la aparición de pleomorfismos en los organismos tratados con BaP. En las gónadas de las tilapias tratadas con BaP los daños fueron más evidentes a partir de los 26 d y se caracterizaron por pleomorfismos, atrofas, edemas, granulomas, degeneración celular y neoplasias. Con el análisis ^1H RMN en el hígado se detectaron 19 metabolitos, incluyendo aminoácidos esenciales y no esenciales, compuestos que participan en la síntesis de energía, vitaminas, nutrientes, metabolitos de la síntesis de ácidos biliares, así como también purinas y bases nitrogenadas. A los 2, 26 y 56 d de exposición 8, 6 y 9 metabolitos fueron significativamente diferentes, respectivamente, entre el grupo control y tratado con BaP, entre ellos se encontró diferencias en casi todos los tiempos de lactato, glucosa, acetato, adenina, colina y glicerol. Las principales rutas afectadas por la exposición a BaP de acuerdo con los metabolitos detectados fueron el metabolismo de nicotinato y nicotinamida, la glucólisis/gluconeogénesis y el metabolismo de glioxilato y dicarboxilato a los 2, 26 y 56 d respectivamente. El análisis de RNA-seq detectó en el hígado de la tilapia que a los 26 d de exposición 286 genes fueron diferencialmente expresados (DE) en el grupo con BaP con respecto al grupo de organismos control ($p \leq 0.05$), mientras que, en el hígado de los organismos de 56 d, 215 genes fueron DE, en comparación con el control. En las gónadas a los 26 d, únicamente se observaron 69 genes diferencialmente expresados (DEG, differentially expressed genes) con respecto al grupo de tilapias control y a los 56 d de exposición 85 DEG fueron observados. Entre estos genes identificados se hallaron genes relacionados con el metabolismo de xenobióticos, metabolismo de energía, el metabolismo y transporte de lípidos. Con los análisis de sobrerrepresentación (ORA, overrepresentation analysis) en el hígado se encontraron afectadas las vías del metabolismo de butirato y propanoato, metabolismo de glicerofosfolípidos, ácidos grasos y esteroides, peroxisoma, la ruta de señalización de la insulina y metabolismo de aminoácidos. Mientras que en las gónadas además de encontrar afectadas vías del metabolismo de aminoácidos, carbohidratos y procesos celulares, encontramos afectadas rutas del metabolismo de xenobióticos. Los resultados indican el incremento del estrés oxidativo derivado del metabolismo del BaP pero también del cambio en procesos metabólicos para compensar el gasto energético para mantener la homeostasis en el cuerpo de la tilapia expuesta a BaP. La exposición subcrónica

ocasionó cambios importantes en metabolismo y vías de señalización celular en el hígado y gónadas de la tilapia, lo cual puede repercutir en su crecimiento adecuado, la reproducción y su supervivencia de este organismo. Este estudio demuestra el efecto de BaP en diferentes niveles de una dosis ambientalmente relevante sobre el metabolismo de la tilapia y su impacto en la reproducción y la salud.

ABSTRACT

Benzo(a)pyrene is a model carcinogenic polycyclic aromatic hydrocarbon. Ecotoxicological studies have reported the toxic effects of BaP on development, reproduction, and survival in aquatic organisms, but the metabolic mechanisms that lead to these adverse responses in fish are still unknown. The aim of this research was to explore the effect of an environmentally relevant and sub-chronic dose of BaP to determine the presence of damage at the morphological level and, changes in the metabolic and molecular profile in the liver and gonads of Nile tilapia. Tissue damage was analyzed using the histological technique with hematoxylin and eosin staining. The profiles of metabolites and metabolic pathways affected were also analyzed using proton nuclear magnetic resonance (^1H NMR), and by RNA sequencing (RNA-seq) the expression of genes. Also, we performed pathway enrichment analysis to determine changes in metabolic and signaling pathways. These analyzes were carried out for two exposure times (2, 8, 26 and 56 d) at repeated doses of 3 mg/kg BaP in the liver and gonads of Nile tilapia. Histological results detected focal to extensive fatty degeneration and necrosis in the liver, as well as the appearance of pleomorphisms in organisms treated with BaP. More damage was detected in the gonads after 26 d, such as pleomorphisms, atrophies, edema, granulomas, cell degeneration and neoplasms that were only seen in tilapia groups treated with BaP. Using the ^1H NMR analysis in the liver, 19 metabolites were detected, among which were essential and non-essential amino acids, compounds that participate in the synthesis of energy, vitamins, nutrients, metabolites of the synthesis of bile acids, as well as purines and nitrogenous bases. At 2, 26 and 56 d of exposure, 8, 6 and 9 metabolites were significantly different, respectively, between the control group and the group treated with BaP. We found at almost all time points, significant differences for lactate, glucose, acetate, adenine, choline and glycerol. The main pathways affected by BaP exposure according to the metabolites detected were nicotinate and nicotinamide metabolism, glycolysis/gluconeogenesis, and glyoxylate and dicarboxylate metabolism at 2, 26, and 56 d, respectively. The RNA-seq analysis detected in the liver of 26 d tilapia that 286 genes were differentially expressed (DE) in the group with BaP compared to the control group ($p \leq 0.05$), while in the liver of 56 d organisms, 215 genes were DE, compared to control. In the gonads at 26 d, only 69 DEG (differentially expressed genes) were observed with respect to the control group and at 56 d of exposure 85 DEG were observed. The identified genes, were related to the metabolism of xenobiotics, energy metabolism, metabolism and lipid transport. The overrepresentation analysis (ORA) in the liver found that the pathways of butyrate and propanoate metabolism, metabolism of glycerophospholipids, fatty acids, and steroids, peroxisome, the insulin signaling pathway, and amino acid metabolism were affected. While in the gonads, in addition to finding affected pathways of metabolism of amino acids, carbohydrates and cellular processes, we found affected pathways of metabolism of xenobiotics. These results indicate the increase in oxidative stress derived from the metabolism of BaP but also the change in metabolic processes to compensate the energy expenditure to maintain homeostasis in the body of tilapia exposed to BaP. Sub-chronic

exposure caused important changes in metabolism and cell signaling pathways in the liver and gonads of tilapia, which may compromise their proper growth, reproduction and survival. This study demonstrates the effect of BaP at different levels of an environmentally relevant dose on tilapia metabolism and its impact on reproduction and health.

Agradecimientos

Al Cinvestav por aceptarme en el programa de doctorado en Ciencias Marinas y brindarme el apoyo económico para realizar mis actividades de investigación

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología por la beca otorgada con número de registro 628636, como apoyo económico durante el transcurso del programa de doctorado.

A mis padres, Nacira Abud y Juan Albornoz por sus consejos, apoyo y haberme cuidado durante toda mi vida y hacer de mí el ser humano que soy ahora.

A mi pareja, José Eduardo Romo Alvarado por su apoyo en todos los aspectos, por su paciencia, sus consejos y su amor brindado en todos los momentos que sentí que este sueño no se cumpliría.

A mis amigos, Viridiana Alvarado, Karina Macal, Pedro Tec, Flor Coronado y Gabriela López, por todo el tiempo que me han hecho reír durante este proceso, por darme consejos y escucharme cuando lo necesitaba.

A mis directoras de tesis Dra. Reyna Collí y Dra. Rossana Rodríguez por todas sus consideraciones para conmigo, su confianza, sus sabios consejos y su amabilidad brindada.

Al Dr. Arnulfo Albores por siempre estar pendiente de mí, creer en mí y en mi trabajo.

Al Dr. Ramón Pacheco que me ayudó con mucha amabilidad y consideración a desenmarañar parte de mis procesos de análisis.

A la Dra. Eunice Couoh por enseñarme y hacer muy divertido el proceso de análisis.

Al comité sinodal por su tiempo y dedicación para revisar y mejorar mi proyecto de investigación.

Por prestar sus instalaciones y servicios: al laboratorio de Biotecnología y Biología Molecular, al Laboratorio de Ictiología, al Laboratorio de Química Marina, al Laboratorio Nacional de nano y biomateriales, al Laboratorio de Inmunología y Biología Molecular y al área de estanques del Cinvestav Mérida.

A todos los mexicanos que con su trabajo hacen posible que personas como yo puedan acceder a estos programas.

CONTENIDO

INTRODUCCIÓN	12
ANTECEDENTES	15
1. EL BENZO(a)PIRENO Y SU PRESENCIA EN EL AMBIENTE ACUÁTICO	15
1.1. Importancia de los peces como indicadores de contaminación del ambiente acuático	18
2. EL METABOLISMO DEL BENZO(a)PIRENO, MECANISMO DE ACCIÓN Y SUS EFECTOS TÓXICOS	19
3. EFECTO DEL BaP A NIVEL MOLECULAR, TRANSCRIPTÓMICO Y METABOLÓMICO	21
JUSTIFICACIÓN	28
OBJETIVOS	30
1. OBJETIVO GENERAL	30
2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	30
PREGUNTAS DE INVESTIGACIÓN	31
METODOLOGÍA	32
1. SUBSTANCIAS QUÍMICAS Y SOLUCIONES	32
2. DISEÑO EXPERIMENTAL	32
3. ANÁLISIS DE CAMBIOS MORFOMÉTRICOS	36
3.1. Cálculo de índices morfométricos	36
3.2. Análisis estadístico	37
4. ANÁLISIS HISTOLÓGICO	37
4.1. Procesamiento y tinción de los cortes histológicos	37
4.2. Determinación de la fase reproductiva y evaluación del daño histológico	38
4.3. Análisis estadístico	40
5. ANÁLISIS DE METABOLITOS	40
5.1. Cuantificación de los metabolitos de BaP en la bilis de la tilapia ..	41
5.2. Análisis de metabolitos en el hígado y gónadas	42
6. ANÁLISIS DE EXPRESIÓN TRANSCRIPCIONAL	44
6.1. Extracción de ARN	44
6.2. Síntesis de ADN complementario (ADNc) y PCR en tiempo real cuantitativa (qPCR)	45
6.3. Construcción de bibliotecas y secuenciación del ARN	46
6.4. Análisis de expresión diferencial (DE) y análisis de enriquecimiento	48

RESULTADOS	50
1. RESULTADOS MORFOMÉTRICOS	50
2. RESULTADOS HISTOLÓGICOS	51
2.1. Fases reproductivas	51
2.2. Cambios histológicos	54
3. METABOLITOS	60
3.1. Metabolitos aromáticos fluorescentes en la bilis	60
3.2. Análisis del Perfil de metabolitos del hígado y las gónadas de la tilapia ..	61
4. EXPRESIÓN DE TRANSCRITOS	79
4.1. Análisis de qPCR	79
4.2. Análisis del perfil de transcritos y rutas afectadas	83
4.3. Análisis funcional de los DEG	86
DISCUSIÓN	96
1. CAMBIOS MORFOMÉTRICOS Y DAÑOS HISTOLÓGICOS EN HÍGADO Y GÓNADAS	96
2. CAMBIOS METABÓLICOS	100
2.1. Compuestos aromáticos fluorescentes (CAF) en la bilis	100
2.2. Cambio metabólico en el hígado y las gónadas	101
3. CAMBIOS EN LA EXPRESIÓN GÉNICA	103
3.1. Cambios en la expresión de genes relacionados con el eje somatotrópico GH/IGF, la inducción del metabolismo de BaP (<i>cyp1a</i>, <i>cyp1b1</i> y <i>gsta</i>) y el daño al ADN (<i>gadd45β</i>)	103
3.2. Cambios en el perfil de transcritos relacionado con el metabolismo de lípidos, metabolismo de xenobióticos y el sistema inmune	107
CONCLUSIÓN	112
PERSPECTIVAS	114
DEFINICIÓN DE TÉRMINOS	116
REFERENCIAS	119
ANEXOS	131

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura. 1. Estructura del benzo(a)pireno.	15
Figura. 2. Formación de HAP por combustión de carbón para la cocción de alimentos.	16
Figura. 3. Metabolismo para la desintoxicación del benzo(a)pireno por CYP450 y su activación en metabolitos cancerígenos.....	20
Figura. 4. Mecanismo de activación de la transcripción del gen <i>cyp1a1</i> por un compuesto como el BaP.....	21
Figura. 5. Diagrama general de los pasos para el procesamiento y análisis histológico.	38
Figura. 6. Cambios morfométricos en individuos de la tilapia control (C) y en los expuestos a BaP (3 mg/kg).	50
Figura. 7. Gráficos de barras de la sub fase del epitelio germinal (GE) en las gónadas y de la fase reproductiva de las tilapias.	53
Figura. 8. Gráficas de prevalencia de las lesiones histológicas en el hígado y las gónadas. Las gráficas representan la prevalencia de la lesión en porcentaje en el hígado de los grupos de tilapias control y tratadas con BaP (3 mg/kg) durante 2, 26 y 56 d.	57
Figura. 9. Índice de daño histológico (IDH) en hígado y gónadas de la tilapia. En las gráficas de barras se representa la media \pm SEM del IDH por grupo..	59
Figura. 10. Corte trasversal de gónadas de tilapia. a) Gónada de organismo sano en él se pueden ver los cistos (C) que contiene a los espermatozoides (Sc) y espermátides (St). En el lumen (L) pueden verse los espermatozoides (Sz); b) Gónada de organismo tratado con BaP. La flecha negra señala la hiperplasia de las células de Sertoli.	59
Figura 11. Hígado de tilapia tratada con BaP. a) En la imagen se pueden observar una sección del hígado con hepatocitos con degeneración grasa (flecha), los núcleos se encuentran desplazados en la periferia celular; b) Foco del hígado en donde se puede observar la hepatopáncreas (punta de flecha) y fibrosis (flecha).	60
Figura. 12. Concentración de metabolitos biliares de BaP, las barras indican la media \pm SEM de la concentración de BaP en la bilis.	61
Figura. 13. Análisis de PCA del hígado y gónada de tilapia control y tratada con BaP. En la gráfica a la izquierda del primer componente se puede observar las elipses en color rosa y fucsia las muestras que pertenecen a las gónadas de 56 d (triángulos), mientras que las demás elipses (verde, amarillo, morado, azul y naranja) pertenecen a las muestras de hígado.....	62
Figura. 14. Imagen que representa la importancia de la variable en la proyección (VIP) del hígado y las gónadas. En esta figura se representan de arriba hacia abajo los metabolitos de más a menos importancia y en el eje x se pueden observar la puntuación VIP. Los recuadros coloreados a la derecha indican las concentraciones relativas del metabolito correspondiente en cada grupo de estudio.....	63
Figura. 15. Análisis de PCA del hígado de tilapia control y tratada con BaP. En la gráfica se puede observar en color rosa a los organismos que pertenecen al tiempo de exposición de 2 d, en morado a los organismos de 26 d y en azul a los organismos del tiempo de 56	

d. Los triángulos representan a los organismos control y los círculos a los tratados con BaP.	65
Figura. 16. Gráficos de cajas con bigotes de las veces de cambio de la concentración de metabolitos afectados significativamente en el hígado de la tilapia expuesta durante 2 d a BaP.	67
Figura. 17. Gráficos de cajas con bigotes de las veces de cambio de la concentración de metabolitos afectados significativamente en el hígado de la tilapia expuesta durante 26 d a BaP.	68
Figura. 18. Gráficos de cajas con bigotes de las veces de cambio de la concentración de metabolitos afectados significativamente en el hígado de la tilapia expuesta durante 56 d a BaP.	69
Figura. 19. Gráficos de cajas con bigotes de las veces de cambio de la concentración de metabolitos afectados significativamente en el hígado de la tilapia expuesta durante 2, 26 y 56 d a BaP.	71
Figura. 20. Mapa de calor que muestra la variación de la concentración de metabolitos en las gónadas de la tilapia expuesta durante 56 d a BaP.	76
Figura. 21. Gráficas de metabolitos afectados significativamente en las gónadas de la tilapia expuesta durante 56 d a BaP.	77
Figura. 22. Niveles de expresión de ARNm de los genes <i>igf1-2</i> y <i>vtg</i> en el hígado y la gónada de la tilapia.	80
Figura. 23. Niveles de expresión de ARNm de los genes <i>cyp1a</i> , <i>cyp1b</i> y <i>gstα</i> en el hígado y la gónada de la tilapia.	81
Figura. 24. Niveles de expresión de ARNm de <i>gadd45β</i> en el hígado y la gónada de la tilapia.	82
Figura. 25. Gráfica de Volcan y diagrama de Venn. a-b) en estas imágenes se puede observar el perfil de expresión del hígado y las gónadas a los 26 y 56 d de exposición a BaP.	84
Figura. 26. Enriquecimiento de términos GO del hígado de la tilapia expuesta a BaP.	89
Figura. 27. GSEA del hígado de tilapias expuestas durante 26 y 56 d.	91
Figura. 28. GSEA de las gónadas de tilapias expuestas durante 26 y 56 d a BaP.	94

INDICE DE TABLAS

Tabla 1. Presencia del BaP en sedimentos, agua y peces.	17
Tabla 2. Investigaciones sobre el efecto del BaP a nivel transcriptómico en especies de peces no modelo con importancia comercial. Las flechas rojas indican la inducción y las azules la inhibición de la expresión de los transcritos.	27
Tabla 3. Análisis realizados en los diferentes tiempos exposición en el hígado y las gónadas de las tilapias control y tratadas con BaP.	35
Tabla 4. Evaluación de las alteraciones histológicas en relación con la extensión del daño (Couch-Puga, 2022). EDH: Extensión del daño histológico; GCT = grado de cambio del tejido.	39
Tabla 5. Fases reproductivas de las tilapias macho control y tratados con BaP (3 mg/kg). En la tabla se presentan los datos de los estadios observados para la espermatogénesis, la subfase del epitelio germinal (GE) y la fase reproductiva de la tilapia.	52
Tabla 6. Porcentajes de las subfases del epitelio germinal (GE) halladas por tratamiento con BaP (3 mg/kg) en las gónadas.	53
Tabla 7. Daños histológicos identificados en el hígado y la gónada de los grupos de las tilapias controles y expuestas a BaP (3 mg/kg) durante 2, 26 y 56 d. En la tabla se pueden observar la extensión del daño (EDH), el grado del cambio en el tejido (GCT) y la prevalencia del daño en porcentaje. Las letras en negritas denotan las lesiones severas y los cambios histológicos irreversibles.	56
Tabla 8. Valores medios de la extensión del daño histológico (EDH) e índice histológico (IDH) en el hígado y gónadas de las tilapias.	58
Tabla 9. Metabolitos afectados significativamente en el hígado de la tilapia expuesta a BaP por 2, 26 y 56 d.	66
Tabla 10. Resultado del análisis de varianza del hígado entre los grupos de tilapias tratadas con BaP.	70
Tabla 11. Rutas afectadas en el hígado de la tilapia por la exposición a BaP durante 2 d. En la tabla se puede ver el número de metabolitos que participan en la ruta (Hits), el valor de p y de p ajustada (FDR), así como también el impacto de los metabolitos afectados en la ruta basado en el análisis de topología de rutas.	73
Tabla 12. Rutas afectadas en el hígado de la tilapia expuesta a BaP durante 26 d. En la tabla se puede ver el número de metabolitos que participan en la ruta (Hits), el valor de p y de p ajustada (FDR), así como también el impacto de los metabolitos afectados en la ruta basado en el análisis de topología de rutas.	74
Tabla 13. Rutas afectadas en el hígado de la tilapia por la exposición a BaP durante 56 d. En la tabla se puede ver el número de metabolitos que participan en la ruta (Hits), el valor de p y de p ajustada (FDR), así como también el impacto de los metabolitos afectados en la ruta basado en el análisis de topología de rutas.	75
Tabla 14. Análisis de rutas afectadas en las gónadas de las tilapias expuestas a BaP durante 56 d.	78
Tabla 15. DEG con mayor significancia en el hígado a los 26 y 56 d de exposición con BaP.	85

Tabla 16. DEG con mayor significancia en las gónadas a los 26 y 56 d de exposición con BaP.	85
Tabla 17. Genes DE que son compartidos entre 26 y 56 d por tejido. En esta tabla se muestra el ID del gen, su símbolo, nombre completo y el log2 de las veces de cambio para cada tejido.	86
Tabla 18. Análisis de sobrerrepresentación en el hígado de <i>O. niloticus</i>	87
Tabla 19. Análisis de sobrerrepresentación de las gónadas de la tilapia.	87
Tabla 20. Análisis de enriquecimiento de set de genes (GSEA) del hígado de la tilapia expuesta a dosis repetidas de BaP durante 26 y 56 d.	92
Tabla 21. Análisis de enriquecimiento de set de genes (GSEA) de las gónadas de la tilapia expuesta a dosis repetidas de BaP durante 26 y 56 d.	95

INTRODUCCIÓN

El benzo(a)pireno (BaP) es un hidrocarburo aromático policíclico (HAP) de alto peso molecular ampliamente estudiado debido a sus efectos tóxicos en los organismos. El BaP es un compuesto modelo de toxicidad por sus características carcinogénicas, mutagénicas, genotóxicas y como potencial disruptor endócrino (IARC, 2010). Este contaminante proviene principalmente de las actividades humanas como la quema de la materia orgánica y la combustión incompleta de combustibles fósiles (Phillips, 1983; Brown, 2009; IARC, 2010) y en diversas investigaciones se ha reportado la presencia de este hidrocarburo en el ambiente acuático, en sedimentos e incluso en organismos acuáticos (Juhasz & Naidu, 2000; Gold-Bouchot *et al.*, 2006; León-Borges & Lizardi-Jiménez, 2017; Ekere *et al.*, 2019).

El metabolismo del BaP se ha estudiado ampliamente en vertebrados (Brown, 2009; Wang *et al.*, 2010). Enzimas pertenecientes a la familia citocromo 450 (CYP450) llevan a cabo la biotransformación oxidativa de los HAP, transformándolos en compuestos más solubles que pueden ser excretados por el organismo. No obstante, la biotransformación del BaP también produce metabolitos tóxicos que pueden llevar al daño hepático y la formación de tumores (Varanasi *et al.*, 1989), varios estudios han puesto en evidencia el impacto negativo del metabolismo del BaP en el desarrollo, la reproducción y supervivencia de los organismos acuáticos (Booc *et al.*, 2014; Fang *et al.*, 2015; Corrales *et al.*, 2014; Costa *et al.*, 2012; García-Tavera *et al.*, 2013; Reyes-Chaparro *et al.*, 2016).

Estudios sobre las respuestas moleculares en especies acuáticas, han encontrado patrones aberrantes en los niveles de expresión del ARNm de diversos genes en los organismos expuestos a BaP, pues se ha observado los cambios de expresión en genes

involucrados en el metabolismo de xenobióticos (como los citocromos *cyp1a*, *cyp1b1* y glutatión-S-transferasa (*gst*), apoptosis, cáncer y daño al ADN. Actualmente estudios con enfoques transcriptómicos y metabolómicos también reportan cambios importantes en genes y metabolitos involucrados con el metabolismo de lípidos, resistencia a la insulina, glucólisis, gluconeogénesis, señalización celular, respuesta inmune, entre otras (Zhang *et al.*, 2011; Collí-Dulá *et al.*, 2018).

Actualmente, la evaluación de los estresores utilizando herramientas ómicas así como la integración de la información de diferentes tipos de datos ómicos puede ser usado para la identificación de modelos efectivos que pueden predecir rasgos y efectos fenotípicos, para elucidar biomarcadores y generar información importante sobre los mecanismos genéticos (Ritchie *et al.*, 2015). Este tipo de estudios proveen de aproximaciones más certeras de lo que está ocurriendo en un organismo, pero a la fecha los estudios sobre el efecto del BaP que integren la información de diferentes análisis ómicos en peces son escasos (Williams *et al.*, 2014; Fang *et al.*, 2015; Doering *et al.*, 2016). La tilapia es un pez teleósteo de gran importancia económica mundial y que ha sido utilizado en diversos estudios ecotoxicológicos como modelo debido a que puede crecer en diversos hábitats acuáticos, su fácil manipulación y su crecimiento rápido (El-Sayed, 2006). No obstante, en la actualidad no hay estudios que evalúen el impacto de este contaminante modelo con un enfoque integral y global en peces teleósteos de importancia comercial. Aunque existen algunos reportes del efecto tóxico, incluso con un enfoque multiómico, de otros contaminantes ambientales como los microplásticos, nanoplásticos y el plaguicida glifosato en donde han encontrado diversas respuestas ante la exposición a estos contaminantes, algunas de estas respuestas son cambios en el metabolismo de glicerofosfólpidos, aminoácidos, el ciclo del citrato, en el ritmo circadiano,

metabolismo anormal de glicolípidos, cambios en el metabolismo de energía, expresión diferencial de genes vinculados con moléculas de adhesión celular (CAM) y percepción sensorial, cambios en el transporte iónico y en la ruta de señalización receptor peroxisoma porliferador activado PPAR (Pang *et al.*, 2021; Lu *et al.*, 2022; Jia *et al.*, 2022). Es por ello, que este estudio tuvo como objetivo analizar el efecto que tiene la exposición subcrónica de una dosis repetida de BaP a nivel molecular, metabólico e histológico en órganos clave para el crecimiento, desarrollo y reproducción de la tilapia del Nilo macho adulta.

Para la presentación de esta tesis que tiene por objetivo explorar el impacto del contaminante BaP en la tilapia, se llevó a cabo el proceso de revisión de antecedentes del tema y de conceptos teóricos para realizar las pruebas y el análisis de los datos obtenidos. En esta tesis se presenta el prólogo general de la tesis, los antecedentes de la investigación, la justificación de estudio, los objetivos del estudio, las preguntas de investigación, la metodología (que comprende de preparación de la soluciones, el diseño experimental y la descripción de los métodos empleados para llevar a cabo el análisis morfológico, histológico, metabólico y transcripcional), los resultados obtenidos de los análisis llevados a cabo, la discusión y conclusión de los resultados, perspectivas y por último un glosario de términos empleados con frecuencia en el documento.

ANTECEDENTES

1. EL BENZO(a)PIRENO Y SU PRESENCIA EN EL AMBIENTE ACUÁTICO

El BaP con fórmula química $C_{20}H_{12}$ es un hidrocarburo policíclico aromático (HAP) que pertenece al grupo de los benzo pirenos y consta de cinco anillos de benceno fusionados (Figura 1). Entre las propiedades fisicoquímicas del BaP, se encuentra la masa molecular elevada de 252.31 u, baja solubilidad en agua 0.00162 mg/L a 25°C y su coeficiente de partición octanol-agua (P_o/w) elevado de 6.35, característica que le brinda alta afinidad a los compuestos lipídicos, físicamente tiene un aspecto de cristales color amarillo pálido (Environmental Protection Agency, 2006).

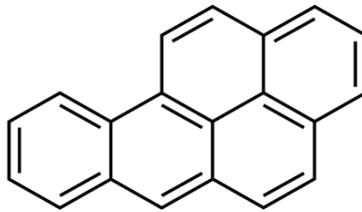


Figura. 1. Estructura del benzo(a)pireno.

El BaP como muchos HAP es derivado de la pirolisis de la materia orgánica y en la combustión incompleta de los combustibles fósiles, por lo tanto es un compuesto ubicuo que se genera diariamente en la industria y las actividades humanas cotidianas, ya sea mediante la producción de humo de los cigarrillos, emisiones de autos, barcos, y lanchas, quema de madera y residuos orgánicos e incluso en la cocción de los alimentos (Figura 2) (Phillips, 1983; Brown, 2009; IARC, 2010). Debido a su alto peso molecular el BaP puede ser un compuesto estable y permanecer en el ambiente por un largo período de tiempo, por lo cual se ha considerado como contaminante orgánico persistente (COP). Sin embargo, el BaP se puede degradar en el ambiente mediante la exposición a la luz

(fotooxidación). A pesar de esto los HAP pueden adherirse fuertemente a las partículas suspendidas y al sedimento marino (proceso de adsorción) pudiendo retardar el proceso de fotólisis y evaporación cuando se encuentran cercanos a la superficie acuática, manteniéndolos más tiempo biodisponibles para los organismos acuáticos además de mejorar su transporte en el ambiente (Jonker *et al.*, 2007; Environmental Protection Agency 2006; ter Laak *et al.*, 2009).

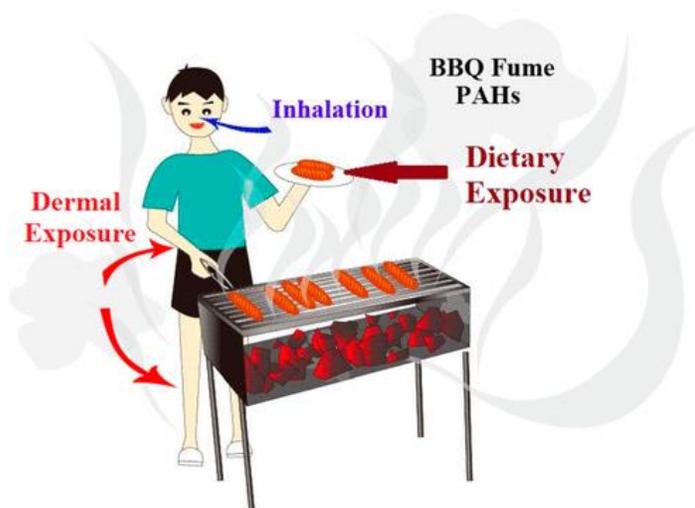


Figura. 2. Formación de HAP por combustión de carbón para la cocción de alimentos. En la imagen se puede observar que el humo proveniente de la quema del carbón contiene HAP que pueden ser inhalados, ingeridos mediante los alimentos y absorbidos por la piel. Imagen modificada de Lao *et al.*, 2018.

El BaP se encuentra ampliamente distribuido en el medio ambiente (Tabla 1): en el agua, sedimentos, suelo, aire e incluso organismos acuáticos como los peces (Juhász & Naidu, 2000; León-Borges & Lizardi-Jiménez, 2017; Minnesota Department of Health, 2018; Ekere *et al.*, 2019). Estos compuestos llegan al ambiente acuático mediante descargas urbanas puntuales, transporte atmosférico y por escorrentías urbanas hacia el manto freático. Así mismo los HAP compuestos son estables y capaces de llegar y

permanecer en lugares lejanos a su fuente de emisión (Prahl & Carpenter, 1984; IARC, 2010).

El BaP es un compuesto que tiene alta lipofilicidad, lo que aumenta la posibilidad de que los organismos puedan absorberlo fácilmente por diferentes vías (Figura 2). Este compuesto puede ingresar al organismo por las vías respiratorias, el aparato digestivo y la piel. Tras su administración, los HAP pueden distribuirse en el organismo y pudiendo ser detectados en casi todos los órganos internos, particularmente en aquellos ricos en lípidos (WHO, 1998; Jonker *et al.*, 2007).

Tabla 1. Presencia del BaP en sedimentos, agua y peces.

				
SITIO	Rio Kitimat, Canadá	Cuerpos de agua dulce del Caribe Mexicano	Minesota, E.U.A	Nigeria, África
MATRIZ	Sedimentos	Agua	Agua subterránea y potable	Bagre, músculo
CONC	0.135–1100 mg/kg	19.67 mg/L	3,100 µg/L y 124 µg/L	0.05 µg/kg
REF	Juhasz & Naidu, 2000	León-Borges & Lizardi-Jiménez, 2017	Minnesota Pollution Control Agency, 2017	Ekere <i>et al.</i> , 2019

El BaP ha sido ampliamente estudiado debido a los efectos tóxicos que produce en los organismos, este contaminante es considerado un compuesto potencialmente cancerígeno del grupo 1 para los seres humanos y animales, además de poseer efectos teratogénicos, mutagénicos y nocivos en la reproducción (IARC, 2010; IARC, 2012).

1.1. Importancia de los peces como indicadores de contaminación del ambiente acuático

Los peces son considerados organismos adecuados para aplicar diferentes métodos de análisis que permitan la evaluación del impacto de los contaminantes, mediante el análisis de sus órganos empleando diferentes enfoques para detectar anomalías. Mantener la salud y el crecimiento adecuado de los peces requiere de diversos elementos en su hábitat y su conectividad, es por ello que estos organismos son importantes indicadores de la integridad del sistema acuático y representan una herramienta ideal para el monitoreo de la contaminación en el ambiente acuático (Chovanec *et al.*, 2003). Debido a que el hígado es uno de los principales órganos que se encargan de metabolizar los compuestos para ser posteriormente excretados. Diversos estudios de todo el mundo han evaluado la presencia y los efectos de HAP como el BaP, mediante el análisis de biomarcadores en el hígado de peces, como enzimas de biotransformación de fase I, productos de biotransformación, parámetros reproductivos, parámetros genotóxicos y biomarcadores histológicos (Revisado en: van der Oost *et al.*, 2003; Abdel-Moneim, 2013). Por otra parte, el impacto en la reproducción de los peces es un indicador de contaminación del ambiente acuático con disruptores endócrinos (Allner *et al.*, 2010). Cambios en morfología, actividades enzimáticas en gónadas y en la expresión de vitelogenina en el hígado de los peces también han sido empleados como indicadores de la presencia de contaminantes y para evaluar el impacto en la reproducción de peces por la exposición a compuestos como el BaP (Corsi *et al.*, 2003; Rodas-Ortíz *et al.*, 2008; Booc *et al.*, 2014). El estudio del hígado y las gónadas de los peces es muy importante pues permite evaluar la repercusión en la salud y el desempeño del organismo, así como también el impacto de la contaminación del ambiente acuático.

2. EL METABOLISMO DEL BENZO(a)PIRENO, MECANISMO DE ACCIÓN Y SUS EFECTOS TÓXICOS

Después del que el compuesto ha sido ingerido o absorbido, el cuerpo lo convierte en un compuesto más soluble que puede ser excretado fácilmente (Figura 3). La biotransformación del BaP, se lleva a cabo principalmente en el hígado en dos fases; en la fase I, enzimas de desintoxicación como el CYP1A llevan a cabo la oxidación del BaP para su transformación a diol-epóxidos que posteriormente en la fase II, son transformados en compuestos más polares mediante la conjugación con ligandos endógenos polares como el glutatión con ayuda de la enzimas de fase II, por ejemplo la glutatión-S-transferasa (GST) (Livingstone, 1993; Carvalho-Neta & Abreu-Silva, 2013). Estos metabolitos polares son almacenados en el saco biliar y son posteriormente excretados en el intestino (Costa *et al.*, 2011). Sin embargo, como resultado de esta transformación no todos los diol-epóxidos que se forman son eliminados, entre algunos de estos compuestos derivados de la transformación del BaP están los metabolitos mutagénicos 7,8-diol-9,10-epoxi BaP y 9-OH-4,5 epoxi BaP que pueden formar aductos y provocar daños al ADN (Brown, 2009; Wang *et al.*, 2010).

El mecanismo de desintoxicación es catalizado principalmente por la enzima CYP1A, esta proteína es miembro de una súper familia de enzimas (CYP450) que se encargan de metabolizar xenobióticos y es reconocida por participar en el metabolismo oxidativo de un amplio rango de sustratos como drogas, contaminantes ambientales, compuestos endógenos como esteroides, ácidos grasos y prostanglandinas (Nebert & Gonzalez, 1987; Nelson *et al.*, 1996).

Los HAP promueven la transcripción del gen *cyp1a* (Figura 4) mediante su unión al factor de transcripción AhR (receptor de hidrocarburos de arilo) localizado en el

citoplasma celular y que a su vez transloca al núcleo para formar un heterodímero con la proteína ARNT (Receptor Nuclear Translocador). El complejo AhR/ARNT reconoce en el ADN la secuencia del elemento de respuesta a xenobióticos (ARX) localizada en la región promotora del gen *cyp1a*, lo que promueve su expresión (Mimura & Fujii-Kuriyama, 2003).

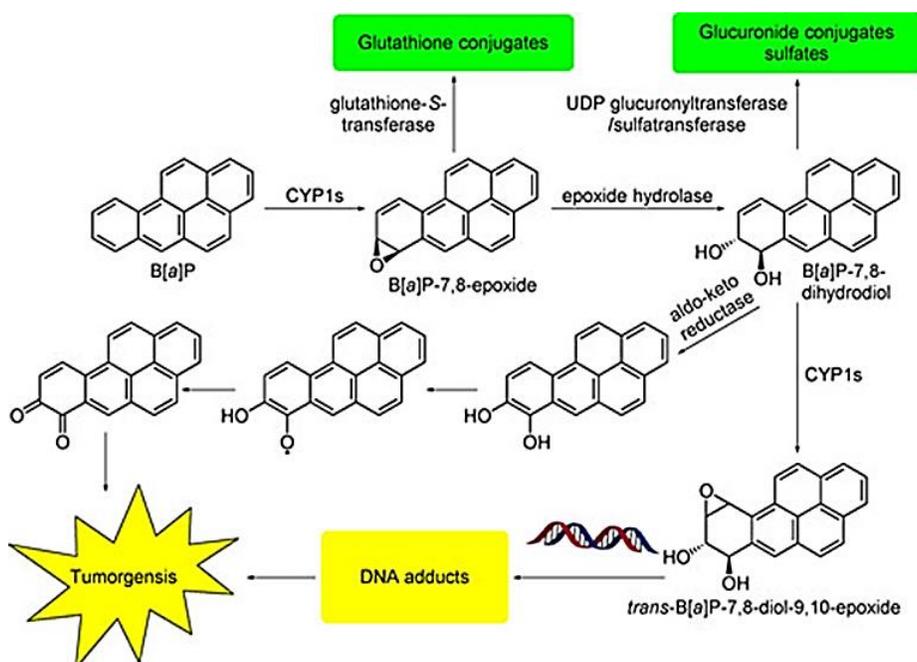


Figura. 3. Metabolismo para la desintoxicación del benzo(a)pireno por CYP450 y su activación en metabolitos cancerígenos (Imagen de: Dong et al., 2016).

Se ha reportado que la exposición a BaP puede ocasionar diversos efectos tóxicos como la carcinogénesis, mutagénesis y la disrupción endócrina (IARC, 2010). En organismos acuáticos se han reportado deformaciones embriogénicas (como deformaciones en la columna de peces), enfermedades cardíacas, alteraciones en niveles de hormonas esteroides, etc. (Incardona *et al.*, 2004; Booc *et al.*, 2014; Corrales *et al.*, 2014). Así mismo, se han realizado estudios de expresión génica con el fin de identificar respuestas tempranas a los efectos del BaP que puedan comprometer el estado de salud del organismo. Las especies acuáticas modelo han sido empleadas para el estudio del efecto del BaP y con ellas se han encontrado que la exposición a BaP

organismo para obtener información de un determinado momento en su ciclo de vida. Estas tecnologías forman parte de las ómicas las cuales son las ciencias que permiten estudiar un gran número de moléculas implicadas en el funcionamiento de un organismo. Tales ciencias como la epigenómica, genómica, transcriptómica, proteómica y metabolómica han ayudado al entendimiento de la causa de ciertos padecimientos tanto heredables como comunes, algunos ejemplos son el cáncer, la diabetes, la obesidad y las enfermedades metabólicas (Frigolet & Gutiérrez-Aguilar, 2017). Estas herramientas han sido utilizadas ampliamente, en el campo de la ecotoxicología debido a que proporcionan información de las rutas metabólicas y de vías de señalización afectadas por los contaminantes, además que proveen apoyo para la caracterización del modo de acción de los compuestos, ayudan a investigar los mecanismos de adaptación de los organismos expuestos y también pueden aportar información para la identificación de biomarcadores. Pero también, es importante resaltar que la importancia del estudio de los eventos moleculares como la transcripción, es que estos son sensibles y preceden a los efectos adversos en niveles de organización más altos, en teoría permiten la detección temprana de efectos potenciales adversos (Bahamonde *et al.*, 2016).

Existen diversos estudios en donde han aplicado las tecnologías ómicas para estudiar los efectos tóxicos de los contaminantes ambientales en organismos acuáticos. No obstante, aún hay una gran carencia de información de los efectos globales a nivel molecular y metabólico del impacto de los contaminantes, como el BaP, en especies de peces de importancia comercial tal como lo es la tilapia del Nilo y hasta la fecha aún son escasos los estudios que se han llevado a cabo con el enfoque ómico que permiten comprender los mecanismos de los compuestos tóxicos y sus efectos en el desempeño del crecimiento y la reproducción de estos peces. En algunas especies de peces modelo

y no modelo tales como la trucha arcoíris (*Oncorhynchus mykiss*), el pez gato (*Ictalurus punctatus*), la tilapia del Nilo y el pez cebra (*Danio rerio*) se ha estudiado la respuesta del transcriptoma ante el estrés ocasionado por la exposición a BaP. Por ejemplo, en una investigación reciente se identificaron cambios en el transcriptoma del pez cebra expuesto al contaminante BaP en una etapa temprana de su desarrollo larvario. En este estudio se encontró que el gen citocromo p450 1b1 (*cyp1b1*) gen involucrado en el metabolismo del BaP, estuvo más expresado en comparación con los organismos controles (Fang *et al.*, 2015) y lo interesante es que no se halló diferencialmente expresado el gen *cyp1a* que es considerado el biomarcador de exposición a dioxinas e hidrocarburos aromáticos policíclicos. Resultados similares han sido hallados en un estudio reciente que fue llevado a cabo en la tilapia del Nilo la cual fue expuesta subcrónicamente a BaP, en esta investigación de nuevo se encontró que el gen *cyp1b1* se expresó más veces que el gen *cyp1a* (Collí-Dulá *et al.*, 2018). El incremento de la expresión del gen *cyp1b1* en organismos expuestos a BaP, se ha relacionado con el incremento de formación de metabolitos mutagénicos que forman aductos en el ADN y modificaciones epigenéticas (Pfeifer & Ghruenberg, 1989). Algunos autores han comentado que esta respuesta indicaría que el órgano en cuestión o la especie no poseen una eficiente maquinaria de desintoxicación, lo cual lo haría más susceptible a adquirir enfermedades graves como el cáncer (Shimada *et al.*, 1999; Schlenk *et al.*, 2008; Albornoz-Abud *et al.*, 2021).

Los estudios transcriptómicos en peces de importancia comercial también han permitido identificar que la exposición a BaP puede ocasionar cambios en la expresión de genes que participan en diversas vías metabólicas y de señalización celular. Por ejemplo, en bacalaos que se encontraban en etapa juvenil y que fueron expuestos a BaP

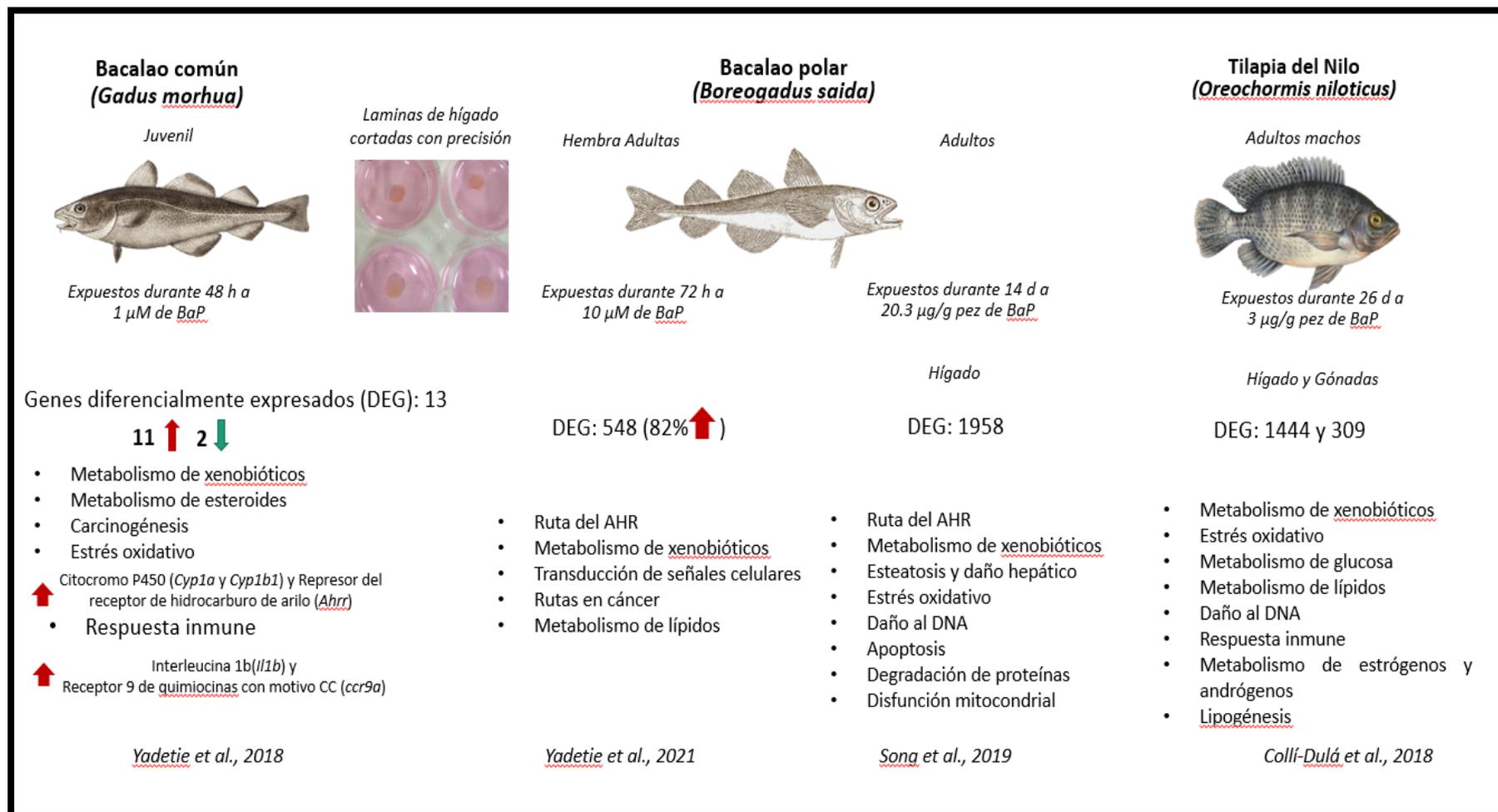
solo 13 genes fueron diferencialmente expresados (DEG) después de 2 d de exposición al contaminante, pero en hembras adultas se observaron 548 DEG a los 3 d post exposición con BaP. Los genes afectados en este estudio estaban involucrados en el metabolismo de xenobióticos, metabolismo de esteroides, el estrés oxidativo, la respuesta inmunológica, la transducción de señales, rutas asociadas con la carcinogénesis y el metabolismo de lípidos (Yadatie *et al.*, 2018; Yadatie *et al.*, 2021). Mientras que en el bacalao adulto la exposición subcrónica a BaP ocasionó respuestas más tóxicas, como el cambio de la expresión en genes involucrados en enfermedades como la esteatosis hepática, las vías asociadas con el daño al ADN, la degradación de proteínas y la disfunción mitocondrial (Song *et al.*, 2019) y en la tilapia del Nilo macho adulta además de encontrar cambios en la expresión de genes involucrados en la inducción del metabolismo de xenobióticos y el estrés oxidativo, también se observó cambios de expresión de genes involucrados en el metabolismo de la glucosa, metabolismo de lípidos, daño al ADN, entre otros que pueden ser observados en la tabla 2 (Collí-Dulá *et al.*, 2018).

Por otra parte, el análisis del perfil metabólico en un organismo permite obtener una relación más cercana al estatus fisiológico del organismo, por lo que, las respuestas metabólicas derivadas de la desintoxicación y el uso de la energía están más asociadas directamente con los efectos adversos en la salud del organismo que las otras respuestas moleculares (Bahamonde *et al.*, 2016). No obstante, son más escasas las investigaciones que se han llevado a cabo empleando el enfoque metabolómico para conocer el efecto de contaminantes como el BaP en organismos acuáticos, incluso a la fecha no existen investigaciones que estudien el efecto del BaP en la tilapia. A continuación, se presentan algunos estudios llevados a cabo en peces para conocer el efecto del BaP y otros

hidrocarburos en el perfil de metabolitos. En un reciente estudio, se aplicó la microextracción en fase sólida (SPME por sus siglas en inglés) in vivo para realizar un muestreo poco invasivo en el músculo de truchas arcoíris vivas expuestas a BaP (1 ng/L y 10 ng/L) después de 1 y 14 d post exposición. El análisis de los resultados obtenidos de la cromatografía líquida/espectrometría de masas (LC/MS) del extracto demostró que el perfil de metabolitos era dependiente de la concentración de BaP y el tiempo, y que diversas vías de señalización que fueron afectadas involucran aminoácidos, lípidos y los componentes de la regulación osmótica en los peces (Roszkowska *et al.*, 2018). También estos autores emplearon la técnica SPME para extraer sustancias tóxicas y metabolitos endógenos del pez *Catostomus commersonii* proveniente del río Athabasca en Alberta, Canadá. En este estudio se encontraron cambios significativos en los niveles de metabolitos, como eicosanoides, ácidos linoleicos y vitaminas liposolubles, además de que también se identificaron algunos compuestos relacionados con el petróleo (Roszkowska *et al.*, 2019). En otro estudio, mediante el análisis de espectroscopia de resonancia magnética nuclear de protón (^1H RMN) para evaluar la exposición del pez *Gasterosteus aculeatus* a 1,2:5,6-dibenzantraceno (DbA) en concentraciones entre 0,01 y 50 $\mu\text{g/L}$ durante cuatro días, se destacaron cambios importantes en las concentraciones de taurina, malonato, glutamato y alanina (Williams *et al.*, 2009). También, mediante ^1H RMN, se examinaron los efectos de la exposición dietética al petróleo pesado en la carpa *Cyprinus carpio*. Metabolitos como los aminoácidos (p. ej., leucina, isoleucina, valina, glutamina, histidina, prolina y metionina), 3-D-hidroxitirato y glicerol se elevaron y el metabolito como el formiato se redujo pero solo en grupos de 1 y 5% de petróleo. Los cambios en estos metabolitos sugirieron la alteración del ciclo ácido cítrico en el hígado de la carpa. El isobutirato (marcador de anoxia) también incrementó en los peces

expuestos a 1 y 5 % y además la concentración de creatinina en el plasma de las carpas expuestas al 5% de aceite pesado incrementó significativamente lo cual les sugirió una alteración de la función renal (Kokushi *et al.*, 2012). En un estudio más reciente, Hano *et al.* (2021) llevaron a cabo el análisis del metaboloma en las heces fecales del pez marino besugo (*Pagrus major*) para evaluar su salud después de la exposición a fenantreno. Observaron que la apariencia fecal fue anormal con cambios notables en las características fecales y alteraciones del metabolismo del colesterol y la putrescina y el uso mayoritario de este último metabolito como fuente de carbono. Por otra parte, en un estudio en donde mediante el uso de ^1H RMN se analizó el perfil metabólico de la almeja Manila expuesta a una dosis de $0.2 \mu\text{M}$ de BaP. En esta investigación se encontró que después de 24 h fueron inducidos cambios en el metabolismo de energía y la regulación osmótica, estos resultados fueron basados en los cambios de concentración de metabolitos biomarcadores como el succinato, el glucógeno, osmolitos como la betaína y la taurina, entre otros (Zhang *et al.*, 2011). Como se puede observar en los estudios anteriores, el análisis del transcriptoma y metaboloma demuestran que el estrés ocasionado por la exposición a BaP no solo puede ocasionar cambios en las respuestas tempranas vinculadas con cambios metabólicos, inmunológicos y de señalización en los peces, sino que también el BaP y otros HAP pueden llegar a afectar la concentración de metabolitos importantes vinculados con el metabolismo de energía, daño hepático, renal, osmorregulación y la disrupción endócrina en peces y organismos acuáticos. El estudio de estas respuestas puede ayudarnos a elucidar y comprender los efectos fisiológicos y fenotípicos que pueden llegar a tener lugar en estos organismos de importancia comercial y además proveen de información relevante para el entendimiento de los mecanismos de acción de los contaminantes.

Tabla 2. Investigaciones sobre el efecto del BaP a nivel transcriptómico en especies de peces no modelo con importancia comercial. Las flechas rojas indican la inducción y las azules la inhibición de la expresión de los transcritos.



JUSTIFICACIÓN

Una de las preocupaciones en el cultivo de peces como la tilapia es la incidencia de enfermedades ocasionadas por el inadecuado manejo de factores físicos y químicos como los contaminantes tal como el carcinógeno BaP que puede llegar a ocasionar diversos efectos tóxicos en la vida acuática afectando su crecimiento, reproducción y sobrevivencia (Varanasi *et al.*, 1989; Booc *et al.*, 2014; Fang *et al.*, 2015; Corrales *et al.*, 2014; Costa *et al.*, 2012; García-Tavera *et al.*, 2013; Reyes-Chaparro *et al.*, 2016). En estudios nacionales e internacionales, se ha reportado la presencia del BaP en el agua, sedimentos e incluso en órganos de peces comerciales como la tilapia (Juhasz & Naidu, 2000; Rodas-Ortíz *et al.*, 2008; León-Borges & Lizardi-Jiménez, 2017; Minnesota Department of Health, 2018; Ekere *et al.*, 2019), lo cual no solo es una preocupación para los organismos que habitan en esos sistemas acuáticos sino también por el consumo humano.

En México el cultivo de tilapia es de gran importancia y le ha conferido el cuarto lugar en producción anual en Latinoamérica y el Caribe (Martínez-Cordero *et al.*, 2021). El éxito en el cultivo de tilapia se debe a sus características ideales como el crecimiento rápido, fácil manejo, palatabilidad y a su gran capacidad de adaptación por lo que puede ser hallada en diversos ecosistemas acuáticos (El-Sayed, 2006). No obstante, en años recientes la Secretaría del medio ambiente (Sedema) y diversas fuentes nacionales han reportado muertes masivas de las tilapias en cuerpos de agua, a lo que las autoridades han mencionado que estos sucesos probablemente se deban al impacto por actividades humanas que han incrementado la contaminación de sus hábitats.

En esta investigación se planteó utilizar a la tilapia del Nilo como modelo de estudio ante la exposición subcrónica a BaP, con la finalidad de explorar el impacto en la respuesta transcripcional y metabólica ante una dosis baja y repetida de este contaminante. A la fecha los estudios llevados a cabo para conocer el impacto de contaminantes ambientales como el BaP en la tilapia usando herramientas ómicas como la transcriptómica y metabolómica son muy escasos (Collí-Dulá *et al.*, 2018; Pang *et al.*, 2021; Lu *et al.*, 2022; Jia *et al.*, 2022). El uso simultáneo de diferentes herramientas ómicas en los organismos vivos pueden ayudar a explicar o predecir riesgos a enfermedades u otros efectos moleculares y biológicos de manera más certera (Ritchie *et al.*, 2015). Es por ello que para evaluar si el BaP produjo efectos potencialmente adversos en la tilapia en diferentes niveles de organización biológica, se emplearon dos herramientas ómicas, la secuenciación masiva del ARN y la cuantificación de metabolitos por ^1H RMN en conjunto con el análisis histológico para corroborar los efectos morfológicos en órganos blanco de la tilapia, como en el hígado ya que es uno de los principales órganos que se encargan de metabolizar los compuestos para ser posteriormente excretados, además de estar involucrado en la reproducción y desarrollo de los organismos (van der Oost *et al.*, 2003). Así mismo, el estudio de los cambios en los patrones de expresión de genes y metabolitos en las gónadas de la tilapia del Nilo macho adulta nos pueden ayudar a predecir implicaciones en su reproducción (Booc *et al.*, 2014; Head, 2014). Es por ello que en esta investigación se analizaron los cambios en los patrones de expresión de ARNm y la caracterización de los metabolitos en el hígado y la gónada de la tilapia del Nilo, lo cual contribuirá para elucidar los mecanismos de acción del BaP y a evaluar de forma más certera el impacto en la fisiología de la tilapia expuesta al contaminante.

OBJETIVOS

1. OBJETIVO GENERAL

Analizar el efecto que tiene la exposición subcrónica a una dosis repetida y ambientalmente relevante de BaP (3 mg/kg) a nivel molecular, metabólico e histológico en órganos clave para el crecimiento, desarrollo y reproducción de la tilapia del Nilo macho adulta.

2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Analizar a nivel transcripcional el efecto global de la dosis repetida de BaP (3 mg/kg) en dos diferentes tiempos de exposición (26 y 56 d) en el hígado y la gónada de las tilapias adultas, mediante el uso de la secuenciación masiva de ARN, para conocer la expresión diferencial de los genes y con ellos representar los cambios moleculares fisiológicos, a nivel de rutas metabólicas y de señalización.
2. Analizar a nivel metabólico el efecto global de la dosis repetida de BaP (3 mg/kg) en tres diferentes tiempos de exposición (2, 26 y 56 d) en el hígado y la gónada de las tilapias adultas, mediante ¹H RMN con la finalidad de conocer el perfil de metabolitos en cada órgano y las concentraciones relativas de los metabolitos, que ayuden a representar los cambios fisiológicos a nivel de rutas metabólicas y de señalización.
3. Determinar daños en los órganos por la exposición a BaP, mediante el análisis morfológico en el hígado y la gónada de la tilapia del Nilo de tres diferentes tiempos de exposición (2, 26 y 56 d) a la dosis repetida de BaP (3 mg/kg) con el uso de técnicas histológicas.

PREGUNTAS DE INVESTIGACIÓN

1. ¿Cuál es el impacto que ocasionará la exposición subcrónica de BaP en dosis repetidas y en diferentes tiempos de exposición en la expresión de genes y el perfil de metabolitos en el hígado y las gónadas de la tilapia del Nilo macho adulta?
2. De haber cambios en la expresión de genes en la tilapia expuesta a BaP, ¿cuáles son los genes más afectados y cuáles serán las principales rutas metabólicas y de señalización enriquecidas a los 26 y 56 d de exposición?
3. De existir diferencias en el perfil de metabolitos ante la exposición a BaP ¿Cuáles serán los metabolitos más afectados y que rutas metabólicas serán enriquecidas en los organismos tratados con BaP?
4. Los cambios en rutas metabólicas y de señalización observados con los diferentes enfoques empleados ¿son similares o están relacionados?
5. La exposición subcrónica a BaP ¿ocasionará cambios morfológicos en el hígado y las gónadas de las tilapias y cuáles cambios serán los más recurrentes?
6. Los cambios morfológicos observados ¿estarán relacionados con los cambios moleculares y metabólicos encontrados en el hígado y las gónadas de las tilapias?

METODOLOGÍA

En este apartado de la tesis primero se explica cómo fueron preparadas la solución de BaP y como se llevó a cabo el experimento de exposición al contaminante, la obtención, preparación y almacenamiento de las muestras para los análisis. Posteriormente, se describen los procesos que se realizaron para el análisis histológico, metabolómico y transcriptómico, así como también los análisis estadísticos que se llevaron a cabo para cada caso.

1. SUBSTANCIAS QUÍMICAS Y SOLUCIONES

Como fue descrito en publicaciones anteriores, el benzo(a)pireno ($\geq 96\%$, CAS# 50-32-8) de la marca Sigma Aldrich (Saint Louis, MO), fue empleado para preparar una solución de BaP (10 mg/ml) disuelto en aceite de maíz y 1% de dimetil sulfoxido (DMSO). Para los organismos controles, se preparó una solución que únicamente contenía aceite de maíz y 1% de dimetil sulfoxido (DMSO). Ambas soluciones fueron almacenadas en frascos ámbar hasta su uso. Las soluciones preparadas fueron utilizadas para administrar el volumen aproximado de 0.1 ml (esto calculado en función del peso del pez) y para obtener la dosis de BaP (3 mg/kg) para los organismos de los grupos tratados con BaP (Collí-Dulá *et al.*, 2018; Albornoz-Abud *et al.*, 2021).

2. DISEÑO EXPERIMENTAL

Tilapias machos adultos de la línea Sterling fueron adquiridos y mantenidos en el área de estanquería del Cinvestav-Merida. Los peces fueron aclimatados durante cuatro semanas en tanques de fibra de vidrio de 1000 L de capacidad, con una densidad de 8–11 peces/m³, flujo de agua continuo, temperatura ~ 28°C, aireación constante, fotoperíodo natural, concentración de oxígeno disuelto (OD) de 5 mg/L y bajo

alimentación controlada con pellets de marca comercial (CAMPI®, con contenido proteico de 32%).

Las tilapias seleccionadas para el estudio tenían 12 meses de edad, longitud corporal promedio (cm) y peso promedio (g) en los siguientes rangos: $27,7 \pm 0,214$ cm y $378,8 \pm 9,63$ g.

Para este estudio la exposición se llevó a cabo mediante inyecciones intraperitoneales (*ip*) de BaP debido a que proporciona mediciones directas para estudios toxicológicos de exposición a HAP y ha demostrado que proporciona fuertes correlaciones con las concentraciones de metabolitos contenidos en la bilis de peces expuestos a BaP (Gerger & Weber, 2015; Karami *et al.*, 2011).

Con base en estudios anteriores (Padros *et al.*, 2003; Collí-Dulá *et al.*, 2018), las tilapias seleccionadas fueron divididas aleatoriamente en dos grupos, control y tratado, con 26 y 21 peces, respectivamente, distribuidos en 4 tanques de fibra de vidrio (2 para el grupo control y 2 para el grupo tratado). Brevemente, inmediatamente antes de comenzar el experimento como una medida de control se seleccionaron 2 peces al azar del grupo control los cuales fueron sacrificados únicamente para confirmar que eran peces adultos con posible capacidad para reproducirse e identificar la fase reproductiva, para esto último una parte de la gónada fue fijada en un casete para el análisis histológico e inmediatamente fijada en formalina al 10% tamponada. Seguidamente, los 24 peces restantes del grupo control recibieron inyecciones *ip* de la solución acarreadora, mientras que los del grupo tratado fueron inyectados *ip* con una dosis de 3 mg/kg de la solución de BaP. Las inyecciones en cada grupo se realizaron cada 6 días durante un período de 54 días (última inyección). Individuos inyectados *ip* de cada grupo fueron seleccionados al azar dos días después de la primera dosis (2 d), dos días después de la segunda dosis

(8 d), dos días después la cuarta dosis (26 d) y dos días después de la décima dosis (56 d). Es importante mencionar que de los 6 individuos que formaban parte del grupo de 56 d de los organismos control, durante las últimas semanas del experimento demostraron un comportamiento agresivo y territorial (comportamiento a corde a su talla) ocasionando la muerte de 3 organismos antes de que este concluyera. Mientras que los organismos tratados con BaP mostraron un comportamiento contrario (pasivos y presentando una pérdida de peso). Por otra parte, debido a la limitación en el número de organismos (21 para el grupo de organismos tratados con BaP) y para cumplir con 1) el principal objetivo del estudio de analizar el efecto del BaP en tiempos prolongados de exposición (26 y 56 d), para comparar la respuesta con una exposición aguda de BaP (2 d). El número de muestras fue ajustado en base a lo anteriormente mencionado, seis o tres peces de cada grupo (control y tratado) fueron seleccionados al azar. Solo se seleccionaron 3 organismos a los 8 días en el grupo de BaP y a los 56 días para el grupo control. Para los otros grupos y tiempos de exposición (2, 26 y 56d), se seleccionaron 6 tilapias.

A todos los peces seleccionados se les escindieron el hígado, los testículos y la vesícula biliar. El hígado y los testículos fueron inmediatamente pesados y una parte de cada uno de ellos fue inmediatamente criogenizada en nitrógeno líquido y almacenado a -80°C en tubos Corning para llevar a cabo los análisis transcripcionales y metabólicos. Otra parte de los órganos escindidos fueron colocados en casetes para histología y fijados inmediatamente en formalina al 10% tamponada. La bilis también fue inmediatamente extraída y almacenada a -20°C .

Como fue mencionado anteriormente, el principal interés del estudio de este trabajo fue analizar respuestas moleculares y fisiológicas en la tilapia adulta en dos tiempos de exposición subcrónica de BaP, no obstante, para explorar posibles diferencias

ante una exposición aguda casi todos los análisis fueron también llevados a cabo en el grupo de 2 d (a excepción de la secuenciación masiva de ARN por limitaciones en presupuesto) y solo algunos análisis fueron realizados a los 8 d de exposición (Tabla 3). Es por ello, que la mayoría de los análisis realizados que se presentan en la tabla 3 se efectuaron a los 26 y 56 d de exposición para gónadas e hígado, a excepción del análisis de ¹H RMN que en el caso de las gónadas solo pudo ser llevado a cabo a los 56 d por que los peces de este tiempo de exposición poseían un tamaño mayor de los cuales si se pudo obtener la cantidad suficiente del órgano para también realizar este estudio.

Tabla 3. Análisis realizados en los diferentes tiempos exposición en el hígado y las gónadas de las tilapias control y tratadas con BaP.

Análisis Realizado	Tiempo de exposición (d)				
	0	2	8	26	56
Índices morfométricos		X	X	X	X
Fases reproductivas	X	X		X	X
Daños histológicos		X		X	X
Cuantificación de metabolitos en bilis		X	X	X	X
Análisis de perfil de metabolitos por ¹ H RMN		X		X	X
Expresión de transcritos por PCR		X	X	X	X
RNA-seq				X	X

El color rojo de la X representa que el análisis solo fue realizado en el hígado.

Durante los periodos de aclimatación y experimentación en cada estanque se monitorearon la temperatura, el valor de pH y el oxígeno disuelto (OD) con un oxímetro (YSI 556 MPS). Las muestras de agua fueron colectadas semanalmente para medir las concentraciones de nutrientes con un espectrómetro (Shimadzu 20), como lo describen Strickland & Parsons (1972) y Greenberg *et al.* (1992).

Todos los parámetros del agua estaban dentro de los rangos sugeridos para el cultivo adecuado de tilapia (Hsien-Tsang & Quintanilla, 2008; Muir *et al.*, 2000). La temperatura fue de 28.8 ± 0.09 °C, el pH de 8.8 ± 0.09 , el OD de 6.9 ± 0.5 mg/L, carbonato

de calcio [CaCO₃] 309 ± 5,1 mg/L, amoníaco de 0.04 ± 0.015 mg/L, nitritos 0.2 ± 0.02 mg/L, nitratos 4.9 ± 0.42 mg/L y fosfatos 0.45 ± 0.24 mg/ L.

Este experimento se llevó a cabo de acuerdo con las directrices para el Cuidado y Manejo de Animales de Laboratorio (PICUAL-Cinvestav, 2002), Norma Oficial Mexicana NOM-062-ZOO-1999 (de Aluja, 2002) y la Guía para el cuidado y uso de animales de laboratorio del Instituto Nacional de Salud de E.U. (http://www.aaalac.org/resources/Guide_2011.pdf).

3. ANALISIS DE CAMBIOS MORFOMÉTRICOS

3.1. Cálculo de índices morfométricos

Para conocer la condición de salud general del organismo el factor de condición (K), el índice hepatosomático y gonadosomático fueron medidos para cada muestra de los grupos control y tratados con BaP en cada tiempo de exposición, para ello los índices fueron calculados de acuerdo a Da Costa & Ruby (1984) como se describe a continuación:

- *Factor de condición*

El factor de condición (K) se calculó de la siguiente manera:

$$K = \text{masa total del pez en gramos} / \left[\left(\text{longitud total en centímetros} \right)^3 \right]$$

- *Índice hepatosomático y gonadosomático*

El índice hepatosomático (IHS) se calculó como sigue:

$$\text{IHS} = \text{masa total del hígado en gramos} / \text{masa total del pez en gramos} * 100$$

Para el cálculo del índice gonadosomático (IGS) se usó la siguiente fórmula:

$$\text{IGS} = \text{masa total de la gónada en gramos} / \text{masa total del pez en gramos} * 100$$

3.2. Análisis estadístico

Después de haber calculado los índices morfométricos para cada espécimen se realizó un análisis estadístico para cada tiempo de colecta de órganos con el objetivo de detectar posibles diferencias en los indicadores morfométricos entre organismos controles y tratados, para esto, se realizaron pruebas de *t* de Student e intervalos de confianza al 95%.

4. ANÁLISIS HISTOLÓGICO

Para conocer el impacto y los daños que fueron ocasionados en los órganos de la tilapia por la exposición a BaP, se realizó el análisis histológico de los órganos de los peces de cada grupo experimental. Cabe recalcar que para estos análisis únicamente fueron analizados los grupos control y tratados con BaP que pertenecían al tiempo 2, 26 y 56 d de exposición.

4.1. Procesamiento y tinción de los cortes histológicos

Las muestras de hígado y de las gónadas que estaban fijados en formalina al 10% tamponada fueron procesadas en un histoquinete, en donde primero fueron deshidratadas con diferentes concentraciones de alcohol, aclaradas con baños de benceno e impregnadas con parafina Paraplast. Posteriormente, los tejidos fueron incluidos en parafina, para ello los cortes fueron colocados con una orientación sagital en moldes de metal cúbicos rellenos con Paraplast líquido. Después del enfriado de los bloques con parafina, estos fueron cortados horizontalmente con un micrótopo semiautomático (MICROM) con un grosor de 6 μm . Para cada muestra se obtuvieron 4 cortes consecutivos a manera de "cinta", las cuales fueron alisadas en un baño de flotación con agua destilada con la temperatura de 48 a 50° C, para posteriormente ser

adheridas a un portaobjetos. Con el fin de asegurar la adhesión de los cortes al portaobjetos, éstos fueron puestos a secar en una estufa a 60° C durante 2 días. Los cortes adheridos fueron teñidos con hematoxilina y eosina y montados con un cubreobjetos con resina sintética diluida al 60% en Xilol. Por último, los cortes montados fueron colocados en una estufa aproximadamente por 5 días o hasta que se obtuvo el secado y la polimerización total de la resina. El exceso de resina en el portaobjetos fue removido con benceno. La observación de cada corte se efectuó con un microscopio óptico con los objetivos de 4, 10 y 40 X (Figura 5).

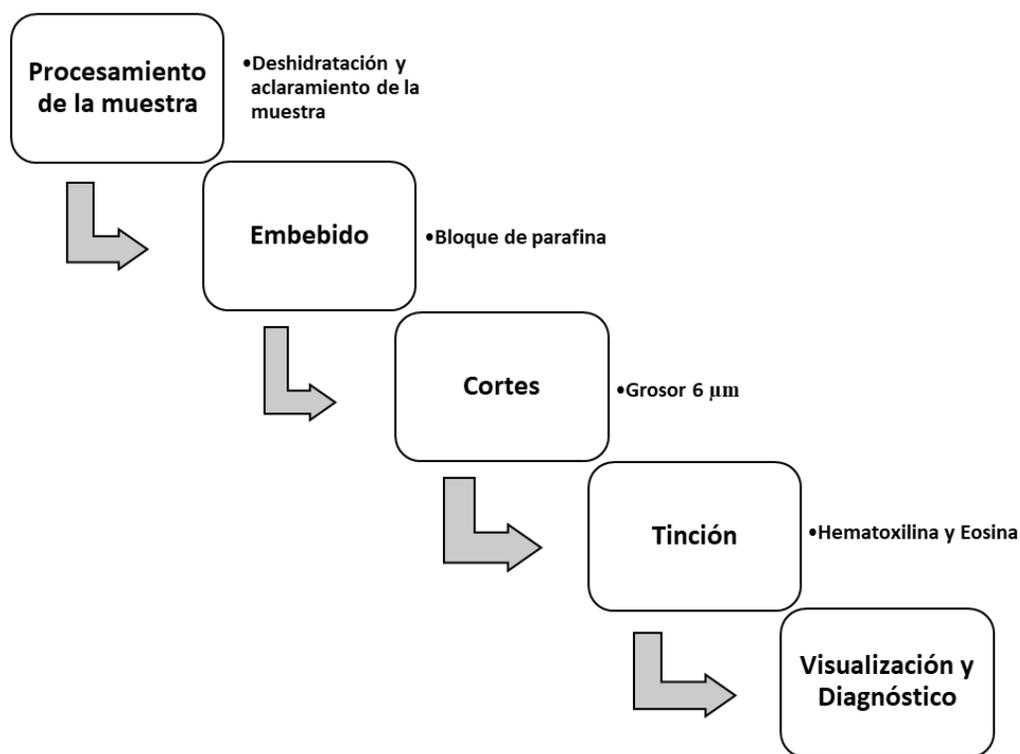


Figura. 5. Diagrama general de los pasos para el procesamiento y análisis histológico.

4.2. Determinación de la fase reproductiva y evaluación del daño histológico

Mediante la observación en microscopio óptico, en las gónadas se llevó a cabo la determinación de las fases reproductivas de cada pez según el criterio histológico para

peces teleósteos descrito por Brown-Peterson *et al.* (2011), las cuales son: fase inmadura (nunca ha desovado), fase de desarrollo, fase en aptitud para desovar (peces capaces de reproducirse), fase de regresión (cese del desove) y fase de regeneración (sexualmente maduro pero inactivo).

También se llevó a cabo la determinación de la prevalencia de daños histológicos (expresado como porcentaje) en el hígado y las gónadas como está descrito en la tesis de Couoh-Puga (2022). Brevemente, se registró la presencia- ausencia de cada lesión histológica y el cálculo del índice de daño histológico (IDH). Las alteraciones histológicas fueron clasificadas en tres grados de incidencia (Extensión del daño histológico, EDH) y por el grado de cambio del tejido (GCT) (Tabla 4).

Tabla 4. Evaluación de las alteraciones histológicas en relación con la extensión del daño (Couoh-Puga, 2022). EDH: Extensión del daño histológico; GCT = grado de cambio del tejido.

EDH	Extensión del daño histológico	GCT	Grado de cambio en el tejido
Grado 1	No hay lesiones	Etapas I	Cambios que no alteran el tejido u órgano al grado que este no pueda repararse a sí mismo si las condiciones mejoran.
Grado 2	Cambios histológicos focales	Etapas II	Cambios más severos que pueden afectar la función del tejido/órgano.
Grado 3	Cambios histológicos extendidos o difusos	Etapas III	Cambios que impiden que el órgano se repare a sí mismo incluso si las condiciones mejoran.

El IDH se calculó por cada tejido y por cada pez con la suma del número de lesiones clasificadas en cada grado y multiplicadas por la etapa, empleando la ecuación $IDH = 1 \times \Sigma I + 10 \times \Sigma II + 100 \times \Sigma III$, en donde I, II y III son las etapas GCT. Esta fórmula propuesta por Poleksic & Mitrovic-Tutundzic (1994), asume empíricamente que los grados de cambio tienen una cinética exponencial, por lo que los números 1, 10 y 100

son valores asignados (índices de las etapas) correspondientes a las tres diferentes etapas de cambio (Poleksic & Mitrovic-Tutundzic, 1994; Couoh-Puga, 2022). El IDH fue comparado entre tiempos de exposición entre los grupos tratados con BaP y también fueron comparados entre los grupos de organismos control y con tratamiento a BaP. También se capturaron imágenes de los tejidos con ayuda del software ImageJ 1.46r.

4.3. Análisis estadístico

El propósito de este análisis fue determinar si había diferencias estadísticamente significativas en los daños encontrados entre los grupos control y tratados con BaP en cada tiempo de exposición. Para ello, se realizó la determinación de la normalidad de los promedios del EDH e IDH mediante la prueba de Shapiro-Wilks. Para identificar diferencias entre los grupos (control y tratado) se aplicó la prueba de *t* de Student no pareada y para detectar diferencias entre tiempos de exposición a BaP se llevó a cabo el análisis de varianza de una vía (ANOVA) ambas pruebas con un valor de significancia de $p < 0.05$. Cuando los datos no pasaron la prueba de normalidad para determinar posibles diferencias estadísticas entre los valores del IDH se emplearon pruebas no paramétricas ANOVA no paramétrica (Kruskal Wallis) con un nivel de significancia de $p < 0.05$.

5. ANÁLISIS DE METABOLITOS

Para el análisis de metabolitos se realizaron dos técnicas, una de ellas fue la espectrometría de fluorescencia aplicada en la bilis para monitorear los metabolitos de BaP en tilapia y en la otra técnica empleada ^1H RMN, se analizó el perfil de metabolitos presentes en las muestras de hígado y gónadas. Para llevar a cabo el análisis del perfil de metabolitos primero se realizó la extracción de los metabolitos mediante la técnica de metanol:cloroformo que permitió obtener el extracto que fue analizado mediante

espectroscopia de resonancia magnética nuclear de protón hidrógeno. Una vez que los espectros fueron obtenidos, estos se analizaron mediante comparación con una base de datos de espectros de RMN con un programa comercial con la finalidad de caracterizar y obtener la concentración relativa de los metabolitos. Por último, los datos obtenidos fueron analizados estadísticamente con ayuda de un programa de análisis libre. A continuación, se presenta la explicación de cada parte del proceso que se realizó.

5.1. Cuantificación de los metabolitos de BaP en la bilis de la tilapia

En este análisis los metabolitos de BaP en la bilis se cuantificaron de acuerdo con la metodología que se encuentra descrita en Albornoz-Abud *et al.* (2021) y en estudios previos (Aas *et al.*, 1998; García-Tavera *et al.*, 2013; Collí-Dula *et al.*, 2018). La bilis que fue extraída de la vesícula biliar con una jeringa hipodérmica de 1 ml, fue colectada en tubos Eppendorf de 2 ml y almacenada a -20° C hasta el análisis.

Para medir la concentración total de metabolitos de BaP, primero se realizó una curva de calibración, para ello se preparó la solución estándar de BaP en diclorometano y posteriormente se prepararon diluciones en etanol al 48%. La curva de calibración se realizó por triplicado, obteniéndose un coeficiente de correlación del 99 % con un rango de concentración de 0 a 3.2 mg/ml de BaP.

Por otro lado, las muestras de bilis se diluyeron en una proporción de 1:400 con 48% de etanol:agua. Cada muestra diluida fue transferida a una celda de cuarzo de 1 cm para ser medidas en el espectrómetro de fluorescencia marca Thermo Scientific Lumina (Thermo Fisher Sci-entific, Waltham, Massachusetts, E.U.) a longitudes de onda de 364/404 nm (excitación/emisión). La adquisición de los espectros y su procesamiento se realizó mediante el software Luminous V.3.0.

5.1.1. Análisis estadístico

Para saber si había diferencias estadísticas significativas entre las concentraciones de metabolitos de los grupos control y tratados con BaP en cada tiempo de exposición, a los grupos se les aplicó una prueba t y el ANOVA de una vía en todos los grupos. Cuando los datos de concentración no presentaron la distribución normal o no pasaron la prueba de homocedasticidad, se aplicó la prueba no paramétrica de Kruskal-Wallis, seguida de la prueba U de Mann-Whitney. Todas las pruebas estadísticas se realizaron con el programa SigmaPlot. Versión 12.0 (SYSTAT, Chicago, IL, E.U.). Las gráficas fueron creadas con el programa Prism versión 8.0 (GraphPad Software Inc., San Diego CA, E.U.).

5.2. Análisis de metabolitos en el hígado y gónadas

5.2.1. Extracción de metabolitos

Los metabolitos de cada muestra de gónadas e hígado fueron extraídos mediante la técnica de metanol/cloroformo descrita por Misra *et al.* (2018), con modificaciones propuestas por Tapia-Pérez *et al.*, (Sin publicar). Brevemente, 200 mg de tejido fue macerado con nitrógeno líquido, se adicionó en un tubo Eppendorf junto con 500 µl de metanol deuterado y 127 µl de agua deuterada con el estándar de referencia 3-trimetilsilil{2,2,3,3-H₂}propionato sódico (TSP). La preparación fue agitada durante 1 min y centrifugada por 30 min a 14,000 RPM a 4°C. Transcurrido el tiempo, el líquido sobrenadante fue transferido a un nuevo tubo al cual se le adicionaron 250 µl de cloroformo, 125 µl de agua deuterada con TSP y 125 µl de solución amortiguadora de fosfatos con pH 7. Se agitó el tubo durante 1 min y se centrifugó a 14,000 RPM a 4°C por 15 min. El sobrenadante (600 µl) fue transferido a un tubo para RMN de 5 mm para

su análisis inmediato. Para asegurar la precisión de la extracción, cada muestra fue extraída por triplicado y la concentración final de TSP fue de 0.292 μM .

5.2.2. Adquisición de espectros de ^1H RMN, procesamiento, Identificación y cuantificación de metabolitos

La adquisición de los espectros de ^1H RMN se realizó siguiendo la metodología descrita por Ravanbakhsh *et al.* (2015). Brevemente, el análisis de ^1H RMN fue realizado a 25 °C con el equipo Varian 600 MHz AR Premium Compact (Varian-Agilent, Santa Clara, CA, E.U.). Para las mediciones se aplicó un campo magnético de 14.1 T, una frecuencia de resonancia ^1H de 599.77 Hz y la secuencia PRESAT con el total de 128 transitorios con datos recopilados en 64 k puntos. El retardo de relajación fue de 1 segundo y el tiempo de adquisición fue de 3 segundos. Todas las muestras fueron analizadas con los mismos parámetros y equipo.

Antes de llevar a cabo la cuantificación de los metabolitos, cada espectro fue procesado con el programa Chenomx Inc Versión 9.0. Para llevar cabo la identificación y cuantificación de los metabolitos, la señal del TSP fue utilizada como estándar interno y en todos los espectros fue fijada a 0 ppm con la concentración de 0.292 μM . Las líneas base de los espectros fueron corregidas manualmente con la opción BXR spline, el pH fue fijado a 7, con corrección de fase automática y sin supresión de la señal residual del agua.

La identificación y cuantificación de los metabolitos de cada espectro fue perfilado manualmente con la biblioteca de espectros de metabolitos del Chenomx.

5.2.3. Análisis diferencial de metabolitos de ^1H RMN

El análisis diferencial se llevó a cabo con el programa libre en línea MetaboAnalyst 5.0 y se seleccionó la opción de análisis estadístico de un factor. Para este análisis las

concentraciones de las muestras fueron ingresadas al programa. Para la transformación de los datos fue seleccionada la opción de transformación de raíz cuadrada y el escalamiento automático. Para detectar diferencias entre grupos se realizó el análisis de varianza de una vía, para detectar correlaciones entre metabolitos se llevó a cabo las correlaciones de Spearman y para detectar la variación entre las réplicas técnicas y muestras biológicas se hizo el análisis discriminante-mínimos cuadrados parciales (PLS-DA). Para detectar diferencias entre controles y tratados en cada tiempo de exposición se realizó la prueba de *t* de Student y también se realizó el análisis de Fold Change, en donde las veces de cambio (fold change, FC) fueron fijadas ≥ 2 .

6. ANÁLISIS DE EXPRESIÓN TRANSCRIPCIONAL

Para llevar a cabo la exploración de la respuesta transcripcional en las gónadas e hígados de las tilapias expuestas a BaP primero se llevó a cabo la obtención y purificación del ARN total de cada muestra biológica, para posteriormente llevar a cabo los análisis. Mientras que la cuantificación de transcritos por la técnica de PCR en tiempo real de nueve genes de interés fue llevada a cabo en todos los tiempos de exposición (2, 8, 26 y 56 d), la exploración de los cambios globales en el perfil de expresión mediante el análisis transcriptómico únicamente fue realizada en los tiempos de exposición subcrónica (26 y 56 d).

6.1. Extracción de ARN

El ARN del hígado y de los testículos se extrajo de cada muestra de tejido (~ 0,5 g) utilizando el reactivo Trizol siguiendo el protocolo del fabricante (Invitrogen™, Carlsbach CA, E.U.). El ARN se re suspendió en RNasecure™ Reagent (Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, E.U.), seguido de un tratamiento para eliminar el

ADN genómico con el kit Turbo DNA-free (Ambión, Austin, Texas, E.U.) y un tratamiento para eliminar impurezas con el método de extracción fenol:cloroformo, 1:1 (Chomczynski & Sacchi, 1987). La concentración y la pureza del ARN se midió con un espectrofotómetro NanoDrop™ 2000 (Thermo Scientific, Waltham, Massachusetts, E.U.).

6.2. Síntesis de ADN complementario (ADNc) y PCR en tiempo real cuantitativa (qPCR).

La síntesis del ADNc se llevó a cabo para cada muestra, utilizando 5 µg del ARN purificado, con el kit comercial Improm-II Reverse Transcription System (Promega, Madison, Wisconsin, E.U.) y el termociclador Veriti® (Applied Biosystems™, Atenas, Georgia, E.U.). Para asegurar el control de calidad del proceso de síntesis de ADNc se usaron preparaciones a las cuales no se les adicionó la enzima Transcriptasa Reversa (-RT) y también se emplearon controles negativos (preparaciones sin ARN).

Para llevar a cabo la qPCR, se diseñaron cebadores específicos a partir de secuencias específicas de transcritos contenidos en el GenBank del NCBI (Anexo 1). Para ello se utilizó el software Primer 3 (<http://frodo.wi.mit.edu/primer3/>) (Koressaar & Remm, 2007; Untergasser *et al.*, 2012) con las siguientes especificaciones: Longitud del amplicón inferior a 150 pb; temperatura de elongación de 60°C, con una diferencia máxima de temperatura entre los cebadores de 1°C y con un contenido de GC de 20% a 80% (Dieffenbach *et al.*, 1993).

La especificidad de los cebadores se evaluó mediante PCR de punto final y qPCR con el ADNc sintetizado de las muestras. Los productos de la PCR de punto final se obtuvieron usando el kit comercial Taq DNA Polimerase (Invitrogen®, Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, E.U.). Para la visualización de los productos del PCR punto final se usó electroforesis y el trans iluminador ultravioleta (Pvu). Para medir la

expresión relativa de los genes de interés con qPCR, se utilizó el reactivo SYBR Green PCR Master Mix (Applied Biosystems™, Atenas, Georgia, E.U.) y el termociclador StepOnePlus™. Cada muestra se midió por triplicado, incluidos los -RT y controles negativos. Las condiciones de la PCR fueron: 95° C durante 10 min, 40 ciclos de 95° C durante 15 s, y de 56° C hasta 62° C durante 1 min. Las curvas de fusión para cada gen indicaron que únicamente se formó un producto durante la PCR. La validación de las reacciones de qPCR para cada cebador y la cuantificación de los transcritos se realizó de acuerdo con el método $2^{\Delta\Delta CT}$ descrito por Livak & Schmittgen (2001). Durante este proceso se siguieron las directrices MIQE establecidas para qPCR (Taylor *et al.*, 2010).

6.2.1. Análisis estadístico de los datos de qPCR

Para determinar la existencia de diferencias estadísticas significativas entre los datos obtenidos del qPCR de los grupos de control y tratados con BaP en los diferentes tiempos de exposición, se utilizó la prueba de *t* no pareada y el ANOVA de una vía. Cuando los datos no estuvieron distribuidos normalmente o no pasaron la prueba de homocedasticidad de varianza, se llevó a cabo la prueba de Kruskal-Wallis no paramétrica, seguida de la prueba U de Mann-Whitney. Estos análisis se realizaron utilizando la versión del software SigmaPlot. 12.0 (SYSTAT, Chicago, IL, E.U.). Los gráficos fueron creados con el software Prism versión 8.0 (GraphPad Software Inc., San Diego, CA, E.U.).

6.3. Construcción de bibliotecas y secuenciación del ARN

Cabe señalar que la secuenciación del ARN únicamente fue realizada para los grupos de exposición subcrónica de 26 y 56 d. Los análisis de construcción de bibliotecas

y de secuenciación fueron llevados a cabo en diferentes fechas, con diferentes kits comerciales y parámetros distintos que se describen a continuación.

Para las muestras de 26 d, el análisis de la secuenciación se encuentra descrito en Collí-Dulá *et al.*, 2018. Brevemente, la secuenciación se realizó con los reactivos proporcionados en el kit Illumina de 150 ciclos y siguiendo el protocolo del fabricante para la secuenciación con NextSeq500. Se mezclaron diez μl de biblioteca (4 nM) con 10 μl de NaOH 0,1 N durante 5 min, luego la biblioteca se diluyó a 20 pM en tampón HT1. Se realizó una dilución final de 1.3 a 1.5 pM con el buffer HT1 para un volumen final de 1 ml. Un volumen de 600 μl fue cargado en el cartucho proporcionado en el kit para la secuenciación. Se estableció la corrida eligiendo el flujo de trabajo 'Generate FASTQ only' en Illumina Experiment Manager (Illumina, E.U.). En estas condiciones, la densidad del cluster típicamente cae en el rango de 200–220 K/mm². Ocho muestras con código de barras fueron agrupadas para una corrida de secuenciación, con una salida esperada de ~50 millones de lecturas por muestra.

Para las muestras de 56 d, la elaboración de las bibliotecas para RNA-seq, la integridad de las muestras de ARN total fue determinada por Electroforesis Capilar Automatizada usando el sistema Bioanalyzer 2100 (Agilent Technologies, Inc., Santa Clara, CA, E.U.) y el chip Agilent RNA 6000 Nano, los valores de RIN (RNA Integrity Number) obtenidos para las muestras fueron en todos los casos > 8. El ARN mensajero fue enriquecido por perlas magnéticas y la construcción de las bibliotecas se realizó a partir del ARN enriquecido con la ayuda del Kit Illumina TruSeq Stranded mRNA sample prep (Illumina, Inc., SanDiego, CA, E.U) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Brevemente, se generaron fragmentos de ARN entre 200-600 pb para posteriormente sintetizar ADNc por la transcriptasa reversa con oligonucleótidos degenerados de 6 nt. El

ADNc fue convertido a ADNc de doble hélice por la actividad de la enzima Klenow. Posteriormente, fueron ligados los adaptadores específicos de Illumina. Finalmente, cada biblioteca fue amplificada por PCR con oligonucleótidos específicos para los adaptadores para incrementar el número de moléculas para la secuenciación masiva. Cada biblioteca fue analizada por Electroforesis Capilar Automatizada (Bioanalyzer 2100, Agilent Technologies, Inc., Santa Clara, CA, E.U.) utilizando el chip DNA High Sensitivity. Finalmente, las bibliotecas fueron cuantificadas utilizando el fluorómetro Qubit®fluorometer con el kit Qubit ds DNA HS Assay (Invitrogen). Las bibliotecas fueron amplificadas clonalmente en la laminilla de flujo (“Flowcell”) y secuenciadas con la plataforma NextSeq 500 de la marca Illumina (Illumina, Inc., SanDiego, CA, E.U) y con el kit NextSeq 500/550 High Output v2 kit (150 ciclos) con una configuración de corrida pareada de 2 x 75, indexada y siguiendo el protocolo descrito por el fabricante.

6.4. Análisis de expresión diferencial (DE) y análisis de enriquecimiento

Después de haber obtenido los archivos de secuenciación del ARN en formato fasta de las muestras de 26 y 56 d de gónada e hígado, se procedió a analizar la calidad de las lecturas con el programa fastqc (v0.11.9; Andrews, 2010) las cuales tuvieron valores de calificación Q > 30 y el preprocesamiento de las muestras se llevó a cabo con el programa fastp (v0.20.0; Chen *et al.*, 2018). Para el alineamiento de las muestras con el genoma de referencia, primero se generó el índice del genoma el cual se realizó con el programa HISAT2 (v2.2.0; Kim *et al.*, 2019) con *Oreochromis niloticus* Annotation Release

104

(https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genome/annotation_euk/Oreochromis_niloticus/104/).

Posteriormente, se llevó a cabo la alineación de cada muestra con el genoma de referencia con el programa HISAT2. Los nuevos archivos obtenidos fueron convertidos a

formato bam y ordenados por coordenadas con el programa SAMtools (v1.12; Li *et al.*, 2009). En el caso de los archivos de las muestras de 26 d (4 archivos por cada muestra) estos fueron además concatenados con el programa SAMtools. Para asegurar que los archivos estuvieron adecuadamente contruidos se sometieron a control de calidad con el programa Qualimap 2 (Okonechnikov *et al.*, 2016).

Después de este proceso, se analizaron los datos, para ello los conteos de las lecturas fueron realizados con el programa estadístico R (v4.2.1; Core Team 2021), mediante el uso de la paquetería Rsubread (Liao *et al.*, 2019) con la función “featureCounts”, la expresión diferencial se llevó a cabo con la paquetería Deseq2 (Love *et al.*, 2014) con la función “lfcShrink”, las anotaciones con la paquetería biomaRt (Durinck *et al.*, 2009). Tanto el análisis de sobre representación (ORA por sus siglas en inglés) y el análisis de enriquecimiento de grupos de genes (GSEA por sus siglas en inglés) se realizó con la paquetería clusterProfiler (Yu *et al.*, 2012) con funciones para organismos no modelo. Para comparar los resultados de enriquecimiento se utilizó el software libre g:Profiler (Raudvere *et al.*, 2019).

RESULTADOS

1. RESULTADOS MORFOMÉTRICOS

El promedio de los índices calculados (IHS e IGS) en la mayoría de los tiempos de exposición fueron menores en los grupos tratados con BaP en comparación con los grupos control y la media del factor de crecimiento (K) fue menor en los organismos tratados con BaP a partir de los 8 d de exposición (Figura 6).

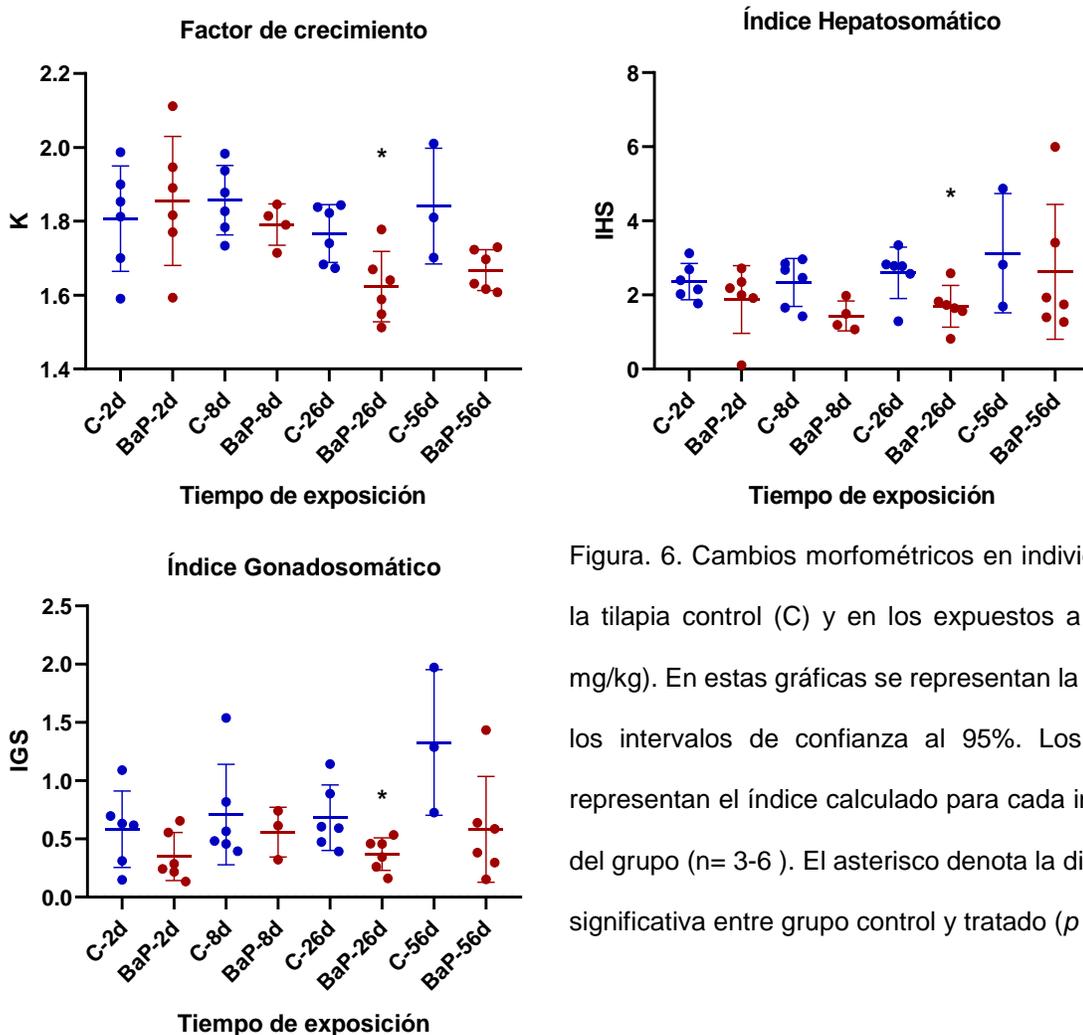


Figura. 6. Cambios morfométricos en individuos de la tilapia control (C) y en los expuestos a BaP (3 mg/kg). En estas gráficas se representan la media y los intervalos de confianza al 95%. Los puntos representan el índice calculado para cada individuo del grupo (n= 3-6). El asterisco denota la diferencia significativa entre grupo control y tratado ($p < 0.05$).

No obstante, los resultados estadísticos indicaron que las diferencias no fueron significativas a los 2, 8 y 56 d. Únicamente a los 26 d del tratamiento con BaP, todos los índices de los órganos disminuyeron. Al comparar los resultados del factor de condición

(K) de los grupos tratados con BaP, se observó que tanto el grupo de 2 y 8 d tenían una media significativamente mayor ($p < 0.05$) a la del grupo de 56 d, 1.855 ± 0.175 , 1.783 ± 0.0661 y 1.667 ± 0.0554 respectivamente.

Por otra parte, el IGS no mostró diferencias significativas entre los grupos de organismos tratados con BaP, lo que sí se puede apreciar es que entre los grupos control de 2 y 56 d hay un incremento significativo de este índice (0.583 ± 0.328 y 1.329 ± 0.625 , respectivamente), tendencia que no se observó en los organismos tratados con BaP (Figura 6).

2. RESULTADOS HISTOLÓGICOS

2.1. Fases reproductivas

En todas las gónadas analizadas tanto en organismos controles como tratados se observaron todos los estadios de la espermatogénesis, es decir que espermatogonias, espermatocitos, espermatidas y espermatozoides estuvieron presentes en las gónadas (Tabla 5).

Mientras que los resultados del análisis del epitelio germinal (GE) muestra que el 14.7% del total de los organismos presentaron en sus gónadas la subfase de GE “discontinua temprana”, el 61.8% se encontraron en “discontinua media” y el 23.5% en “discontinua tardía” (Tabla 6).

El porcentaje por tratamiento de las subfases del GE puede ser observado en la Tabla 5. A pesar de que la subfase de GE “discontinua media” fue predominante a los 0 y 2 d, a partir de los 26 d la fase “discontinua tardía” comienza a presentarse con mayor frecuencia (25%), siendo el 44.4% las gónadas que presentaron esta condición a los 56 d (control y tratados con BaP), en los controles el 33% y en los tratados con BaP el 50% de las gónadas presentaron esta subfase del GE (figura 7b).

Tabla 5. Fases reproductivas de las tilapias macho control y tratados con BaP (3 mg/kg). En la tabla se presentan los datos de los estadios observados para la espermatogénesis, la subfase del epitelio germinal (GE) y la fase reproductiva de la tilapia.

Grupos	Control				Tratados			
Tiempo (d)	Muestra	Estadios	Subfase GE	Fase de Reproducción	Muestra	Estadios	Subfase GE	Fase de Reproducción
0	1	Todos	DM	APD	ND	ND	ND	ND
	2	Todos	DM	APD	ND	ND	ND	ND
2	1	Todos	DM	APD	1	Todos	DM	APD
	2	Todos	DM	APD	2	Todos	DM	APD
	3	Todos	DTe	APD	3	Todos	DM	APD
	4	Todos	DTa	APD	4	Todos	DM	APD
	5	Todos	DM	APD	5	Todos	DM	APD
	6	Todos	DM	APD	ND	ND	ND	ND
26	1	Todos	DTa	Regresión	1	Todos	DTe	APD
	2	Todos	DM	APD	2	Todos	DM	APD
	3	Todos	DM	APD	3	Todos	DM	APD
	4	Todos	DM	APD	4	Todos	DM	APD
	5	Todos	DM	APD	5	Todos	DTa	APD
	6	Todos	DTa	APD	6	Todos	DM	APD
56	1	Todos	DTa	Regresión	1	Todos	DTa	APD
	2	Todos	DM	APD	2	Todos	DTa	APD
	3	Todos	DM	APD	3	Todos	DTe	APD
	ND	ND	ND	ND	4	Todos	DTa	APD
	ND	ND	ND	ND	5	Todos	DM	APD
	ND	ND	ND	ND	6	Todos	DM	APD

***Todos:** Espermatogonia (Sg), espermatocono I y II (Sc1 y Sc2), espermátidas (St) y espermatozoides (Sz).

***Subfase GE:** DTe (Discontinuo-Temprano), DM (Discontinuo-Medio) y DTa (Discontinuo-Tardío).

***Fase de Reproducción:** APD (Apto Para Desove).

***ND**=Dato no disponible

Tabla 6. Porcentajes de las subfases del epitelio germinal (GE) halladas por tratamiento con BaP (3 mg/kg) en las gónadas.

Tiempo (d)	Tratamiento	DTe	DM	DTa
0	Control	100	0	0
2	Control	17	67	17
	BaP	0	100	0
26	Control	0	67	33
	BaP	17	67	17
56	Control	0	67	33
	BaP	17	33	50

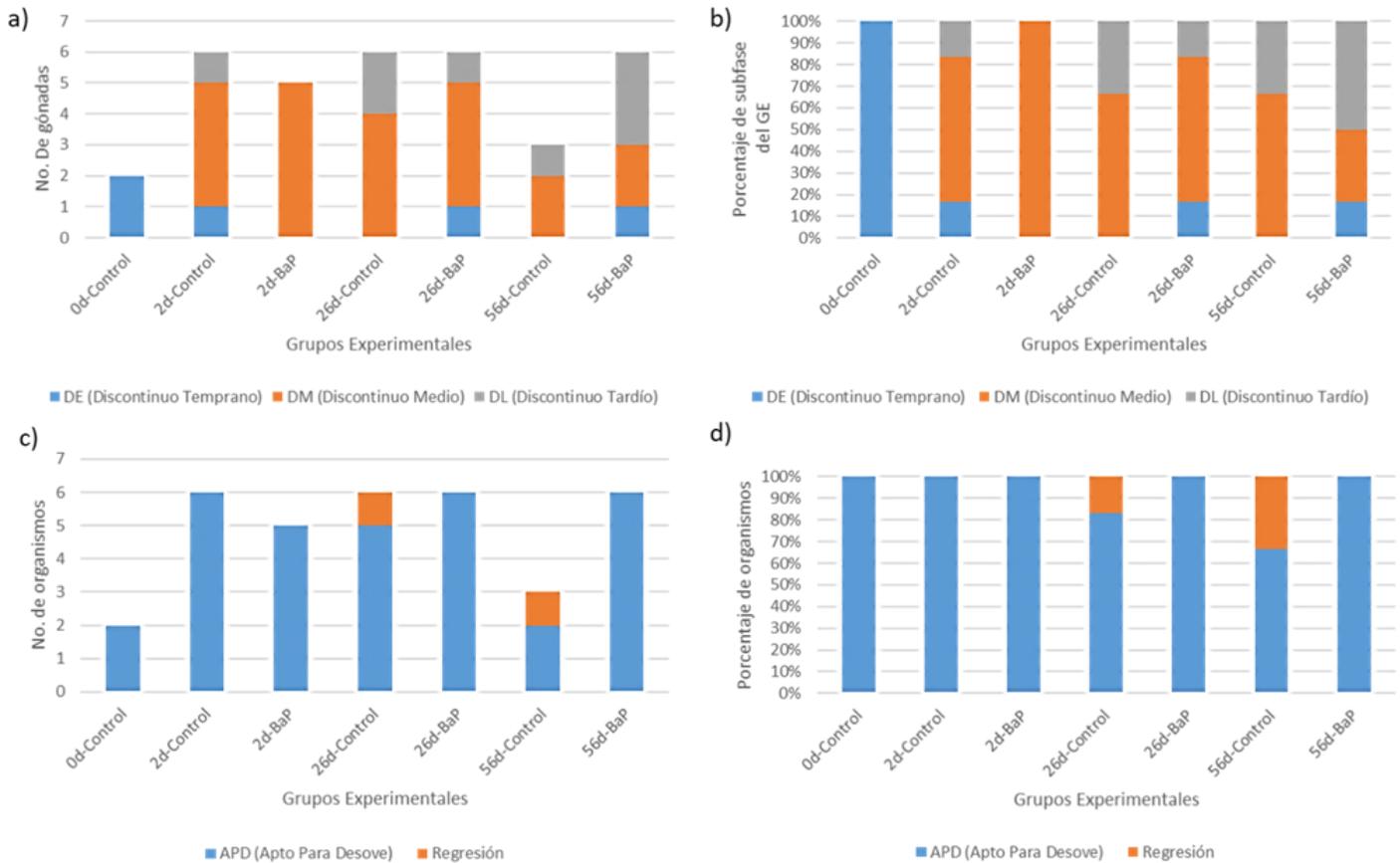


Figura 7. Gráficos de barras de la sub fase del epitelio germinal (GE) en las gónadas y de la fase reproductiva de las tilapias. Las barras representan la frecuencia y el porcentaje, respectivamente, de la subfase de GE en las gónadas (a-b). Las barras representan la frecuencia y el porcentaje, respectivamente, de la fase de reproducción de las tilapias

En cuanto a la fase de reproducción con mayor porcentaje (94.11%) fue la de organismo “apto para desovar”, únicamente dos organismos se encontraban en fase de “regresión” (Figura 7c-d).

2.2. Cambios histológicos

Los daños histológicos en el hígado y las gónadas de cada tilapia tanto control como tratadas con BaP (3mg/kg) durante 2 , 26 y 56 d, se muestran en la tabla 7. En el hígado la extensión de la necrosis fue focal en el 100% de los organismos tratados con el BaP (3mg/kg) durante 2 y 26 d. Pero a los 56 d la necrosis fue extendida en hígado del grupo tratado con BaP. Aun así, puede verse que más del 50% de los organismos de los grupos control también presentaron este daño focal en el hígado. Los centros melanomacrófagos (CMM) fueron identificados únicamente a los 2 , 26 y 56 d en los organismos tratados con BaP (3mg/kg), así como también los pleomorfismos con una prevalencia mayor al 80% (Tabla 7).

La presencia de la degeneración grasa y los centros de melanomacrófagos (CMM) fue focal en igual o mayor al 80% de los organismos en ambos grupos, controles y tratados con BaP, en todos los tiempos de exposición. La hipertrofia también presentó una extensión media focal en casi todos los grupos controles y tratados, con excepción del grupo control de 2 d de exposición en donde la media de la extensión fue 1 (sin lesiones). Únicamente a los 56 d se halló fibrosis focal y necrosis extendida en el hígado de la tilapia expuesta a BaP, mientras que en los demás grupos controles y tratados con BaP de 2 y 26 d la fibrosis no se presentó en el hígado y la extensión de la necrosis fue de grado 2 (focal). En el hígado de

todos los grupos tratados con BaP fueron observados pleomorfismos focales mientras que en los de los controles no fueron observados estos cambios (Tabla 7).

Por otra parte, la extensión de la necrosis en las gónadas fue de focal a extendida en más del 60% de los organismos tratados con BaP a los 2, 26 y 56 d, mientras que en los controles solo a los 2 d se observó su presencia focal en tan solo el 17% de los individuos (Figura 8). Los pleomorfismos, atrofas, edemas, granulomas y degeneración celular solo fueron vistos en las gónadas de los grupos de tilapias tratadas con BaP. La presencia focal de neoplasias solo fue observada a los 26 y 56 d en gónadas de algunos organismos tratados con BaP (3 mg/kg). Mientras que, parásitos y fibrosis, aunque también se presentaron con extensión focal únicamente lo hicieron a los 56 d en gónadas de tilapias tratadas con BaP.

La media de la extensión de los daños histológicos (EDH) en el hígado en los organismos expuestos a BaP fueron significativamente mayores a los 2 y 26 d con respecto a los controles de su respectivo tiempo de colecta ($p < 0.05$). Pero a los 56 d no observamos diferencias significativas entre organismos controles y tratados.

Tampoco hubo diferencia significativa de la EDH cuando fue comparada con respecto al tiempo. Mientras que en las gónadas la EDH fue significativamente mayor en los organismos tratados con BaP en todos los tiempos de exposición en comparación con los controles ($p \leq 0.05$). Y también se observó que la EDH fue incrementando significativamente con el paso del tiempo entre los grupos de organismos tratados con BaP. Los valores medios y la desviación estándar (SD) del EDH e IDH se presentan en la tabla 8.

Tabla 7. Daños histológicos identificados en el hígado y la gónada de los grupos de las tilapias controles y expuestas a BaP (3 mg/kg) durante 2, 26 y 56 d. En la tabla se pueden observar la extensión del daño (EDH), el grado del cambio en el tejido (GCT) y la prevalencia del daño en porcentaje. Las letras en negritas denotan las lesiones severas y los cambios histológicos irreversibles.

TIEMPO		2 días				26 días				56 días			
DAÑOS	GCT	Control		BaP		Control		BaP		Control		BaP	
		EDH	PREV (%)	EDH	PREV (%)	EDH	PREV (%)	EDH	PREV (%)	EDH	PREV (%)	EDH	PREV (%)
Hipertrofia	II	2	33	2	80	2	67	2	50	2	100	2	67
Degeneración celular	II	2	100	2	80	2	100	2	83	2	100	2	83
Necrosis	III	2	67	2	100	2	50	2	100	2	100	3	100
Inflamación	I	2	33	2	20	2	50	2	67	1	0	2	83
Fibrosis	II	2	17	2	20	2	17	2	33	1	0	2	33
Dilatación sinusoidal	I	2	33	2	80	2	50	2	50	2	50	2	33
CMM	I	2	83	2	100	2	83	2	100	2	100	2	83
Granulomas	II	1	0	1	0	2	17	2	50	1	0	2	17
Pleomorfismo	II	1	0	2	80	1	0	2	100	1	0	2	83
Hemorragias	II	1	0	2	40	1	0	2	17	2	50	1	0
GÓNADAS													
Hiperplasia	II	1	0	2	80	1	0	2	100	1	0	2	100
Necrosis	III	2	17	2	60	1	0	3	100	1	0	3	100
Apoptosis	I	1	0	1	0	2	33	2	33	1	0	2	50
Pleomorfismo	I	1	0	2	20	1	0	2	50	1	0	2	100
Atrofia	II	1	0	2	60	1	0	2	83	1	0	2	67
CMM	I	2	33	2	100	1	0	2	100	2	33	2	83
Edema	II	1	0	2	60	1	0	2	100	1	0	2	100
Granulomas	II	1	0	2	60	1	0	2	50	1	0	2	83
Degeneración celular	II	1	0	2	60	1	0	2	100	1	0	2	100
Neoplasia	III	1	0	1	0	1	0	2	33	1	0	2	33
Desintegración estructural	I	1	0	1	0	1	0	2	67	1	0	3	100
Parásitos	I	1	0	1	0	1	0	1	0	1	0	2	33
Fibrosis	II	1	0	1	0	1	0	1	0	1	0	2	83

Los valores de prevalencia de cada lesión corresponden a n= número total de peces evaluados por grupo (control o tratado). CMM: centros melanomacrófagos.

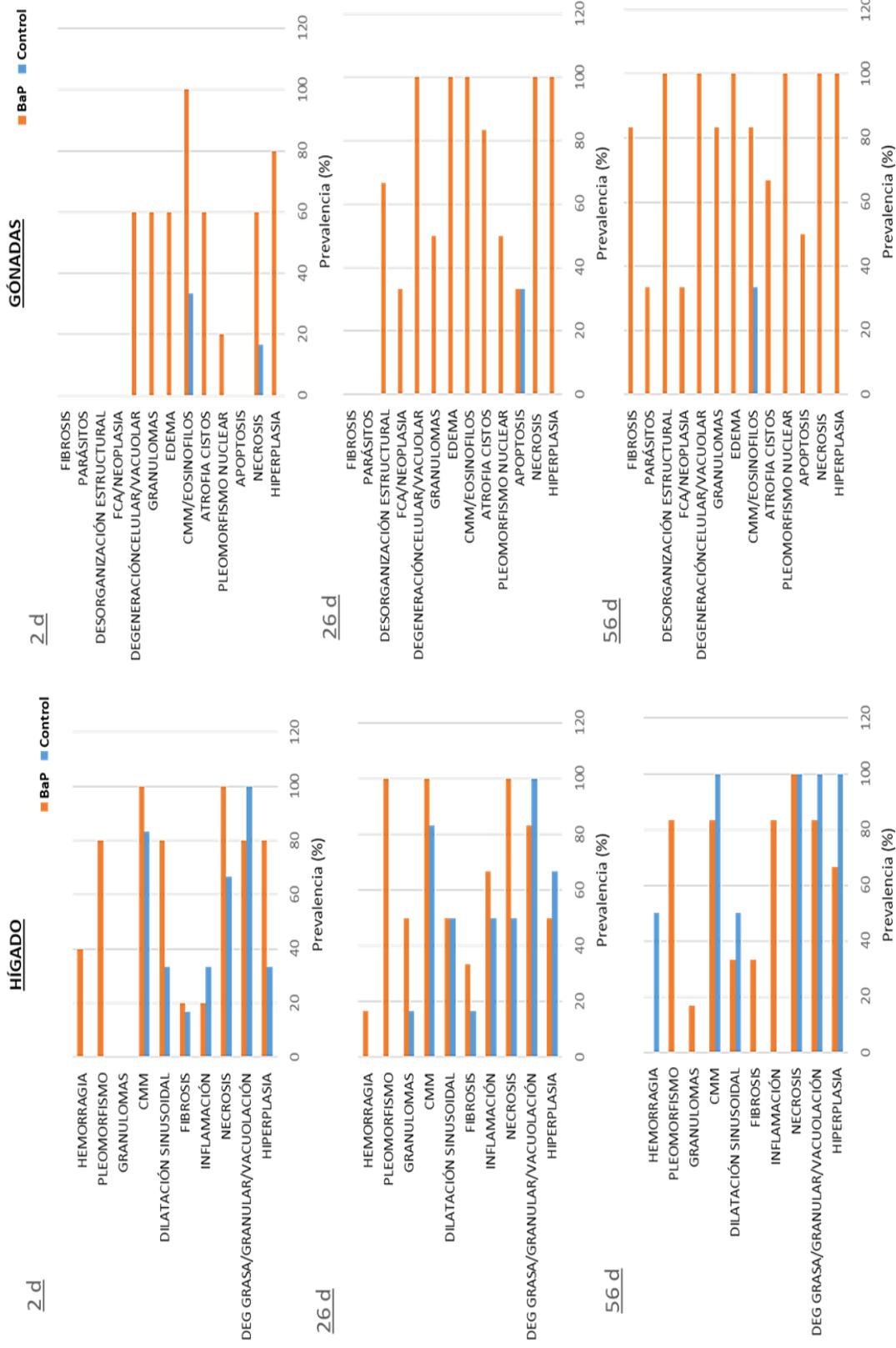


Figura. 8. Gráficas de prevalencia de las lesiones histológicas en el hígado y las gónadas. Las gráficas representan la prevalencia de la lesión en porcentaje en el hígado de los grupos de tilapias control y tratadas con BaP (3 mg/kg) durante 2, 26 y 56 d. En las tres gráficas del lado derecho pertenecen al hígado y las del lado izquierdo a las de las gónadas. En ellas se pueden ver la representación del porcentaje de la prevalencia de cada daño en organismos controles y grupos tratados con BaP. Cada color representa un tratamiento (Control o BaP).

Tabla 8. Valores medios de la extensión del daño histológico (EDH) e índice histológico (IDH) en el hígado y gónadas de las tilapias.

		EDH	IDH		N
HÍGADO		MEDIA ± SD	MEDIA ± SD	MIN-MAX	
2 d	Controles	1.4 ± 0.17	12.67 ± 9.2	feb-23	6
	Tratados	1.68 ± 0.15*	22.2 ± 4.71	14 - 26	5
26 d	Controles	1.47 ± 0.19	11.83 ± 7.81	mar-25	6
	Tratados	1.75 ± 0.14*	51.5 ± 49.27	15 - 116	6
56 d	Controles	1.5 ± 0	14 ± 0	14 - 14	2
	Tratados	1.7 ± 0.26	65.83 ± 56.9	12 - 124	6
GÓNADAS		MEDIA ± SD	MEDIA ± SD	MIN-MAX	N
2 d	Controles	1.05 ± 0.09 ^a	17 ± 41.15 ^a	0 - 101	6
	Tratados	1.4 ± 0.17^b	12.2 ± 5.89 ^a	feb-17	5
26 d	Controles	1.03 ± 0.04 ^a	0.33 ± 0.52 ^b	0 - 1	6
	Tratados	1.74 ± 0.11^c	04.17 ± 78.24	17 - 225	6
56 d	Controles	1.03 ± 0.04 ^a	0.33 ± 0.58 ^b	0 - 1	3
	Tratados	2.01 ± 0.13^d	37.83 ± 76.39	29 - 228	6

Los “*” denotan diferencias significativas en los grupos comparados con su respectivo grupo control y las letras diferentes muestran diferencias significativas entre grupos. La N= número de tejidos evaluados.

Por otra parte, el índice de daño histopatológico (IDH) no fue diferente en el hígado de organismos tratados con BaP con respecto los controles y al tiempo. Pero en la gónada de los organismos tratados con BaP (3 mg/kg) el EDH fue significativamente diferente con respecto a los controles tanto a los 26 y 56 d de exposición ($p < 0.05$) (Tabla 8; Figura 9).

En la figura 10, puede observarse del lado izquierdo (a) una sección de la gónada de una tilapia control que mostró estructuras normales y en donde pueden ser apreciados cistos con diferentes estadios de la espermatogénesis. Mientras que en la figura 10b se observan cambios en las células de Sertoli de un organismo expuesto durante 56 d a

BaP, además de la desorganización estructural. Mientras que en la figura 11, se puede observar en la figura de la izquierda (a) una sección del hígado de un organismo control con degeneración grasa y a la derecha (b) una sección que muestra el hepatopáncreas y fibrosis en un organismo tratado con BaP (3 mg/kg) del tiempo de exposición de 56 d.

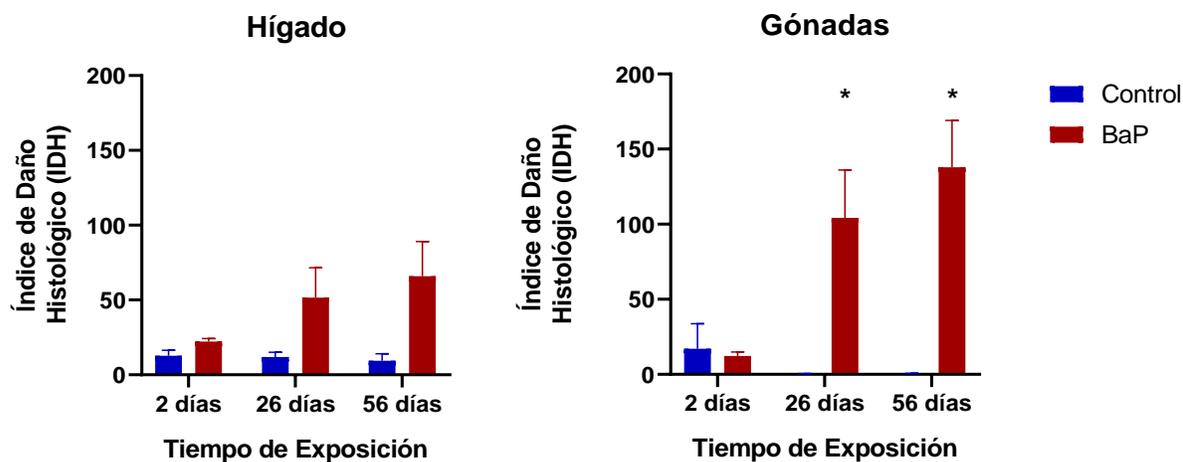


Figura. 9. Índice de daño histológico (IDH) en hígado y gónadas de la tilapia. En las gráficas de barras se representa la media \pm SEM del IDH por grupo. *Diferencias estadísticamente significativas entre controles y tratados del mismo tiempo de exposición.

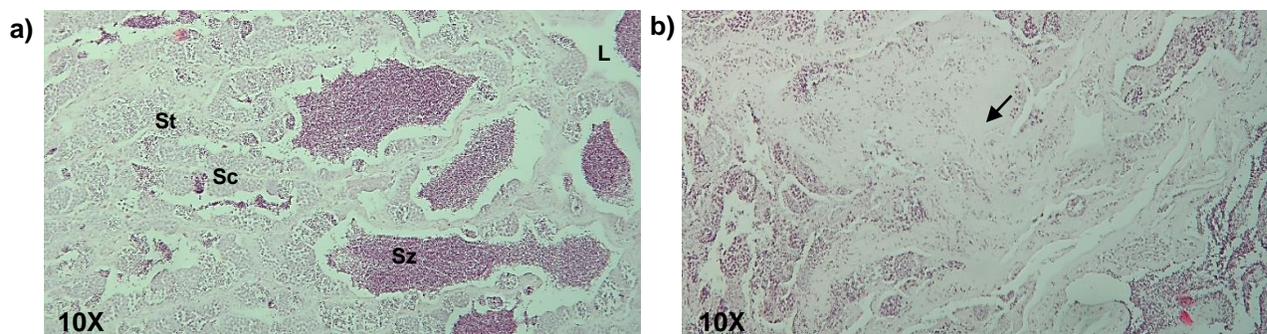


Figura. 10. Corte trasversal de gónadas de tilapia. a) Gónada de organismo sano en él se pueden ver los cistos (C) que contiene a los espermatocitos (Sc) y espermatídes (St). En el lumen (L) pueden verse los espermatozoides (Sz); b) Gónada de organismo tratado con BaP. La flecha negra señala la hiperplasia de las células de Sertoli.

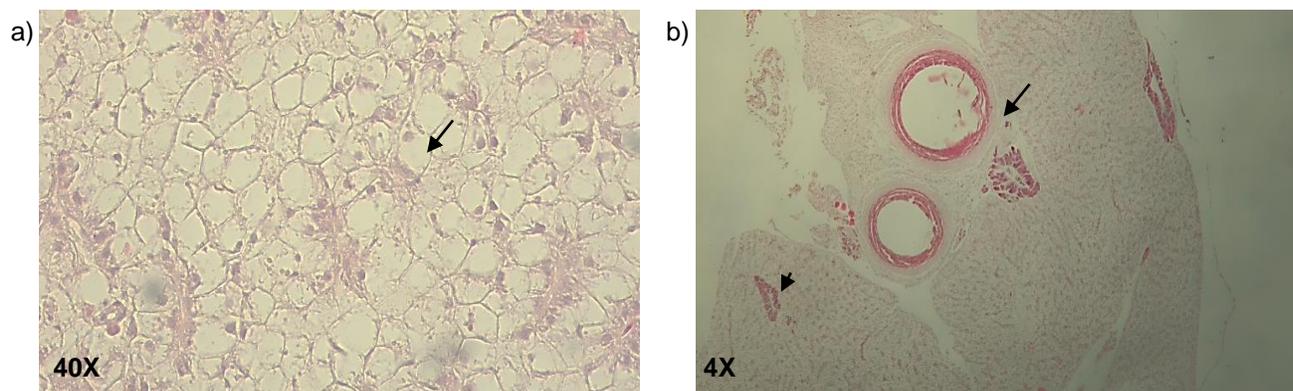


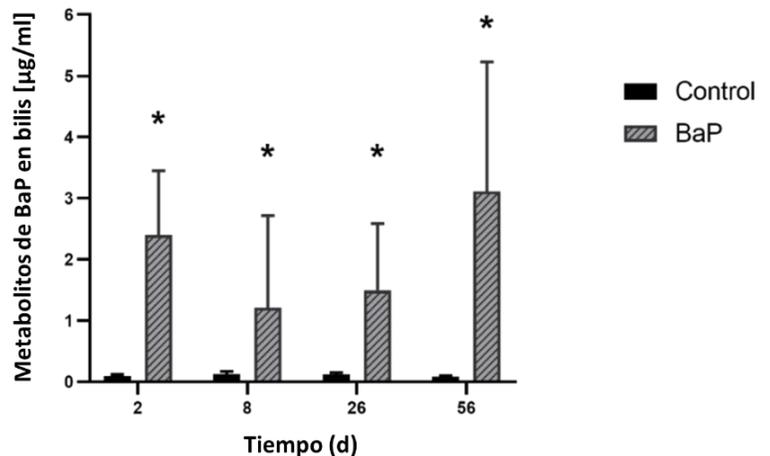
Figura 11. Hígado de tilapia tratada con BaP. a) En la imagen se pueden observar una sección del hígado con hepatocitos con degeneración grasa (flecha), los núcleos se encuentran desplazados en la periferia celular; b) Foco del hígado en donde se puede observar la hepatopáncreas (punta de flecha) y fibrosis (flecha).

3. RESULTADOS DE METABOLITOS

3.1. Metabolitos aromáticos fluorescentes en la bilis

El análisis de espectrometría de fluorescencia de la bilis que se llevó a cabo fue con la finalidad de conocer sobre la capacidad metabólica de la tilapia en este experimento, y demostró que en todos los grupos de organismos expuestos a BaP durante 2, 8, 26 y 56 d la concentración de metabolitos fue significativamente mayor en comparación con los organismos control ($p < 0.05$) (Figura 12). Los valores medios de concentración obtenidos fueron los siguientes: 2,4 $\mu\text{g/ml}$ a los 2 d; 1,2 $\mu\text{g/ml}$ a los 8 d; y 3.1 $\mu\text{g/ml}$, el promedio más alto, a los 56 d (Albornoz-Abud *et al.*, 2021; Collí-Dulá *et al.*, 2018).

Figura. 12. Concentración de metabolitos biliares de BaP, las barras indican la media \pm SEM de la concentración de BaP en la bilis. Los “*” indican diferencias significativas entre los grupos control y tratado de cada tiempo de exposición ($p \leq 0,05$). El tamaño de muestra fue de $n = 3-6$



3.2. Perfil de metabolitos del hígado y las gónadas de la tilapia

Con el objetivo de explorar el impacto del BaP en el perfil de metabolitos a través del tiempo se llevó a cabo el análisis diferencial en el hígado de las tilapias expuestas durante 2, 26 y 56 d. Debido a la limitación del material biológico de las gónadas el análisis diferencial para este tejido solo fue llevado a cabo con muestras del tiempo de 56 d. Al realizar el análisis de componentes principales (PCA) y el análisis discriminante de mínimos cuadrados parciales (PLS-DA) demostraron que el mayor porcentaje de la variación (45%) de la concentración de los metabolitos se debe al órgano (Figura 13).

El análisis de PLS-DA mostró que la hipoxantina, la adenina y el lactato fueron los tres principales metabolitos que se encontraron en ambos órganos que contribuyeron a hacer esta diferenciación. Mientras que en las gónadas la niacinamida, el nicotinurato y la colina fueron los únicos tres metabolitos que no se detectaron, a diferencia del hígado la betaína si fue observada en las gónadas tanto en controles como en tratados (Figura 14).

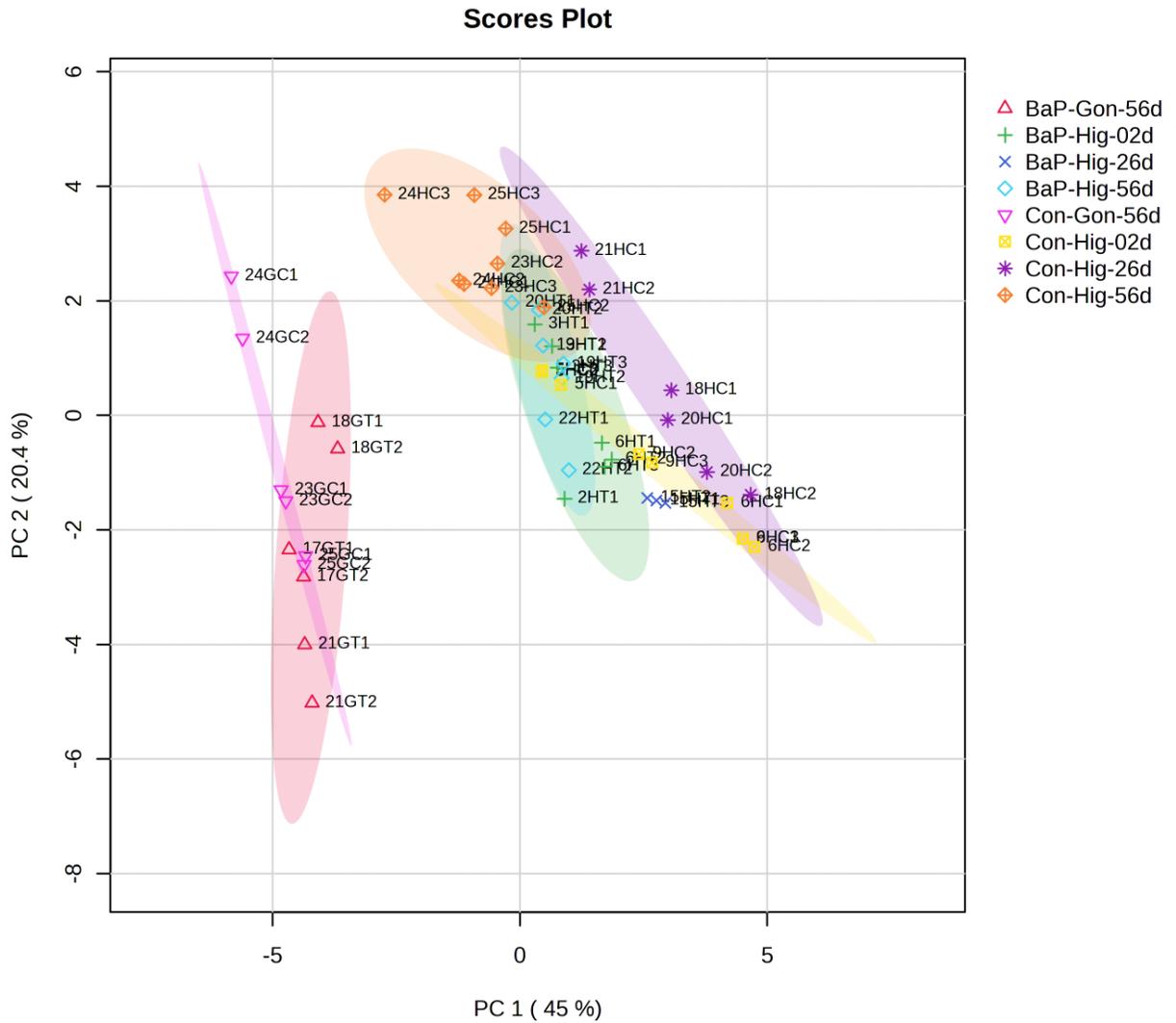


Figura. 13. Análisis de PCA del hígado y gónada de tilapia control y tratada con BaP. En la gráfica a la izquierda del primer componente se puede observar las elipses en color rosa y fucsia las muestras que pertenecen a las gónadas de 56 d (triángulos), mientras que las demás elipses (verde, amarillo, morado, azul y naranja) pertenecen a las muestras de hígado.

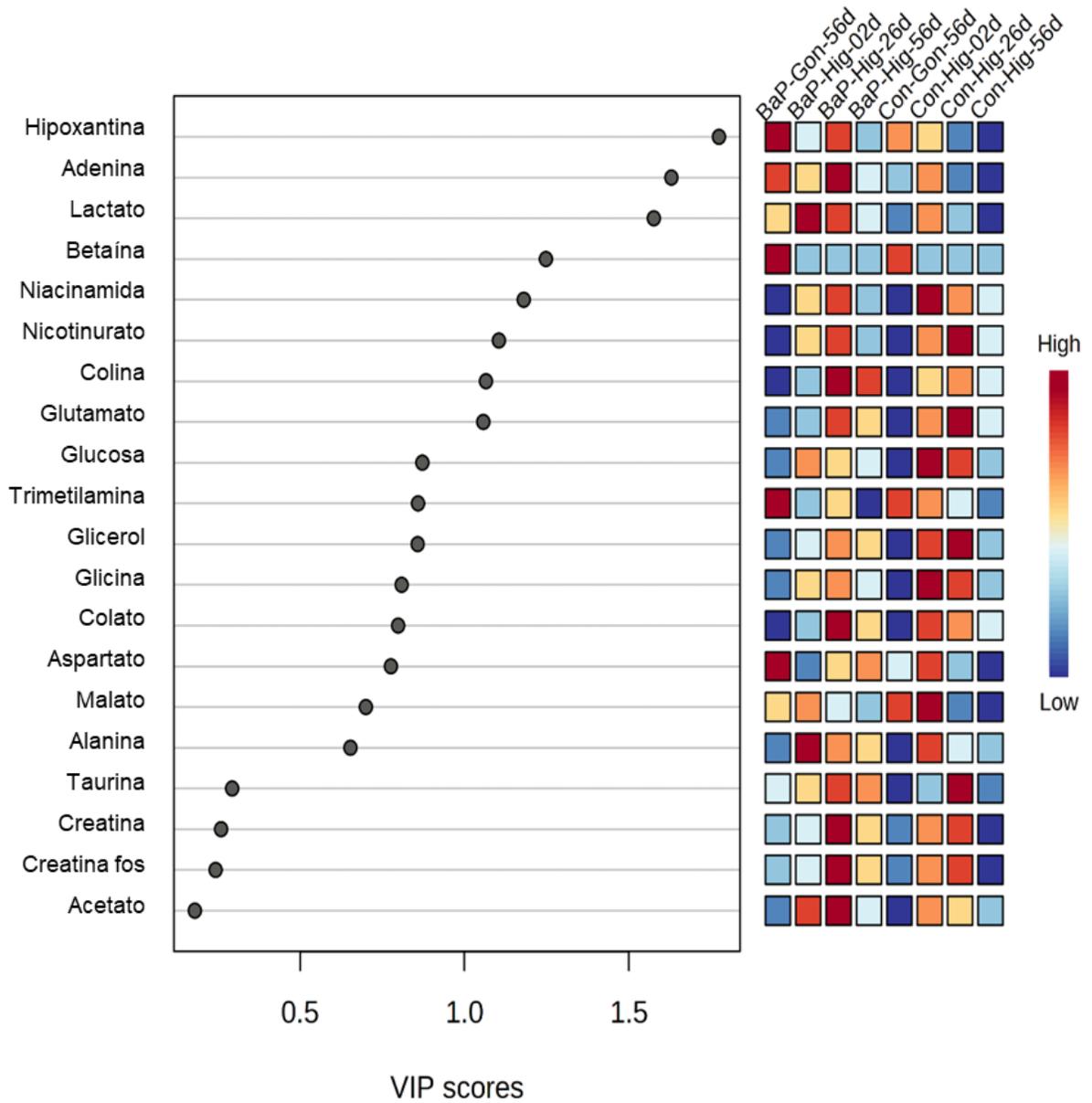


Figura. 14. Imagen que representa la importancia de la variable en la proyección (VIP) del hígado y las gónadas. En esta figura se representan de arriba hacia abajo los metabolitos de más a menos importancia y en el eje x se pueden observar la puntuación VIP. Los recuadros coloreados a la derecha indican las concentraciones relativas del metabolito correspondiente en cada grupo de estudio.

3.2.1. Análisis diferencial de metabolitos y de rutas afectadas en el hígado de la tilapia

En el análisis comparativo en el hígado de las tilapias tratadas y control se detectaron 19 metabolitos, de los cuales siete fueron aminoácidos esenciales (taurina) y no esenciales (alanina, aspartato, creatina, creatina fosfato, glutamato y glicina), compuestos que participan en la síntesis de energía (acetato, glucosa, glicerol, lactato y malato), también, se identificó a la purina hipoxantina y la base nitrogenada adenina, formas vitamínicas (niacinamida y su metabolito nicotinurato) también fueron identificadas, así como también un metabolito de la síntesis de ácidos biliares (ácido cólico) y el nutriente esencial colina y el metabolito *N*-óxido de trimetilamina (TMAO por sus siglas en ingles).

A través del análisis de componentes principales, de correlaciones y de distancias Euclidianas se demostró que había variación alta en la concentración de metabolitos entre organismos dentro del mismo grupo de tratamiento (Figura 15 y Anexo 2). Pero en el análisis de PCA se pudo apreciar que las muestras se agruparon por tiempo de exposición.

No obstante, se realizaron las comparaciones entre los grupos control y tratado con BaP por cada tiempo de exposición (Tabla 9). A los 2 d de exposición únicamente 8 metabolitos fueron significativamente diferentes entre el grupo control y tratado con BaP. Mientras que 7 metabolitos (colina, niacinamida, glutamato, aspartato, glicerol, glucosa y *N*-óxido de trimetilamina) disminuyeron su concentración significativamente en el hígado de los organismos tratados con BaP ($p.adjust < 0.05$), el lactato incrementó significativamente 2.49 veces con respecto al grupo control (Figura 16).

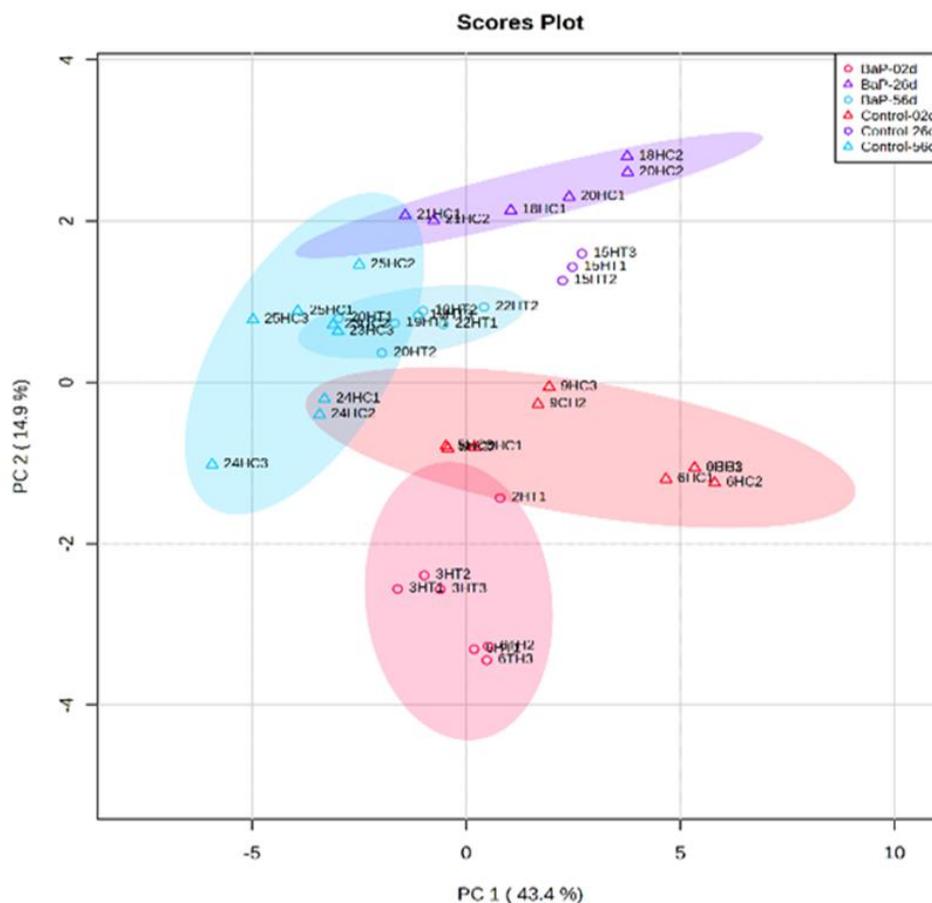


Figura. 15. Análisis de PCA del hígado de tilapia control y tratada con BaP. En la gráfica se puede observar en color rosa a los organismos que pertenecen al tiempo de exposición de 2 d, en morado a los organismos de 26 d y en azul a los organismos del tiempo de 56 d. Los triángulos representan a los organismos control y los círculos a los tratados con BaP.

En cuanto a las correlaciones entre los metabolitos afectados significativamente, se pudo observar la relación fuerte y positiva entre los aminoácidos glutamato y aspartato ($0.91, p < 8.11E^{-07}$) y el glicerol y glucosa ($0.95, p < 8.17 E^{-09}$) (Anexo 3). Por otra parte, a los 26 d de exposición solo 6 metabolitos fueron significativamente afectados en el hígado de la tilapia expuesta a BaP (Figura 17), el aminoácido glicina y la base nitrogenada adenina, otros tres metabolitos involucrados con el metabolismo de energía (lactato, glicerol y acetato) y la purina hipoxantina. La adenina y la hipoxantina tuvieron

una correlación alta positiva significativa ($0.96, p < 1.98E^{-05}$), también la glicina y el glicerol ($0.87, p < 0.002$) y el lactato y acetato ($0.85, p < 0.003$).

Tabla 9. Metabolitos afectados significativamente en el hígado de la tilapia expuesta a BaP por 2, 26 y 56 d.

Tiempo	Metabolitos	FC	p.value	FDR
2d	Colina	0.76	3.87E-04	3.70E-03
	Niacinamida	0.72	3.89E-04	3.70E-03
	Glutamato	0.72	1.38E-03	8.73E-03
	Aspartato	0.63	2.30E-03	8.95E-03
	Glicerol	0.59	2.35E-03	8.95E-03
	Glucosa	0.58	4.81E-03	1.52E-02
	Lactato	2.49	6.12E-03	1.66E-02
	N-oxido de Trimetilamina	0.72	9.86E-03	2.34E-02
26 d	Glicina	0.59	1.19E-03	2.26E-02
	Hipoxantina	1.55	6.96E-03	6.61E-02
	Adenina	1.53	1.17E-02	7.41E-02
	Lactato	1.58	2.47E-02	1.17E-01
	Glicerol	0.74	3.84E-02	1.45E-01
	Acetato	1.41	4.59E-02	1.45E-01
56 d	Malato	1.55	3.27E-06	6.22E-05
	Lactato	1.64	4.03E-05	3.83E-04
	Acetato	1.7	6.11E-05	3.87E-04
	Glucosa	1.48	1.42E-04	6.76E-04
	Glicerol	1.54	4.68E-04	1.78E-03
	Glicina	1.37	2.28E-03	7.24E-03
	Aspartato	1.69	6.21E-03	1.69E-02
	Adenina	1.41	1.12E-02	2.54E-02
	Colina	1.48	1.20E-02	2.54E-02

Mientras que a los 56 d la concentración de 9 metabolitos fue significativamente alterada (Figura 18). En este tiempo 5 metabolitos pertenecientes al metabolismo de energía (malato, lactato, acetato, glucosa y glicerol), aminoácidos (glicina y aspartato) y la adenina y colina incrementaron significativamente en los organismos tratados con BaP en comparación con su respectivo grupo control.

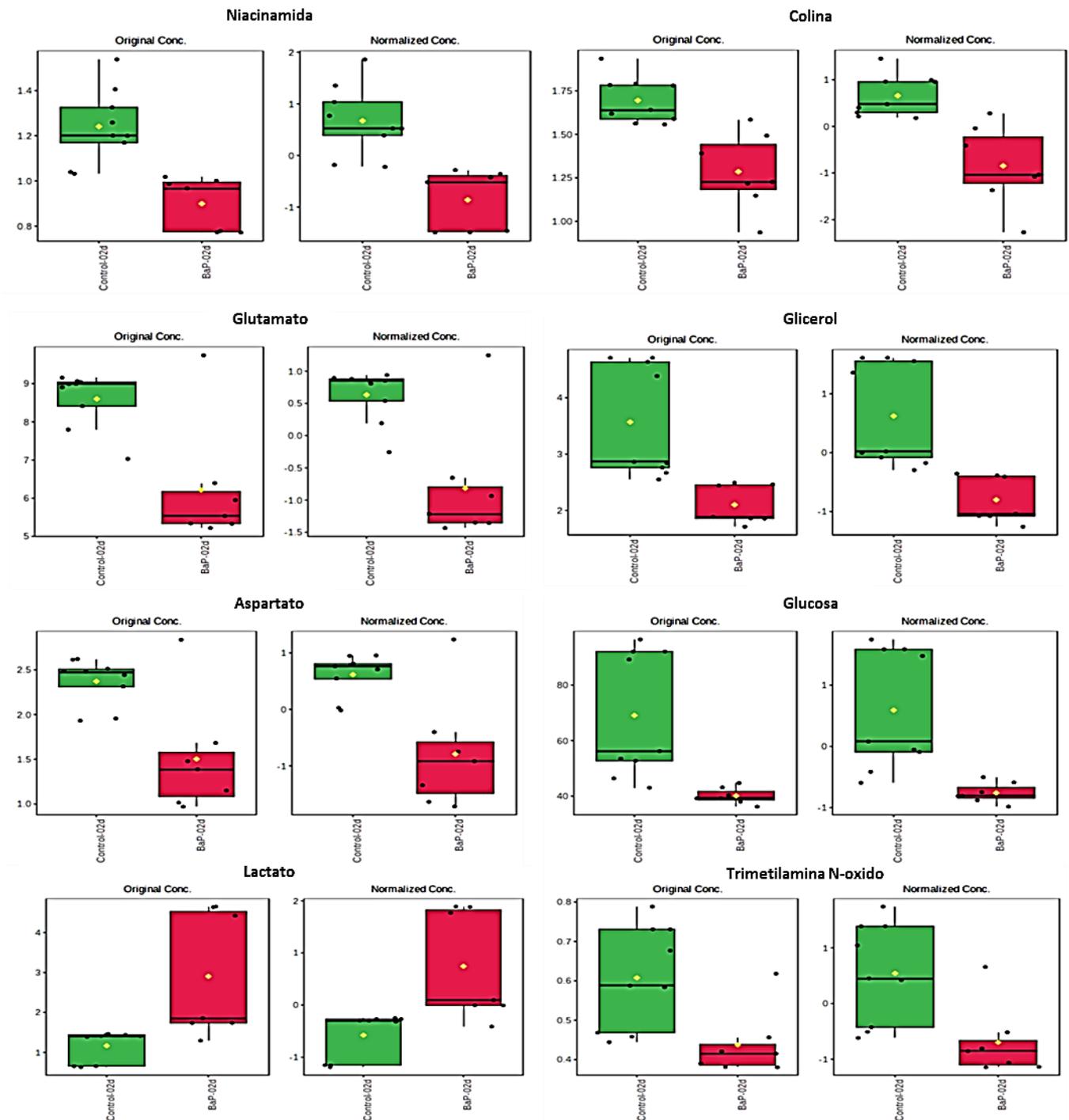


Figura. 16. Gráficos de cajas con bigotes de las veces de cambio de la concentración de metabolitos afectados significativamente en el hígado de la tilapia expuesta durante 2 d a BaP. En color verde está representado el grupo control y en rojo el tratado con BaP. Los gráficos de cada metabolito que se encuentran a la izquierda muestran los valores originales de las concentraciones de metabolito (media \pm SD) y en la derecha se representan los valores normalizados.

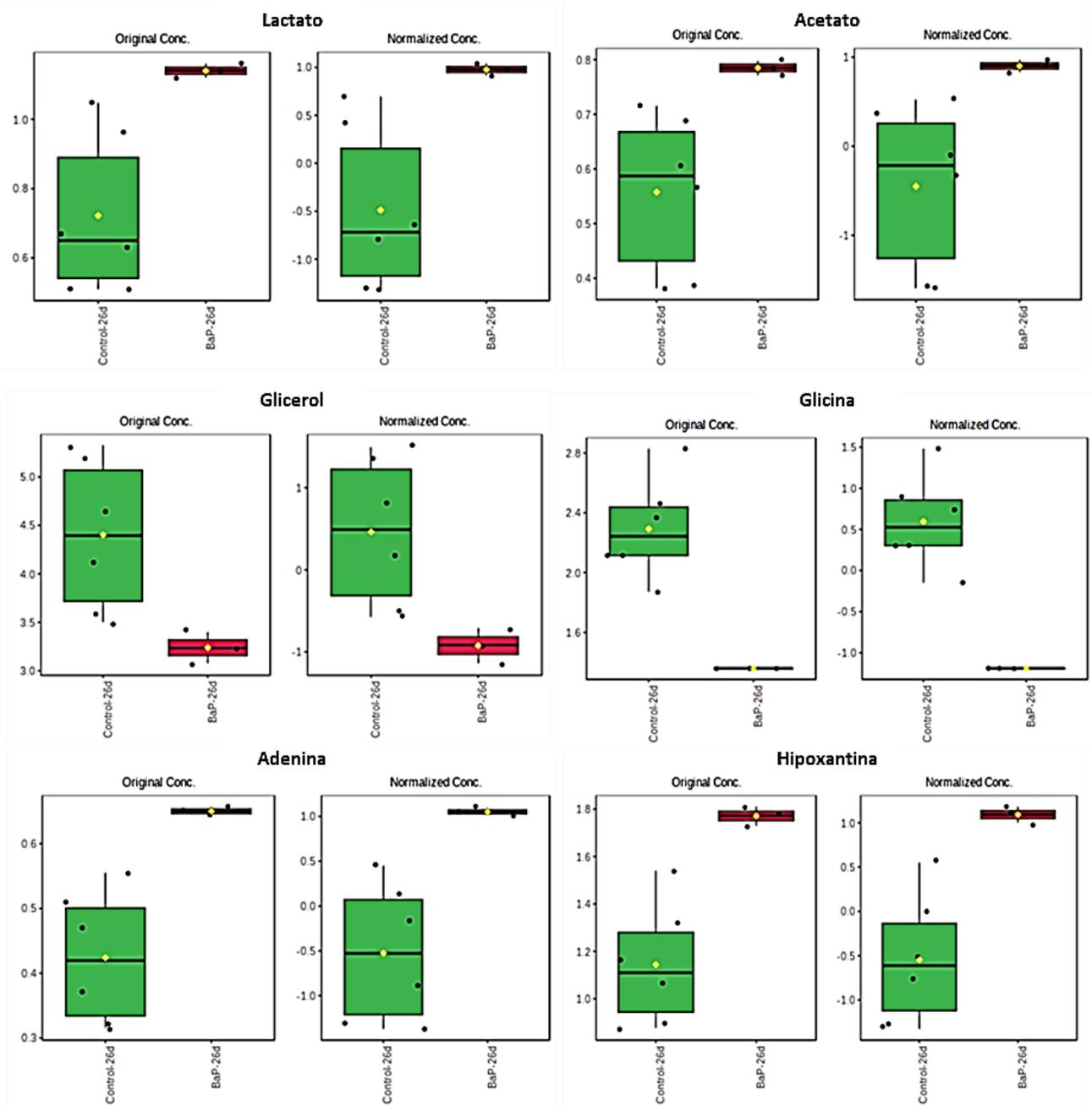


Figura. 17. Gráficos de cajas con bigotes de las veces de cambio de la concentración de metabolitos afectados significativamente en el hígado de la tilapia expuesta durante 26 d a BaP. En color verde está representado el grupo control y en rojo el tratado con BaP. Los gráficos de cada metabolito que se encuentran a la izquierda muestran los valores originales de las concentraciones de metabolito (media \pm SD) y en la derecha se representan los valores normalizados.

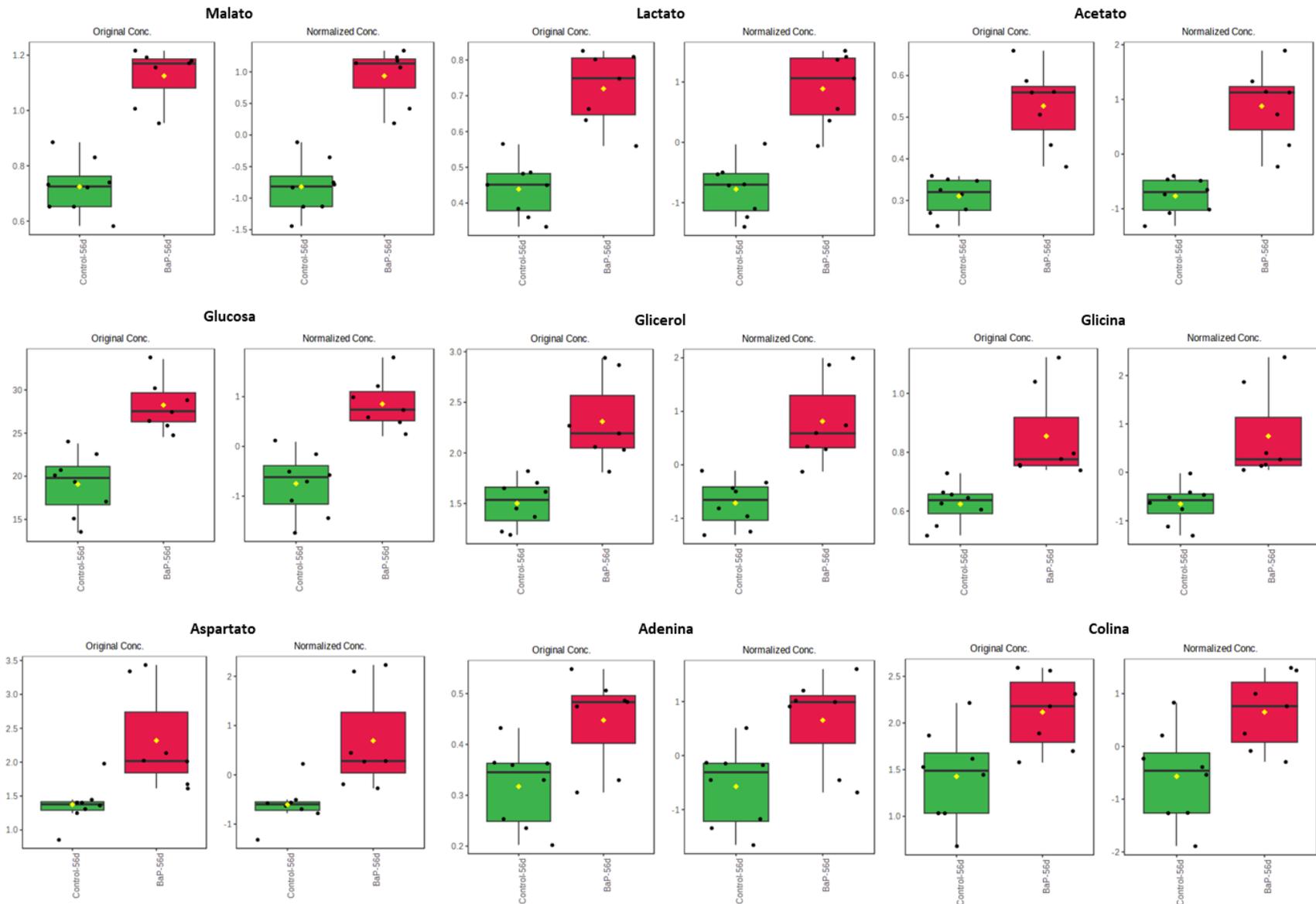


Figura. 18. Gráficos de cajas con bigotes de las veces de cambio de la concentración de metabolitos afectados significativamente en el hígado de la tilapia expuesta durante 56 d a BaP. En color verde está representado el grupo control y en rojo el tratado con BaP. Los gráficos de cada metabolito que se encuentran a la izquierda muestran los valores originales de las concentraciones de metabolito (media \pm SD) y en la derecha se representan los valores normalizados.

El análisis de varianza entre las muestras de los tres grupos de organismos tratados con BaP mostró que las concentraciones de la alanina, el nicotunurato, el TMO y el ácido cólico variaron significativamente en los tres grupos. El lactato y malato por otra parte disminuyeron significativamente a los 26 y 56 d de exposición a BaP en comparación con el grupo de 2 d de exposición. Mientras que la glucosa y el acetato también disminuyeron significativamente pero solo hasta los 56 d de exposición a BaP (Tabla 10 y Figura 19).

Tabla 10. Resultado del análisis de varianza del hígado entre los grupos de tilapias tratadas con BaP.

Metabolito	f.value	p.value	FDR	Fisher's LSD
Alanina	102.79	4.28E-09	8.14E-08	BaP-02d - BaP-26d; BaP-02d - BaP-56d; BaP-26d - BaP-56d
Glucosa	34.54	3.86E-06	3.67E-05	BaP-02d - BaP-56d; BaP-26d - BaP-56d
Nicotinurato	31.18	6.96E-06	4.41E-05	BaP-26d - BaP-02d; BaP-02d - BaP-56d; BaP-26d - BaP-56d
N-oxido de Trimetilamina	19.57	8.80E-05	3.39E-04	BaP-26d - BaP-02d; BaP-02d - BaP-56d; BaP-26d - BaP-56d
Colina	19.53	8.91E-05	3.39E-04	BaP-26d - BaP-02d; BaP-56d - BaP-02d
Taurina	18.48	1.18E-04	3.75E-04	BaP-26d - BaP-02d; BaP-26d - BaP-56d
Ácido cólico	16.72	1.95E-04	5.30E-04	BaP-26d - BaP-02d; BaP-56d - BaP-02d; BaP-26d - BaP-56d
Lactato	12.53	7.61E-04	1.61E-03	BaP-02d - BaP-26d; BaP-02d - BaP-56d
Glicina	12.52	7.63E-04	1.61E-03	BaP-02d - BaP-56d; BaP-26d - BaP-56d
Malato	9.56	2.41E-03	4.58E-03	BaP-02d - BaP-26d; BaP-02d - BaP-56d
Glicerol	9.22	2.79E-03	4.82E-03	BaP-26d - BaP-02d; BaP-26d - BaP-56d
Acetato	7.82	5.26E-03	8.32E-03	BaP-02d - BaP-56d; BaP-26d - BaP-56d
Glutamato	6.77	8.77E-03	1.28E-02	BaP-26d - BaP-02d; BaP-26d - BaP-56d
Adenina	5.53	1.70E-02	2.31E-02	BaP-26d - BaP-02d; BaP-26d - BaP-56d

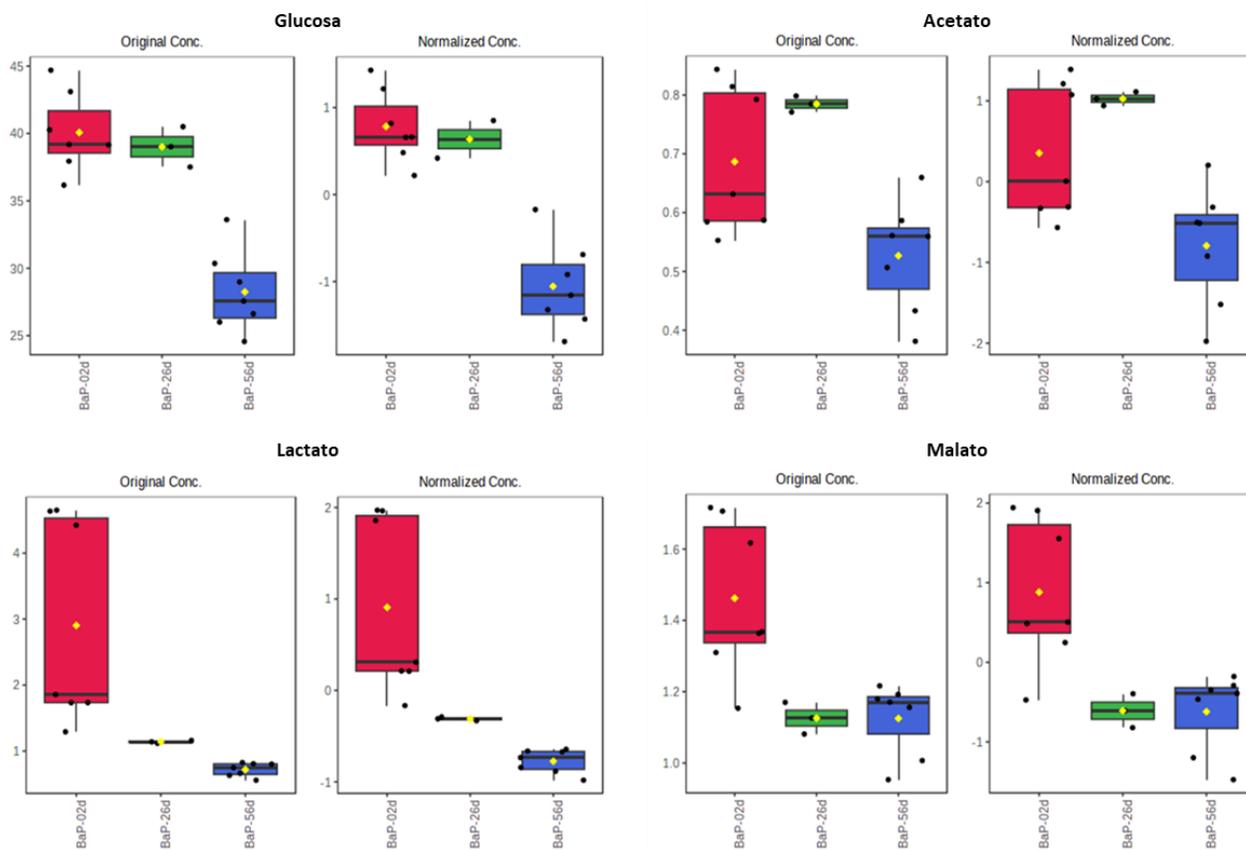


Figura. 19. Gráficos de cajas con bigotes de las veces de cambio de la concentración de metabolitos afectados significativamente en el hígado de la tilapia expuesta durante 2, 26 y 56 d a BaP. Cada color representa un grupo de muestras de hígado de tilapias tratadas con BaP. Los gráficos de cada metabolito que se encuentran a la izquierda muestran los valores originales de las concentraciones de metabolito (media \pm SD) y en la derecha se representan los valores normalizados.

También, se llevó a cabo el análisis de rutas con cada tiempo de exposición para conocer cuales vías fueron afectadas significativamente a los 2, 26 y 56 d de exposición. Las rutas afectadas fueron analizadas en Metaboanalyst con la base de datos de KEGG (Enciclopedia de Genes y Genomas de Kioto) de la especie *Danio rerio*.

En las tablas 11, 12 y 13 se puede ver las rutas metabólicas que fueron afectas en cada tiempo de exposición. Como se puede ver en las tablas observar las rutas afectadas significativamente fueron aquellas implicadas en el metabolismo de energía, el

metabolismo de carbohidratos, aminoácidos y lípidos, así como también el metabolismo de cofactores y vitaminas y también fueron afectadas vías relacionadas con el procesamiento de la información genética. A los dos días de exposición 23 rutas metabólicas fueron significativamente afectas (Tabla 11). Las principales vías afectadas fueron el metabolismo de nicotinamida y nicotinato, la biosíntesis de aminoacil-tRNA, el metabolismo de alanina, aspartato y glutamato ($p.adjust < 0.05$), esta última con 3 metabolitos que proporcionaron el impacto de 0.45 en la ruta.

A los 26 d solo 9 rutas fueron afectadas significativamente ($p < 0.05$), entre ellas las tres principales fueron la glicólisis/gluconeogénesis, la biosíntesis de aminoacil-RNAt y el metabolismo de glioxilato y dicarboxilato, cabe señalar que el valor de p ajustada (FDR) no fue significativo para ninguna ruta (Tabla 12). Mientras que a los 56 d de estas 23 rutas 13 si fueron alteradas significativamente ($p.adjust < 0.05$), entre ellas destacaron el metabolismo de glioxilato y dicarboxilato, el metabolismo de D-glutamina y D-Glutamato, el metabolismo de purina y el metabolismo del butanoato (Tabla 13). Las tablas se encuentran en la siguiente página.

Tabla 11. Rutas afectadas en el hígado de la tilapia por la exposición a BaP durante 2 d. En la tabla se puede ver el número de metabolitos que participan en la ruta (Hits), el valor de p y de p ajustada (FDR), así como también el impacto de los metabolitos afectados en la ruta basado en el análisis de topología de rutas.

	Total Cmpd	Hits	Raw p	$-\log_{10}(p)$	Holm adjust	FDR	Impact
Nicotinate and nicotinamide metabolism	14	2	5.78E-06	5.24E+00	1.39E-04	1.39E-04	0.22
Aminoacyl-tRNA biosynthesis	48	4	2.46E-04	3.61E+00	5.65E-03	2.21E-03	0.00
Alanine, aspartate and glutamate metabolism	27	3	3.67E-04	3.44E+00	8.07E-03	2.21E-03	0.45
Glycerophospholipid metabolism	38	1	4.69E-04	3.33E+00	9.85E-03	2.21E-03	0.03
Glutathione metabolism	28	2	7.73E-04	3.11E+00	1.55E-02	2.21E-03	0.11
Porphyrin and chlorophyll metabolism	30	2	7.73E-04	3.11E+00	1.55E-02	2.21E-03	0.00
Arginine biosynthesis	14	2	8.10E-04	3.09E+00	1.55E-02	2.21E-03	0.12
Histidine metabolism	15	2	8.10E-04	3.09E+00	1.55E-02	2.21E-03	0.00
D-Glutamine and D-glutamate metabolism	6	1	1.01E-03	2.99E+00	1.62E-02	2.21E-03	0.50
Butanoate metabolism	15	1	1.01E-03	2.99E+00	1.62E-02	2.21E-03	0.00
Nitrogen metabolism	6	1	1.01E-03	2.99E+00	1.62E-02	2.21E-03	0.00
Glycolysis / Gluconeogenesis	26	3	1.12E-03	2.95E+00	1.62E-02	2.23E-03	0.03
Glycerolipid metabolism	16	1	1.35E-03	2.87E+00	1.63E-02	2.32E-03	0.24
Galactose metabolism	27	1	1.35E-03	2.87E+00	1.63E-02	2.32E-03	0.00
beta-Alanine metabolism	18	1	1.67E-03	2.78E+00	1.67E-02	2.67E-03	0.00
Glycine, serine and threonine metabolism	33	3	7.35E-03	2.13E+00	6.62E-02	1.10E-02	0.27
Glyoxylate and dicarboxylate metabolism	32	4	1.33E-02	1.88E+00	1.06E-01	1.80E-02	0.11
Primary bile acid biosynthesis	38	1	1.35E-02	1.87E+00	1.06E-01	1.80E-02	0.00
Pyruvate metabolism	22	3	2.83E-02	1.55E+00	1.70E-01	3.58E-02	0.09
Arginine and proline metabolism	38	3	4.97E-02	1.30E+00	2.49E-01	5.97E-02	0.10
Citrate cycle (TCA cycle)	20	1	1.61E-01	7.93E-01	6.45E-01	1.84E-01	0.04
Selenocompound metabolism	18	1	1.80E-01	7.44E-01	6.45E-01	1.97E-01	0.00
Purine metabolism	66	2	2.06E-01	6.86E-01	6.45E-01	2.15E-01	0.03
Taurine and hypotaurine metabolism	7	1	4.03E-01	3.95E-01	6.45E-01	4.03E-01	0.20

Tabla 12. Rutas afectadas en el hígado de la tilapia expuesta a BaP durante 26 d. En la tabla se puede ver el número de metabolitos que participan en la ruta (Hits), el valor de p y de p ajustada (FDR), así como también el impacto de los metabolitos afectados en la ruta basado en el análisis de topología de rutas.

	Total Cmpd	Hits	Raw p	$-\log_{10}(p)$	Holm adjust	FDR	Impact
Glycolysis / Gluconeogenesis	26	3	5.11E-03	2.29E+00	1.23E-01	6.33E-02	0.03
Purine metabolism	66	2	5.28E-03	2.28E+00	1.23E-01	6.33E-02	0.03
Aminoacyl-tRNA biosynthesis	48	4	1.61E-02	1.79E+00	3.53E-01	8.79E-02	0.00
Glyoxylate and dicarboxylate metabolism	32	4	2.16E-02	1.67E+00	4.53E-01	8.79E-02	0.11
Glutathione metabolism	28	2	2.20E-02	1.66E+00	4.53E-01	8.79E-02	0.11
Porphyrin and chlorophyll metabolism	30	2	2.20E-02	1.66E+00	4.53E-01	8.79E-02	0.00
Glycine, serine and threonine metabolism	33	3	2.70E-02	1.57E+00	4.86E-01	9.26E-02	0.27
Glycerolipid metabolism	16	1	4.49E-02	1.35E+00	7.64E-01	1.20E-01	0.24
Galactose metabolism	27	1	4.49E-02	1.35E+00	7.64E-01	1.20E-01	0.00
Pyruvate metabolism	22	3	5.98E-02	1.22E+00	8.97E-01	1.44E-01	0.09
Selenocompound metabolism	18	1	9.59E-02	1.02E+00	1.00E+00	2.09E-01	0.00
beta-Alanine metabolism	18	1	1.50E-01	8.23E-01	1.00E+00	2.80E-01	0.00
Glycerophospholipid metabolism	38	1	1.51E-01	8.20E-01	1.00E+00	2.80E-01	0.03
Alanine, aspartate and glutamate metabolism	27	3	1.75E-01	7.56E-01	1.00E+00	3.01E-01	0.45
Taurine and hypotaurine metabolism	7	1	2.06E-01	6.86E-01	1.00E+00	3.30E-01	0.20
Nicotinate and nicotinamide metabolism	14	2	3.10E-01	5.09E-01	1.00E+00	4.65E-01	0.22
Arginine biosynthesis	14	2	3.52E-01	4.53E-01	1.00E+00	4.70E-01	0.12
Histidine metabolism	15	2	3.52E-01	4.53E-01	1.00E+00	4.70E-01	0.00
Primary bile acid biosynthesis	38	1	7.81E-01	1.08E-01	1.00E+00	8.99E-01	0.00
D-Glutamine and D-glutamate metabolism	6	1	8.41E-01	7.50E-02	1.00E+00	8.99E-01	0.50
Butanoate metabolism	15	1	8.41E-01	7.50E-02	1.00E+00	8.99E-01	0.00
Nitrogen metabolism	6	1	8.41E-01	7.50E-02	1.00E+00	8.99E-01	0.00
Citrate cycle (TCA cycle)	20	1	8.62E-01	6.45E-02	1.00E+00	8.99E-01	0.04
Arginine and proline metabolism	38	3	9.77E-01	9.97E-03	1.00E+00	9.77E-01	0.10

Tabla 13. Rutas afectadas en el hígado de la tilapia por la exposición a BaP durante 56 d. En la tabla se puede ver el número de metabolitos que participan en la ruta (Hits), el valor de p y de p ajustada (FDR), así como también el impacto de los metabolitos afectados en la ruta basado en el análisis de topología de rutas.

	Total Cmpd	Hits	Raw p	$-\log_{10}(p)$	Holm adjust	FDR	Impact
Glyoxylate and dicarboxylate metabolism	32	4	1.42E-04	3.85E+00	3.40E-03	3.40E-03	0.11
D-Glutamine and D-glutamate metabolism	6	1	1.17E-03	2.93E+00	2.70E-02	7.04E-03	0.50
Butanoate metabolism	15	1	1.17E-03	2.93E+00	2.70E-02	7.04E-03	0.00
Nitrogen metabolism	6	1	1.17E-03	2.93E+00	2.70E-02	7.04E-03	0.00
Glycolysis / Gluconeogenesis	26	3	1.64E-03	2.79E+00	3.27E-02	7.53E-03	0.03
Arginine biosynthesis	14	2	2.20E-03	2.66E+00	4.17E-02	7.53E-03	0.12
Histidine metabolism	15	2	2.20E-03	2.66E+00	4.17E-02	7.53E-03	0.00
Alanine, aspartate and glutamate metabolism	27	3	2.76E-03	2.56E+00	4.70E-02	8.29E-03	0.45
Pyruvate metabolism	22	3	6.63E-03	2.18E+00	1.06E-01	1.77E-02	0.09
Glutathione metabolism	28	2	9.18E-03	2.04E+00	1.38E-01	2.00E-02	0.11
Porphyrin and chlorophyll metabolism	30	2	9.18E-03	2.04E+00	1.38E-01	2.00E-02	0.00
Aminoacyl-tRNA biosynthesis	48	4	1.47E-02	1.83E+00	1.91E-01	2.94E-02	0.00
Nicotinate and nicotinamide metabolism	14	2	1.87E-02	1.73E+00	2.25E-01	3.46E-02	0.22
Arginine and proline metabolism	38	3	3.55E-02	1.45E+00	3.91E-01	6.09E-02	0.10
Taurine and hypotaurine metabolism	7	1	5.76E-02	1.24E+00	5.76E-01	8.92E-02	0.20
Selenocompound metabolism	18	1	5.95E-02	1.23E+00	5.76E-01	8.92E-02	0.00
beta-Alanine metabolism	18	1	2.13E-01	6.72E-01	1.00E+00	3.01E-01	0.00
Citrate cycle (TCA cycle)	20	1	2.82E-01	5.50E-01	1.00E+00	3.76E-01	0.04
Primary bile acid biosynthesis	38	1	3.68E-01	4.35E-01	1.00E+00	4.64E-01	0.00
Purine metabolism	66	2	4.01E-01	3.97E-01	1.00E+00	4.81E-01	0.03
Glycerolipid metabolism	16	1	5.66E-01	2.47E-01	1.00E+00	6.07E-01	0.24
Galactose metabolism	27	1	5.66E-01	2.47E-01	1.00E+00	6.07E-01	0.00
Glycine, serine and threonine metabolism	33	3	5.82E-01	2.35E-01	1.00E+00	6.07E-01	0.27
Glycerophospholipid metabolism	38	1	7.28E-01	1.38E-01	1.00E+00	7.28E-01	0.03

3.2.2. Análisis diferencial de metabolitos y de rutas afectadas en la gónada de la tilapia después de 56 d de exposición subcrónica a BaP

En las gónadas de la tilapia expuesta durante 56 d a BaP, se detectaron 16 metabolitos, entre ellos los aminoácidos alanina, aspartato, creatina, creatina fosfato, glutamato, glicina y taurina metabolitos de energía acetato, glucosa, glicerol, lactato y malato la purina hipoxantina, la base nitrogenada adenina, el metabolito N-óxido de trimetilamina y el osmolito betaína (Figura 20).

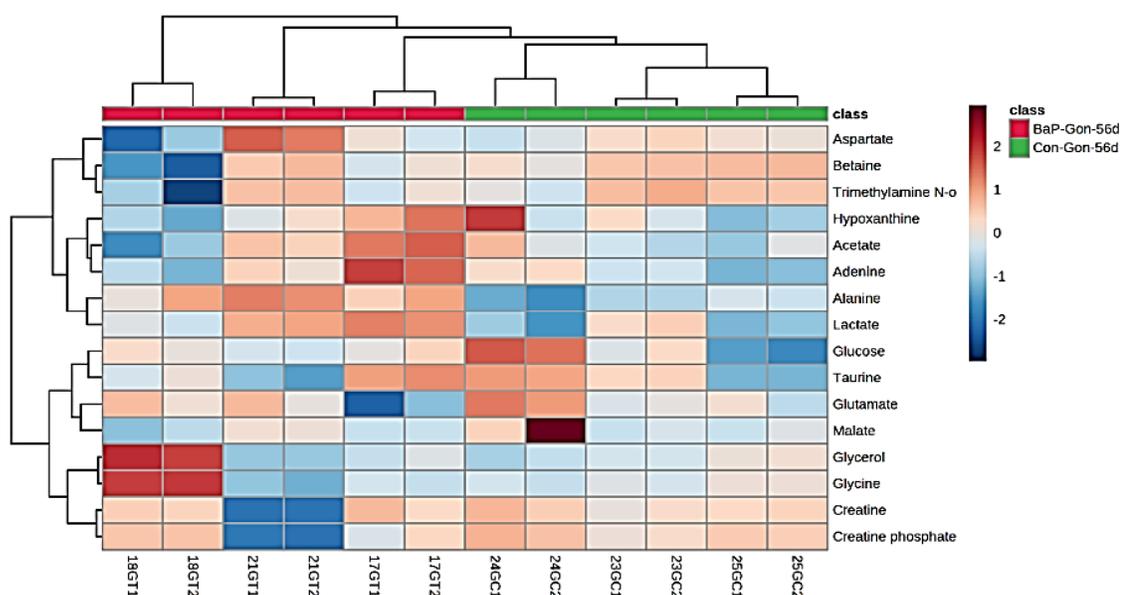


Figura. 20. Mapa de calor que muestra la variación de la concentración de metabolitos en las gónadas de la tilapia expuesta durante 56 d a BaP. En color verde está representado el grupo control y en rojo el tratado con BaP.

Al llevar a cabo el análisis de comparación entre controles y tratados para detectar los metabolitos significativamente diferentes solo 3 fueron afectados en su concentración por el BaP, el aminoácido alanina ($FC = 1.4221$, $p = 0.04$), la adenina ($FC = 1.5335$, $p = 0.02$) y el lactato ($FC = 1.608$, $p = 0.02$) (Figura 21).

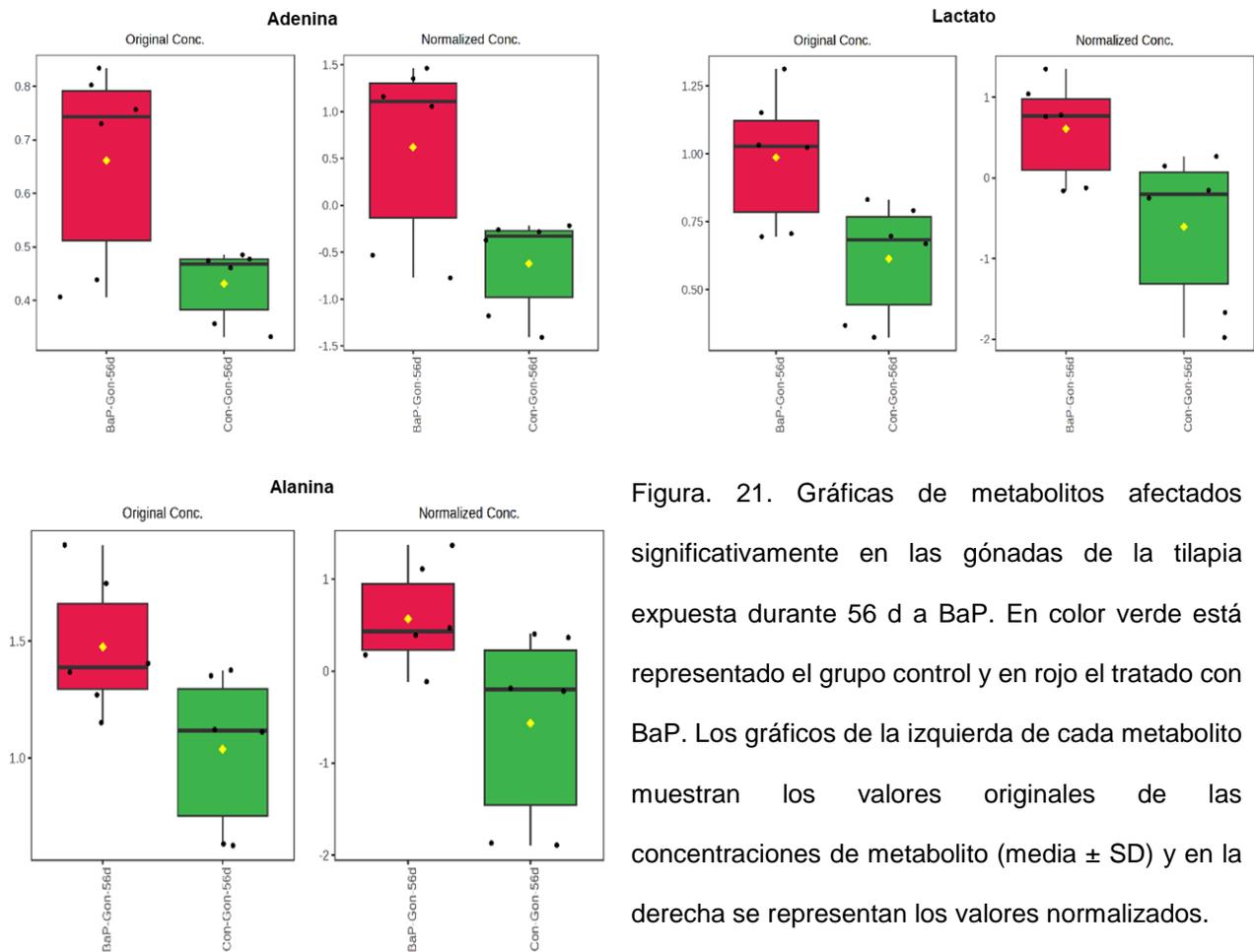


Figura. 21. Gráficas de metabolitos afectados significativamente en las gónadas de la tilapia expuesta durante 56 d a BaP. En color verde está representado el grupo control y en rojo el tratado con BaP. Los gráficos de la izquierda de cada metabolito muestran los valores originales de las concentraciones de metabolito (media \pm SD) y en la derecha se representan los valores normalizados.

Mientras que con el análisis de rutas se observó que las rutas de glicólisis/gluconeogénesis, el metabolismo de purinas y el metabolismo selenocompuestos fueron afectadas significativamente (Tabla 14).

Tabla 14. Análisis de rutas afectadas en las gónadas de las tilapias expuestas a BaP durante 56 d.

	Total Cmpd	Hits	Raw p	-log10(p)	Holm adjust	FDR	Impact
Glycolysis / Gluconeogenesis	26	3	1.53E-02	1.82E+00	3.36E-01	2.68E-01	0.03
Purine metabolism	66	2	3.98E-02	1.40E+00	8.35E-01	2.68E-01	0.03
Selenocompound metabolism	18	1	4.23E-02	1.37E+00	8.46E-01	2.68E-01	0.00
Taurine and hypotaurine metabolism	7	1	5.40E-02	1.27E+00	1.00E+00	2.68E-01	0.20
Pyruvate metabolism	22	3	6.09E-02	1.22E+00	1.00E+00	2.68E-01	0.09
Aminoacyl-tRNA biosynthesis	48	4	1.44E-01	8.42E-01	1.00E+00	3.65E-01	0.00
Alanine, aspartate and glutamate metabolism	27	3	1.49E-01	8.28E-01	1.00E+00	3.65E-01	0.45
Glycerolipid metabolism	16	1	1.61E-01	7.93E-01	1.00E+00	3.65E-01	0.24
Galactose metabolism	27	1	1.61E-01	7.93E-01	1.00E+00	3.65E-01	0.00
Glyoxylate and dicarboxylate metabolism	32	4	2.24E-01	6.50E-01	1.00E+00	3.65E-01	0.11
beta-Alanine metabolism	18	1	2.85E-01	5.46E-01	1.00E+00	3.65E-01	0.00
Nicotinate and nicotinamide metabolism	14	1	2.85E-01	5.46E-01	1.00E+00	3.65E-01	0.00
Arginine biosynthesis	14	2	3.06E-01	5.15E-01	1.00E+00	3.65E-01	0.12
Histidine metabolism	15	2	3.06E-01	5.15E-01	1.00E+00	3.65E-01	0.00
Arginine and proline metabolism	38	3	3.07E-01	5.12E-01	1.00E+00	3.65E-01	0.10
Glutathione metabolism	28	2	3.16E-01	5.00E-01	1.00E+00	3.65E-01	0.11
Porphyrin and chlorophyll metabolism	30	2	3.16E-01	5.00E-01	1.00E+00	3.65E-01	0.00
D-Glutamine and D-glutamate metabolism	6	1	3.32E-01	4.79E-01	1.00E+00	3.65E-01	0.50
Butanoate metabolism	15	1	3.32E-01	4.79E-01	1.00E+00	3.65E-01	0.00
Nitrogen metabolism	6	1	3.32E-01	4.79E-01	1.00E+00	3.65E-01	0.00
Glycine, serine and threonine metabolism	33	3	3.95E-01	4.04E-01	1.00E+00	4.13E-01	0.32
Citrate cycle (TCA cycle)	20	1	5.09E-01	2.93E-01	1.00E+00	5.09E-01	0.04

4. RESULTADOS DE LA EXPRESIÓN DE TRANSCRITOS

4.1. Análisis de qPCR

Se realizó el análisis de la expresión de los transcritos de genes asociados con el sistema endocrino, factor de crecimiento tipo insulina 1 y 2 (*igf1* y *igf2*), receptor de hormona del crecimiento 1 y 2 (*ghr1* y *ghr2*) y el biomarcador de disrupción endócrina vitelogenina (*vtg*). Se observó que en el hígado de la tilapia el BaP únicamente ocasionó cambios en el gen *igf2* a los 8 y 26 días de exposición y en *vtg* a los 2 d de exposición. Mientras que a los 8 d ocurrió la disminución de 1.6 veces del *igf2*, a los 26 días incrementó 1.8 veces en comparación con el grupo de control ($p < 0.05$). Por otra parte, la expresión de *vtg* disminuyó 5.6 veces en el grupo de organismos tratados con BaP 2 d posteriores a la inyección *ip* en comparación con el grupo de organismos control ($p < 0.05$), no obstante, en la gráfica se puede observar que la expresión de este gen permanece baja con respecto a los controles y hasta los 56 d que la expresión del grupo tratado con BaP es igual a la de los controles (Figura 22). En las gónadas de la tilapia expuesta a BaP se observó la disminución significativa de 1.9 veces de *igf1* en el grupo de tilapias tratadas con BaP 2 d posteriores a la inyección *ip*. Ningún otro gen que fue considerado en este estudio para evaluar el efecto en el eje somatotrópico fue afectado en las gónadas de las tilapias expuestas a BaP (Figura 22).

Por otro lado, también se cuantificó la expresión *cyp1a*, *cyp1b1* y *gsta*, genes vinculados con el metabolismo de xenobióticos tanto en el hígado como en las gónadas (Figura 23). Y se evaluó la expresión de un gen relacionado con el daño en el ADN, *gadd45 β* . En el hígado de organismos tratados con BaP, la expresión de *cyp1a* no presentó cambios en los niveles de magnitud estadísticamente significativos (Figura 23a). Pero, la expresión del gen *cyp1b1* fue mayor en todos los tiempos de exposición y con

incrementos significativos de más de 2 veces de cambio observados después de 2, 8 y 26 d posteriores a la inyección *ip* en comparación con los grupos de control (Figura 23b). En las gónadas de la tilapia el BaP indujo la expresión de *cyp1a* y *cyp1b1* en todos los tiempos de exposición (Figura 23d-e). La expresión del gen *cyp1a* incrementó significativamente a los 2, 26 y 56 días con un cambio de 5.6, 4.6 y 3.9 veces, respectivamente y la expresión de *cyp1b1* aumentó 4.3 veces a los 2 d y 2.7 veces a los 56 d después del tratamiento *ip* con BaP en comparación con los grupos control ($p < 0.05$).

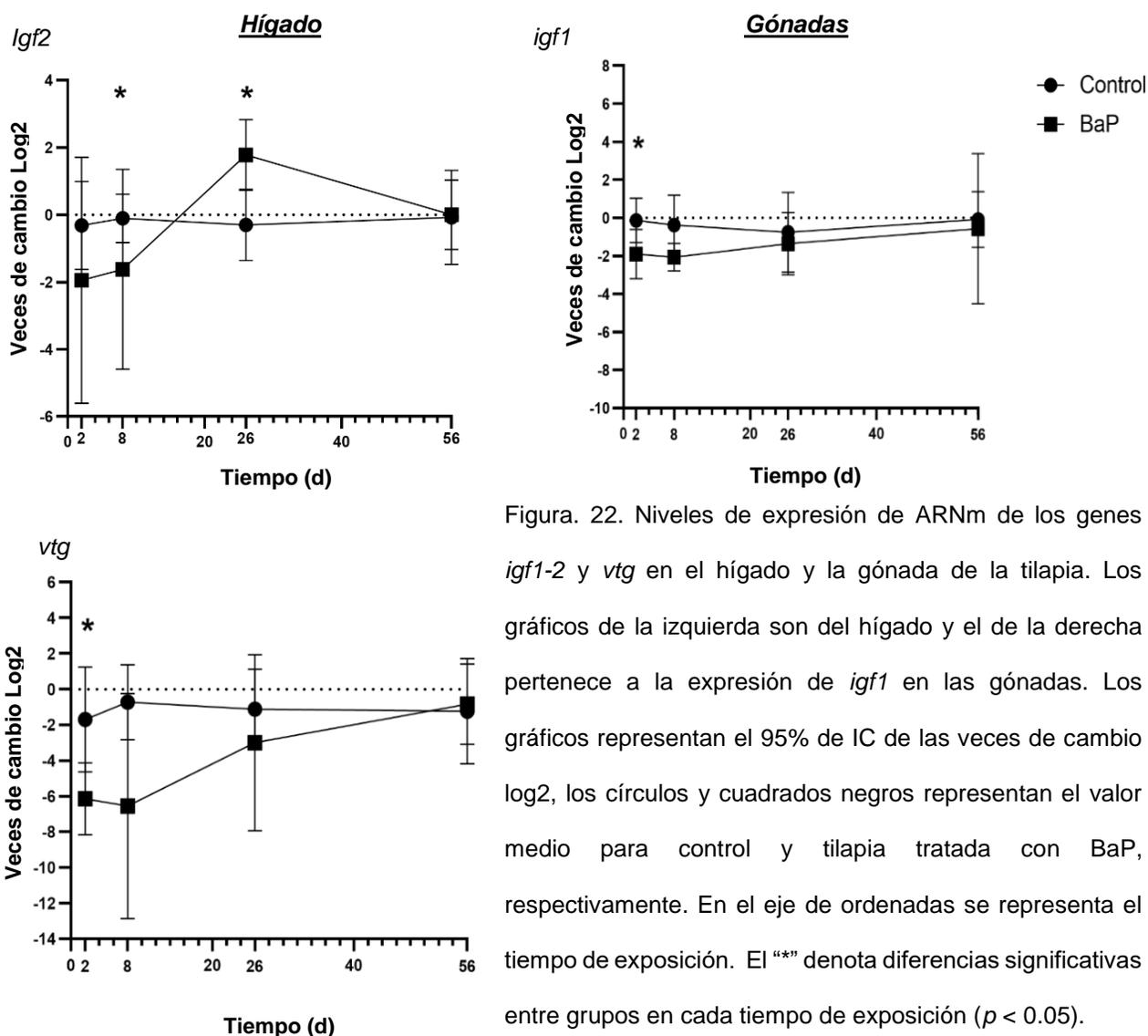


Figura. 22. Niveles de expresión de ARNm de los genes *igf1-2* y *vtg* en el hígado y la gónada de la tilapia. Los gráficos de la izquierda son del hígado y el de la derecha pertenece a la expresión de *igf1* en las gónadas. Los gráficos representan el 95% de IC de las veces de cambio log2, los círculos y cuadrados negros representan el valor medio para control y tilapia tratada con BaP, respectivamente. En el eje de ordenadas se representa el tiempo de exposición. El “*” denota diferencias significativas entre grupos en cada tiempo de exposición ($p < 0.05$).

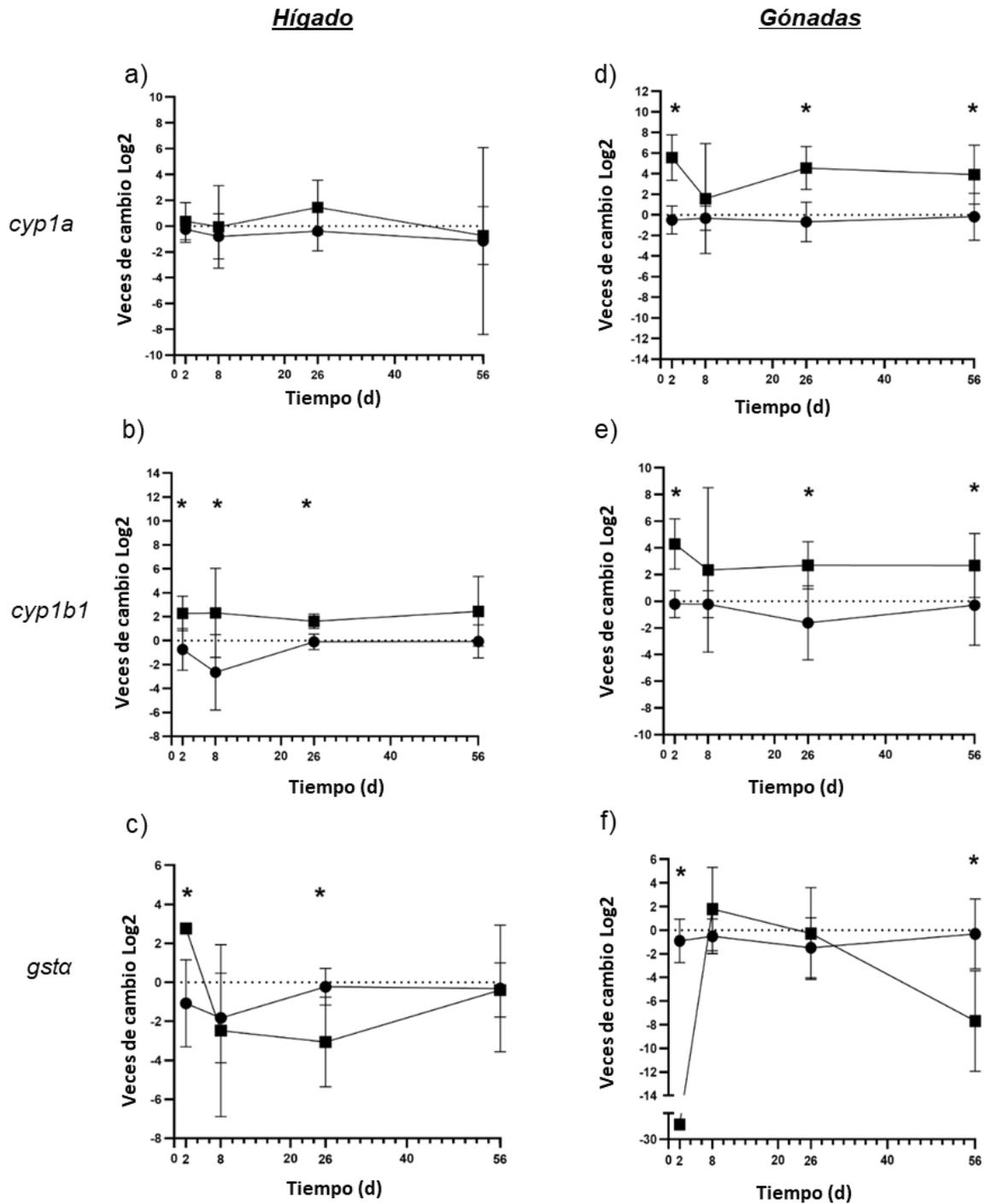


Figura. 23. Niveles de expresión de ARNm de los genes *cyp1a*, *cyp1b* y *gsta* en el hígado y la gónada de la tilapia. Los gráficos de la izquierda son del hígado y el de la derecha pertenece a la expresión en las gónadas. Los gráficos representan el 95% de IC de las veces de cambio log2, los círculos y cuadrados negros representan el valor medio para control y tilapia tratada con BaP, respectivamente. En el eje de ordenadas se representa el tiempo de exposición. El “*” denota diferencias significativas entre grupos en cada tiempo de exposición ($p < 0.05$).

Los niveles de expresión de *gsta* en el hígado fue variable: incrementó 2.8 veces después de 2 d de exposición, pero a los 26 d disminuyó 3.1 veces y a los 56 d no se observó ningún cambio en las tilapias tratadas con BaP (Figura 23c). En los testículos, la expresión de *gsta* se reguló significativamente a la baja con un cambio de 26.6 veces después de 2 d y un cambio de 7.7 veces después de 56 días, en organismos tratados con BaP (Figura 23f). Por otra parte, la exposición a BaP ocasionó que la expresión del gen vinculado con el daño al ADN, *gadd45β* incrementara tanto en el hígado como en las gónadas a los 2 d post exposición (Figura 24). En el hígado se observó el incremento de 2.4 veces y en las gónadas de 1.1 veces en comparación con el grupo control.

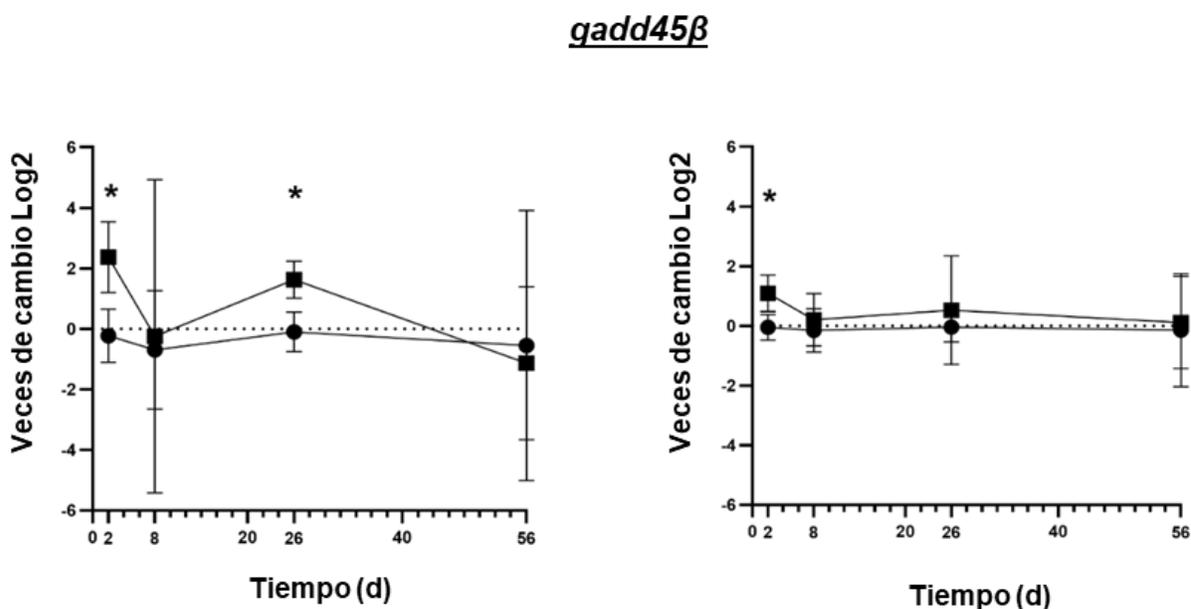


Figura. 24. Niveles de expresión de ARNm de *gadd45β* en el hígado y la gónada de la tilapia. La gráfica de la izquierda pertenece al hígado y la de la derecha pertenece a las gónadas. Los gráficos representan el 95% de IC de las veces de cambio log₂, los círculos y cuadrados negros representan el valor medio para control y tilapia tratada con BaP, respectivamente. En el eje de ordenadas se representa el tiempo de exposición. El “*” denota diferencias significativas entre grupos en cada tiempo de exposición ($p \leq 0.05$).

4.2. Análisis del perfil de transcritos y rutas afectadas

Con el objetivo de conocer los eventos moleculares que ocurren en diferentes tiempos de exposición subcrónica de BaP en los órganos clave en el crecimiento, desarrollo y reproducción, llevamos a cabo el análisis transcriptómico del hígado y la gónada escindidos en dos tiempos de exposición (26 y 56 d) de tilapias macho adulto expuestas al vehículo acarreador y las expuestas con BaP (3 mg/kg). El análisis de componentes principales, sugiere que el patrón de la expresión génica entre estos dos tejidos es totalmente diferente. También, se observó diferencia entre grupos control vs tratados y entre tiempos de exposición. Por lo tanto, se realizaron gráficos de volcán para cada órgano y tiempo de exposición con base en el filtrado de los resultados para identificar DEG significativos en cada grupo (Figura 25). En el hígado de la tilapia expuesta subcrónicamente durante 26 d a BaP, 286 genes presentaron cambios significativos con respecto al grupo de organismos control ($p.adjust \leq 0.05$; $abs \log_2FC \geq 0.58$) de los cuales 146 genes fueron regulados a la baja y 140 genes fueron regulados a la alta, mientras que en el hígado de los organismos expuestos subcrónicamente durante 56 d, 215 genes presentaron cambios significativos comparados con las tilapias control, de los cuales 76 genes fueron regulados a la baja y 139 genes a la alta, en la tabla 15 se pueden observar algunos de los genes que fueron significativos.

En las gónadas de la tilapia expuesta subcrónicamente durante 26 d a BaP (3 mg/kg), únicamente se observaron 69 DEG significativos con respecto al grupo de tilapias control, de los cuales 19 genes fueron regulados a la baja y 50 genes fueron regulados al alta, y después de 56 d de exposición 85 DEG significativos fueron observados, 33 genes fueron regulados a la baja y 52 genes fueron sobre regulados (Tabla 16).

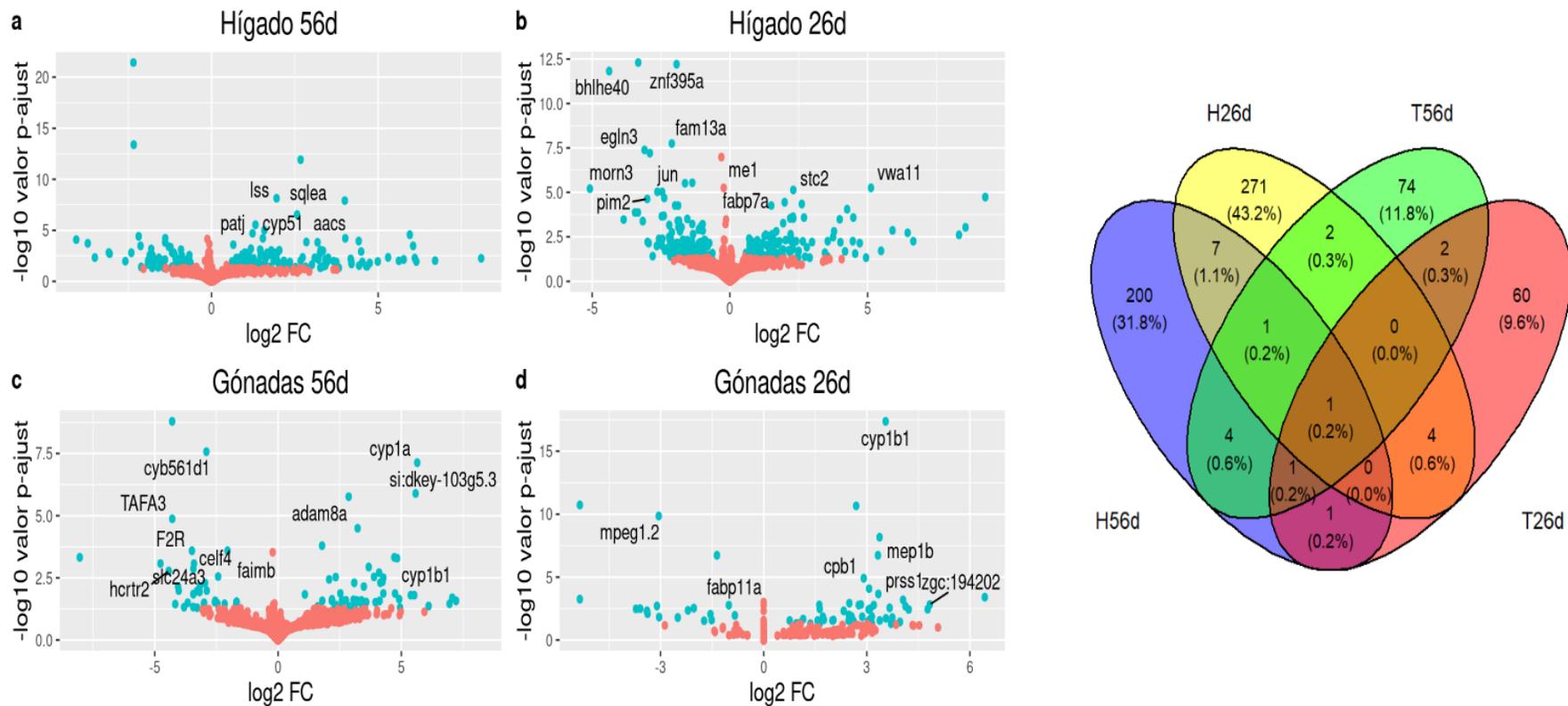


Figura. 25. Gráfica de Volcan y diagrama de Venn. a-b) en estas imágenes se puede observar el perfil de expresión del hígado y las gónadas a los 26 y 56 d de exposición a BaP, en ellas los puntos azules representan los genes DEG significativos ($\log_2 FC > 0.58$ y $p_{ajust} < 0.05$). En la imagen de la derecha se puede observar el número de genes que fueron significativos en cada tiempo de exposición, la intersección entre cada set de datos y el porcentaje que representa cada uno del total de los genes expresados.

Tabla 16. DEG con mayor significancia en el hígado a los 26 y 56 d de exposición con BaP.

Hígado 26 días de exposición				
gene_ID	Símbolo	Descripción	log2FC	padj
ENSONIG00000013882	<i>morn3</i>	MORN repeat containing 3	-5.08	6.17E-06
ENSONIG00000020277	<i>bhlhe40</i>	basic helix-loop-helix family, member e40	-4.38	1.50E-12
ENSONIG00000013737	<i>apoea</i>	apolipoprotein Ea	-3.86	0.00034
ENSONIG00000001922	<i>acaca</i>	Acetyl-CoA Carboxylase Alpha	-3.34	0.00014
ENSONIG00000003515	<i>mme</i>	membrane metalloendopeptidase	8.56	0.00093
ENSONIG000000031481	<i>cldn4</i>	claudin-4-like	8.32	0.00247
ENSONIG00000001872	<i>pcdh1a</i>	protocadherin 1a	5.91	0.00139
ENSONIG00000003467	<i>vwa11</i>	von Willebrand factor A domain containing 11	5.12	5.56E-06
Hígado 56 días de exposición				
ENSONIG000000016151	<i>apo4b.2</i>	apolipoprotein A-I	-3.08	0.00155
ENSONIG00000001326	<i>fabp7a</i>	fatty acid-binding protein, brain	-3.06	0.00197
ENSONIG00000003433	<i>prf1</i>	perforin-1	-2.41	0.00159
ENSONIG000000024626	<i>bdp1</i>	B double prime 1, subunit of RNA polymerase III transcription initiation factor IIIB	-2.34	3.61E-22
ENSONIG000000028850	<i>gimap4-like</i>	GTPase IMAP family member 4-like	6.71	0.0095
ENSONIG00000005156	<i>nuggc</i>	nuclear GTPase SLIP-GC	5.95	2.76E-05
ENSONIG000000012864	<i>syt12</i>	synaptotagmin 12	5.62	0.00989
ENSONIG000000017966	<i>ahrr</i>	aryl-hydrocarbon receptor repressor	5.3	0.00457

Tabla 16. DEG con mayor significancia en las gónadas a los 26 y 56 d de exposición con BaP.

Gónadas 26 d de exposición				
gene_ID	Símbolo	Descripción	log2FC	padj
ENSONIG00000007098	<i>hmr1</i>	major histocompatibility complex class I-related gene protein-like	-3.72	0.00334
ENSONIG00000001900	<i>tkt</i>	transketolase	-3.59	0.00318
ENSONIG00000004147	<i>slc13a5a</i>	solute carrier family 13 member 5a	-3.40	0.00512
ENSONIG00000006375	<i>gad3</i>	glutamate decarboxylase 3	-3.39	0.00478
ENSONIG000000028850	<i>gimap4</i>	GTPase IMAP family member 4-like	4.77	0.00357
ENSONIG00000007897	<i>myod2</i>	myogenic factor MyoD2	4.22	0.00369
ENSONIG000000016153	<i>apo2</i>	apolipoprotein A-II	4.12	0.00205
ENSONIG000000016419	<i>prss1</i>	serine protease 1	4.05	0.00064
Gónadas 56 d de exposición				
ENSONIG00000007653	<i>st3gal1</i>	CMP-N-acetylneuraminic acid-6-sialyltransferase	-4.769	0.00084
ENSONIG00000009721	<i>hcrtr2</i>	hypocretin (orexin) receptor 2	-4.435	0.00167
ENSONIG000000014675	<i>tafa3a</i>	TAF3A chemokine like family member 3a	-4.290	1.33E-05
ENSONIG000000018960	<i>eps8l3a</i>	epidermal growth factor receptor pathway substrate 8 like 3a	-4.056	0.00706
ENSONIG000000020466	<i>cldn3</i>	claudin-3	6.953	0.03476
ENSONIG000000041126	<i>cyp1a</i>	cytochrome P450 1A	5.643	7.39E-08
ENSONIG00000006151	<i>zpld1</i>	zona pellucida-like domain-containing protein 1	5.577	1.28E-06
ENSONIG000000028850	<i>gimap4</i>	GTPase IMAP family member 4-like	5.381	0.01569

En el hígado fueron identificados únicamente 8 genes diferencialmente expresados en ambos tiempos, 26 y 56 d de exposición subcrónica a BaP y en las

gónadas solamente se identificaron 4 genes DEG en ambos tiempos de exposición subcrónica (Tabla 17). Entre estos genes identificados se hallaron genes relacionados con el metabolismo de xenobióticos, metabolismo de energía, el metabolismo y transporte de lípidos.

Tabla 17. Genes DE que son compartidos entre 26 y 56 d por tejido. En esta tabla se muestra el ID del gen, su símbolo, nombre completo y el log2 de las veces de cambio para cada tejido.

HÍGADO				
Ensembl ID	Símbolo	Gen	Log2FoldChange	
			26 días	56 días
ENSONIG00000001066	<i>aclya</i>	ATP citrate lyase a	-2.11	-1.39
ENSONIG00000003467	<i>vwa11</i>	von Willebrand factor A domain containing 11	5.12	4.53
ENSONIG00000006474	<i>pklr</i>	pyruvate kinase L/R	1.19	0.59
ENSONIG00000007292	<i>fasn</i>	fatty acid synthase	-3.16	-1.73
ENSONIG00000008980	<i>galnt13</i>	UDP-N-acetyl-alpha-D-galactosamine:polypeptide N-acetylgalactosaminyltransferase 13	-1.26	-0.75
ENSONIG00000016151	<i>apoa4b.2</i>	apolipoprotein A-IV b, tandem duplicate 2	-2.95	-3.08
ENSONIG00000020641	<i>fzd8a</i>	frizzled class receptor 8a	1.32	1.04
ENSONIG00000035380	<i>cyp1b1</i>	cytochrome P450 1B1	4.18	4.49
GÓNADAS				
ENSONIG00000012921	<i>atp10b</i>	ATPase phospholipid transporting 10B	3.08	3.38
ENSONIG00000028850	<i>gimap4</i>	GTPase IMAP family member 4-like	4.77	5.38
ENSONIG00000034614	<i>NA</i>	NA	-3.04	-3.44
ENSONIG00000035380	<i>cyp1b1</i>	cytochrome P450 1B1	3.55	4.82

4.3. Análisis funcional de los DEG

Se llevó a cabo tanto el análisis de sobrerrepresentación (ORA) de los genes DEG significativos como también el de enriquecimiento de grupos de genes (GSEA) de todo el transcriptoma para cada órgano y tiempo de exposición. El ORA con la base de datos del KEGG que en el hígado de las tilapias expuestas durante 26 y 56 d revelaron el enriquecimiento de genes involucrados en el metabolismo de carbohidratos (butirato y propanoato), metabolismo de lípidos (glicerofosfolípidos, ácidos grasos y esteroides), la homeostasis de lípidos (peroxisoma), en el sistema endócrino (ruta de señalización de la insulina) y metabolismo de aminoácidos (Tabla 18)

Tabla 18. Análisis de sobrerepresentación en el hígado de *O. niloticus*.

Análisis de sobrerepresentación (ORA)		Hígado			
		26 d		56 d	
Clase	Ruta KEGG	pvalue	p.adjust	pvalue	p.adjust
Metabolismo de lípidos	Fatty acid metabolism	0.016	0.246	--	--
	Glycerolipid metabolism	0.020	0.246	--	--
	Glycerophospholipid metabolism	0.012	0.240	0.047	0.279
	Steroid biosynthesis	--	--	1.54E-05	0.001
	alpha-Linolenic acid metabolism	--	--	0.011	0.145
	Linoleic acid metabolism	--	--	0.024	0.178
Metabolismo de aminoácidos	beta-Alanine metabolism	0.033	0.254	--	--
	Arginine biosynthesis	--	--	0.013	0.145
	Biosynthesis of amino acids	--	--	0.024	0.178
	Glycine, serine and threonine metabolism	--	--	0.045	0.279
Metabolismo de carbohidratos	Propanoate metabolism	0.024	0.251	--	--
	Butanoate metabolism	--	--	0.011	0.145
Sistema endócrino	Insulin signaling pathway	0.010	0.240	--	--
	Adipocytokine signaling pathway	0.033	0.254	--	--
	PPAR signaling pathway	--	--	0.023	0.178
Traducción génica	Ribosome	3.66E-07	2.27E-05	--	--
Metabolismo de terpenoides	Terpenoid backbone biosynthesis	--	--	1.29E-05	0.001
Transporte y catabolismo	Peroxisome	--	--	0.006	0.122

-- En este tiempo no se presentaron diferencias significativas en los organismos tratados con BaP en comparación con los organismos control.

Con el análisis de sobrerepresentación que se realizó en las gónadas de la tilapia expuesta a BaP durante 26 d se identificaron 4 rutas afectadas significativamente ($p \leq 0.05$) también relacionadas con el metabolismo de aminoácidos, carbohidratos y procesos celulares. Mientras que en las gónadas expuestas durante 56 d únicamente se identificaron 2 rutas afectadas significativamente con respecto a los organismos controles, y que estaban involucradas con el metabolismo de xenobióticos y de lípidos (Tabla 19).

Tabla 19. Análisis de sobrerepresentación de las gónadas de la tilapia.

Análisis de sobrerepresentación (ORA)		Gónadas			
		26 d		56 d	
Clase	Ruta KEGG	pvalue	p.adjust	pvalue	p.adjust
Metabolismo de aminoácidos	Taurine and hypotaurine metabolism	0.028	0.112	--	--
	beta-Alanine metabolism	0.044	0.112	--	--
Metabolismo de carbohidratos	Butanoate metabolism	0.028	0.112	--	--
Procesos celulares	Tight junction	0.040	0.112	--	--
Biodegradación y metabolismo de xenobióticos	Metabolism of xenobiotics by cytochrome P450	--	--	0.005	0.049
Metabolismo de lípidos	Steroid hormone biosynthesis	--	--	0.005	0.049

Por otra parte, se realizó el análisis de sobrerrepresentación de ontología de genes (GO) en ambos órganos de *O. niloticus* expuesta subcrónicamente a BaP (3 mg/kg) durante 26 d y se logró identificar el enriquecimiento de 38 procesos biológicos (BP), 16 relacionados con componentes celulares (CC) y 6 con funciones moleculares (MF). Los principales términos GO enriquecidos estuvieron relacionados con procesos involucrados con la homeostasis de iones de hierro a nivel celular, subunidades ribosomales y enzimas desubiquitinizantes dependientes de metales (Figura 26).

En las gónadas de las tilapias expuestas subcrónicamente a dosis repetidas de BaP durante 26 d, identificamos 26 términos GO significativos, 3 procesos biológicos, 2 términos de componentes celulares y 21 de funciones moleculares, mientras que a los 56 d fueron encontrados 29 términos significativos de los cuales, 5 fueron procesos biológicos, 4 de componentes celulares y 15 de funciones moleculares.

En las gónadas de tilapias expuestas a BaP por 26 y 56 d si se encontraron enriquecidos procesos biológicos involucrados con la respuesta a xenobióticos, incluso a los 56 d se identificaron términos relacionados con la actividad monooxigenasa y la unión hemo. Otros términos GO enriquecidos en los organismos expuestos durante 26 d fueron las actividades de serinas peptidasas e hidrolasas y componentes extracelulares, mientras que a los 56 d además se identificaron enriquecidos términos de componentes de uniones intercelulares.

Por último, en este apartado se presentan los resultados del análisis de enriquecimiento de set de genes (GSEA) con la base de datos KEGG, para cada órgano de las tilapias expuestas subcrónicamente a dosis repetidas de BaP durante 26 y 56 d.

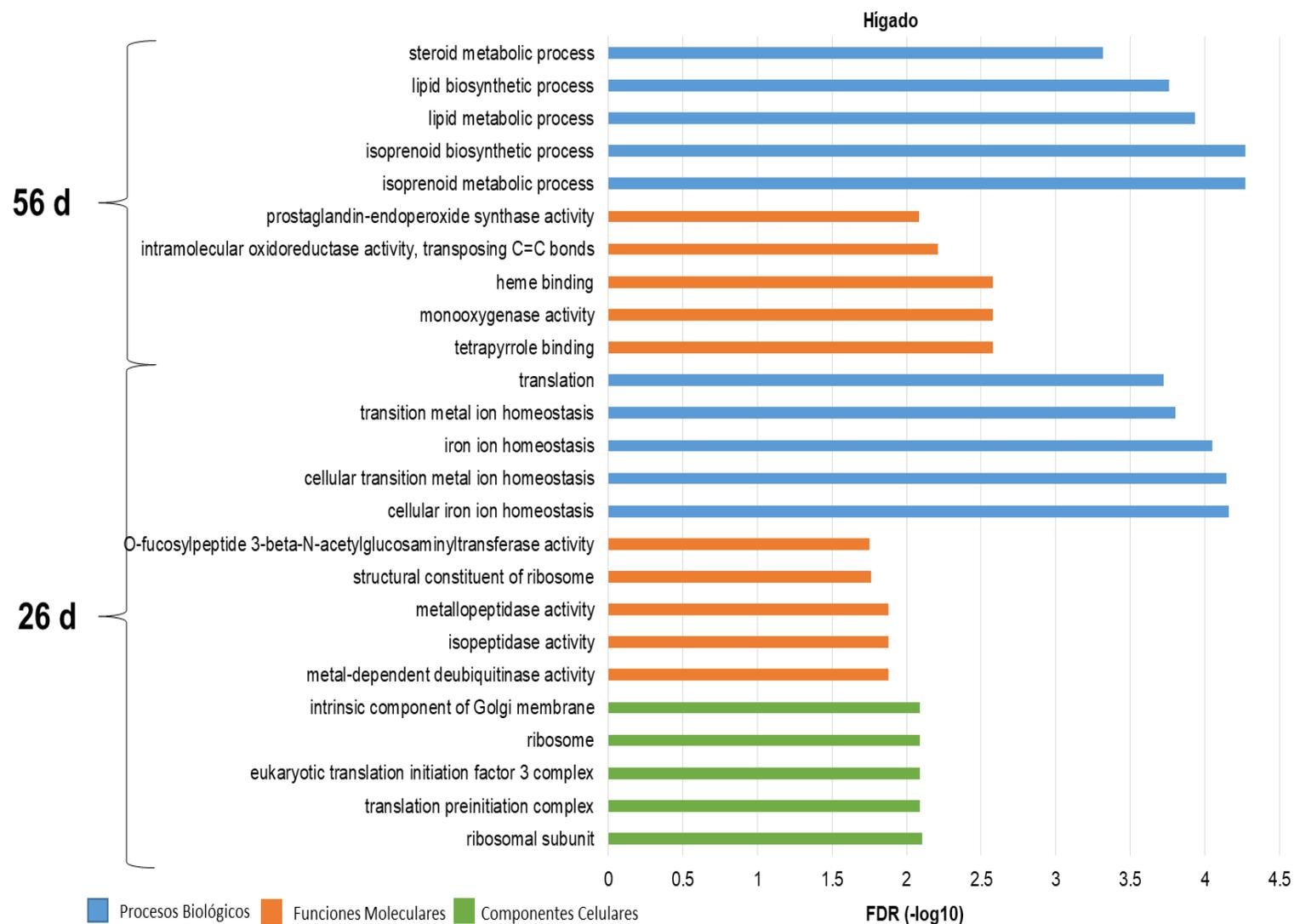


Figura. 26. Enriquecimiento de términos GO del hígado de la tilapia expuesta a BaP.

En el hígado de los organismos expuestos subcrónicamente a dosis repetidas de BaP durante 26 d, 14 rutas fueron enriquecidas significativamente ($p \leq 0.05$) con respecto a los organismos control, de las cuales 6 fueron activadas y 8 suprimidas (Figura 27). De las 14 rutas afectadas 5 estaban relacionadas con el metabolismo de lípidos (Tabla 20) de las cuales 4 fueron suprimidas y solamente la síntesis de esteroides se activó. En este tiempo se observó que la ruta de moléculas de adhesión celular relacionada con el procesamiento de la información ambiental se activó y también identificamos que rutas ligadas al proceso de traducción genética aumentaron, mientras que el proceso de degradación por proteosoma disminuyó al igual que el proceso celular catabólico autofagia, lo cual indicó la disminución de la regulación celular. No obstante, las rutas con un valor de FDR significativo únicamente fueron ribosoma y autofagia animal. A los 56 d de exposición subcrónica a BaP, en el hígado, 15 rutas fueron enriquecidas significativamente ($p \leq 0.05$), de las cuales 6 rutas fueron activadas y 9 suprimidas con respecto a los organismos control (Figura 27). Con este análisis no fueron observados cambios en rutas del metabolismo de lípidos, pero si fueron suprimidas rutas de metabolismo de energía como la fosforilación oxidativa, el incremento en el metabolismo de carbohidratos y además las rutas del metabolismo de xenobióticos por citocromo P450 y de rutas relacionadas con el sistema inmune y enfermedades infecciosas fueron activadas. La principal ruta activada fue la red inmunológica del intestino para la producción de anticuerpos de inmunoglobulina A y el metabolismo del butirato (Tabla 20).

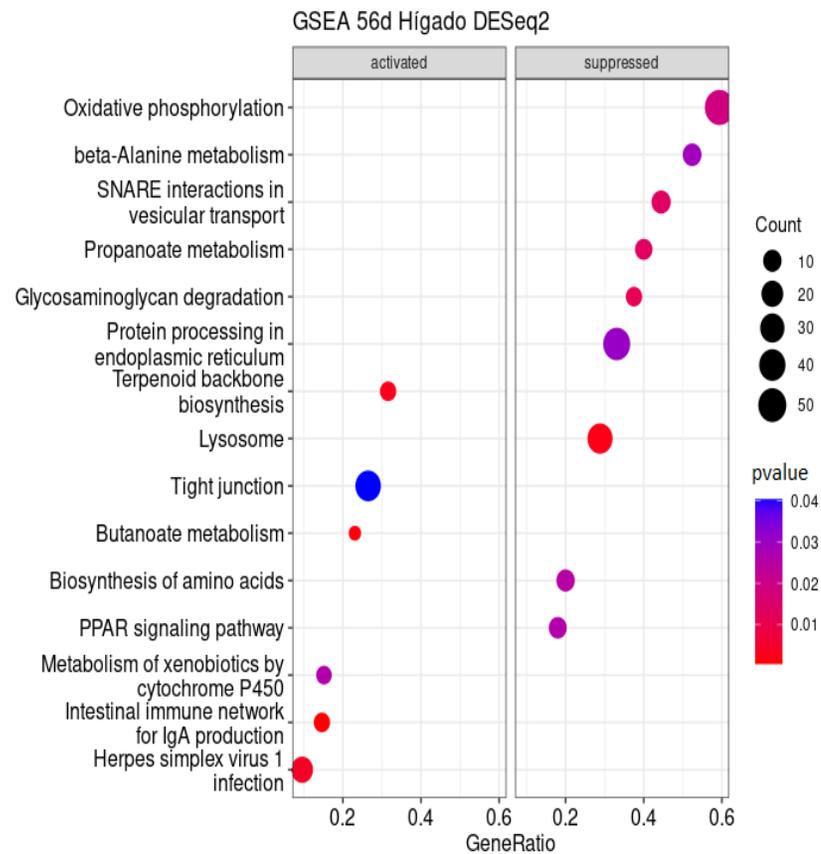


Figura. 27. GSEA del hígado de tilapias expuestas durante 26 y 56 d. En el gráfico de puntos se pueden observar el GeneRatio que se refiere a la relación entre el conteo de genes del set de datos de las muestras y los genes que participan en la ruta. La palabra Count se refiere a la cantidad de genes que enriquecieron la ruta.

Tabla 20. Análisis de enriquecimiento de set de genes (GSEA) del hígado de la tilapia expuesta a dosis repetidas de BaP durante 26 y 56 d.

GSEA DEL HIGADO DE 26 D					
Clase	Ruta	setSize	enrichmentScore	NES	pvalue
Procesamiento de Información Genética; Traducción	<i>Ribosome</i>	85	0.86	2.34	1.84E-10
	<i>Aminoacyl-tRNA biosynthesis</i>	33	0.67	1.59	0.0400
Procesamiento de Información Genética; Plegado, clasificación y degradación	<i>Proteasome</i>	37	-0.72	-1.68	0.0029
Procesos Celulares; Transporte y catabolismo	<i>Autophagy - animal</i>	141	-0.61	-1.76	0.0003
	<i>Autophagy - other</i>	22	-0.78	-1.68	0.0038
Sistemas de Organismos; Sistema endocrino	<i>Insulin signaling pathway</i>	118	-0.57	-1.60	0.0034
Metabolismo; Metabolismo de lípidos	<i>Biosynthesis of unsaturated fatty acids</i>	29	-0.78	-1.76	0.0059
	<i>Fatty acid elongation</i>	35	-0.70	-1.63	0.0161
	<i>Glycerophospholipid metabolism</i>	81	-0.57	-1.53	0.0206
	<i>Fatty acid biosynthesis</i>	13	-0.85	-1.67	0.0231
	<i>Steroid biosynthesis</i>	14	0.83	1.69	0.0341
Procesamiento de la Información Ambiental; Moléculas de señalización e interacción.	<i>Cell adhesion molecules</i>	150	0.56	1.63	0.0080
Procesos Celulares; Comunidad celular - eucariotas	<i>Tight junction</i>	151	0.50	1.46	0.0260
Exportación de proteínas	<i>Protein export</i>	17	0.78	1.64	0.0483
GSEA DEL HIGADO DE 56 D					
Clase	Ruta	setSize	enrichmentScore	NES	pvalue
Enfermedades humanas; Enfermedad infecciosa: viral	<i>Herpes simplex virus 1 infection</i>	209	0.65	1.66	0.0040
Metabolismo; Metabolismo de energía	<i>Oxidative phosphorylation</i>	96	-0.58	-1.59	0.0189
Metabolismo; Biodegradación y metabolismo de xenobióticos	<i>Metabolism of xenobiotics by cytochrome P450</i>	33	0.80	1.67	0.0260
Metabolismo; Biosíntesis y metabolismo de los glicanos	<i>Glycosaminoglycan degradation</i>	16	-0.81	-1.72	0.0110
Metabolismo; Metabolismo de aminoácidos	<i>Biosynthesis of amino acids</i>	50	-0.65	-1.59	0.0252
	<i>beta-Alanine metabolism</i>	21	-0.76	-1.69	0.0292
Metabolismo; Metabolismo de carbohidratos	<i>Butanoate metabolism</i>	13	0.93	1.83	0.0014
Metabolismo; Metabolismo de terpenoides	<i>Terpenoid backbone biosynthesis</i>	19	0.93	1.85	0.0029
	<i>Propanoate metabolism</i>	20	-0.75	-1.65	0.0131
Procesamiento de Información Genética; Plegado, clasificación y degradación	<i>SNARE interactions in vesicular transport</i>	27	-0.77	-1.74	0.0137
	<i>Protein processing in endoplasmic reticulum</i>	133	-0.52	-1.48	0.0307
Procesos Celulares; Comunidad celular - eucariotas	<i>Tight junction</i>	136	0.63	1.54	0.0403
Procesos Celulares; Transporte y catabolismo	<i>Lysosome</i>	118	-0.62	-1.74	0.0022
Sistemas de Organismos; Sistema endocrino	<i>PPAR signaling pathway</i>	50	-0.65	-1.59	0.0258
Sistemas de Organismos; Sistema inmunitario	<i>Intestinal immune network for IgA production</i>	41	0.89	1.89	0.0005

Por otra parte, tanto a los 26 d como a los 56 d diferentes rutas vinculadas con el procesamiento de la información genética, el sistema endócrino, el transporte y catabolismo fueron inactivadas, mientras que la ruta de conexiones intercelulares Tight Junction se mantuvo activada.

A los 26 d en la gónada de la tilapia expuesta repetidamente a BaP (3 mg/kg), únicamente 5 rutas fueron afectadas. De las rutas afectadas 4 pertenecieron al metabolismo de aminoácidos como el metabolismo de alanina, aspartato y glutamato, metabolismo de histidina y metabolismo de taurina e hipotaurina fueron suprimidos mientras que solamente el metabolismo de triptófano fue activado. También, se observó que el metabolismo de butanoato (butirato o ácido butírico) fue suprimido (Figura 28).

En contraste con los resultados anteriores, a los 56 d fueron afectadas 38 rutas, de las cuales 22 fueron suprimidas y 16 activadas. Las rutas principales suprimidas fueron del metabolismo de energía la fosforilación oxidativa y de la traducción de la información genética la ruta ribosoma. De las principales rutas activadas fueron del metabolismo de lípidos la biosíntesis de ácidos biliares primarios y de moléculas de señalización e interacción la vía de interacción de receptores citoquina-citoquina. También, se observó que únicamente el metabolismo del triptófano se mantuvo activado en ambos tiempos de exposición (Tabla 21).

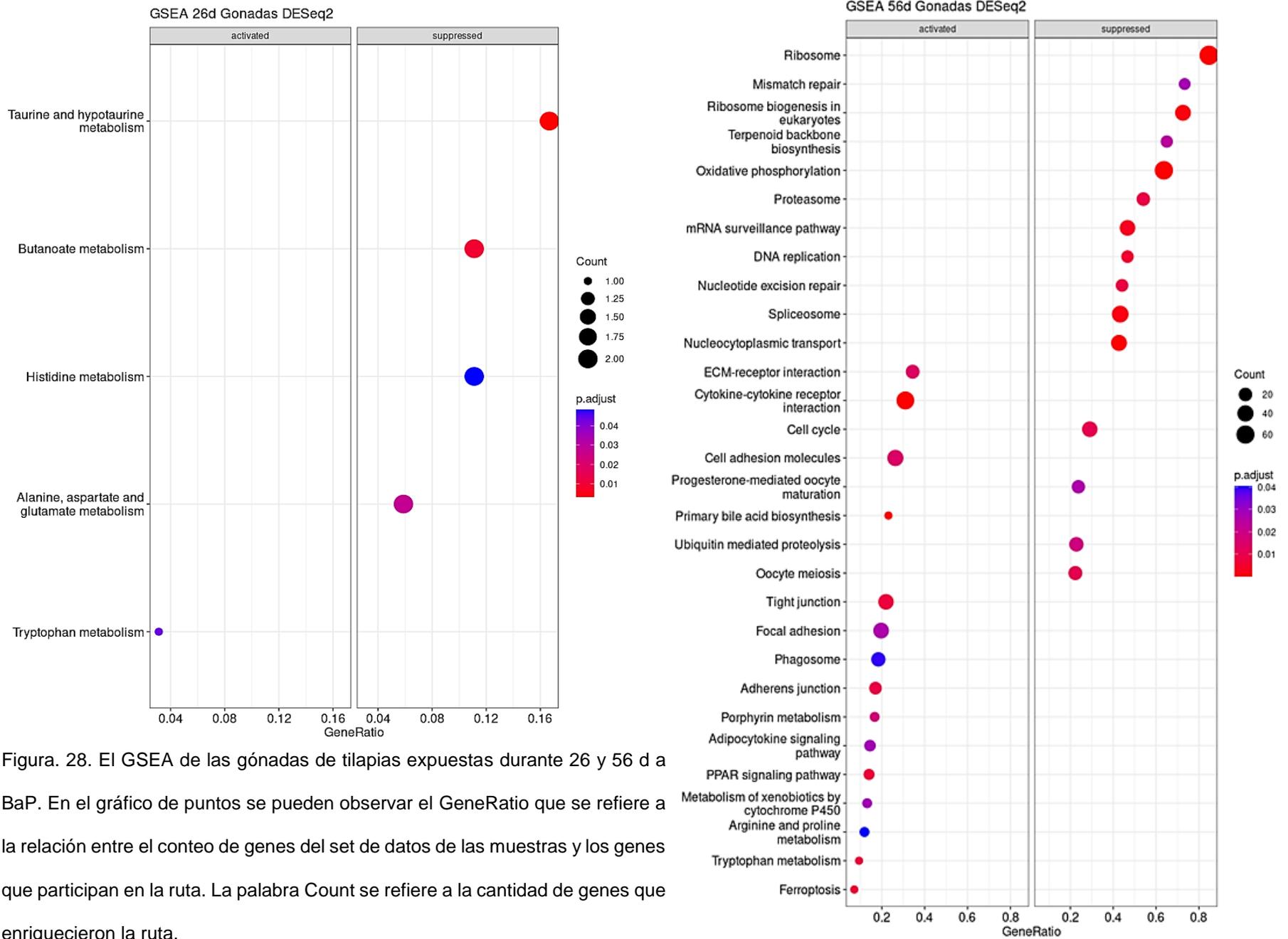


Figura. 28. El GSEA de las gónadas de tilapias expuestas durante 26 y 56 d a BaP. En el gráfico de puntos se pueden observar el GeneRatio que se refiere a la relación entre el conteo de genes del set de datos de las muestras y los genes que participan en la ruta. La palabra Count se refiere a la cantidad de genes que enriquecieron la ruta.

Tabla 21. Análisis de enriquecimiento de set de genes (GSEA) de las gónadas de la tilapia expuesta a dosis repetidas de BaP durante 26 y 56 d.

GÓNADAS DE 26 D					
Clase	Ruta	setSize	enrichmentScore	NES	pvalue
Metabolismo; Metabolismo de aminoácidos	<i>Alanine, aspartate and glutamate metabolism</i>	34	-0.9999	-1.9957	0.0277
	<i>Tryptophan metabolism</i>	32	0.9992	1.5888	0.0434
	<i>Histidine metabolism</i>	18	-0.9987	-1.9585	0.0485
	<i>Taurine and hypotaurine metabolism</i>	12	-0.9999	-1.9020	0.0030
Metabolismo; Metabolismo de los carbohidratos	<i>Butanoate metabolism</i>	18	-0.9999	-1.9609	0.0091
GÓNADAS DE 56 D					
Metabolismo; Metabolismo de energía	<i>Oxidative phosphorylation</i>	99	-0.6853	-2.2320	2.11E-08
Metabolismo; Biodegradación y metabolismo de xenobióticos	<i>Metabolism of xenobiotics by cytochrome P450</i>	38	0.6280	1.6481	0.0287
Metabolismo; Metabolismo de aminoácidos	<i>Tryptophan metabolism</i>	32	0.7336	1.8735	0.0081
	<i>Arginine and proline metabolism</i>	42	0.5911	1.5754	0.0405
Metabolismo; Metabolismo de cofactores y vitaminas.	<i>Porphyrin metabolism</i>	30	0.7223	1.8264	0.0177
	<i>Vitamin B6 metabolism</i>	5	-0.8588	-1.5797	0.0414
Metabolismo; Metabolismo de lípidos	<i>Primary bile acid biosynthesis</i>	13	0.9421	2.1571	3.36E-05
Metabolismo; Metabolismo de terpenoides	<i>Terpenoid backbone biosynthesis</i>	20	-0.6756	-1.6860	0.0240
Procesamiento de Información Genética; Plegado, clasificación y degradación	<i>Proteasome</i>	37	-0.6323	-1.7572	0.0090
	<i>Ubiquitin mediated proteolysis</i>	114	-0.4582	-1.5313	0.0185
	<i>RNA degradation</i>	56	-0.4802	-1.4273	0.0490
Procesamiento de Información Genética; Replicación y reparación	<i>DNA replication</i>	30	-0.6724	-1.8245	0.0055
	<i>Nucleotide excision repair</i>	34	-0.6398	-1.7730	0.0083
	<i>Mismatch repair</i>	15	-0.7118	-1.6748	0.0279
	<i>Homologous recombination</i>	31	-0.6072	-1.6528	0.0281
	<i>Fanconi anemia pathway</i>	40	-0.5228	-1.4833	0.0447
Procesamiento de Información Genética; Traducción	<i>Ribosome</i>	85	-0.7732	-2.4544	1.00E-10
	<i>Nucleocytoplasmic transport</i>	89	-0.6045	-1.9447	0.0001
	<i>Ribosome biogenesis in eukaryotes</i>	51	-0.6436	-1.8943	0.0010
	<i>mRNA surveillance pathway</i>	75	-0.5601	-1.7399	0.0030
	<i>Aminoacyl-tRNA biosynthesis</i>	33	-0.5502	-1.5042	0.0424
Procesamiento de Información Genética; Transcripción	<i>Spliceosome</i>	104	-0.5295	-1.7334	0.0014
	<i>RNA polymerase</i>	22	-0.6774	-1.7258	0.0285
	<i>Basal transcription factors</i>	29	-0.5905	-1.5869	0.0312
Procesos Celulares; Comunidad celular - eucariotas	<i>Tight junction</i>	155	0.5095	1.6545	0.0072
	<i>Adherens junction</i>	88	0.5870	1.7562	0.0090
	<i>Focal adhesion</i>	183	0.4407	1.4612	0.0266
Procesos Celulares; Crecimiento y muerte celular.	<i>Ferroptosis</i>	42	0.6822	1.8181	0.0064
	<i>Cell cycle</i>	117	-0.4684	-1.5694	0.0103
	<i>Oocyte meiosis</i>	103	-0.4854	-1.5890	0.0105
Procesos Celulares; Transporte y catabolismo	<i>Phagosome</i>	136	0.4448	1.4091	0.0395
Sistemas de Organismos; Sistema endocrino	<i>PPAR signaling pathway</i>	57	0.6564	1.8251	0.0069
	<i>Progesterone-mediated oocyte maturation</i>	80	-0.4782	-1.5060	0.0264
	<i>Adipocytokine signaling pathway</i>	69	0.5376	1.5530	0.0286
Sistemas de Organismos; Sistema inmunitario	<i>Intestinal immune network for IgA production</i>	46	0.5999	1.6238	0.0464
Procesamiento de la Información Ambiental; Moléculas de señalización e interacción.	<i>Cytokine-cytokine receptor interaction</i>	184	0.6548	2.1761	1.29E-07
	<i>ECM-receptor interaction</i>	64	0.6120	1.7443	0.0136
	<i>Cell adhesion molecules</i>	152	0.4885	1.5830	0.0142

DISCUSIÓN

1. CAMBIOS MORFOMÉTRICOS Y DAÑOS HISTOLÓGICOS EN HÍGADO Y GÓNADAS

Diversas investigaciones han reportado que la exposición a BaP puede representar un desafío para mantener una condición corporal y reproductiva saludable de peces (Booc *et al.*, 2014; Hoffmann & Oris, 2006; Loughery *et al.*, 2018). Después de una exposición subcrónica observamos que el factor K a los 56 d de los organismos tratados con BaP fue menor que a los de 2 y 8 d y que el IGS tendió a incrementar en los organismos control con el paso del tiempo en contraste a lo observado en los organismos tratados con BaP. No obstante, en un estudio se observó que a los 26 d de exposición todos los índices morfométricos (K, IHS e IGS) se redujeron significativamente en comparación con los organismos control (Collí-Dulá *et al.*, 2018). En una investigación llevada a cabo por Kopecka-Pilarczyk & Correia (2009), se reportaron resultados similares a los de este estudio. Los autores observaron que una mezcla de HAP en un tiempo de exposición corto pudo reducir significativamente el factor de condición del pez besugo (*Sparus aurata*), pero no ocasionó cambios en el IHS. Por otra parte, la exposición a 10 µg/L de BaP durante 14 a 28 d pudo disminuir el peso de las gónadas en el pez *F. heteruclitus*, pero tampoco ocasionó cambios en el IHS (Booc *et al.*, 2014).

La exposición a xenobióticos puede ocasionar disturbios en el crecimiento y el desarrollo de los organismos debido a la interferencia de los contaminantes con rutas metabólicas y de señalización clave y al gasto energético para mantener la homeostasis (Meyer *et al.*, 1992). A pesar de que en este estudio no se observaron diferencias significativas en la mayoría de los tiempos de exposición, algunas investigaciones

recientes, han reportado que la exposición subcrónica a BaP puede afectar rutas relacionadas con el metabolismo de energía junto con la reducción de índices morfométricos, pérdida de peso y reducción de la salud de organismos acuáticos (Collí-Dulá *et al.*, 2018; Yu *et al.*, 2018). No obstante, el que no se hallan observado cambios significativos a los 56 d de exposición, pero si a los 26 d podría estar relacionado con diferencias en las fases reproductivas y el tamaño de la muestra entre los grupos control y tratados con BaP. Así mismo, los cambios del índice hepatosomático está más relacionado con exposiciones crónicas a xenobióticos (Pilarczyk & Correia, 2009). Por otra parte, en un estudio se observó que a los 26 d de exposición subcrónica a BaP todos los índices disminuyeron (Collí-Dulá *et al.*, 2018). A lo que los autores señalaron que esto pudo deberse al proceso de desintoxicación y el estrés ocasionado por el BaP (Gravato & Guilhermino, 2009; Tintos, *et al.*, 2008), pero también en ese estudio se observaron cambios transcripcionales relacionados con la activación de rutas involucradas en el metabolismo de energía lo cual sugirió el consumo de la energía debido a la exposición a BaP (Collí-Dulá *et al.*, 2018).

Con relación a la evaluación de los daños histológicos encontrados a los 2 d posteriores a la primera inyección *ip* el hígado y gónada que se escindieron de las tilapias control y tratados con BaP, se observaron algunas lesiones focales en el hígado de ambos grupos como la necrosis y la degeneración grasa. La necrosis y la degeneración grasa son patologías que han sido observadas en diferentes tejidos de organismos bajo estrés oxidativo y condiciones de hipoxia ocasionados por diversos factores tales como los aditivos alimentarios y contaminantes (Thompson & Bannigan, 2008; Polavarapu *et al.*, 1998). Contaminantes como el cloruro de cadmio (CdCl₂) pueden ocasionar cambios hepáticos que van desde la degeneración celular moderada hasta la necrosis multifocal

(El-Ashmawy & Youseff, 1999; Sauer *et al.*, 1997). La necrosis focal en el hígado y en las células hepáticas puede ser observada desde las 24 y 48 h después de exposición a contaminantes como el Cd y el BaP, respectivamente (Sauer *et al.*, 1997; Lin & Yang, 2008), pero esta patología también se ha visto detectada junto con acumulación de grasa en organismos alimentados con alimentos altos en lípidos. Tanto mamíferos como peces alimentados con ácidos grasos poliinsaturados muestran signos de moderados a extensos de acumulación de grasa en el hígado después de 4 semanas de constante consumo (Polavarapu *et al.*, 1998; Jia *et al.*, 2020). En este estudio las tilapias se alimentaron con alimento comercial de la marca Campi. Los resultados de este estudio son relevantes, debido a que investigaciones recientes han revelado que el alimento comercial por su composición tiende a ocasionar esteatosis y daños hepáticos en las tilapias en sistemas de cultivo (Tao *et al.*, 2018, Jia *et al.*, 2020; Li *et al.*, 2020). Esto podría explicar la elevada prevalencia de la degeneración celular hallada en cada grupo experimental y que no se observaran diferencias significativas de daño histológico entre ningún tiempo de exposición. Aun así, la prevalencia de la necrosis de focal (a los 2 y 26 d) a extendida (a los 56 d) en los grupos tratados con BaP fue siempre del 100% en comparación con los grupos controles, lo cual puede ser explicado por el incremento del estrés oxidativo, también ocasionado por el metabolismo del BaP e incluso encontramos fibrosis focal en un organismo expuesto durante 56 d a BaP, lo cual nos indica el incremento de la susceptibilidad a tener cirrosis no alcohólica y cáncer de hígado por la exposición al contaminante, esto soportado con la aparición focal de pleomorfismos únicamente en las tilapias inyectadas con BaP.

En las gónadas de los organismos expuestos a BaP se observaron diversas patologías tales como necrosis, pleomorfismos, atrofas, edemas, granulomas y

degeneración celular, e incluso neoplasias, en los grupos de 26 y 56 d de tilapias tratadas con BaP. La exposición a BaP puede ocasionar efectos adversos en la reproducción de organismos macho (Revel *et al.*, 2001; Sha *et al.*, 2021; Yang *et al.*, 2021). En una investigación llevada a cabo con ratones macho inyectados con BaP durante 5 semanas (dosis de 0.5 a 50 mg/kg) se demostró la relación positiva de un rango de dosis de BaP (dosis 0,5 a 5 mg/semana) con la apoptosis de los espermatozoides y las dosis más elevadas incrementaron la necrosis de los espermatozoides. Además, el BaP indujo significativamente la apoptosis en espermatogonias y aumentó la formación de aductos de ADN de BPDE en espermatozoides y la apoptosis en los testículos del ratón (Revel *et al.*, 2001). En otro estudio con la carpa *Cyprinus carpio*, tras la exposición a BaP, se produjo hipertrofia de las células gonadales, así como también el incremento de los núcleos picnóticos o vacuolares, abultamiento y cavitación de los orgánulos y fuga de citoplasma (Sha *et al.*, 2021). Incluso en bivalvos como las vieiras *Chlamys farreri* después de la exposición a BaP se observó atrofia de los folículos testiculares, desprendimiento de espermatozoides, vacuolización del citoplasma y estructuras radiales dañadas en machos y los efectos registrados fueron dependientes del tiempo de exposición y de la concentración de BaP. Incluso, en ese estudio se observó que las mitocondrias y los microsomas fueron más vulnerables a la peroxidación de lípidos y la carbonilación de proteínas que otros orgánulos celulares y que los machos fueron más susceptibles al daño en el ADN que las hembras expuestas a los contaminantes. Los autores también señalaron que los daños histológicos en las gónadas pueden reducir la calidad y la cantidad de gametos, inducir la disfunción reproductiva y, finalmente, reducirían la sostenibilidad del bivalvo (Yang *et al.*, 2021). También, se ha sugerido que el metabolismo de BaP podría ser el causante de los daños histológicos ya que el BaP

puede inducir la expresión de enzimas de la fase 1 de la biotransformación de xenobióticos que pueden producir metabolitos que forman aductos con el ADN. La constante exposición y daño a la estructura del ADN incrementaría la apoptosis de las células germinales y por consiguiente el daño al tejido (Revel *et al.*, 2001).

2. CAMBIOS METABÓLICOS EN LA TILAPIA

2.1. Compuestos aromáticos fluorescentes (CAF) en la bilis

Aunque los CAF se han sido utilizados en campo como indicadores de exposición a HAP en peces (Meador *et al.*, 1995), en estudios de laboratorio, la cuantificación de CAF en bilis proporciona información sobre la biotransformación del BaP (Costa *et al.*, 2011; Mdegela *et al.*, 2006). En este estudio a 2 d de la exposición con BaP la concentración de los CAF incrementó significativamente (Figura 12) y durante todos los tiempos de exposición (2, 8, 26 y 56 d). Estos resultados fueron similares a los encontrados en la bilis de peces *C. gariepinus*, en los que la concentración máxima de CAF se produjo 3 días después de la exposición a 5 mg/kg de BaP (Mdegela *et al.*, 2006) y en la tilapia del Nilo 2 d después de la exposición *ip* a BaP (20 mg/kg) (García-Tavera *et al.*, 2013). No obstante, Albornoz-Abud *et al.* (2021) que emplearon una concentración más elevada de BaP (40 mg/kg) en tilapias de menor talla (juveniles) observaron el incremento de los CAF después de la exposición aguda a BaP, pero el aumento que observaron fue variable entre los organismos y no fue significativo. Con base en estos resultados se puede inferir que al administrar concentraciones elevadas de BaP vía inyección intraperitoneal, se puede llegar a presentar el efecto depósito del BaP y que este puede cristalizar en zonas cercanas a su administración lo que lleva al retraso de su liberación y por lo tanto el retraso del metabolismo y excreción por medio de la bilis (Beyer

et al., 1997). Otro factor que puede influir en la capacidad metabólica es el tamaño del hígado de los peces (Kopecka-Pirczyk & Correia, 2009). Estos aspectos podrían explicar los resultados observados en estos estudios, ya que tanto el tamaño del pez como el tamaño del hígado fueron mucho más pequeños en la exposición aguda a una dosis elevada de BaP, en comparación con la exposición subcrónica a una dosis de 3 mg/kg de BaP. Por otro lado, a los 56 d notamos que la concentración de los CAF fue mayor con respecto a otros tiempos de exposición, lo que puede indicar o el incremento de la capacidad metabólica de las tilapias o que el BaP se había estado acumulando con las anteriores exposiciones.

2.2. Cambio metabólico en el hígado y las gónadas

En el análisis metabolómico en el hígado se detectaron 19 metabolitos, entre ellos aminoácidos esenciales y no esenciales, metabolitos que participan en la síntesis de energía, formas vitamínicas, metabolitos biliares, entre otros. A los 2 d de exposición con BaP, el hígado de la tilapia el lactato o ácido láctico fue el único metabolito que incremento significativamente más de 2 veces en comparación con el control. El lactato es un metabolito que se produce a partir del piruvato durante la glucólisis anaeróbica (Rodwell *et al.*, 2018). En el plasma de la trucha arcoíris (*Oncorhynchus mykiss*) han encontrado resultados similares, pues a las 24 y 72 h de la exposición *ip* de 10 mg/kg de β -naftoflavona o BaP, se encontró que el lactato y la glucosa incrementaron significativamente en el plasma, así como también la glucólisis y la gluconeogénesis se incrementaron en el hígado (Tintos *et al.*, 2008). Otros estudios, también han detectado el incremento de lactato y la glucólisis acelerada en pacientes con enfermedades hepáticas aguda y crónicas, específicamente con pacientes con cirrosis (Jeppesen *et al.*, 2013). En este estudio, el resultado del análisis de metabolitos muestra que hay una

disminución significativa de la glucosa y el incremento del lactato en todos los tiempos de exposición en los organismos tratados con BaP. Estos resultados junto con los histológicos indican que los organismos ya tenían una falla hepática probablemente debida a la alimentación. Más aun, en este tiempo de exposición se detectaron que los cambios en las concentraciones de metabolitos afectaron principalmente a rutas como el metabolismo de glicerolípidos, el metabolismo de nicotinato y nicotinamida, el metabolismo de alanina, aspartato y glutamato y el metabolismo de D-glutamina y D-glutamato. Resultados similares han sido encontrados en un estudio en donde se llevó a cabo la microextracción fase-sólida en vivo de compuestos endógenos del músculo de la trucha arcoíris, en donde a la dosis 10 ng/L de BaP detectaron metabolitos que son activos en la transformación de ácidos grasos que participan en el metabolismo de glicerolípidos, a lo cual ellos sugieren que esta respuesta indica que el BaP ejerce un gran impacto en el metabolismo de energía (Roszkowska *et al.*, 2018).

Por otra parte, en las gónadas de las tilapias a diferencia del hígado, solo se detectaron 16 metabolitos. En este órgano no se observó la presencia de la colina, colato, niacinamida ni el nicotinurato, pero si se detectó el osmolito betaína. Y de nuevo se observó el incremento significativo de lactato, alanina y adenina a los 56 d posterior a la inyección *ip* con BaP. Tanto el incremento de lactato y nucleótidos de adenina se han vinculado con efectos anti apoptóticos en testículos de humanos. El lactato es uno de los principales metabolitos producidos por las células de Sertoli y es utilizado como sustrato para la formación de energía. A pesar de que en otros órganos el rol de lactato es variado, en células germinales masculinas la reducción de lactato puede disminuir su viabilidad e incluso el tratamiento con lactato de células germinales de ratas ha demostrado que puede mejorar la espermatogénesis (Revisado en: Erkkilä *et al.*, 2002). Por otra parte, la

purina adenina juega un rol importante en procesos celulares como en el metabolismo de energía, señalización celular y la construcción del material genético (Chua & Fraser, 2020). No obstante, la síntesis *de novo* de purinas que ocurre cuando existe un déficit de estas, es una ruta metabólica costosa para la célula en cuestión de energía y que su inducción ha sido vinculada con marcas de cáncer. En contraste a esta ruta se encuentra la ruta de salvación de purinas que ayuda a producir nucleótidos de purinas como la adenosina monofosfato (AMP por sus siglas en inglés) que es un metabolito ubicuo que controla muchas respuestas celulares como la apoptosis y además es importante para producción de ATP. La AMP puede producirse por la fosforilación de la purina adenina en la ruta de salvación de las purinas la cual es utilizada preferentemente por las células debido al bajo costo energético (Huang *et al.*, 2021). En este estudio, se observó en las gónadas la inducción del metabolismo de purinas, esta respuesta junto al incremento de lactato podría indicar una respuesta ante el incremento de la demanda de energía para mantener la homeostasis en las células germinales en las gónadas, pero por otra parte también podría sugerir el favorecimiento de un microambiente ácido para la proliferación de células cancerosas (Huang *et al.*, 2021). Esto último podría tener una relación con el incremento de neoplasias focales que se observaron a los 26 y 56 d de exposición a BaP.

3. CAMBIOS EN LA EXPRESIÓN GÉNICA

3.1. Cambios en la expresión de genes relacionados con el eje somatotrópico GH/IGF, la inducción del metabolismo de BaP (*cyp1a*, *cyp1b1* y *gsta*) y el daño al ADN (*gadd45β*).

En este estudio se observó que la exposición con BaP (3 mg/kg) tiene un mayor efecto sobre los niveles de ARNm de *igf1-2* en tiempos cortos de exposición. Mientras

que en las gónadas de tilapia se observó una disminución significativa de *igf1* a 2 d post exposición, en el hígado se encontró la disminución de *igf2* a 8 d. En Shved *et al.* (2008), analizaron tilapias macho expuestas a 5 ng/L y 25 ng/L de 17 α -etinilestradiol (EE2) y observaron que la expresión de *igf1* disminuyó. También, los autores señalaron que la diferencia en la expresión de *igf1* en estos órganos puede deberse a variaciones en el mecanismo de comunicación cruzada de IGF-1-estrógeno entre la parte endocrina del sistema IGF1 (hígado) y la autocrina/paracrina (gónadas). Otros autores también han encontrado que compuestos como el estradiol (E2) y el 4-nonilfenol pueden reducir la expresión de *ghr* e *igf* y la capacidad de unión de GH en el hígado en peces teleósteos (Lerner *et al.*, 2012; Norbeck & Sheridan, 2011). Así mismo, la diferencia en la expresión de *igf1–2* encontrada también puede ser ocasionado por diferencias en la distribución de IGF en los tejidos de tilapia del Nilo, además de la dependencia de la etapa de desarrollo del organismo (Berishvili *et al.*, 2006).

Por otro lado, los niveles elevados de VTG en tilapias macho está relacionado con la exposición a contaminantes (Okoumassoun *et al.*, 2002; Rodas-Ortíz *et al.*, 2008). En este estudio con la exposición a BaP (3 mg/kg) se redujeron significativamente los niveles de *vtg* a los dos días después de la primera inyección en la tilapias expuestas. Después los niveles de *vtg* parecieron restablecerse y fueron muy similares a los del grupo de control. Resultados similares fueron hallados por Booc *et al.* (2014) quienes observaron que la expresión del ARNm de *vtg* disminuyó en peces machos adultos de *F. heteroclitus* después de la exposición a BaP (1 μ g/L y 10 μ g/L). Aunque la información sobre la importancia biológica de la VTG en peces macho es escasa, en tilapia se sabe que la inducción de VTG es dependiente de estrógenos (Kim *et al.*, 2003; Chen *et al.*, 2020). Por ejemplo, en tilapia macho colectada en lagos contaminados en el sur de México, se

ha observado una relación positiva de la concentración de E2 en plasma y los niveles de VTG (Rodas-Ortiz *et al.*, 2008). También, en peces los niveles de testosterona en plasma y anomalías gonadales se ha correlacionado inversamente con los niveles de VTG (Hashimoto *et al.*, 2000; Mills *et al.*, 2003). La exposición a BaP, puede ocasionar en peces teleósteos la disminución de los niveles de E2 y testosterona (Booc *et al.*, 2014; Yan *et al.*, 2012), lo cual podría explicar la inhibición de los niveles de ARNm de *vtg* en tilapias macho adultas observadas en este estudio y podría indicar la supresión del eje cerebro-hipófisis-gónada (BPG) por BaP (Gao *et al.*, 2018). No obstante, el patrón de *vtg* observado en esta tesis sugiere que el aumento de *vtg* podría depender del tiempo de exposición y que su inducción podría ser causada por una condición crónica.

La inducción en el hígado de las enzimas de fase 1 de biotransformación de HAP (*cyp1a1* y *cyp1b1*) es un biomarcador de exposición a estos contaminantes (Goksøyr, 1994; Livingstone, 1993; Shimada, 2006; van der Oost *et al.*, 2003). Pero, solo algunas investigaciones han evaluado la inducción de estas enzimas en los órganos reproductivos (Butala *et al.*, 2004; Willett *et al.*, 2006; Woo & Chung, 2020). En este estudio, solo el gen *cyp1b1* se indujo significativamente en el hígado de la tilapia expuesta a BaP, pero en las gónadas tanto los niveles de ARNm de *cyp1a1* como de *cyp1b1* incrementaron significativamente post inyección *ip* con BaP. Otros estudios también han mostrado resultados similares, por ejemplo, en las tilapias inyectadas *ip* con pireno (20 mg/kg) y BaP (1 mg/L), la actividad de EROD incrementó cientos de veces, pero la enzima CYP1A fue muy baja y menor a dos veces en magnitud (Hassanain *et al.*, 2007; Zapata-Pérez *et al.*, 2002). El incremento de la actividad EROD no está necesariamente relacionado con el incremento de CYP1A (Jimenez & Stegeman, 1990). También, en otras especies de teleósteos se han observado respuestas similares, e incluso se ha sugerido que otros

miembros de la familia CYP1 podrían llevar a cabo la biotransformación de manera más eficiente del BaP (Karami *et al.*, 2011). Por otra parte, la inducción de *cyp1b* en hígado y gónadas se ha observado en el bagre macho 4 días después de una exposición *ip* a 20 mg/kg de BaP (Willett *et al.*, 2006). En humanos la enzima *cyp1b1* puede catalizar la biotransformación de BaP en el metabolito tóxico trans-7,8-dihidroxi-7,8-dihidrobenc[α]pireno de manera más eficiente que la enzima *cyp1a1*, por lo que se ha sugerido que la inducción de *cyp1b1* podría hacer a un órgano más propenso al cáncer (Shimada *et al.*, 1999; Schlenk *et al.*, 2008). Los resultados de este trabajo sugieren que tanto el hígado como los testículos de la tilapia del Nilo pueden ser susceptibles a los efectos tóxicos de la biotransformación de BaP. Estos resultados son novedosos y relevantes.

La enzima GST α está involucrada en la fase 2 de la biotransformación de HAP y en diversos estudios su inducción ha sido ampliamente utilizada como biomarcador de contaminación ambiental y estrés oxidativo (Costa *et al.*, 2011; Lu *et al.*, 2009; Santana *et al.*, 2018). No obstante, algunos estudios han encontrado que el BaP puede inhibir a la enzima GST en el hígado de *E. marginatus* y en *O. niloticus* (Salvo *et al.*, 2016; Costa *et al.*, 2011). En este trabajo, se observó la inducción de *gst α* en hígado y la reducción significativa en las gónadas a los 2 d posteriores a la inyección *ip*. No obstante, en el hígado 26 d posteriores a la exposición con BaP, la expresión de este gen se redujo lo cual podría indicar que después de varias dosis de BaP la capacidad de biotransformación en el hígado podría estar disminuyendo. La enzima *gst* requiere del glutatión para llevar a cabo la reacción de conjugación con los metabolitos oxidados provenientes de la fase 1 de biotransformación. No obstante, bajo estrés oxidativo severo, los niveles de glutatión pueden irse a la baja ya sea por la oxidación o por la carencia de

rasgos adaptativos de las especies, lo cual conllevaría a la reducción de la expresión de *gst* (Oliva *et al.*, 2010; Sun *et al.*, 2008). Revel *et al.* (2001) encontraron que el BaP en testículos de ratas induce la formación de aductos con el ADN con metabolitos mutagénicos conforme incrementa la concentración del contaminante y también aumenta la apoptosis y la necrosis de las células germinales. En este estudio, el incremento de *cyp1b1* y la disminución de *gst α* conforme pasa el tiempo podría estar relacionado con el incremento de daños histológicos que observamos en ambos órganos.

Por otra parte, en este trabajo también se analizó la expresión del biomarcador de daño al ADN *gadd45 β* tras la exposición a BaP. Ante la exposición a agentes genotóxicos como la luz ultravioleta, se ha observado la inducción de *gadd45 β* y su relación con la activación de puntos de control de desarrollo celular en las fases S y G2/M tras la exposición a estos agentes (Salvador *et al.*, 2013). La familia *gadd45* es inducida por agentes genotóxicos, en la diferenciación terminal y por citoquinas inflamatorias (Liebermann & Hoffman, 2008; Vairapandi *et al.*, 2002). En este estudio se observó un incremento significativo de la expresión de *gadd45 β* después de 2 d de exposición en ambos órganos y a los 26 d pero solo en el hígado. Se ha visto que el daño al ADN inducido por la exposición a BaP ocasiona el incremento de los niveles de ARNm de *gadd45 β* (Guerrero-Castilla & Olivero-Verbel, 2014). Por lo que los resultados de este estudio podrían indicar que la reparación del ADN en el hígado de la tilapia expuesta a BaP se indujo ante la exposición aguda y subcrónica a BaP.

3.2. Cambios en el perfil de transcritos relacionado con el metabolismo de lípidos, metabolismo de xenobióticos y el sistema inmune

Tanto a los 26 y 56 d de exposición se encontró la disminución significativa de la expresión de genes vinculados con el metabolismo y el transporte de ácidos grasos, cómo

el gen acetil-CoA carboxilasa alfa (*acaca*), apolipoproteínas Ea y Ea4b.2 (*apoEa-a4b.2*), el receptor de ácidos grasos proteína de unión a ácidos grasos 7a (*fabp7a*), la acetil CoA citrato liasa a (*acly*) y la sintasa de ácidos grasos (*fasn*). Incluso con los análisis de enriquecimiento de genes que el metabolismo de lípidos como la biosíntesis de ácidos grasos y su elongación, así como el metabolismo de glicerolípidos fueron decrecientadas a los 26 y 56 d se observó la inactivación de la vía de señalización PPAR y de la fosforilación oxidativa, pero el metabolismo del butirato incrementó significativamente. En estudios recientes se ha observado que el estrés inducido por diferentes factores como contaminantes puede reducir el metabolismo de lípidos. Datos transcriptómicos sobre la exposición prolongada al plaguicida glifosato, demostraron que este puede suprimir la ruta de señalización PPAR en la tilapia del Nilo (Jia *et al.*, 2022). La desregulación de la señalización de PPAR podría ocasionar la disminución de genes involucrados en el metabolismo de lípidos, lo que al final desencadenaría la reducción de la oxidación de los ácidos grasos y efectos adversos en la expresión de lipoproteínas, la deposición de lípidos en el hígado y el subsecuente daño hepático (Wilbanks *et al.*, 2014; Huang *et al.*, 2018). Por otra parte, la inducción del metabolismo del butanoato está implicado en la regulación de la lipogénesis y en aliviar enfermedades metabólicas como el hígado graso no alcohólico. Se ha encontrado que el butanoato puede incrementar el metabolismo de energía e inducir la oxidación de grasas y la reducción de la esteatosis hepática, no obstante, la vía de señalización para regular la homeostasis metabólica hepática por butirato aun es desconocida, pero se ha visto que puede activar el metabolismo de lípidos mediante la vía de señalización AMPK (Zhao *et al.*, 2021). Por lo tanto, los resultados de este estudio sugieren que en respuesta a la acumulación de lípidos que se observó en

las pruebas histológicas del hígado, la activación del metabolismo del butirato podría ser una vía para activar la oxidación de lípidos en el hígado de la tilapia.

En los resultados transcriptómicos, también se detectó que genes relacionados con el metabolismo de xenobióticos fueron inducidos significativamente tanto en el hígado como en las gónadas de la tilapia expuesta a BaP por 26 y 56 d salió incrementada la expresión de *cyp1b1*. Resultados que están relacionados con los datos que se obtuvieron del análisis de expresión con PCR en tiempo real (qPCR). Con estos datos del perfil del transcriptoma incluso se observó que a los 56 d de exposición en el hígado se llevó a cabo la inducción significativa de la expresión del gen que codifica al represor del receptor de arilo de hidrocarburos (*ahrr*). La vía del receptor de hidrocarburo de arilo (AhR) es conocida por modular procesos celulares, especialmente los relacionados con el metabolismo de tóxicos químicos como las dioxinas y compuestos similares a dioxinas, además de estar asociado con la formación de neoplasias malignas (Haarmann-Stemann & Abel, 2006; Vogel *et al.*, 2019). El represor *ahrr*, es una proteína que similar a *ahr* que puede reprimir su señalización mediante la competencia por el translocador nuclear de arilo de hidrocarburo ARNT, también se ha asociado su actividad con la represión de respuestas inflamatorias y como supresor de tumores (Vogel & Haarmann-Stemann, 2017; Vogel *et al.*, 2019). En un estudio reciente llevado a cabo en ratones transgénicos que sobre expresaban el *ahrr* observaron que esta característica le permitía al organismo reducir el efecto tóxico de la 2,3,7,8-tetraclorodibenzo-p-dioxina (TCDD) y el crecimiento tumoral inducido por la inflamación ante la exposición a células de linfoma e incluso se ha observado que posee la capacidad de inhibir la respuesta anti apoptótica (Vogel *et al.*, 2019). Otros autores, han especulado que niveles elevados de *ahrr* en ciertos tejidos como en los testículos pueden proteger a órganos susceptibles a daños

por metabolitos tóxicos generados por enzima como la *cyp1a*, mediante la reducción de la expresión constitutiva del gen *cyp1a* (Yamamoto *et al.*, 2004).

En las gónadas en ambos tiempos de exposición se encontró que la exposición a BaP indujo significativamente la expresión tanto del gen *cyp1b1* y del gen vinculado con el sistema inmunológico *gimap4*. Otro cambio que se detectó en las gónadas relacionado con el sistema inmune fue la activación de la vía red inmunitaria intestinal para la producción de inmunoglobulina A. En testículos de mamíferos se han detectado diferentes tipos de células T que están implicados en la respuesta inmunológica de este órgano que permite que se lleve a cabo el proceso espermatogénico normal (Gong *et al.*, 2020). No obstante, se ha descubierto que la inducción de *gimap4* acelera la muerte celular programada en células T (Schnell *et al.*, 2006) y que cambios en su patrón de expresión podría afectar la viabilidad de los espermatozoides, ya que este gen igual está involucrado en la adecuada formación del acrosoma espermático, por lo que su disminución podría ser causa de problemas en calidad espermática (Escalier *et al.*, 1991; Dere *et al.*, 2017). En peces resistentes, se ha observado que procesos infecciosos pueden inducir rápidamente la respuesta inmune mediante el incremento fuerte y en un periodo de tiempo corto de diversos genes parálogos de *gimap4* en el intestino (Barrett *et al.*, 2021). En esta investigación la inducción de la expresión del gen *gimap4* desde los 26 días de exposición a BaP podría indicar que en las gónadas de la tilapia hay una respuesta inmunológica para mantener la viabilidad del esperma, no obstante, los resultados de histología demuestran que a los 56 d de exposición algunos organismos expuestos a BaP ya presentaban cistos con parásitos, lo cual podría estar relacionado con el incremento en la inducción del gen *gimap4* y la activación de la red inmunitaria para la producción de IgA. En vertebrados machos se ha observado que los testículos

están protegidos de los patógenos por la respuesta inmune mediada por IgA (Jiri & Russel, 2000; Qian *et al.*, 2021). En peces teleósteos los linfocitos B producen inmonoglobulinas que se adhieren a las paredes de los cuerpos extraños para promover la fagocitosis (Chavez-Pozo *et al.*, 2018) y en otros estudios, se ha vinculado que agentes tóxicos como los HAP vía AhR pueden inducir la expresión de receptores de la inmonoglobulina A para inducir la fagocitosis, la liberación de citoquinas, superóxidos y otros factores inflamatorios (Pinel-Marie *et al.*, 2011). Por lo que estas respuestas en las gónadas de las tilapias ante la exposición a BaP indicarían que la tilapia estaba tratando de contrarrestar los efectos del BaP mediante la activación inmune.

CONCLUSIÓN

Mediante el análisis histológico se identificó que todas las tilapias presentaron signos de esteatosis hepática causado posiblemente por el alimento comercial. Además, se observó que ante la presencia del BaP el daño en el hígado incremento en los organismos expuestos, coadyuvando a la disminución del crecimiento por posible malnutrición. Mientras que en las gónadas de las tilapias la prevalencia de los daños observados incrementó con el tiempo de exposición a BaP lo cual puede llegar a afectar la capacidad en la reproducción de las tilapias macho.

Los organismos expuestos a BaP habrían rebasado su capacidad de metabolizar este compuesto. Esto soportado por 1) el mayor incremento significativo de CAF que se dio a los 56 d con respecto al grupo control y en comparación con los demás tiempos de exposición. Es posible que los organismos tratados habían acumulado una gran cantidad de metabolitos de BaP en órganos blanco, lo cual fue congruente con los resultados de los daños histológicos identificados en el hígado pues los más notorios fueron a los 56 d y por lo tanto esto indicaría que la capacidad metabólica del hígado podría estar limitada. 2) Por los resultados transcripcionales en donde se reportó que en la enzima *cyp1a* no fue inducida en este órgano, pero si el gen de *cyp1b1* asociado con daños derivados de metabolitos del BaP.

En conjunto con el análisis de metabolitos y el del transcriptoma se demuestra que el BaP ocasiona un desbalance en el metabolismo de energía en la tilapia. Nuestros resultados sugieren que la tilapia ya tenía un problema metabólico en el hígado y que el BaP podría estar contribuyendo a un incremento en la acumulación de lípidos al final de la exposición.

Con base en los resultados encontrados en las gónadas, estas parecen no poseer un sistema de desintoxicación eficiente. Debido a que se observó en este tejido un alto incremento de la expresión de gen de la enzima *cyp1b1* vinculada con la producción de metabolitos mutagénicos. Estos resultados en conjunto con el incremento de neoplasias focales evidenciadas en las gónadas ante la exposición a BaP sugieren que se producen cambios metabólicos que podrían originar un microambiente ácido para la proliferación de células cancerosas (Huang *et al.*, 2021). Este estudio brinda información importante de línea base sobre los efectos del BaP en el órgano reproductivo de la tilapia, lo cual no había sido explorado, así como los efectos de la producción de respuestas asociadas con la presencia de lípidos potencializados por el BaP y posiblemente causado por el alimento proporcionado a las tilapias. Este estudio contribuye para que pueda ser utilizado para proponer políticas y estrategias adecuadas del cultivo, manejo y monitoreo en organismos de importancia comercial en la acuicultura. Así como para apoyar una mejor comprensión integral a través de las respuestas transcripcionales y metabólicas de los efectos adversos del BaP en el metabolismo y su repercusión en la reproducción de la tilapia y en el consumo humano.

PERSPECTIVAS

El estudio de las respuestas de los organismos ante estresores ambientales en la acuicultura como deficiencia de la calidad del agua, temperatura, hipoxia, salinidad, entre otros, deben ser llevados a cabo en diferentes niveles de organización biológica, para poder esclarecer cuales genes, rutas moleculares y metabólicas están involucradas en respuestas fisiológicas ante eventos estresantes, pues esta información puede ser beneficiosa para las prácticas en acuicultura. Para ello, emplear el enfoque multiómico para su estudio puede contribuir en el entendimiento de respuestas fisiológicas complejas de animales acuáticos en cultivo como en el crecimiento, reproducción, inmunidad y el descubrimiento de biomarcadores moleculares que pueden ser de gran utilidad por ejemplo para el manejo de la maduración, la tasa de crecimiento y el control de enfermedades de los organismos en cultivo (Rise *et al.*, 2019). En la acuicultura intensiva y semi-intensiva la alimentación está basada en productos comerciales de engorda de bajo costo con la finalidad de incrementar rendimientos y ganancias. No obstante, las investigaciones actuales demuestran que este tipo de alimento ocasiona la incidencia de enfermedades hepáticas en la tilapia (Tao *et al.*, 2018, Jia *et al.*, 2020; Li *et al.*, 2020) y si a esto se adiciona el factor de una mala calidad agua con la presencia de contaminantes puede incrementar la susceptibilidad de la tilapia de contraer enfermedades y por lo tanto mermar su producción y/u obtener una mala calidad del producto. Es por ello por lo que se deben buscar alternativas viables y de bajo costo para los productores con las que las tilapias puedan hacer frente a estos desafíos. Un ejemplo es el uso de aditivos alimentarios como el resveratrol y grasas monoinsaturadas que son capaces de inducir respuestas para proteger a las tilapias contra el estrés oxidativo (Wang *et al.*, 2020). Disminuir las enfermedades hepáticas asociadas tanto por el

alimento comercial de engorda como también por el contacto con contaminantes presentes en el agua de cultivo, es un reto que debe ser considerado para afrontar pertinentemente los problemas de producción acuícola. Es por ello que deben ser llevados a cabo más estudios de efectos globales a diferentes niveles (p.ej., epigenético, metagenómico, transcriptómico y metabolómico), en conjunto con la medición de parámetros importantes en la calidad del agua de las tilapias y de los alimentos en donde no solo se considere la introducción de aditivos alimentarios para mejorar la resistencia de los organismos, sino que también debe ser cubierta la problemática de la calidad del agua de cultivo, pues a la fecha los estudios realizados sobre los efectos de contaminantes en la tilapia del Nilo con un enfoque global e integral son escasos. Y por último se debe llevar a cabo la difusión de la información recabada de este tipo de estudio a los acuicultores para mejorar las políticas y estrategias de manejo en el cultivo de la tilapia para consumo humano.

DEFINICIÓN DE TÉRMINOS

En este apartado presento la definición de algunos términos que fueron considerados relevantes ya que serán empleados con frecuencia en el documento.

1. **Aminoácido esencial:** son aquellos aminoácidos que no pueden ser producidos y que son requeridos para los procesos metabólicos del organismo. Estos aminoácidos pueden ser obtenidos de fuentes alimenticias (Hernández-Velázquez *et al.*, 2022).
2. **Aminoácido no esencial:** son aquellos aminoácidos que pueden ser sintetizados por el organismo y que no requieren ser ingeridos directamente de los alimentos. Pero estos aminoácidos son importantes ya que pueden participar en procesos metabólicos y biológicos en los organismos como en la producción de energía, sistema inmune y osmorregulación en organismos acuáticos (Hernández-Velázquez *et al.*, 2022).
3. **Análisis de enriquecimiento de rutas:** es un método utilizado para identificar las vías metabólicas o de señalización biológica que están asociadas con un conjunto de genes o proteínas de interés. Este análisis se utiliza para identificar los procesos biológicos que están regulados en diferentes condiciones o enfermedades (Khatri *et al.*, 2012).
4. **Benzo(a)pireno:** el BaP es un hidrocarburo aromático policíclico que se produce por la combustión incompleta de materia orgánica, incluyendo la quema de combustibles fósiles. También es conocido por ser un carcinógeno y ha sido clasificado como compuesto cancerígeno de categoría 1 por la Agencia Internacional para la Investigación del Cáncer IARC (IARC, 2012; OMS, 1998; EPA, 2016).
5. **Exposición subcrónica:** se refiere a la exposición a un agente químico, físico o biológico durante un período de tiempo limitado pero repetido, que puede durar desde varias semanas o hasta meses. Durante la exposición subcrónica, se pueden

observar efectos a largo plazo en la salud que pueden no ser evidentes durante una exposición aguda y que pueden no manifestarse durante un período de tiempo más corto (Timbrell, 2008).

6. **Expresión de transcritos:** la expresión de transcritos se refiere a la cantidad de ARNm producido por un gen específico en una célula o tejido particular en un momento determinado (Frigolet & Gutiérrez-Aguilar, 2017).
7. **Expresión diferencial de genes (DEG):** se refiere a la variación en la cantidad de ARNm producido por un gen específico en diferentes condiciones o tejidos. Un gen se declara expresado diferencialmente si una diferencia o cambio observado en los recuentos de lectura o los niveles de expresión entre dos condiciones experimentales es estadísticamente significativo (Anjum *et al.*, 2016).
8. **Extenso o difuso:** en patología describe algo que se ve en toda la muestra de tejido examinada (National Cancer Institute, s.f.a).
9. **Focal:** en patología la palabra focal describe algo que está limitado a un área específica o que se ve en solo una pequeña parte de la muestra de tejido examinada bajo el microscopio (National Cancer Institute, s.f.b).
10. **Metabolito:** se refiere a moléculas pequeñas que son un producto intermedio o final del metabolismo de alimentos, medicamentos, químicos o tejido propio y que pueden tener varias funciones en los organismos como por ejemplo de estructura y de señalización (Mamas *et al.*, 2011).
11. **Metabolómica:** la metabolómica es el estudio de los cambios globales en la concentración de los metabolitos presentes (moléculas pequeñas), producidos por células, tejidos u organismos, en respuesta a la variación génica, cambio ambiental o presencia de enfermedades (Mamas *et al.*, 2011; Park *et al.*, 2015).

12. **Ómicas:** el término "ómicas" se refiere a aquellas disciplinas que se encargan del estudio de un gran número de moléculas, involucradas en el funcionamiento de un organismo (Frigolet & Gutiérrez-Aguilar, 2017).
13. **Resonancia magnética nuclear de protón (^1H RMN):** es la técnica analítica que aplica la resonancia magnética nuclear en la espectroscopia de RMN con respecto a los núcleos del protón hidrógeno dentro de las moléculas de una sustancia, con el fin de determinar la estructura de sus moléculas (Silverstein *et al.*, 1992)
14. **Secuenciación masiva de ARN:** la secuenciación masiva de ARN (RNA-Seq, por sus siglas en inglés) es una técnica de alto rendimiento que se utiliza para analizar el conjunto de ARN transcritos a partir del genoma de un organismo (Wang *et al.*, 2009)
15. **Transcriptómica:** la transcriptómica es la ómica que se encarga de estudiar las moléculas de ARN mensajero (ARNm) que son transcritas a partir de los genes del ADN y se centra en el análisis de la expresión génica o cuánto se transcribe un gen en particular y en qué condiciones se lleva a cabo la transcripción (Frigolet & Gutiérrez-Aguilar, 2017).
16. **Vía de señalización:** descripción de una serie de reacciones químicas en las que un grupo de moléculas de la célula trabajan juntas para controlar las funciones celulares, como la multiplicación o la destrucción celular (National Cancer Institute, s.f.c).

REFERENCIAS

- Aas, E., Beyer, J., & Goksøyr, A. (1998). PAH in fish bile detected by fixed wavelength fluorescence. *Marine Environmental Research*, 46(1-5), 225-228.
- Abdel-Moneim, A.M. Histopathological and ultrastructural perturbations in tilapia liver as potential indicators of pollution in Lake Al-Asfar, Saudi Arabia. *Environ Sci Pollut Res* 21, 4387–4396 (2014). <https://doi.org/10.1007/s11356-013-2185-9>
- Albornoz-Abud, N. A., Canul-Marín, G. F., Chan-Cuá, I., Hernández-Núñez, E., Cañizares-Martínez, M. A., Valdés-Lozano, D., ... & Colli-Dula, R. C. (2021). Gene expression analysis on growth, development and toxicity pathways of male Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*), after acute and sub-chronic benzo (α) pyrene exposures. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology*, 250, 109160.
- Allner, B., von der Gönna, S., Griebeler, E. M., Nikutowski, N., Weltin, A., & Stahlschmidt-Allner, P. (2010). Reproductive functions of wild fish as bioindicators of reproductive toxicants in the aquatic environment. *Environmental Science and Pollution Research*, 17, 505-518.
- Andrews, S. (2010). FastQC: A Quality Control Tool for High Throughput Sequence Data [Online]. Available online at: <http://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc/>
- Anjum, A., Jaggi, S., Varghese, E., Lall, S., Bhowmik, A., & Rai, A. (2016). Identification of differentially expressed genes in RNA-seq data of *Arabidopsis thaliana*: a compound distribution approach. *Journal of Computational Biology*, 23(4), 239-247.
- Bahamonde, P. A., Feswick, A., Isaacs, M. A., Munkittrick, K. R., & Martyniuk, C. J. (2016). Defining the role of omics in assessing ecosystem health: Perspectives from the Canadian environmental monitoring program. *Environmental toxicology and chemistry*, 35(1), 20-35.
- Barrett, D. E., Estensoro, I., Sitjà-Bobadilla, A., & Bartholomew, J. L. (2021). Intestinal transcriptomic and histologic profiling reveals tissue repair mechanisms underlying resistance to the parasite *Ceratomyxa shasta*. *Pathogens*, 10(9), 1179.
- Berishvili, G., D’Cotta, H., Baroiller, J. F., Segner, H., & Reinecke, M. (2006). Differential expression of IGF-I mRNA and peptide in the male and female gonad during early development of a bony fish, the tilapia *Oreochromis niloticus*. *General and comparative endocrinology*, 146(3), 204-210.
- Beyer, J., Sandvik, M., Skare, J. U., Egaas, E., Hylland, K., Waagbo, R., & Goksoyr, A. (1997). Time- and dose-dependent biomarker responses in flounder (*Platichthys flesus* L.) exposed to benzo [a] pyrene, 2, 3, 3', 4, 4', 5-hexachlorobiphenyl (PCB-156) and cadmium. *Biomarkers*, 2(1), 35-44.
- Booc F., Thornton C., Lister A., et al. (2014). Benzo[a]pyrene effects on reproductive endpoints in *Fundulus heteroclitus*. *Toxicol Sci*, 140:73-82. doi: 10.1093/toxsci/kfu064
- Brown, T. L. (2009). *Chemistry: the central science*. Pearson Education.
- Brown-Peterson, N. J., Wyanski, D. M., Saborido-Rey, F., Macewicz, B. J., & Lowerre-Barbieri, S. K. (2011). A standardized terminology for describing reproductive development in fishes. *Marine and Coastal Fisheries*, 3(1), 52-70.

- Butala, H., Metzger, C., Rimoldi, J., & Willett, K. L. (2004). Microsomal estrogen metabolism in channel catfish. *Marine environmental research*, 58(2-5), 489-494.
- Carvalho-Neta, R. N., & Abreu-Silva, A. L. (2013). Glutathione S-Transferase as biomarker in *Sciades herzbergii* (Siluriformes: Ariidae) for environmental monitoring: the case study of São Marcos Bay, Maranhão, Brazil. *Latin american journal of aquatic research*, 41(2), 217-225.
- Chaves-Pozo, E., García-Ayala, A., & Cabas, I. (2018). Effects of sex steroids on fish leukocytes. *Biology*, 7(1), 9.
- Chen, J. R., Wu, S. M., Tsai, S. C., Hsien, F. C., & Huang, C. T. (2020). Changes in vitellogenin and estrogen receptor expression and 17 β -estradiol concentration in male juvenile tilapia can be used to evaluate endocrine-disrupting chemicals. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology*, 229, 108682.
- Chen, S., Zhou, Y., Chen, Y., & Gu, J. (2018). fastp: an ultra-fast all-in-one FASTQ preprocessor. *Bioinformatics*, 34(17), i884-i890.
- Chomczynski, P., & Sacchi, N. (1987). Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Analytical biochemistry*, 162(1), 156-159.
- Chovanec, A., Hofer, R., & Schiemer, F. (2003). Fish as bioindicators. In *Trace metals and other contaminants in the environment* (Vol. 6, pp. 639-676). Elsevier.
- Chua, S. M., & Fraser, J. A. (2020). Surveying purine biosynthesis across the domains of life unveils promising drug targets in pathogens. *Immunology and cell biology*, 98(10), 819-831.
- Colli-Dula, R. C., Fang, X., Moraga-Amador, D., Albornoz-Abud, N., Zamora-Bustillos, R., Conesa, A., ... y Hernandez-Nuñez, E. (2018). Transcriptome analysis reveals novel insights into the response of low-dose benzo (a) pyrene exposure in male tilapia. *Aquatic toxicology*, 201, 162-173.
- Corrales J., Thornton C., White M. & Willett K. L. (2014). Multigenerational effects of benzo[a]pyrene exposure on survival and developmental deformities in zebrafish larvae. *Aquat Toxicol* 148:16-26. doi: 10.1016/j.aquatox.2013.12.028
- Corsi, I., Mariottini, M., Sensini, C., Lancini, L., & Focardi, S. (2003). Fish as bioindicators of brackish ecosystem health: integrating biomarker responses and target pollutant concentrations. *Oceanologica Acta*, 26(1), 129-138.
- Costa, J., Ferreira, M., Rey-Salgueiro, L., & Reis-Henriques, M. A. (2011). Comparison of the waterborne and dietary routes of exposure on the effects of Benzo (a) pyrene on biotransformation pathways in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Chemosphere*, 84(10), 1452-1460.
- Costa, J., Reis-Henriques, M. A., Castro, L. F. C., & Ferreira, M. (2012). Gene expression analysis of ABC efflux transporters, CYP1A and GST α in Nile tilapia after exposure to benzo (a) pyrene. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology*, 155(3), 469-482.
- Danecek, P., Bonfield, J. K., Liddle, J., Marshall, J., Ohan, V., Pollard, M. O., ... & Li, H. (2021). Twelve years of SAMtools and BCFtools. *Gigascience*, 10(2), giab008.
- De Aluja, A. S. (2002). Animales de laboratorio y la Norma Oficial Mexicana (NOM-062-ZOO-1999). *Gac Med Mex*, 138(3), 295-8.
- Dere, E., Spade, D. J., Hall, S. J., Altemus, A., Smith, J. D., Phillips, J. A., ... & Boekelheide, K. (2017). Identification of sperm mRNA biomarkers associated with

- testis injury during preclinical testing of pharmaceutical compounds. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 320, 1-7.
- Dieffenbach, C. W., Lowe, T. M., & Dveksler, G. S. (1993). General concepts for PCR primer design. *PCR methods appl*, 3(3), S30-S37.
- Doering, J. A., Tang, S., Peng, H., Eisner, B. K., Sun, J., Giesy, J. P., ... & Hecker, M. (2016). High conservation in transcriptomic and proteomic response of white sturgeon to equipotent concentrations of 2, 3, 7, 8-TCDD, PCB 77, and benzo [a] pyrene. *Environmental Science & Technology*, 50(9), 4826-4835.
- Dong, Jinyun & Zhang, Qijing & Cui, Qing & Huang, Guang & Pan, Xiaoyan & Li, Shaoshun. (2016). Flavonoids and Naphthoflavonoids: Wider Roles in the Modulation of Cytochrome P450 Family 1 Enzymes. *ChemMedChem*. 11. 10.1002/cmdc.201600316.
- Durinck, S., Spellman, P., Birney, E. & Huber, W. (2009). "Mapping identifiers for the integration of genomic datasets with the R/Bioconductor package biomaRt." *Nature Protocols*, 4, 1184–1191.
- Ekere, N. R., Yakubu, N. M., Oparanozie, T., & Ihedioha, J. N. (2019). Levels and risk assessment of polycyclic aromatic hydrocarbons in water and fish of Rivers Niger and Benue confluence Lokoja, Nigeria. *Journal of Environmental Health Science and Engineering*, 17, 383-392.
- El-Ashmawy, I. M., & Youssef, S. A. (1999). The antagonistic effect of chlorpromazine on cadmium toxicity. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 161(1), 34-39.
- El-Sayed, A. F. M. (Ed.). (2006). *Tilapia culture*. CABI publishing.
- Environmental Protection Agency (2006). Benzo[a]pyrene (BaP). Teach 1-14.
- Erkkilä, K., Aito, H., Aalto, K., Pentikäinen, V., & Dunkel, L. (2002). Lactate inhibits germ cell apoptosis in the human testis. *Molecular human reproduction*, 8(2), 109-117.
- Escalier, D., Gallo, J. M., Albert, M., Meduri, G., Bermudez, D., David, G., & Schrevel, J. (1991). Human acrosome biogenesis: immunodetection of proacrosin in primary spermatocytes and of its partitioning pattern during meiosis. *Development*, 113(3), 779-788.
- Fang X., Corrales J., Thornton C., *et al.* (2015). Transcriptomic Changes in Zebrafish Embryos and Larvae Following Benzo[a]pyrene Exposure. *Toxicol Sci* 146:395-411. doi: 10.1093/toxsci/kfv105
- Frigolet, M. E., & Aguilar, R. G. (2017). ¿cómo ayudan a las ciencias de la salud? *Revista Digital Universitaria*, 18(7).
- Gao, D., Lin, J., Ou, K., Chen, Y., Li, H., Dai, Q., ... & Wang, C. (2018). Embryonic exposure to benzo (a) pyrene inhibits reproductive capability in adult female zebrafish and correlation with DNA methylation. *Environmental Pollution*, 240, 403-411.
- García-Tavera, J. L., Valdés-Lozano, D., Poblete-Naredo, I., Albores-Medina, A., & Zapata-Pérez, O. (2013). Bile benzo [a] pyrene concentration and hepatic CYP1A induction in hypoxic adult tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Chemosphere*, 92(1), 16-23.
- Gerger, C. J., & Weber, L. P. (2015). Comparison of the acute effects of benzo-a-pyrene on adult zebrafish (*Danio rerio*) cardiorespiratory function following intraperitoneal injection versus aqueous exposure. *Aquatic Toxicology*, 165, 19-30.
- Goksoyr, A. (1994). Use of cytochrome P450 1A in fish as a biomarker of aquatic pollution. *ARCHIVES OF TOXICOLOGY-SUPPLEMENT-*, 17, 80-80.

- Gold-Bouchot G, Zapata-Perez O, Rodriguez-Fuentes G, *et al* (2006) Biomarkers and pollutants in the Nile Tilapia, *Oreochromis niloticus*, in four lakes from San Miguel, Chiapas, Mexico. *Int J Environ Pollut* 26:129. doi: 10.1504/IJEP.2006.009102
- Gong J, Zeng Q, Yu D, Duan YG. T Lymphocytes and Testicular Immunity: A New Insight into Immune Regulation in Testes. *Int J Mol Sci.* 2020 Dec 23;22(1):57. doi: 10.3390/ijms22010057. PMID: 33374605; PMCID: PMC7793097.
- Gravato, C., & Guilhermino, L. (2009). Effects of benzo (a) pyrene on seabass (*Dicentrarchus labrax L.*): biomarkers, growth and behavior. *Human and Ecological Risk Assessment*, 15(1), 121-137.
- Greenberg, A. E., Clesceri, L. S., & Eaton, A. D. (1992). Standard methods for the examination of waste and wastewater. American Public Health Society: Washington DC.
- Guerrero-Castilla, A., & Olivero-Verbel, J. (2014). Altered gene expression in HepG2 cells exposed to a methanolic coal dust extract. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 38(3), 742-750.
- Haarmann-Stemmann, T., & Abel, J. (2006). The arylhydrocarbon receptor repressor (AhRR): structure, expression, and function.
- Hano, T., Ito, M., Ito, K., & Uchida, M. (2021). Alterations of stool metabolome, phenome, and microbiome of the marine fish, red sea bream, *Pagrus major*, following exposure to phenanthrene: A non-invasive approach for exposure assessment. *Science of The Total Environment*, 752, 141796.
- Hashimoto, S., Bessho, H., Hara, A., Nakamura, M., Iguchi, T., & Fujita, K. (2000). Elevated serum vitellogenin levels and gonadal abnormalities in wild male flounder (*Pleuronectes yokohamae*) from Tokyo Bay, Japan. *Marine environmental research*, 49(1), 37-53.
- Hassanain, M. A., Abdel-Rahman, E. H., Abo-Hegab, S., Tawfik, M. A., & Abbas, W. T. (2007). Induction of cytochrome P450 1A1 as a biomarker of Benzo-a-pyrene pollution in Egyptian fresh water fish. *Pakistan journal of biological sciences: PJBS*, 10(8), 1161-1169.
- Hernández-Velázquez, I. M., Zamora-Briseño, J. A., Hernández-Bolio, G. I., Hernández-Núñez, E., Lozano-Álvarez, E., Briones-Fourzán, P., & Rodríguez-Canul, R. (2022). Metabolic changes in antennal glands of Caribbean spiny lobsters *Panulirus argus* infected by *Panulirus argus* virus 1 (PaV1). *Diseases of Aquatic Organisms*, 151, 11-22.
- Hoffmann, J. L., & Oris, J. T. (2006). Altered gene expression: A mechanism for reproductive toxicity in zebrafish exposed to benzo [a] pyrene. *Aquatic Toxicology*, 78(4), 332-340.
- Hsien-Tsang S., y Quintanilla, M. (2008). Manual sobre reproducción y cultivo de Tilapia. CENDEPESCA. San Salvador.
- Huang, L., Cheng, Y., Huang, K., Zhou, Y., Ma, Y., & Zhang, M. (2018). Ameliorative effect of *Sedum sarmentosum* Bunge extract on Tilapia fatty liver via the PPAR and P53 signaling pathway. *Scientific reports*, 8(1), 8456.
- Huang, Z., Xie, N., Illes, P., Di Virgilio, F., Ulrich, H., Semyanov, A., ... & Tang, Y. (2021). From purines to purinergic signalling: molecular functions and human diseases. *Signal Transduction and Targeted Therapy*, 6(1), 162.
- IARC (2010). IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans: Some Non-heterocyclic Polycyclic Aromatic Hydrocarbons and Some Related Exposures. *Iarc Monogr Eval Carcinog Risks to Humans* 92:1-868.

- IARC (2012). Agents Classified by the IARC Monographs, Volumes 1–104. IARC Monographs 7:1-25.
- Incardona J. P., Collier T.K. & Scholz N.L. (2004). Defects in cardiac function precede morphological abnormalities in fish embryos exposed to polycyclic aromatic hydrocarbons. *Toxicol Appl Pharmacol* 196:191-205. doi: 10.1016/j.taap.2003.11.026
- Jeppesen, J. B., Mortensen, C., Bendtsen, F., & Møller, S. (2013). Lactate metabolism in chronic liver disease. *Scandinavian journal of clinical and laboratory investigation*, 73(4), 293-299.
- Jia, R., Cao, L. P., Du, J. L., He, Q., Gu, Z. Y., Jeney, G., ... & Yin, G. J. (2020). Effects of high-fat diet on steatosis, endoplasmic reticulum stress and autophagy in liver of tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Frontiers in marine science*, 7, 363.
- Jia, R., Hou, Y., Feng, W., Li, B., & Zhu, J. (2022). Alterations at biochemical, proteomic and transcriptomic levels in liver of tilapia (*Oreochromis niloticus*) under chronic exposure to environmentally relevant level of glyphosate. *Chemosphere*, 294, 133818.
- Jimenez, B. D. & Stegeman J. J. (1990). Detoxication Enzymes as Indicators of. In *American Fisheries Society Symposium* (Vol. 8, pp. 67-79).
- Jin Q., Pan L., Liu T. y Hu F. (2015). RNA-seq based on transcriptome reveals differ genetic expressing in *Chlamys farreri* exposed to carcinogen PAHs. *Environ Toxicol Pharmacol* 39:313-320. doi: 10.1016/j.etap.2014.11.019
- Jiri, M., & Russell, M. W. (2000). Induction of mucosal immune responses in the human genital tract. *FEMS Immunology & Medical Microbiology*, 27, 351–355. <https://doi.org/10.1111/j.1574-695X.2000.tb01449.x>
- Jonker M. T., van der Heijden S. A., Kreitinger J. P. & Hawthorne S. B. (2007). Predicting PAH bioaccumulation and toxicity in earthworms exposed to manufactured gas plant soils with solid-phase microextraction. *Environ Scien y Tech*, 41(21), 7472-7478. doi: 10.1021/es070404s
- Juhasz A. L. & Naidu R. (2000) Bioremediation of high molecular weight polycyclic aromatic hydrocarbons: A review of the microbial degradation of benzo[a]pyrene. *Int Biodeterior Biodegrad* 45:57–88. doi: 10.1016/S0964-8305(00)00052-4
- Karami, A., Christianus, A., Ishak, Z., Syed, M. A., & Courtenay, S. C. (2011). The effects of intramuscular and intraperitoneal injections of benzo [a] pyrene on selected biomarkers in *Clarias gariepinus*. *Ecotoxicology and environmental safety*, 74(6), 1558-1566.
- Khatri, P., Sirota, M., & Butte, A. J. (2012). Ten years of pathway analysis: current approaches and outstanding challenges. *PLoS computational biology*, 8(2), e1002375. Khatri, P., Sirota, M., & Butte, A. J. (2012). Ten years of pathway analysis: current approaches and outstanding challenges. *PLoS computational biology*, 8(2), e1002375.
- Kim, B. H., Takemura, A., Kim, S. J., & Lee, Y. D. (2003). Vitellogenin synthesis via androgens in primary cultures of tilapia hepatocytes. *General and comparative endocrinology*, 132(2), 248-255.
- Kim, D., Paggi, J.M., Park, C. et al. Graph-based genome alignment and genotyping with HISAT2 and HISAT-genotype. *Nat Biotechnol* 37, 907–915 (2019). <https://doi.org/10.1038/s41587-019-0201-4>

- Kokushi, E., Uno, S., Harada, T., & Koyama, J. (2012). ¹H NMR-based metabolomics approach to assess toxicity of bunker a heavy oil to freshwater carp, *Cyprinus carpio*. *Environmental toxicology*, 27(7), 404-414.
- Kopecka-Pilarczyk, J., & Correia, A. D. (2009). Biochemical response in gilthead seabream (*Sparus aurata*) to in vivo exposure to a mix of selected PAHs. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 72(4), 1296-1302.
- Lao, J. Y., Xie, S. Y., Wu, C. C., Bao, L. J., Tao, S., & Zeng, E. Y. (2018). Importance of dermal absorption of polycyclic aromatic hydrocarbons derived from barbecue fumes. *Environmental science & technology*, 52(15), 8330-8338.
- León-Borges, J. A., & Lizardi-Jiménez, M. A. (2017). Hydrocarbon pollution in underwater sinkholes of the Mexican Caribbean caused by tourism and asphalt: Historical data series and cluster analysis. *Tourism Management*, 63, 179-186.
- Lerner, D. T., Sheridan, M. A., & McCormick, S. D. (2012). Estrogenic compounds decrease growth hormone receptor abundance and alter osmoregulation in Atlantic salmon. *General and comparative endocrinology*, 179(2), 196-204.
- Li, H., Handsaker, B., Wysoker, A., Fennell, T., Ruan, J., Homer, N., ... & 1000 Genome Project Data Processing Subgroup. (2009). The sequence alignment/map format and SAMtools. *bioinformatics*, 25(16), 2078-2079.
- Li, S., Zhang, Y., Liu, N., Chen, J., Guo, L., Dai, Z., ... & Wu, G. (2020). Dietary L-arginine supplementation reduces lipid accretion by regulating fatty acid metabolism in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Journal of Animal Science and Biotechnology*, 11, 1-10.
- Liao, Y., Smyth, G.K. & Shi, W. (2019). "The R package Rsubread is easier, faster, cheaper and better for alignment and quantification of RNA sequencing reads." *Nucleic Acids Research*, 47, e47. doi: 10.1093/nar/gkz114.
- Liebermann, D. A., & Hoffman, B. (2008). Gadd45 in stress signaling. *Journal of molecular signaling*, 3(1), 1-8.
- Livak, K. J., & Schmittgen, T. D. (2001). Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2- $\Delta\Delta$ CT method. *methods*, 25(4), 402-408.
- Livingstone, D. R. (1993). Biotechnology and pollution monitoring: use of molecular biomarkers in the aquatic environment. *Journal of Chemical Technology & Biotechnology*, 57(3), 195-211.
- Loughery, J. R., Kidd, K. A., Mercer, A., & Martyniuk, C. J. (2018). Part B: Morphometric and transcriptomic responses to sub-chronic exposure to the polycyclic aromatic hydrocarbon phenanthrene in the fathead minnow (*Pimephales promelas*). *Aquatic Toxicology*, 199, 77-89.
- Love, M., Anders, S., & Huber, W. (2014). Differential analysis of count data—the DESeq2 package. *Genome Biol*, 15(550), 10-1186.
- Lu, G. H., Wang, C., & Zhu, Z. (2009). The dose–response relationships for EROD and GST induced by polyaromatic hydrocarbons in *Carassius auratus*. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 82, 194-199.
- Lu, X., Zhang, J. X., Zhang, L., Wu, D., Tian, J., Yu, L. J., ... & Jiang, M. (2022). Comprehensive understanding the impacts of dietary exposure to polyethylene microplastics on genetically improved farmed tilapia (*Oreochromis niloticus*): tracking from growth, microbiota, metabolism to gene expressions. *Science of The Total Environment*, 841, 156571.

- Martínez-Cordero, F.J., Delgadillo, T.S., Sanchez-Zazueta, E. & Cai, J. 2021. Tilapia aquaculture in Mexico: assessment with a focus on social and economic performance. FAO Fisheries and Aquaculture Circular No. 1219. Rome, FAO.
- Martinez-Porchas M., Hernández-Rodríguez M., Davila-Ortíz J., *et al.* (2011). A preliminary study about the effect of benzo[a]pyrene (BaP) injection on the thermal behavior and plasmatic parameters of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus* L.) acclimated to different temperatures. *Pan-American J Aquatic Sci* 6:76-85.
- Mills, L. J., Gutjahr-Gobell, R. E., Horowitz, D. B., Denslow, N. D., Chow, M. C., & Zarogian, G. E. (2003). Relationship between reproductive success and male plasma vitellogenin concentrations in cunner, *Tautoglabrus adspersus*. *Environmental health perspectives*, 111(1), 93-100.
- Mimura J. & Fujii-Kuriyama Y. (2003). Functional role of AhR in the expression of toxic effects by TCDD. *Biochim Biophys Acta - Gen Subj* 1619:263-268. doi: 10.1016/S0304-4165(02)00485-3
- Minnesota Department of Health. Benzo[a]pyrene and Groundwater. 2018 Health Risk Assessment Unit.
- Misra, B. B., Ruiz-Hernández, I. M., Hernández-Bolio, G. I., Hernández-Núñez, E., Díaz-Gamboa, R., & Colli-Dula, R. C. (2019). ¹H NMR metabolomic analysis of skin and blubber of bottlenose dolphins reveals a functional metabolic dichotomy. *Comparative Biochemistry and Physiology Part D: Genomics and Proteomics*, 30, 25-32.
- Muir, J., Van Rijn, J., & Hargreaves, J. (2000). Production in intensive and recycle systems. *Tilapias: biology and exploitation*, 405-445.
- National Cancer Institute (s.f.a). SEER Training Modules. Multiple Primaries & Histology Coding Rules. When & How to Use New Rules. Definitions. Recuperado en: <https://training.seer.cancer.gov/rules/using/definitions.html>.
- National Cancer Institute (s.f.b). "NCI's Dictionary of Cancer Terms: "Diffuse". Revisado en: <https://www.cancer.gov/publications/dictionaries/cancer-terms/def/diffuse>.
- National Cancer Institute (s.f.c). "NCI's Dictionary of Cancer Terms: Vía de señalización". Revisado en: <https://www.cancer.gov/espanol/publicaciones/diccionarios/diccionario-cancer/def/via-de-senalizacion>
- Nebert D. W. & Gonzalez F. J. (1987). P450 genes: structure, evolution, and regulation. *Ann Rev of Bioch*, 56(1), 945-993. doi: 10.1146/annurev.bi.56.070187.004501
- Nelson D. R., Koymans L., Kamataki T., *et al.* (1996). P450 superfamily: update on new sequences, gene mapping, accession numbers and nomenclature. *Pharmacogenetics and Genomics*, 6(1), 1-42
- Norbeck, L. A., & Sheridan, M. A. (2011). An in vitro model for evaluating peripheral regulation of growth in fish: effects of 17β-estradiol and testosterone on the expression of growth hormone receptors, insulin-like growth factors, and insulin-like growth factor type 1 receptors in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *General and Comparative Endocrinology*, 173(2), 270-280.
- Okonechnikov, K., Conesa, A., & García-Alcalde, F. (2016). Qualimap 2: advanced multi-sample quality control for high-throughput sequencing data. *Bioinformatics*, 32(2), 292-294.
- Okoumassoun, L. E., Brochu, C., Deblois, C., Akponan, S., Marion, M., Averill-Bates, D., & Denizau, F. (2002). Vitellogenin in tilapia male fishes exposed to organochlorine

- pesticides in Ouémé River in Republic of Benin. *Science of the Total Environment*, 299(1-3), 163-172.
- Oliva, M., de Canales, M. G., Gravato, C., Guilhermino, L., & Perales, J. A. (2010). Biochemical effects and polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in senegal sole (*Solea senegalensis*) from a Huelva estuary (SW Spain). *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 73(8), 1842-1851.
- Padrós, J., Pelletier, É., & Ribeiro, C. O. (2003). Metabolic interactions between low doses of benzo [a] pyrene and tributyltin in arctic charr (*Salvelinus alpinus*): a long-term in vivo study. *Toxicology and applied pharmacology*, 192(1), 45-55.
- Pang, M., Wang, Y., Tang, Y., Dai, J., Tong, J., & Jin, G. (2021). Transcriptome sequencing and metabolite analysis reveal the toxic effects of nanoplastics on tilapia after exposure to polystyrene. *Environmental Pollution*, 277, 116860.
- Park, S., Sadanala, K. C. y Kim, E.-K. (2015). A Metabolomic Approach to Understanding the Metabolic Link between Obesity and Diabetes. *Molecules and Cells*. DOI: <<http://doi.org/10.14348/molcells.2015.0126>>.
- Pfeifer G. P. & Grunberger D. (1984). Impaired enzymatic methylation of BPDE-modified DNA. 5:931-935. doi: <https://doi.org/10.1093/carcin/5.7.931>
- Phillips D. H. (1983). Fifty years of benzo[a]pyrene. *Nature* 303:468-472. doi: 10.1038/303468a0
- PICUAL-Cinvestav, 2002. Programa Institucional para el Cuidado y Uso de los Animales de Laboratorio del Centro de Investigación y Estudios Avanzados del IPN https://administracion.cinvestav.mx/Portals/0/SiteDocs/SPlaneacion/UPEAL/PI04_02/PI-04-02.pdf (2002)
- Pinel-Marie, M. L., Louarn, L., Desmots, S., Fardel, O., & Sparfel, L. (2011). Aryl hydrocarbon receptor-dependent induction of the IgA receptor FcαRI by the environmental contaminant benzo (a) pyrene in human macrophages. *Toxicology*, 290(1), 89-95.
- Polavarapu, R., Spitz, D. R., Sim, J. E., Follansbee, M. H., Oberley, L. W., Rahemtulla, A., & Nanji, A. A. (1998). Increased lipid peroxidation and impaired antioxidant enzyme function is associated with pathological liver injury in experimental alcoholic liver disease in rats fed diets high in corn oil and fish oil. *Hepatology*, 27(5), 1317-1323.
- Poleksić, V., & Mitrović-Tutundžić, V. (1994). Fish gills as a monitor of sublethal and chronic effects of pollution. *Sublethal and chronic effects of pollutants on freshwater fish*, 339-352.
- Prahl F. G. & Carpenter R. (1984). Hydrocarbons in Washington coastal sediments. *Estuarine Coastal and Shelf Science*, 18(6), 703-720. doi:10.1016/0272-7714(84)90040-4
- R Core Team (2021). R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. URL <https://www.R-project.org/>.
- Raudvere Uku, Kolberg Liis, Kuzmin Ivan, Arak Tambet, Adler Priit, Peterson Hedi, Vilo Jaak: g:Profiler: a web server for functional enrichment analysis and conversions of gene lists (2019 update) *Nucleic Acids Research* 2019; doi:10.1093/nar/gkz369 [PDF].
- Ravanbakhsh, S., Liu, P., Bjordahl, T. C., Mandal, R., Grant, J. R., Wilson, M., ... & Wishart, D. S. (2015). Accurate, fully-automated NMR spectral profiling for metabolomics. *PLoS one*, 10(5), e0124219.

- Revel, A., Raanani, H., Younglai, E., Xu, J., Han, R., Savouret, J. F., & Casper, R. F. (2001). Resveratrol, a natural aryl hydrocarbon receptor antagonist, protects sperm from DNA damage and apoptosis caused by benzo (a) pyrene. *Reproductive toxicology*, 15(5), 479-486.
- Reyes-Chaparro, A., Colli-Dulá, R. C., Osorio-Yáñez, C., Puch-Hau, C. A., Albores, A., & Zapata-Pérez, O. (2016). Benzo [a] pyrene induces ANP gene expression in the heart of Nile tilapia. *Toxicology Letters*, (259), S106.
- Rise, M. L., Martyniuk, C. J., & Chen, M. (2019). Comparative physiology and aquaculture: Toward Omics-enabled improvement of aquatic animal health and sustainable production. *Comparative Biochemistry and Physiology Part D: Genomics and Proteomics*, 31, 100603.
- Ritchie, M. D., Holzinger, E. R., Li, R., Pendergrass, S. A., & Kim, D. (2015). Methods of integrating data to uncover genotype–phenotype interactions. *Nature Reviews Genetics*, 16(2), 85-97.
- Rodas-Ortíz, J. P., Ceja-Moreno, V., Chan-Cocom, M. E., & Gold-Bouchot, G. (2008). Vitellogenin induction and increased plasma 17 β -estradiol concentrations in male Nile tilapia, *Oreochromis niloticus*, exposed to organochlorine pollutants and polycyclic aromatics hydrocarbons. *Bulletin of environmental contamination and toxicology*, 81, 543-547.
- Rodwell, Victor W., & Robert K. Murray, (2018). "Biochemistry & Medicine." Harper's Illustrated Biochemistry, 31e Rodwell VW, Bender DA, Botham KM, Kennelly PJ, Weil P. Rodwell V.W., & Bender D.A., & Botham K.M., & Kennelly P.J., & Weil P(Eds.),Eds.
- Roszkowska, A., Yu, M., Bessonneau, V., Bragg, L., Servos, M., & Pawliszyn, J. (2018). Metabolome profiling of fish muscle tissue exposed to benzo [a] pyrene using in vivo solid-phase microextraction. *Environmental Science & Technology Letters*, 5(7), 431-435.
- Roszkowska, A., Yu, M., Bessonneau, V., Ings, J., McMaster, M., Smith, R., ... & Pawliszyn, J. (2019). In vivo solid-phase microextraction sampling combined with metabolomics and toxicological studies for the non-lethal monitoring of the exposome in fish tissue. *Environmental Pollution*, 249, 109-115.
- Salvador, J. M., Brown-Clay, J. D., & Fornace Jr, A. J. (2013). Gadd45 in stress signaling, cell cycle control, and apoptosis. *Gadd45 stress sensor genes*, 1-19.
- Salvo, L. M., Severino, D., de Assis, H. C. S., & da Silva, J. R. M. (2016). Photochemical degradation increases polycyclic aromatic hydrocarbon (PAH) toxicity to the grouper *Epinephelus marginatus* as assessed by multiple biomarkers. *Chemosphere*, 144, 540-547.
- Santana, M. S., Sandrini-Neto, L., Neto, F. F., Ribeiro, C. A. O., Di Domenico, M., & Prodocimo, M. M. (2018). Biomarker responses in fish exposed to polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs): systematic review and meta-analysis. *Environmental pollution*, 242, 449-461.
- Sauer, J. M., Waalkes, M. P., Hooser, S. B., Kuester, R. K., McQueen, C. A., & Sipes, I. G. (1997). Suppression of Kupffer cell function prevents cadmium induced hepatocellular necrosis in the male Sprague-Dawley rat. *Toxicology*, 121(2), 155-164.
- Schlenk, D., Celander, M., Gallagher, E. P., George, S., James, M., Kullman, S. W., ... & Willett, K. (2008). Biotransformation in fishes. *The toxicology of fishes*, 1.

- Schnell, S., Démollière, C., van den Berk, P., & Jacobs, H. (2006). Gimap4 accelerates T-cell death. *Blood*, 108(2), 591-599.
- Sha, W., Cai, F., Li, Y., Wang, Y., Liu, C., Wang, R., & Gao, P. (2021). Biomarker responses and histological damage in the gill, liver, and gonad of *Cyprinus carpio* with benzo (a) pyrene exposure. *Environmental Science and Pollution Research*, 28(43), 61290-61301.
- Shimada, T. (2006). Xenobiotic-metabolizing enzymes involved in activation and detoxification of carcinogenic polycyclic aromatic hydrocarbons. *Drug metabolism and pharmacokinetics*, 21(4), 257-276.
- Shimada, T., Gillam, E. M., Oda, Y., Tsumura, F., Sutter, T. R., Guengerich, F. P., & Inoue, K. (1999). Metabolism of benzo [a] pyrene to trans-7, 8-dihydroxy-7, 8-dihydrobenzo [a] pyrene by recombinant human cytochrome P450 1B1 and purified liver epoxide hydrolase. *Chemical research in toxicology*, 12(7), 623-629.
- Shved, N., Berishvili, G., Baroiller, J. F., Segner, H., & Reinecke, M. (2008). Environmentally relevant concentrations of 17 α -ethinylestradiol (EE2) interfere with the growth hormone (GH)/insulin-like growth factor (IGF)-I system in developing bony fish. *Toxicological sciences*, 106(1), 93-102.
- Silverstein RM, Bassler GC & Morrill TC (1992). Spectrometric identification of organic compounds. Wiley, Chichester, 1991, pp. x+ 419, £ 50.25 (cloth), ISBN 0 471 63404 2.
- Song, Y., Nahrgang, J., & Tollefsen, K. E. (2019). Transcriptomic analysis reveals dose-dependent modes of action of benzo (a) pyrene in polar cod (*Boreogadus saida*). *Science of the Total Environment*, 653, 176-189.
- Strickland, J. D. H., & Parsons, T. R. (1972). A practical handbook of seawater analysis.
- Sun, Y., Yin, Y., Zhang, J., Yu, H., Wang, X., Wu, J., & Xue, Y. (2008). Hydroxyl radical generation and oxidative stress in *Carassius auratus* liver, exposed to pyrene. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 71(2), 446-453.
- Tao, Y. F., Qiang, J., Bao, J. W., Chen, D. J., Yin, G. J., Xu, P., & Zhu, H. J. (2018). Changes in physiological parameters, lipid metabolism, and expression of microRNAs in genetically improved farmed tilapia (*Oreochromis niloticus*) with fatty liver induced by a high-fat diet. *Frontiers in Physiology*, 9, 1521.
- Taylor, S., Wakem, M., Dijkman, G., Alsarraj, M., & Nguyen, M. (2010). A practical approach to RT-qPCR—publishing data that conform to the MIQE guidelines. *Methods*, 50(4), S1-S5.
- ter Laak T. L., ter Bekke M. A. y Hermens J. L. M. (2009). Dissolved Organic Matter Enhances Transport of PAHs to Aquatic Organisms (vol 43, pg 7212, 2009). *Environ Sci Technol* 43:9044. doi: 10.1021/es903149f
- Thompson, J., & Bannigan, J. (2008). Cadmium: toxic effects on the reproductive system and the embryo. *Reproductive toxicology*, 25(3), 304-315.
- Timbrell, J. (2008). *Principles of biochemical toxicology*. CRC press.
- Tintos, A., Gesto, M., Míguez, J. M., & Soengas, J. L. (2008). β -Naphthoflavone and benzo (a) pyrene treatment affect liver intermediary metabolism and plasma cortisol levels in rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 69(2), 180-186.
- Tsang, S. H., & Quintanilla, M. (2008). Manual sobre reproducción y cultivo de tilapia. Ministerio de Agricultura y Ganadería (MAG). CENDEPESCA, El salvador.
- Vairapandi, M., Balliet, A. G., Hoffman, B., & Liebermann, D. A. (2002). GADD45b and GADD45g are cdc2/cyclinB1 kinase inhibitors with a role in S and G2/M cell cycle

- checkpoints induced by genotoxic stress. *Journal of cellular physiology*, 192(3), 327-338.
- van der Oost D., Beyer J. y Vermeulen N. P. E. (2003). Fish bioaccumulation and biomarkers in environmental risk assessment: a review. *Environ Toxicol Pharmacol* 13:57-149. doi: 10.1016/S1382-6689(02)00126-6
- Varanasi, U., Stein, J. E., & Nishimoto, M. (1989). Biotransformation and Disposition of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons(PAH) in Fish. *Metabolism of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons in the Aquatic Environment*. CRC Press, Inc., Boca Raton Florida. 1989. p 93-149, 20 fig, 15 tab, 171 ref. NOAA Contract Y 01-CP-40507. Booc F., Thornton C., Lister A., *et al.* (2014). Benzo[a]pyrene effects on reproductive endpoints in *Fundulus heteroclitus*. *Toxicol Sci*, 140:73-82. doi: 10.1093/toxsci/kfu064
- Vogel, C. F., & Haarmann-Stemmann, T. (2017). The aryl hydrocarbon receptor repressor—more than a simple feedback inhibitor of AhR signaling: clues for its role in inflammation and cancer. *Current opinion in toxicology*, 2, 109-119.
- Vogel, C. F., Ishihara, Y., Campbell, C. E., Kado, S. Y., Nguyen-Chi, A., Sweeney, C., ... & Tuscano, J. M. (2019). A protective role of aryl hydrocarbon receptor repressor in inflammation and tumor growth. *Cancers*, 11(5), 589.
- Wang L., Camus A. C., Dong W., *et al.* (2010). Expression of CYP1C1 and CYP1A in *Fundulus heteroclitus* during PAH-induced carcinogenesis. *Aquat Toxicol* 99:439-447. doi: 10.1016/j.aquatox.2010.06.002
- Wang, M. C., Wang, Y. C., Peng, H. W., Hseu, J. R., Wu, G. C., Chang, C. F., & Tseng, Y. C. (2020). Resveratrol induces expression of metabolic and antioxidant machinery and protects tilapia under cold stress. *International journal of molecular sciences*, 21(9), 3338.
- Wang, Z., Gerstein, M., & Snyder, M. (2009). RNA-Seq: a revolutionary tool for transcriptomics. *Nature reviews genetics*, 10(1), 57-63.
- Wilbanks, M. S., Gust, K. A., Atwa, S., Sunesara, I., Johnson, D., Ang, C. Y., ... & Perkins, E. J. (2014). Validation of a genomics-based hypothetical adverse outcome pathway: 2, 4-dinitrotoluene perturbs PPAR signaling thus impairing energy metabolism and exercise endurance. *Toxicological Sciences*, 141(1), 44-58.
- Willett, K. L., Ganesan, S., Patel, M., Metzger, C., Quiniou, S., Waldbieser, G., & Scheffler, B. (2006). In vivo and in vitro CYP1B mRNA expression in channel catfish. *Marine environmental research*, 62, S332-S336.
- Williams, T. D., Davies, I. M., Wu, H., Diab, A. M., Webster, L., Viant, M. R., ... & Robinson, C. D. (2014). Molecular responses of European flounder (*Platichthys flesus*) chronically exposed to contaminated estuarine sediments. *Chemosphere*, 108, 152-158.
- Williams, T. D., Wu, H., Santos, E. M., Ball, J., Katsiadaki, I., Brown, M. M., ... & Viant, M. R. (2009). Hepatic transcriptomic and metabolomic responses in the stickleback (*Gasterosteus aculeatus*) exposed to environmentally relevant concentrations of dibenzanthracene. *Environmental science & technology*, 43(16), 6341-6348.
- Woo, S. J., & Chung, J. K. (2020). Cytochrome P450 1 enzymes in black rockfish, *Sebastes schlegelii*: Molecular characterization and expression patterns after exposure to benzo [a] pyrene. *Aquatic Toxicology*, 226, 105566.
- World Health Organization (1998). Selected non-heterocyclic polycyclic aromatic hydrocarbons. *Environ Health Criteria* N° 202. International Programme on Chemical Safety. Geneva. Italy. Pág. 240-249. En: De la Cruz Rodríguez E. R. &

- Huaman Gutierrez J. O., 2002. Formación de hidrocarburos aromáticos policíclicos y del 3,4-Benzopireno en aceites comestibles alterados por el calentamiento. Tesis. Universidad Nacional Mayor de San Marcos. Facultad de Farmacia y Bioquímica.
- Yadete, F., Brun, N. R., Vieweg, I., Nahrgang, J., Karlsen, O. A., & Goksøyr, A. (2021). Transcriptome responses in polar cod (*Boreogadus saida*) liver slice culture exposed to benzo [a] pyrene and ethynylestradiol: insights into anti-estrogenic effects. *Toxicology in Vitro*, 75, 105193.
- Yadete, F., Zhang, X., Hanna, E. M., Aranguren-Abadía, L., Eide, M., Blaser, N., ... & Karlsen, O. A. (2018). RNA-Seq analysis of transcriptome responses in Atlantic cod (*Gadus morhua*) precision-cut liver slices exposed to benzo [a] pyrene and 17 α -ethynylestradiol. *Aquatic toxicology*, 201, 174-186.
- Yamamoto, J., Ihara, K., Nakayama, H., Hikino, S., Satoh, K., Kubo, N., Iida, T., Fujii, Y., and Hara, T. (2004). Characteristic expression of aryl hydrocarbon receptor repressor gene in human tissues: organ-specific distribution and variable induction patterns in mononuclear cells. *Life Sci.* 74, 1039–1049.
- Yan, Z., Lu, G., & He, J. (2012). Reciprocal inhibiting interactive mechanism between the estrogen receptor and aryl hydrocarbon receptor signaling pathways in goldfish (*Carassius auratus*) exposed to 17 β -estradiol and benzo [a] pyrene. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology*, 156(1), 17-23.
- Yang, Y., Pan, L., Zhou, Y., Xu, R., Miao, J., Gao, Z., & Li, D. (2021). Damages to biological macromolecules in gonadal subcellular fractions of scallop *Chlamys farreri* following benzo [a] pyrene exposure: Contribution to inhibiting gonadal development and reducing fertility. *Environmental Pollution*, 283, 117084.
- Yu, G., Wang, L., Han, Y. & He, Q. (2012). "clusterProfiler: an R package for comparing biological themes among gene clusters." *OMICS: A Journal of Integrative Biology*, 16(5), 284-287. doi:10.1089/omi.2011.0118.
- Yu, N., Ding, Q., Li, E., Qin, J. G., Chen, L., & Wang, X. (2018). Growth, energy metabolism and transcriptomic responses in Chinese mitten crab (*Eriocheir sinensis*) to benzo [a] pyrene (BaP) toxicity. *Aquatic Toxicology*, 203, 150-158.
- Zapata-Pérez, O., Gold-Bouchot, G., Ortega, A., López, T., & Albores, A. (2002). Effect of pyrene on hepatic cytochrome P450 1A (CYP1A) expression in Nile Tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, 42, 477-485.
- Zhang L, Liu X, You L, et al (2011) Benzo(a)pyrene-induced metabolic responses in Manila clam *Ruditapes philippinarum* by proton nuclear magnetic resonance (1H NMR) based metabolomics. *Environ Toxicol Pharmacol* 32:218–225. doi: 10.1016/j.etap.2011.05.006.
- Zhao, Z. H., Wang, Z. X., Zhou, D., Han, Y., Ma, F., Hu, Z., ... & Fan, J. G. (2021). Sodium butyrate supplementation inhibits hepatic steatosis by stimulating liver kinase B1 and insulin-induced gene. *Cellular and Molecular Gastroenterology and Hepatology*, 12(3), 857-871.

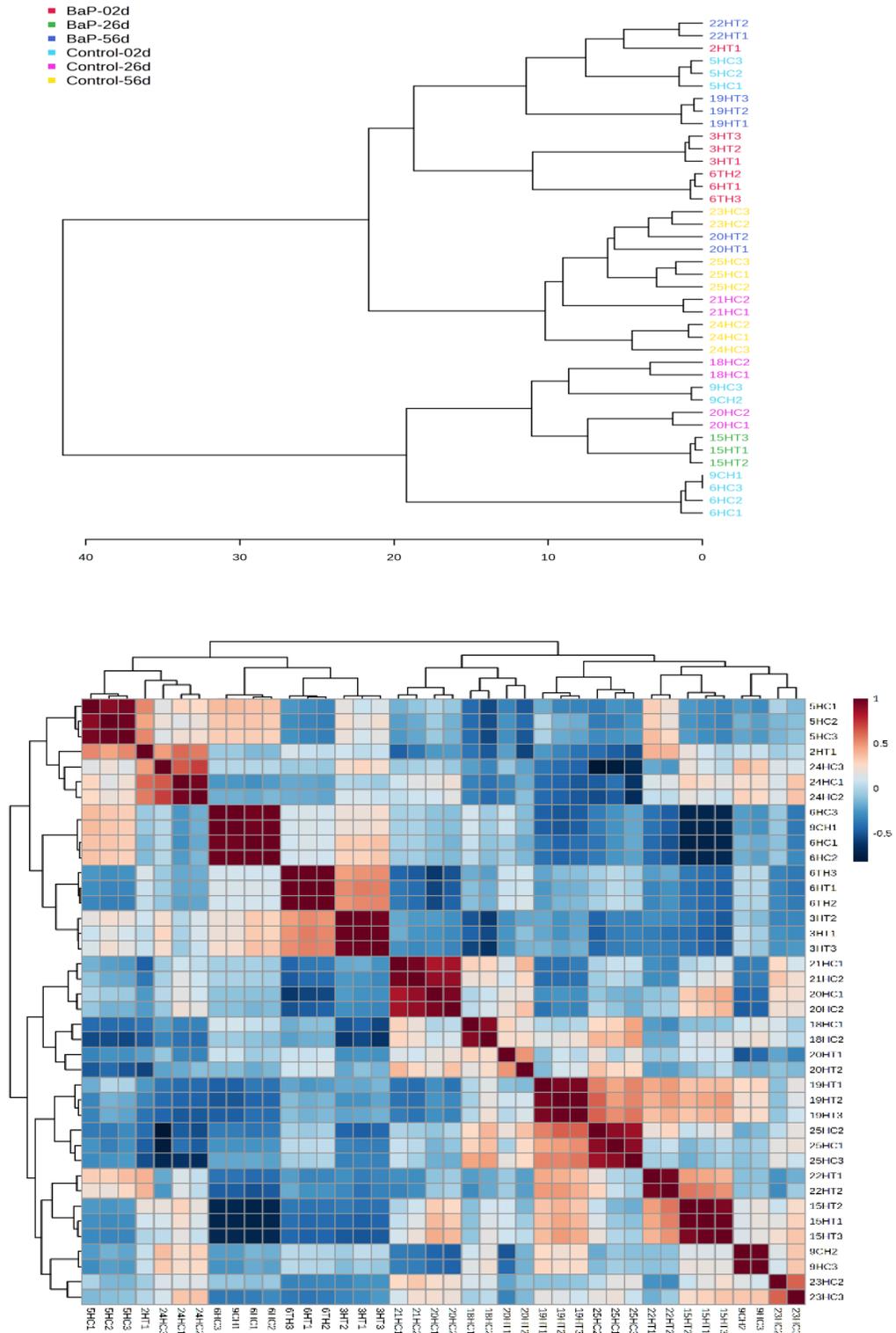
ANEXOS

Anexo 1. Secuencias de cebadores utilizados para qPCR. En esta tabla se incluyen la descripción, el número de acceso del NCBI, todas las secuencias de los cebadores enumerados del 5 al 3, la temperatura de alineación (Tm), el tamaño del amplicón y la eficiencia de la reacción.

Gen	Descripción	No. de acceso (NCBI)	Cebador delantero (5'-3')	Cebador Reverso (5'-3')	T °C de alineación	Tamaño de amplicón	qPCR Eficiencia (%)	Referencia
<i>cyp1a1</i>	Citocromo P450, familia 1, polipeptido 1	AB048938	agtgctctgcctcttttc	tgaagaccaaaggcagcttt	58	135	94.8	Albornoz-Abud <i>et al.</i> , 2021
<i>cyp1b1</i>	Citocromo P450, familia 1, subfamilia B, polipeptido 1	HQ829968.1	gggctacaccgtaccaaaga	tatctttgaccagagcgct	56	104	106	Collí-Dulá <i>et al.</i> , 2018
<i>gst-a</i>	Glutation S-transferasa	EU234530	aatggatggcatgaagctc	caaaggatcccaaagaacga	56	92	106	Costa <i>et al.</i> , 2012
<i>gadd45b</i>	Beta inducible de detención del crecimiento y daño del ADN	XM_003452557	ggagacggtgagtcaagctc	gttggagtctacgagtccgc	58	84	96	Collí-Dulá <i>et al.</i> , 2018
<i>igf1</i>	Factor de crecimiento similar a la insulina 1	AY919869.1	tctagcgcttttccctca	acaccctctcactactgccg	56	93	106	Albornoz-Abud <i>et al.</i> , 2021

<i>igf2</i>	Factor de crecimiento similar a la insulina 2	GQ849008	gcccttccctttgacattat	ctaaaacaaggacaaggcgc	58	92	103	Collí-Dulá <i>et al.</i> ,2018
<i>ghr1</i>	Receptor de hormona del crecimiento 1	XM_019365174.2	gctgatgtaggtgggatg	taccacaaactgggaagcat	58	79	100	Albornoz-Abud <i>et al.</i> , 2021
<i>ghr2</i>	Receptor de hormona del crecimiento 2	AY973233	ttagtgggcatcctgatgtt	aagagtgggaagcttaggga	58	131	94	Albornoz-Abud <i>et al.</i> , 2021
<i>vtg</i>	Vitelogenina	XM_005459912.2	caacgacgacagagtctca	gtgcaagcccttctgatagc	58	90	108	Albornoz-Abud <i>et al.</i> , 2021
<i>rpl8</i>	Proteína ribosomal L8	XM_003451557.2	gttgctggaggtggacgtat	atgaaccctgtgagcatcc	56	125	100	Collí-Dulá <i>et al.</i> ,2018

Anexo 2. Gráficos de correlaciones de Pearson y Distancias Euclidianas del hígado de tilapia control y tratada con BaP. La grafica de la izquierda muestra el Dendograma de distancias Euclidianas y el agrupamiento de las muestras de hígadolas. La gráfica de la derecha muestra las correlaciones entre muestras en el hígado de la tilapia control y tratada con BaP.



Anexo 3. Tabla de correlaciones de Pearson entre los metabolitos del hígado de la tilapia del Nilo.

	Lactate	Taurine	Acetate	Creatine	Creatine phosphate	Alanine	Hypoxanthine	Adenine	Cholate	Trimethylamine N _o	Malate	Glucose	Glycine	Glycerol	Nicotinurate	Aspartate	Glutamate	Choline	Niacinamide
Lactate	1	0.26	0.43	0.52	0.5	0.5	0.17	-0.86	-0.22	-0.4	-0.26	-0.38	-0.16	-0.23	-0.28	-0.52	-0.77	-0.55	-0.66
Taurine	0.26	1	0.8	0.63	0.64	0.21	0.09	0.1	0.49	0.4	0.13	0.1	0.32	0.17	0.2	-0.23	-0.21	0.02	0.27
Acetate	0.43	0.8	1	0.93	0.93	0.44	0.14	-0.2	0.41	0.54	0.38	0.41	0.62	0.53	0.47	-0.06	-0.17	0.25	0.26
Creatine	0.52	0.63	0.93	1	0.99	0.47	0.3	-0.35	0.38	0.51	0.3	0.4	0.6	0.59	0.47	0.09	-0.13	0.19	0.18
Creatine phosphate	0.5	0.64	0.93	0.99	1	0.48	0.35	-0.32	0.38	0.54	0.3	0.41	0.61	0.6	0.49	0.13	-0.08	0.16	0.18
Alanine	0.5	0.21	0.44	0.47	0.48	1	0.43	-0.48	-0.57	0.26	0.53	0.38	0.52	0.38	0.52	0.08	-0.06	-0.13	-0.49
Hypoxanthine	0.17	0.09	0.14	0.3	0.35	0.43	1	-0.02	0	0.37	-0.09	0.07	0.12	0.2	0.27	0.61	0.41	-0.4	-0.11
Adenine	-0.86	0.1	-0.2	-0.35	-0.32	-0.48	-0.02	1	0.46	0.48	0.08	0.21	0.08	0.1	0.16	0.45	0.66	0.35	0.7
Cholate	-0.22	0.49	0.41	0.38	0.38	-0.57	0	0.46	1	0.41	-0.22	0.03	0.07	0.18	-0.01	0.17	0.16	0.3	0.78
Trimethylamine N _o	-0.4	0.4	0.54	0.51	0.54	0.26	0.37	0.48	0.41	1	0.66	0.83	0.84	0.85	0.86	0.7	0.7	0.6	0.68
Malate	-0.26	0.13	0.38	0.3	0.3	0.53	-0.09	0.08	-0.22	0.66	1	0.93	0.91	0.81	0.89	0.31	0.4	0.72	0.27
Glucose	-0.38	0.1	0.41	0.4	0.41	0.38	0.07	0.21	0.03	0.83	0.93	1	0.96	0.96	0.96	0.57	0.62	0.8	0.49
Glycine	-0.16	0.32	0.62	0.6	0.61	0.52	0.12	0.08	0.07	0.84	0.91	0.96	1	0.95	0.96	0.46	0.45	0.7	0.42
Glycerol	-0.23	0.17	0.53	0.59	0.6	0.38	0.2	0.1	0.18	0.85	0.81	0.96	0.95	1	0.94	0.62	0.56	0.73	0.5
Nicotinurate	-0.28	0.2	0.47	0.47	0.49	0.52	0.27	0.16	-0.01	0.86	0.89	0.96	0.96	0.94	1	0.61	0.61	0.64	0.41
Aspartate	-0.52	-0.23	-0.06	0.09	0.13	0.08	0.61	0.45	0.17	0.7	0.31	0.57	0.46	0.62	0.61	1	0.91	0.3	0.42
Glutamate	-0.77	-0.21	-0.17	-0.13	-0.08	-0.06	0.41	0.66	0.16	0.7	0.4	0.62	0.45	0.56	0.61	0.91	1	0.44	0.55
Choline	-0.55	0.02	0.25	0.19	0.16	-0.13	-0.4	0.35	0.3	0.6	0.72	0.8	0.7	0.73	0.64	0.3	0.44	1	0.72
Niacinamide	-0.66	0.27	0.26	0.18	0.18	-0.49	-0.11	0.7	0.78	0.68	0.27	0.49	0.42	0.5	0.41	0.42	0.55	0.72	1