



UNIVERSIDAD
NACIONAL
DE COLOMBIA

**Cambios tempranos en la expresión
génica global ante la exposición a
lodos de perforación petrolera en el
cnidario *Hydractinia
symbiolongicarpus***

Javier Nicolás Contreras Aristizabal

Universidad Nacional de Colombia
Facultad de Ciencias, Departamento de Biología, Instituto de Genética
Bogotá DC, Colombia

2019

Cambios tempranos en la expresión génica global ante la exposición a lodos de perforación petrolera en el cnidario *Hydractinia symbiolongicarpus*

Javier Nicolás Contreras Aristizabal

Tesis de investigación presentada como requisito para optar al título de:
Doctorado en Ciencias-Biología

Director:

Luis Fernando Cadavid Gutiérrez MD. Ph.D.

Línea de Investigación:

Genética

Grupo de Investigación:

Inmunología Evolutiva e Inmunogenética

Universidad Nacional de Colombia

Facultad de Ciencias, Departamento de Biología, Instituto de Genética

Bogotá DC, Colombia

2019

“Las decisiones de nuestro pasado son los arquitectos de nuestro presente”.

Dan Brown, Inferno

A mi abuela, una mujer de lucha inagotable fuerte, altruista y generosa, que me enseñó que en la vida las grandes cosas requieren un poco de sacrificio, esfuerzo, honestidad y valor. Gracias por tus rezos, la familia entera te lo agradece enormemente cada día de nuestras vidas.

A mi mamá por creer en mí y resumir en una sola frase la fuerza para concluir esta etapa: “Aunque tu padre y tu madre te dejen Jehová Dios con todo eso te recogerá”.

A mis papás por ser hombres distintos entre los hombres de nuestra sociedad y enseñarme a ser mejor persona cada día; “porque hay que tener verraquera”

A mis hermanos y primos por ser los mejores primeros amigos de mi vida y guardar algunas de mis confidencias.

A mis amigos por estar a mi lado, acompañarme de manera constante y soportarme en los malos y buenos momentos.

A María Cristina por robarme cada risa y alegría de mi alma en este trayecto en el que me ha acompañado.

“Nada es más creativo... ni destructivo... que una mente brillante con un propósito”.

Dan Brown, Inferno

Agradecimientos

La vida académica me ha permitido tratar con una gran cantidad de mentes brillantes. Se destacan por su humanidad y entendimiento del ser, mi director Luis Fernando Cadavid, hombre de gran sapiencia. Citando al gran músico y compositor Gustavo Ceratti, solo me resta decirle a mi director “Gracias Totales”, lo demás es puro formalismo.

Un especial agradecimiento a mi *alma mater* por permitirme tener un espacio de sana convivencia donde cualquier idea y opinión tiene un lugar donde es escuchada. Un lugar de crecimiento profesional, cultural y personal. A los profesores que de una u otra manera ayudaron a formar las ideas en mí para realizar esta tesis.

La mayor de las gracias al Instituto Colombiano del Petróleo y ECOPETROL por ser las entidades financiadoras de este proyecto, en especial a Diego Gil y Marlon Córdoba por acompañarnos y apoyarnos en este proceso.

A la escuela del Profesor Luis Fernando y grupo de Inmunología Evolutiva e Inmunogenética: Henry José Rodríguez Valbuena, Alejandra Zarate Potes, Catalina Palacios, Javier Andrés López, Juan Sebastián Lugo Ramos, Rossy Johana Fajardo Castro, Jhon Alexander Galindo, Iván Dario Ocampo, Iván Aurelio Paéz Gutiérrez, Rita Mercedes Baldrich Ferrer y Blanca Elvira Schöeder López. Sus aportes e ideas fueron indispensables para la correcta ejecución de este trabajo. Aprovecho también para agradecer a los miembros del Instituto de Genética profesores, estudiantes, personal administrativo y servicios varios, especialmente a Adrián Sandoval, Andrea Carolina Niño, María José Contreras, Jenny Jaramillo y Manuel Antonio Hoyos por las tertulias y discusiones académicas, muchachos fueron muy valiosos

Resumen

La creciente demanda de combustibles fósiles ha generado un auge en la búsqueda de hidrocarburos en altamar, incluyendo zonas del Caribe colombiano. La perforación de nuevos pozos puede dejar hasta cien mil toneladas de desperdicios en el océano, compuestos principalmente por recortes de roca y residuos de lodos de perforación. Los lodos de perforación petrolera son mezclas coloidales complejas de arcillas, fosfatos, lignina, surfactantes y solventes, los cuales tienen como función principal estabilizar el pozo perforado y lubricar la broca de perforación. A pesar de que los lodos de perforación basados en agua son los más usados en la industria por su reducido impacto ambiental, existen reportes sobre efectos adversos de estos lodos en organismos marinos. Adicionalmente, los aspectos toxicodinámicos de los lodos basados en agua son aún desconocidos. En este trabajo se evaluó la expresión génica global del cnidario modelo *Hydractinia symbiolongicarpus* después de una exposición a la fase líquida de los lodos basados en agua, mediante la metodología de RNA-seq para análisis de expresión diferencial. La exposición a los lodos resultó en cambios morfológicos en los tejidos de *H. symbiolongicarpus*, que incluyeron una disminución de hasta un 50% de la biomasa, aumento en el diámetro de los pólipos y retracción de los tentáculos. El análisis de expresión diferencial por RNA-seq mostró que 1.871 transcritos estaban diferencialmente expresados después de la exposición a los lodos. Entre los transcritos diferencialmente expresados, 84 codificaban proteínas involucradas en el proceso de detoxificación intracelular, como por ejemplo los transportadores ABC, tiorredoxinas, el citocromo P450 y componentes de la vía de síntesis del Glutatión. También se encontraron 41 transcritos codificantes para proteínas involucradas en el proceso de apoptosis como la p53, proteína quinasa C, JNK, Ciclina F, el receptor de factor de necrosis tumoral y Apaf-1, cuya activación podría explicar la disminución de la biomasa de *H. symbiolongicarpus*. El análisis de los distintos grupos funcionales de proteínas diferencialmente expresadas indicó que la exposición aguda a lodos de perforación genera estrés oxidativo e inducción de apoptosis en el modelo, provocando daños celulares y tisulares potencialmente irreversibles.

Palabras clave: Expresión genética, WBM, *H. symbiolongicarpus*, Detoxificación, Exposición aguda.

Abstract

The growing demand for fossil fuels has generated an increase in offshore exploration and exploitation of hydrocarbons, including regions in the Colombian Caribbean. The drilling process of new wells can leave up to a hundred thousand tons of waste discharges, mainly composed of rock cuttings and residues of drilling muds. The drilling muds are complex colloidal mixes of clays, phosphates, lignine, surfactants, and solvents, that are used to stabilize the drilled well and to lubricate the drill bit. Despite that the water-based drilling muds are the most used in the industry due to their reduced environmental impact, there are reports on adverse effects of these muds on marine organisms. Furthermore, the toxicodynamics of water-based muds is unknown. This work evaluated the global gene expression of the model cnidarian *Hydractinia symbiolongicarpus* after an exposure to the liquid phase of water-based drilling muds, using the RNA-seq methodology for differential expression analysis. Drilling muds exposition resulted in morphological changes in *H. symbiolongicarpus* that included a decreased in up to 50% of the biomass, and increased in polyp diameter, and a retraction of the tentacles. The differential expression analysis by RNA-seq yielded 1,871 differentially expressed transcripts after mud exposition. Among the differentially expressed transcripts, 84 were predicted to encode proteins involved in cellular detoxification, like ABC transporters, thioredoxins, cytochrome P450, and components of the glutathione synthesis pathway. There were also found 41 transcripts predicted to encode proteins involved in the apoptosis process, including p53, protein kinase C, JNK, cyclin F, the tumor necrosis factor receptor, and Apaf-1, whose activation might explain the decrease in *H. symbiolongicarpus* biomass. The analysis of functional protein groups differentially expressed indicated that the acute exposition to drilling muds generates oxidative stress and induction of apoptosis, which provoke potentially irreversible cellular and tissue damage.

Keywords:

Genetic expression, WBM, *H. symbiolongicarpus*, Detox, Acute exposition.

Contenido

	I
Agradecimientos	VII
Resumen	IX
Abstract	X
Contenido	XI
Lista de figuras	XIII
Lista de tablas	XIV
1. Introducción	1
2. Marco Teórico	5
2.1. Lodos de perforación Petrolera (LPP)	5
2.2. Toxicidad por Lodos de Perforación Petrolera (LPP)	11
2.3. Mecanismos generales de detoxificación celular	15
2.3.1. Absorción.....	15
2.3.2. Distribución.....	16
2.3.3. Biotransformación.....	18
2.3.4. Eliminación	21
2.4. Modelo Biológico: <i>Hydractinia symbio-longicarpus</i> (Cnidaria: <i>Hydrozoa</i>)	23
2.4.1. Morfología y anatomía	23
2.4.1. Ciclo de vida	27
3. Materiales y Métodos	29
3.1. Cultivo de <i>Hydractinia symbiolongicarpus</i>	29
3.2. Preparación de disoluciones de prueba para exposición de WBM	30
3.3. Experimentos de estandarización a exposición de WBM.....	30
3.4. Exposición a LPP tipo WBM.....	32
3.5. Extracción de RNA, construcción de librerías de cDNA y secuenciación por Illumina	33
3.6. Análisis y procesamiento bioinformático.....	34
3.7. Análisis de agrupación	36
4. Resultados	37
4.1. Alteraciones morfológicas y morfométricas	37
4.2. Ensamblaje <i>de novo</i> de transcriptoma a partir de colonias expuestas a WBM .	42
4.3. Análisis de Expresión Diferencial (AED).....	43
4.4. Anotación funcional	47
4.5. Respuesta molecular a la exposición de WBMs	50
4.5.1. Absorción – Eliminación.....	52
4.5.2. Procesos de biotransformación.....	56

XII Cambios tempranos en la expresión génica global ante la exposición a lodos de perforación petrolera en el cnidario *Hydractinia symbiolongicarpus*

4.5.3. Efectos adversos a la exposición por WBM en <i>H. symbiolongicarpus</i>	61
5. Discusión.....	67
5.1. Consideraciones sobre los cambios morfológicos de la exposición a LPP en <i>H. symbiolongicarpus</i>	67
5.2. Aspectos toxicodinámicos relacionados a la expresión genómica por exposición a WBM en <i>H. symbiolongicarpus</i>	70
6. Conclusiones y recomendaciones	77
6.1. Conclusiones	77
6.2. Recomendaciones	78
6.3. Expectativas	79
Bibliografía	80
A. Anexo: Clasificación y componentes principales de los LPPs (11)	96
B. Anexo: Diagrama de pastel de proporciones de Términos GO asociados a transcritos DE	97
C. Anexo C: Mapa de la vía de señalización MAPK (117)	98
D. Anexo D: Mapa del sistema de señalización PIP (118).....	99
E. Anexo E: Mapa de la vía de señalización del p53 (120).....	100
F. Anexo F: Mapa de vía del Ciclo Celular (121).....	101
G. Anexo G: Mapa de señalización de la Apoptosis (122)	102

Lista de figuras

Figura 2-1. Proceso de descarte de LPPs a aguas oceánicas.....	5
Figura 2-2. Esquema general de proceso de detoxificación a nivel celular	17
Figura 2-3. Esquema de componentes enzimáticos de CYP450	19
Figura 2-4. Esquema morfológico y anatómico de <i>Hydractinia symbiolongicarpus</i>	24
Figura 2-5. Líneas celulares derivadas a partir de las células embrionarias iniciales de la gastrulación.....	26
Figura 2-6. Ciclo de vida de <i>Hydractinia symbiolongicarpus</i>	27
Figura 3-1. Mediciones realizadas a longitud de los tentáculos (Línea blanca) y diámetro de pólipos (Línea negra).....	31
Figura 3-2. Esquema del diseño experimental usado para la exposición de <i>H. symbiolongicarpus</i> a los LPP tipo WBS.....	33
Figura 4-1. Resultados morfológicos y morfométricos a la exposición aguda de WBM en colonias de <i>H. symbiolongicarpus</i>	38
Figura 4-2. Resultados morfológicos y morfométricos a después de la exposición aguda de WBM en colonias de <i>H. symbiolongicarpus</i>	40
Figura 4-3. Observaciones adicionales morfológicas en pólipos individuales de colonia expuesta a WBM.....	41
Figura 4-4. Mapa de calor de conteos FPKM para los 1871 transcritos DE	45
Figura 4-5. Matriz de correlación de Spearman entre los conjuntos de datos de conteos para cada librería de los 1871 transcritos DE.	47
Figura 4-6. Clasificación funcional de dominios proteicos Pfam de transcritos diferencialmente expresados.....	49
Figura 4-7. Transcritos codificantes a proteínas de membrana relacionadas con procesos de Absorción – Eliminación de WBM.....	53
Figura 4-8. Transcritos codificantes para enzimas involucradas en procesos de biotransformación de xenobióticos	57
Figura 4-9. Vías metabólicas de procesos biotransformación de xenobióticos.....	59
Figura 4-10. Resumen de vías de señalización del KEGG y valores de expresión promedio por vía.	63

Lista de tablas

Tabla 2-1. Tipos de lodos de perforación base agua (WBM). Propiedades de perforación y reportes toxicológicos o contaminantes.....	7
Tabla 2-2. Componentes y compuestos químicos de cada una de las fases de los LPPs	9
Tabla 2-3. Valores de toxicidad aguda de mezclas preparadas a partir de LPPs y aditivos usados	13
Tabla 2-4. Substratos, productos, reacciones, enzimas y grupo funcional polar de transferencia en los conjugados.....	20
Tabla 4-1. Formulación de lodos tipo WBM usados en pozos de exploración en la costa del bloque Tayrona	30
Tabla 4-1. Métricas, estadísticas de ensamblaje y puntos de referencia del programa BUSCO	43
Tabla 4-2. Estadísticas descriptivas globales de resultados AED.	44
Tabla 4-3. Resumen de anotación funcional (Vías KEGG, Términos GO, Categoría Funcional), a partir de transcritos diferencialmente expresados relacionados con el proceso de toxicidad por WBM.	51
Tabla 5-1. Cambios morfológicos reportados en siete especies de corales expuestas a WBMs en fase aguda hasta 96h en concentraciones de 1%, 3,16% y 10% (21).....	68

1. Introducción

El aumento en la demanda mundial por combustibles fósiles ha llevado a una continua búsqueda de nuevos yacimientos de hidrocarburos. En Colombia, las nuevas zonas de exploración corresponden principalmente al mar Caribe, específicamente al bloque Tayrona y el archipiélago de San Andrés y Providencia. En 2.004, una zona de 1100 Km² en el bloque Tayrona fue asignada para empezar operaciones de exploración en potenciales yacimientos gaseosos y líquidos en la región (1). En 2.005 se dieron permisos de exploración con un plan de duración de 1 a 1,5 años por pozo en el bloque Tayrona. En 2.015, se reportó el hallazgo de un pozo en el bloque Tayrona con cerca de 264 millones de barriles de gas y crudo listos para explotación (2), lo que llevo a un interés mayor para muestrear nuevos lugares de exploración. Por otro lado, en el Archipiélago de San Andrés y Providencia se reportó hallazgos de gas en dos pozos, con áreas cercanas al millón de hectáreas cada uno. Desde entonces se han designado 14 nuevos bloques de exploración en la zona, lo cual ha despertado preocupación por parte de la comunidad científica, política y social de la región, debido a los diversos daños que se podrían generar en los ecosistemas marinos, sobre todo en la reserva de biosfera Seaflower y en áreas marinas protegidas (3).

Los residuos provenientes de la perforación petrolera son una fuente importante de contaminación de los ecosistemas marinos. Entre los años 2.010 y 2.016 se registró un poco más de 3.200 plataformas de perforación petrolera en el mundo (4), dejando entre 640.000 y 320'000.000 de toneladas de residuos de perforación en el mar, según distintas estimaciones (5–7). Los residuos de perforación se encuentran compuestos en mayor medida por escombros provenientes del corte de la roca y en menor proporción por Lodos de Perforación Petrolera (LPPs) (8). La contaminación y toxicidad asociada a la descarga de residuos de perforación, ha sido relacionada principalmente con el uso de LPPs (6), mientras los escombros han sido considerados como materiales no contaminantes o inertes para los ecosistemas marinos (9).

Los LPPs son una mezcla compleja de sustancias incorporadas en una matriz líquida usada principalmente para enfriar y lubricar la broca de perforación (10), remover los escombros del fondo del pozo de perforación, contrarrestar las presiones opuestas y laterales dentro del pozo para prevenir escapes de gas y petróleo, prevenir el colapso de las paredes internas del pozo y permitir el proceso de instalación del casco protector (5). Los LPPs se encuentran clasificados en tres tipos de acuerdo con el solvente que se utiliza como base de la formulación (11): Los lodos a base agua (WBM, por su sigla en inglés Water-based drilling muds) (11), lodos de base acietosa (OBM, Oil-based drilling muds) (12) y lodos de base sintética (SBM, Synthetic-based drilling Muds) (13). Los LPPs de tipo WBM son los más usados por su menor costo de producción, menor impacto ambiental, mayor desarrollo, tecnificación y variedades en la formulación (11).

Los componentes principales de los WBM son una gran variedad de solventes, arcillas, fosfatos, compuestos a base de lignina y surfactantes (6). Los WBM tienen un aspecto físico de sustancia líquida coloidal viscosa, de color variable entre grises a pardos. Los primeros WBM que se usaban en las plataformas de perforación petrolera tenían en su formulación más de 60 compuestos, sustancias y materiales de derivación biológica (6) que se clasificaban en cuatro fases: Líquida, coloidal, química e inerte (10). Inicialmente, era muy común el uso de sales de cromo y asbestos en los WBM (6,14). Sin embargo, los asbestos y sales de cromo han dejado de ser usados en la formulación de los WBM, aunque sigue el empleo de compuestos ligninas ferrocromo-sulfatadas, las cuales pueden dejar trazas de cromo al ambiente (15,16).

El estudio toxicológico de los LPPs se ha enfocado en la medición de dosis y concentraciones subletales (LD50, LC50), el análisis de impacto ambiental a nivel ecosistémico y poblacional, la cuantificación de cambios en la estructura de las comunidades bacterianas, y la evaluación de alteraciones fisiológicas en algunos modelos animales (8,9,17–19). Desafortunadamente, no han sido encontrados reportes sobre la toxicocinética y toxicodinamia de los LPPs en la fisiología de los organismos marinos.

Se ha demostrado que los LPPs tienen efectos adversos en los ecosistemas marinos rápidamente después de su aplicación (8,9,17–19). En primer lugar, los LPPs pueden dispersarse en los ecosistemas marinos cerca de 10.000 metros alrededor de las

plataformas de perforación (9,18), según la fuerza de las corrientes marinas. Específicamente, uno de los componentes más abundantes de los LPPs, como las arcillas de barita, se encontraron en los tejidos de coral ubicados a 10 Km de las plataformas de perforación, evidenciando una bioacumulación de Bario en el exoesqueleto (20). En siete especies de corales formadores de arrecife (*M. annularis*, *A. agaricites*, *D. stokesii*, *A. cervicornis*, *P. divaricata*, *P. furcata*, *P. asteroides*) se reportaron efectos adversos a concentraciones de 3,16% a 100% y tiempo de exposición de hasta 96h, que incluyeron retracción e inflamación de pólipos, incremento en secreción de moco, desintegración de tejidos y muerte de la colonia (21). En otro caso, el coral de aguas profundas *L. pertrusa* mostró efectos adversos similares a los corales mencionados anteriormente (22), como lo fueron retracción de pólipos e incremento en la secreción de moco. Adicionalmente, se reportó muerte de pólipos en un 2,2% de los casos observados después de 84 días de exposición a una concentración de 2,5mg WBM por 100ml disolución (22).

En este trabajo se investigó los efectos en la expresión genética global de la exposición a WBM en el modelo cnidario *Hydractinia symbiolongicarpus* usando análisis de expresión diferencial basados en RNA-seq. *H. symbiolongicarpus* es un cnidario colonial sésil perteneciente a la Clase Hydrozoa, que vive sobre las conchas donde habitan los cangrejos ermitaños de la especie *Pagurus longicarpus* (23). *H. symbiolongicarpus* presenta un plan corporal simple compuesto de tres tejidos principales pólipos, mata estolonial y cavidad gastrovascular (23). *H. symbiolongicarpus* ha sido utilizado como modelo cnidario de investigación en ecología, biología del desarrollo, inmunología comparativa y genética molecular (23). El grupo de Inmunología Evolutiva del Instituto de Genética de la Universidad Nacional de Colombia mantiene cultivos estables de este organismo desde hace más de 10 años. Adicionalmente, *H. symbiolongicarpus* presenta un gran potencial como modelo biológico para evaluación toxicológica de agentes contaminantes debido a su plan corporal simple, tipo de vida sésil y colonial, además de su importancia como simbiote del cangrejo ermitaño.

Las metodologías basadas en técnicas de secuenciación de nueva generación (Next Generation Sequencing, NGS) como el RNA-seq, han mostrado ser una herramienta muy poderosa en el estudio de toxicidad de contaminantes y compuestos derivados de la producción petrolera (24). Un estudio mostró cambios de la expresión genética total en

peces tipo carpa expuestos a petróleo en el Golfo de México (24). Allí se logró determinar la sobre expresión de las vías del metabolismo involucradas en la biotransformación de xenobióticos, incluyendo Citocromo P450, Glutación S transferasa, Receptor del Aril-hidrocarburo y Glucoronosil transferasa a diferentes concentraciones de exposición (24). Este reporte deja un precedente de éxito de las metodologías aplicadas al campo de la toxicología y permite que pueda ser aplicada con otros tipos de sustancias con potencial tóxico como los WBM.

2. Marco Teórico

2.1. Lodos de perforación Petrolera (LPP)

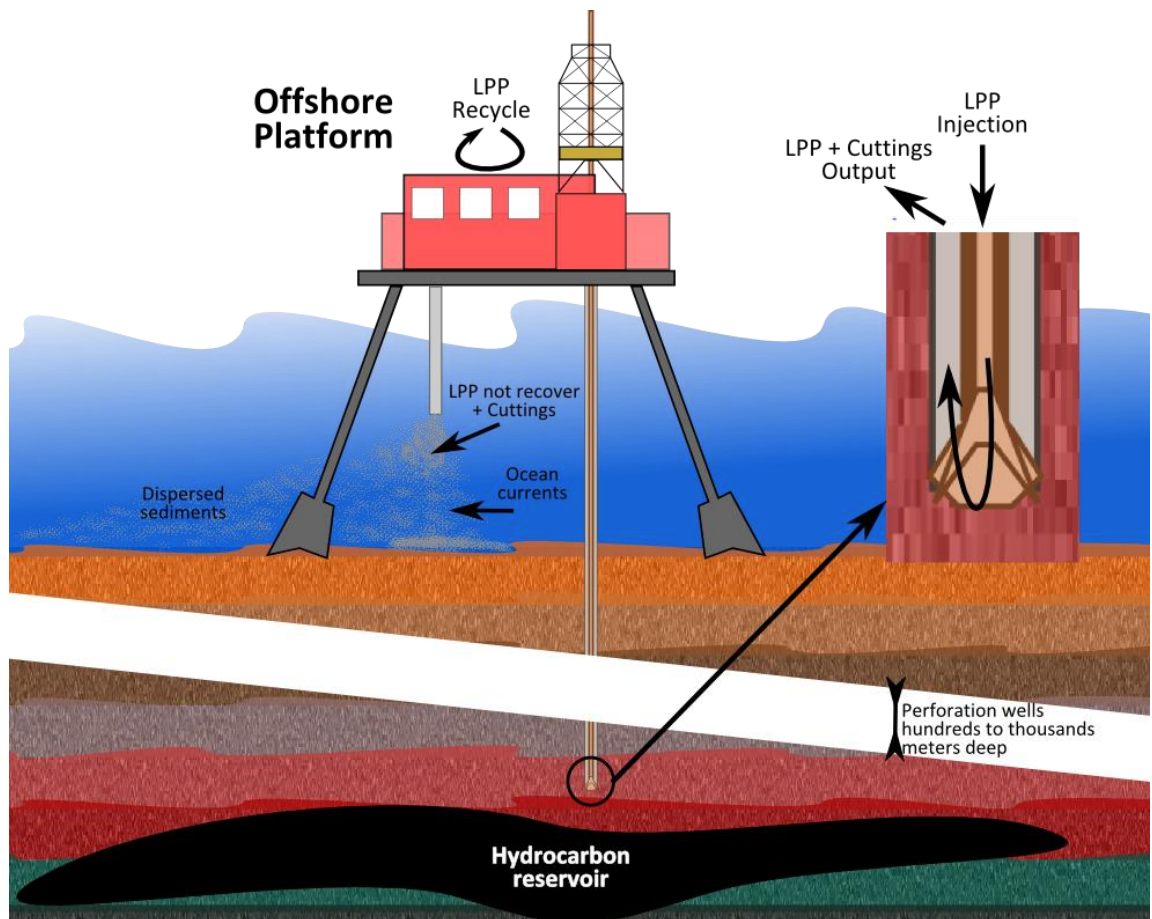


Figura 2-1. Proceso de descarte de LPPs a aguas oceánicas. Inicialmente los LPPs son bombeados a través de la tubería interconectada a la broca de perforación. Posteriormente el LPP realiza sus funciones en la broca y es eyectado por la tubería de revestimiento junto con los escombros o "cuttings" de perforación. Una vez de regreso en la plataforma el LPP se recupera entre el 60% y 90% para finalmente se vertido en el agua oceánica junto con los escombros de perforación (6).

El proceso de perforación de pozos de hidrocarburos costa afuera es utilizado durante la fase de exploración. En esta fase, se utiliza una maquinaria especializada a manera de un taladro vertical que tritura la roca de plataformas oceánicas a grandes profundidades según donde se encuentre el reservorio de hidrocarburos (**Figura 2-1**) (19). Para facilitar el proceso de perforado se emplean los lodos de perforación (LPP), los cuales son fluidos viscosos utilizados para remover los escombros producidos durante el proceso de perforación petrolera (25) y adicionalmente, contribuyen a la refrigeración y limpieza de los cabezales de la broca, reducción de la fricción entre la broca y los estratos rocosos de perforación, estabilización del pozo, muestreo del perfil estratigráfico de los sedimentos depositados, soporte durante el proceso de instalación del casco protector y ayuda a la retención de la filtración de fluidos al pozo de perforación a través de rocas permeables (19,25,26).

Los LPP son una mezcla compleja de sustancias que varía en composición y concentración de sustancias de acuerdo con el perfil estratigráfico del lugar y tipo de yacimiento al que se pretende llegar (26). Los componentes principales son agua, solventes orgánicos, material espesante (Ej, barita o sulfato de bario, poliacrilatos u otros polímeros orgánicos), aditivos, emulsificantes (Ej, Alquilacrilatos, sulfonatos y óxidos de polietileno), sustancias tampón, limos, arcillas, defloculantes, éteres, ésteres, olefinas, hidrocarburos aromáticos (18). Los LPPs se clasifican tradicionalmente en dos tipos principales de acuerdo con su solvente base: agua o aceite (**Anexo A**) (11,25).

Además de las características fisicoquímicas, las nuevas técnicas de producción de LPPs contemplan que haya una minimización en la liberación de agentes contaminantes al medio ambiente a través de los residuos de perforación y bajos costos de producción (25). Debido a esto, los lodos que cumplen con estas dos características son de tipo WBM, haciéndolos los más ampliamente usados en la industria y de los cuales se han descrito al menos 30 diferentes tipos de lodos de la clase WBM (**Tabla 2-1**) (25).

La formulación química de los LPPs categoriza sus componentes en cuatro fases: líquida, coloidal, inerte y química (26). Cada una de las fases otorga propiedades fisicoquímicas específicas de viscosidad, propiedades anticorrosivas, valor de rendimiento, baja capaci-

Tabla 2-1. Tipos de lodos de perforación base agua (WBM). Propiedades de perforación y reportes toxicológicos o contaminantes. Tomado de (11).

Nombre	Propiedades de perforación	Componentes principales	Reporte tóxico ó Contaminantet	Ref
Fluidos no disperses	Alta viscosidad y mayor proporción de punto-plástico.	No especificado	N/A	N/A
Fluidos Dispersos	Buenas propiedades anticorrosivas	Bentonita	Altera el paisaje de los lechos marinos y modifica el equilibrio en las poblaciones de invertebrados.	(27)
		Tiner	Puede inducir estrés oxidativo en organismos por vías de metabolismo respiratorio.	(28)
		Carboxi metil celulosa	Sin efecto tóxico o contaminante reportado.	N/A
Fluidos Inhibidos	Minimiza el impacto ambiental	Glicerol	Sin efecto tóxico o contaminante reportado.	N/A
		Silicatos Na o K	Biocompatibilidad con organismos vivos	(29)
Lodos a base de fosfatos	No especificado	NaCl	Sal encontrada en los ambientes marinos, sin riesgo toxico y contaminante.	N/A
		Fosfatos en baja concentración	Sin efecto tóxico o contaminante reportado.	N/A
		NaOH	Tóxico en contacto directo sobre tejidos, de manera aguda o crónica.	(30)
Lodos a base de lignina	Resistencia a altas temperaturas (alrededor de 205°C), buen control de viscosidad, fuerza gelificante y poca perdida de fluidez.	Lignita	Puede tener reservorios de metales pesados, <i>per se</i> no tiene efectos tóxicos. Riesgo potencial como agente contaminante.	(31)
Lodos de quebracho	Propiedades dispersantes	Quebracho (Agente de bronceado polifenólico)	Sin efecto tóxico o contaminante reportado.	N/A
		Polifosfatos	Sin efecto tóxico o contaminante reportado.	N/A
Lodos Lignosulfonados	Resistente a la contaminación, alta dureza en presencia de sales	Ferrocromo lignosulfonato	Cromo o compuestos derivados del cromo tienen alto riesgo de ser contaminante y tóxico para la vida silvestre. En humanos tiene propiedades carcinogénicas, especialmente el Cr(IV).	(32)
Lodos a base de Limos	Baja viscosidad, poca fuera gelificante y buena suspensión de agentes espesantes.	Limos	Sin efecto tóxico o contaminante reportado.	N/A
		NaOH	Tóxico en contacto directo sobre tejidos, de manera aguda o crónica.	(30)
		Tiner	Puede inducir estrés oxidativo en organismos por vías de metabolismo respiratorio.	(28)
Lodos de agua dulce bajos en solidos	Alta tasa de penetración y promueve la sedimentación de solidos perforados por floculación.	Varios tipos de floculantes y alto nivel de agua	Muchos agentes floculantes son amigables con el medio ambiente, especialmente los floculantes de tipo orgánico o biofloculantes.	(16)
Lodos de agua salada	No especificado	Na, K, Mg, Ca, Cl ⁻ , SO ⁻⁴	Iones salinos encontrados en los ambientes marinos, sin riesgo toxico y contaminante.	N/A
		Bentonita	Altera el paisaje de los lechos marinos y modifica el equilibrio en las poblaciones de invertebrados.	(27)
		Lignina lignosulfonada	Puede ser biodegradada por algunas especies de hongos e invertebrados. No tóxico o contaminante..	(15)
Lodos de densidad variable	Variación de la densidad en función de la presión en formaciones subterráneas.	Estireno	Agente Carcinogénico en invertebrados. Puede formar compuestos epóxicos por metabolismo de Cyp450.	(33)
		Divinilbenceno	Sin efecto tóxico o contaminante reportado.	N/A
		Acrlonitrilo	Tiene efecto agudo con síntomas colinérgicos y reacciones de hiperventilación en ratones.	(34)
		Cloruro de vinilideno	Sin efecto tóxico o contaminante reportado.	N/A
Fluidos Drill-in	No especificado	No especificado	N/A	N/A

dad reológica y capacidad gelificante (25). Adicionalmente, la formulación química de los LPPs debe ser modificable según el lugar y la estratigrafía de la perforación.

- La fase líquida (**Tabla 2-2**) es el solvente de los LPPs, la cual puede estar compuesta por agua (dulce o salada) o emulsión (agua-petróleo o derivado). Dependiendo del LPP y su uso final, la cantidad de fase líquida puede variar entre un 30% y 75% 24. En ambientes marinos suele usarse con mayor frecuencia agua salada saturada o parcialmente saturada (11).
- La fase coloidal o reactiva (**Tabla 2-2**) está constituida principalmente por arcilla, limos o coloides orgánicos, los cuales le dan viscosidad variable al LPP (11). Esta fase puede variar de acuerdo con la salinidad del agua. Si el agua es dulce se utilizan arcillas tipo montmorillonita y si el agua es salada se utilizan arcillas con atapulguita (10).
- La fase inerte (**Tabla 2-2**) se encuentra el material densificante (Barita), que tiene como principal componente sulfato de bario y sales derivadas, con una gravedad específica de 4,2, el cual ayuda a disminuir o aumentar la viscosidad de acuerdo con la temperatura de la broca (10). A la fase inerte se le pueden añadir aditivos para modificar sus características fisicoquímicas como arenas, sílices negros, arcillas no hidratables, calcita, aragonita, carbonato de hierro, carbonato de zinc, ilmenita, tetraóxido de magnesio, óxido ferroso, óxido de zinc, óxido de zirconio y carbonato de plomo (11,35). Además, los aditivos tienen la característica de ser fácilmente extraíbles del sistema
- La fase química (**Tabla 2-2**) está compuesta por iones, sustancias solubles, emulsificantes, metales pesados (19), reductores de filtrado y otras sustancias que le dan al lodo sus propiedades físicas específicas (10), como de dispersante de arcillas. Principalmente suelen usarse fosfatos, tanatos de sodio (Hidróxido de sodio más taninos), lignosulfanatos (Pulpa de madera de varios tipos), lignitos, fluconotantes y surfactantes (11).

Tabla 2-2. Componentes y compuestos químicos de cada una de las fases de los LPPs, Adaptada de (6)

Fase	Categoría	Componente	
<i>Inerte</i>	Agentes de carga y viscosificadores	Barita	
		Carbonato de Calcio	
		Bentonita	
		Sub-Bentonita	
		Atapulquita	
		Bentonita beneficiada	
		Fibra de Asbesto	
		Polímeros orgánicos largos producidos por por bacterias	
<i>Química</i>	Químicos comerciales	Cromato de sodio	
		Hidróxido de sodio	
		Bicarbonato de sodio	
		Carbonato de bario	
		Sulfato de calcio	
		Hidróxido de calcio	
		Cloruro de sodio	
		Hidróxido de potasio	
		Cloruro crómico	
		Tetrafosfato de sodio	
		Pirofosfato ácido de sodio	
		Quebrancho	
		Quebrancho caustificado	
		Extracto de cicuta	
Taninos			
<i>Química</i>	Dispersantes	Lignita minada	
		Lignita caustificada	
		Lignosulfonato de calcio	
		Lignosulfonato modificado	
		Compuestos lignosulfonatos mezclados	
		Reductores de la pérdida de líquido	Almidon pregelatinizado
			Sodio carboximetil celulosa
			Polimero celulosico polianiónico
			Poliacrilato de sodio
		Lubricantes, Detergentes, Emulsificadores	Lubricantes para presión extrema
			Hidrocarburos procesados
			Asfaltos solubles en aceite

10 Cambios tempranos en la expresión génica global ante la exposición a lodos de perforación petrolera en el cnidario *Hydractinia symbiolongicarpus*

Fase	Categoría	Componente
	Antiespumantes, flucolulantes y bactericidas	Surfactantes solubles en aceite
		Detergente
		Emulsificadores no iónicos
		Mezcla de surfactantes aniónicos
		Especies organicas neutralizadas con aminas
		Mezclas de ácidos grasos sulfonados con materiales asfálticos
		Estearato de Aluminio
		Sodio alquil aril sulfonato
		Agente floculante
		Paraformaldehido
<i>Coloidal</i>	Materiales de baja circulación	Pentaclorofenato de sodio
		Material Fibroso
		Lana mineral fibrosa
		Conchas de nueces finas y medianas
		Mica de tierra
		Celofano
		Combinación de granulos, escamas y materiales fibrosos de varios tamaños en un saco
		Mezcla de fluidos pesados con tamponamiento de materiales suaves
		Reactivo de control de esquisto
		Bentonita extender
<i>Líquida</i>	Base aceitosa y lodos de emulsión invertida	Surfactantes no iónicos
		Amina de filmación
		Emulsión invertida, Agua en diesel aceitoso
		Lodo de base aceitosa
		Fluido de base de gelatina aceitosa
	Emulsificantes para emulsiones invertidas	Emulsificante primario
		Gel de construcción y espesante
		Estabilizador de alta temperatura

2.2. Toxicidad por Lodos de Perforación Petrolera (LPP)

El impacto ambiental de la perforación resulta principalmente del vertimiento de cerca de 180.000 galones de residuos provenientes de LPP por cada taladro utilizado (36), de acuerdo con el esquema de ciclado y reutilización usado en las distintas plataformas (**Figura 2-1**). La cantidad de desechos que puede dejar la perforación de un pozo puede variar desde 13.000. hasta 210.000 toneladas (18); y en los escenarios más extremos oscila entre las 50.000 y 100.000 toneladas. por pozo al año (7). Los impactos ambientales pueden verse a varios cientos de metros alrededor de los pozos de exploración ya que se ha registrado que los sedimentos tienen un radio de dispersión entre 25m hasta 10.000m máximo sobre el lecho marino y columna de agua del lugar de exploración, de acuerdo a la fluencia de las corrientes oceánicas (18,27,37). Inclusive se ha demostrado que la barita puede ser transportada por las corrientes oceánicas y depositarse en lugares distantes, como por ejemplo en el mar de Noruega se ha encontrado sedimentos de Barita en concentraciones de 5% P/P en exoesqueletos calcáreos del coral *Lophelia petrusa* que se hallaban a 4 Km del lugar de perforación (20).

Una de las primeras alteraciones ecosistémicas observadas son los cambios en las dinámicas poblacionales de las distintas comunidades marinas (19,38). Se ha visto que un aumento en las deposiciones de sedimentos con contenidos de LPPs llevan a alteraciones en el establecimiento y desarrollo de algas pelágicas y bentónicas (38). Así mismo, se ha observado una reducción en el intercambio de gases y aumento en la anaerobiosis generando un cambio en la composición de comunidades microbianas de los bentos marinos (19). En otras poblaciones bentónicas se ha registrado pérdida de biodiversidad y abundancia de especies en un radio de 50 m del sitio de deposición de escombros de una zona de perforación (los escombros contienen del 10% al 20% de LPP), dejando ver que sus efectos son locales (39). Otros análisis *in vitro* comparando los perfiles de agregación del fitoplancton mostraron alteraciones en el tamaño, tasa de asentamiento y comportamiento de agregación después de su exposición a LPPs (8).

También la macrofauna de invertebrados sésiles (Poríferos y cnidarios) mostraron una perturbación sobre la densidad de asentamientos, los cuales habitan a una profundidad cercana a los 100m (40). Específicamente, la cobertura de la macrofauna de una zona de 100m a la redonda era de 0.23 individuos/m² antes de la perforación, mientras que después de 76 días de iniciada la perforación se observó una reducción de un poco más del 50% de la cobertura (0.08-0.1 Individuos/m²) (40). En otro caso de invertebrados bentónicos como los cangrejos *Paralomis sp.*, *Shinkaia crosnieri galatheid* y el camarón *Alvinocaris longirostris*, se determinó que las abundancias de poblaciones se alteraban dramáticamente favoreciendo el incremento de la población de *S. crosnieri* alrededor de un 90%, seguido entre un 10% de *S. crosnieri galatheid* y 8% a *A. logirostris*. Además, los avistamientos de los individuos de la especie *Paralomis sp.* fueron escasos, en áreas de hasta 30 metros a la redonda del lugar de perforación, luego de 16 meses de iniciados los procesos de exploración (27).

La exposición a LPP tipo WBM, pueden generar efectos adversos en órganos y tejidos de invertebrados bentónicos. En vieiras se observó que las partículas disueltas en la columna de agua provenientes de los WBM generan una disminución en la tasa de crecimiento de los individuos, estrés oxidativo, daño histológico en branquias y glándulas digestivas, disminución de la estabilidad de membranas lisosomales y daños en el DNA (7). En bivalvos como *Placopecten magellanicus*, la exposición a LPP en concentraciones de 10 mg/L (Equivalente a 10 ppm) o superiores mostraron una reducción en el crecimiento de tejidos asociados a órganos reproductivos debido principalmente a la Barita (41), fenómeno reportado también en las vieiras.

Incluso en casos más dramáticos, donde se emplearon especies coralinas como *Montastrea annularis* y *Agaricia agaricites*, los cuales son altamente sensibles a cambios ambientales, se demostró que pueden morir luego de 75 horas de exposición a LPP si las concentraciones superan los 150 µl/L o 0.15 ppm de LPP, mientras que el coral *Acropora cervicornis* lo hace a las 65 horas de exposición a una concentración superior a 1000 µl/L de LPP (21), siendo estas las más sensibles a la exposición por LPP. Además, los LPPs también mostraron un efecto en la morfología de los corales mencionados anteriormente, observándose una retracción de los tentáculos. Dicho fenotipo también se observó en otras especies de corales usadas en el mismo estudio como *Porites astreoides*, *P. divaricata*, *P.*

furcata y *Dichocoenia stokesii*. La retracción total de los tentáculos luego en estas especies de corales se observó luego de 24 horas de exposición a una concentración de 1000 ppm, que en la mayoría de casos duro hasta las 48h y 72h, mientras que en otros se observó una relajación de los tentáculos hacia las 72h y 96h (21).

Tabla 2-3. Valores de toxicidad aguda de mezclas preparadas a partir de LPPs y aditivos usados. Concentraciones subletales CL50 a 96h. Adaptada de (6).

Especie	Organismo	Mezcla de Prueba	CL ₅₀ -96h (ppm por Vol o mg/L)
<i>Skeletonema costatum</i>	Diatomea		>100-<1000*3 (EC50)-652*4 (EC50)
<i>Acartia tonsa</i>	Copepodo	Lodo en gel-Agua salada	100*3- 385*4
<i>Menidia menidia</i>	Pez teleosteo		>100,000
<i>Skeletonema costatum</i>	Diatomea		3700 (EC50)
<i>Acartia tonsa</i>	Copepodo	Agua marina ligeramente tratada con ferrocromo-lignosulfonato en agua dulce	10,000
<i>Menidia menidia</i>	Pez teleosteo		48,500
<i>Skeletonema costatum</i>	Diatomea		<18,000-<32,000 (EC50) >10,000-<18,000*4 (EC50)
<i>Acartia tonsa</i>	Copepodo	Ferrocromo-lignosulfonato en lodo base agua dulce	100*3-300*4
<i>Menidia menidia</i>	Pez teleosteo		>100,000
<i>Oncorhynchus kisutch</i>	Salmon coho		15,000-190,000
<i>Nereis sp.</i>	Poliqueto		23,000->560,000
<i>Mya sp.</i>	Bivalvo	Siete diferentes LPPs	10,000- >60,000
<i>Hemigrapsus nudus</i>	Cangrejo		53,000- >560,000
<i>Orchestia sp.</i>	Amphiopodo		14,000- >560,000
<i>Oncorhynchus gorbusha</i>	Salmon rosado	LPPs (10 3 mg/l), ~228 barita, ~88 bentonita	3,000-29,000
<i>Neomysis integer</i>	Camaron		10,000-50,000; 100,000-125,000; 74,000 (48h); >100,000 (48h)*5
<i>Pandalus hypsinotus</i>	Camaron		44,000; 32,000-150,000
<i>Anisogammarus confervicolus</i>	Amphiopodo	~55 Ferrocromo lignosulfonato, ~3 Soda caustica, ~79% Agua	>70,000*5; >200,000*5; 10,000-50,000 (48h)
<i>Gnorimospheroma oregonensis</i>	Isopodo		>70,000
<i>Modiolus modiolus</i>	Bivalvo		>30,000
<i>Leptocottus armatus</i>	Pez teleosteo		100,000-200,000 (48h)

*3 Rango hallado, *4 Definitivo, *5 Únicamente sobrenadante.

Por otro lado, los estudios de toxicidad por LPP se han realizado en diferentes organismos invertebrados y vertebrados, utilizando diferentes mezclas de prueba derivadas de LPPs o con aditivos en soluciones con fase líquida acuosa (**Tabla 2-3**). Solo en los casos donde los organismos eran microscópicos, los valores de concentración letal 50 (CL₅₀) eran bajos cuando se usaban los aditivos de LPP, como en el caso de la diatomea *Skeletonema costatum* (6). Cuando se empleaban los LPPs completos se observó que los valores de concentración en general eran representativamente menores que los vistos en las mezclas de aditivos de LPPs, con rangos que varían entre los 10,000 y 560,000 ppm con respecto a rangos de 100 a 200,000 ppm respectivamente (6).

Un aspecto central para el estudio de la toxicidad por LPP es que sus componentes aislados no necesariamente son equivalentes a la toxicidad del LPP completo (**Tabla 2-3**) (42). Por ejemplo, el uso de una base aceitosa en la fase líquida genera múltiples contaminantes como hidrocarburos aromáticos, algunos detergentes, ácido sulfónico, aminas y amidas. Estos pueden permanecer en el medio hasta 180 días después de su uso y en algunos casos pueden actuar como biocidas (19). En la fase química se encuentran metales pesados como el cadmio, plomo y mercurio, que son tóxicos y bioacumulables (36). Otras sustancias como la Barita, cuyo componente activo es el sulfato de bario y está presente en gran proporción en los LPP en base agua (19,26), puede disolverse en pequeñas cantidades en el agua circundante, a pesar de su baja solubilidad en agua (43). Cada uno de los componentes anteriormente mencionado puede actuar de manera complementaria y mayor cuando se encuentran mezclados y se absorben de manera simultánea en el organismo. Este fenómeno podría estar explicando porque motivo los valores de LC₅₀ disminuyen cuando se utiliza como sustancia de prueba LPP completo.

En general, los impactos ambientales por LPP son amplios y variados, y su potencial para biorremediación depende de la biota y ecosistema asociados al lugar. Un estudio realizado en Noruega muestra que después de las operaciones de perforación al ecosistema le toma cerca de 6 meses en empezar a recuperarse (44). Esta recuperación no es sucesional, ya que las especies que recolonizan son diferentes a las iniciales, incluso cuando se aumenta la ventana temporal. Una de las razones importantes que explican esta transición, es que

las condiciones de las zonas cercanas a los pozos de perforación varían en cuanto a la concentración de elementos traza, nutrientes y oxígeno disuelto, por lo cual las especies que colonizan estas zonas deben tener un rango de adaptabilidad amplio (44).

Los estudios toxicológicos con LPP se pueden resumir básicamente en estudios de impacto ambiental, los cuales evalúan fases agudas y crónicas, dejando de lado el estudio de la toxicocinética y toxicodinamia de los LPP (19–21,39,41,45,46). En general estos estudios incluyen también planes de mitigación de impacto ambiental, como protocolos de manejo para la descarga y reubicación de desechos provenientes de residuos de perforación (47). Este trabajo llevó el análisis toxicológico de los LPP a otro nivel, ya que a partir de datos de expresión diferencial es posible hacer análisis que permitan ver algunos de los efectos toxicocinéticos de los LPP en organismos coloniales sésiles marinos como *H. symbiolongicarpus* (Cnidario). Igualmente, este trabajo es pionero en el país, ya que permitió abrir el campo aplicativo de tecnologías de secuenciamiento de última generación a la toxicología ambiental.

2.3. Mecanismos generales de detoxificación celular

Los procesos que determinan la toxicidad celular de una sustancia son diversos y a su vez cada una de las etapas tiene distintos niveles de complejidad durante el tránsito del xenobiótico en la célula. Todo xenobiótico con potencial tóxico cuando entra en un sistema biológico debe pasar por cuatro etapas para poder ejercer un efecto adverso en la célula diana: absorción, distribución, biotransformación y eliminación (**Figura 2-2**) (48,49).

2.3.1. Absorción

A nivel celular los mecanismos de absorción de xenobióticos involucran todos los procesos de transporte pasivo (difusión simple y filtración) y transporte especial (Transporte activo,

transporte facilitado y pinocitosis) que presentan las membranas biológicas (**Figura 2-2**) (48,49). Cada mecanismo de absorción celular de xenobióticos dependerá de sus características físico-químicas como polaridad, formas ionizadas (pH del medio), coeficiente de partición y tamaño de la molécula (49). Por ejemplo, la urea (sustancia endógena) es una sustancia apolar soluble en sustancias hidrófobas que puede atravesar membranas biológicas por difusión simple, mientras que el ácido fórmico, el cual es una sustancia polar que presenta un coeficiente de partición octanol/agua de -0.41, no puede atravesar libremente las membranas biológicas y requiere un proceso de transporte a través de canales proteicos como las acuaporinas (49).

2.3.2. Distribución

La distribución de los xenobióticos en la célula es un proceso dinámico que involucra el flujo y tasa de absorción y eliminación (48). En organismos multicelulares, el proceso de distribución de un xenobiótico en las células, al igual que la absorción, depende de las características fisicoquímicas del xenobiótico, la cantidad y características de las barreras biológicas y la afinidad por sustancias endógenas que pueda presentar el xenobiótico (49). El proceso de distribución dependerá de la cantidad de compartimentos (Ej, Sistemas gastrovasculares, órganos, tejidos, espacios intersticiales y células) que presente el organismo o de su complejidad de plan corporal antes de llegar a la célula. Los factores que pueden afectar la distribución de xenobióticos en las células son los fluidos plasmáticos y extracelulares, cantidad y características de las membranas biológicas; característica ligada a los factores fisicoquímicos del xenobiótico, y afinidad de los xenobióticos por los distintos tipos de biomoléculas, células, tejidos y órganos (49).

En la distribución de los xenobióticos es necesario también distinguir el lugar en donde se puede concentrar y el lugar en donde ejerce el efecto adverso (49). Algunas células de acuerdo con su papel dentro del organismo pueden funcionar como acumuladores (Ej, adipocitos), mientras que otras células con funciones metabólicas especializadas (Ej, hepatocitos) pueden tener un papel como célula diana de un xenobiótico (49). Además, la distribución depende también la afinidad de los xenobióticos por proteínas plasmáticas e intersticiales, ya que en muchos casos las proteínas plasmáticas tienen doble función, acumuladora y transportadora.

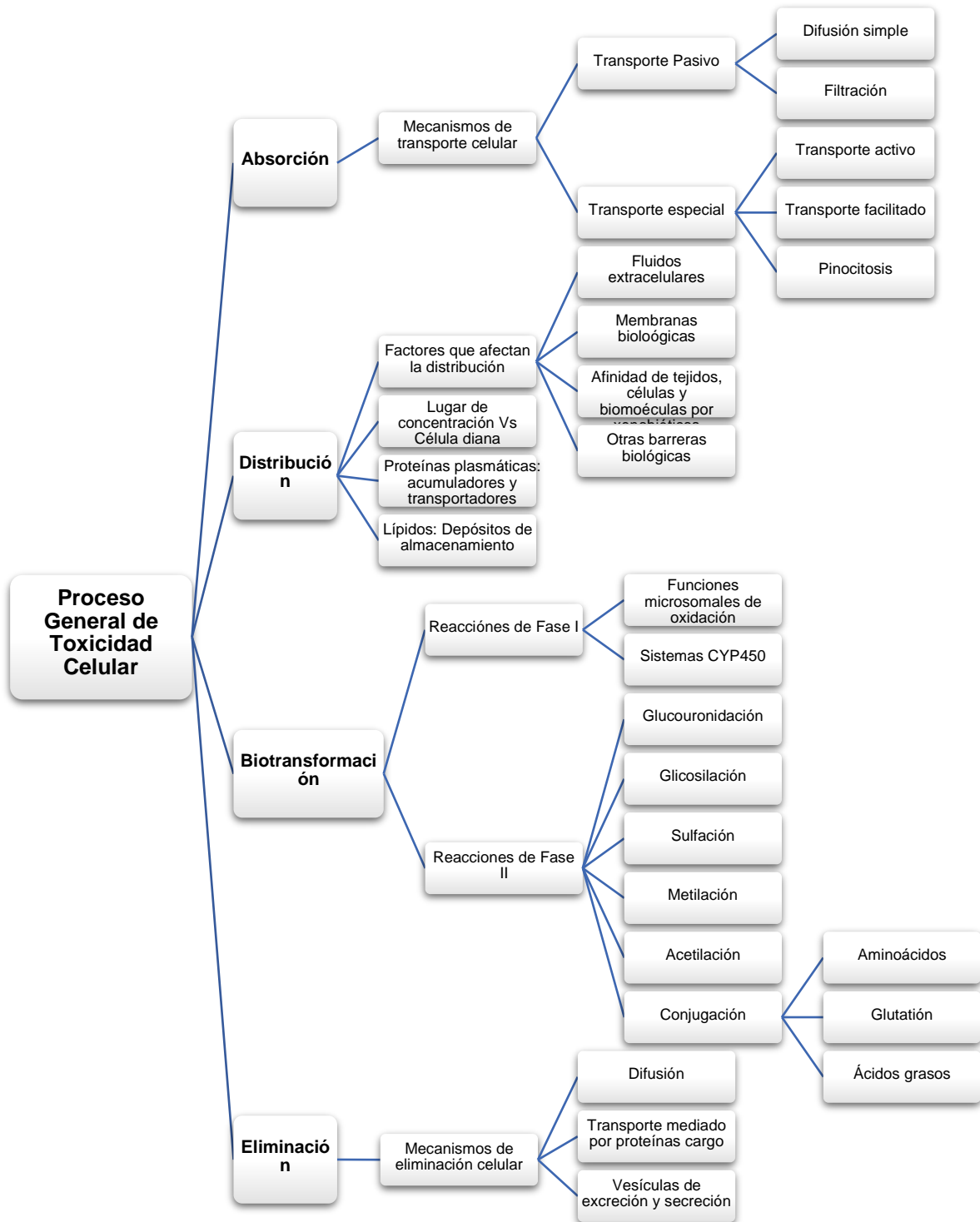


Figura 2-2. Esquema general de proceso de detoxificación a nivel celular. Adaptado de (49)

En el caso de la función acumuladora, normalmente el xenobiótico tiende a desplazar a otra sustancia de características químicas similares endógena o xenobiótica, alterando la función esencial de la proteína (49). Para la función transportadora, la proteína puede facilitar el flujo del xenobiótico hacia la célula diana, potencializando el efecto adverso del xenobiótico en dicha célula (49). Finalmente, los tejidos con alta concentración de lípidos pueden funcionar como acumuladores genéricos de xenobióticos, especialmente con aquellos que tengan valores de coeficientes de partición octanol/agua iguales o mayores a cero. Este fenómeno puede aumentar el tiempo de exposición de la célula al xenobiótico y cambiar la dinámica de distribución en el tiempo, generando efectos adversos crónicos a nivel celular (49).

2.3.3. Biotransformación

La biotransformación es el proceso metabólico por el cual los xenobióticos son transformados químicamente en la célula (49). El objetivo final de la biotransformación es aumentar la polaridad de los xenobióticos y hacerlos más solubles para que sean fácilmente excretables por la célula (49,50). Los procesos de biotransformación ocurren en células con alta actividad enzimática como los hepatocitos. La biotransformación consta de dos etapas denominadas reacciones de fase I o primera fase y reacciones de fase II o de segunda fase (49). Las reacciones de fase I consta de procesos de oxidación, reducción, hidrólisis, isomerización, etc; mientras que las reacciones de fase II involucra procesos de glucoronidación, glucosidación, sulfación, metilación, acetilación, conjugación (aminoácidos, glutatión y ácidos grasos) (49).

Las reacciones de primera fase se dividen en dos subprocesos: Funciones microsomales de oxidación y reacciones de oxidorreducción mediado por citocromo P450 (CYP450). Las funciones microsomales de oxidación son realizadas en el retículo endoplásmico liso de la mayoría de las células e involucra un complejo enzimático caracterizado por Monooxigenasas que contienen flavina, Alcohol deshidrogenasa, aldehído deshidrogenasa, sistemas peroxidasas-catalasas-superoxidodismutasa, xantina oxidasa, amino oxidasas, aromatasas y alquilhidrazina oxidasa (49). Este complejo enzimático

requiere cofactores al oxígeno y NADPH para catalizar las reacciones de oxidación en substratos que contengan átomos de nitrógeno, azufre y fósforo. Además, puede oxidar radicales o grupos funcionales amino, hidracinas, sulfatos y fosfatos (49).

Las reacciones de oxidorreducción mediadas por la familia de CYP450 se componen de cuatro enzimas (**Figura 2-3**), dos flavoproteínas deshidrogenasa (NADH-Citocromo B₅ reductasa y NADPH-CYP450 reductasa) y dos hemoproteínas (Citocromo B₅ y CYP450) (49). Los Citocromos B₅ se encuentran embebidas en la bicapa fosfolipídica de la membrana del retículo endoplasmático liso facilitando la interacción con los CYP450 (**Figura 2-3**). Las

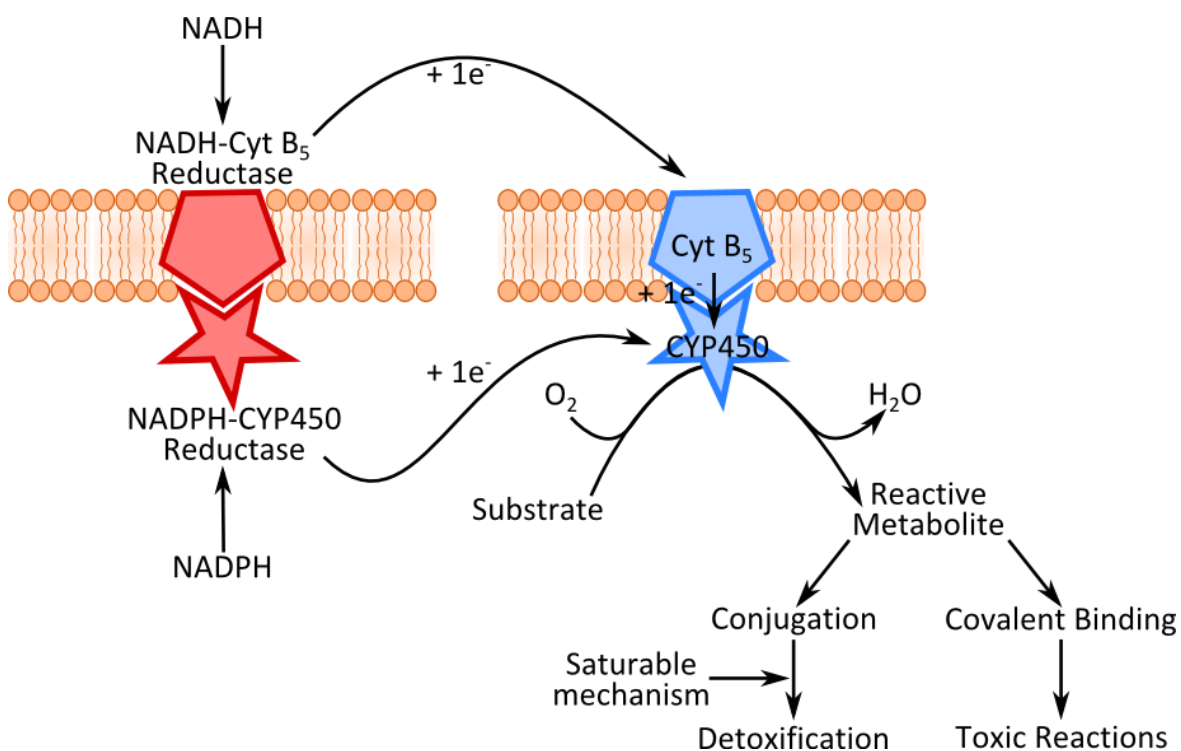


Figura 2-3. Esquema de componentes enzimáticos de CYP450. Adaptado de (49).

flavoproteínas funcionan como agentes reductores al transferir un electrón del NADPH al CYP450 y otro electrón del NADH al Citocromo B₅ (**Figura 2-3**) (49). Finalmente, el CYP450 recibe un segundo electrón del Citocromo B₅ para poder realizar varias reacciones de oxidación, peroxidación, reducción, y metabolismo hidrolítico de substratos endógenos y xenobióticos (49).

Tabla 2-4. Substratos, productos, reacciones, enzimas y grupo funcional polar de transferencia en los conjugados. Adaptado de (49)

Químico conjugado	Producto	Reacción	Transferasa	Grupo Funcional
Ácido glucurónico	Glucorinoato	Glucoronidación	UDP-Glucoroniltransferasa	OH COOH NH ₂ SH
Conjugación de glucosido	Glucosido	Glicosidación	UDP-Glucosiltransferasa	OH COOH SH
Ácido sulfúrico	Etereal sulfato	Sulfación	Sulfotransferasa	OH NH ₂ SO ₂ NH ₂
Glutatión	Ácido mercaptúrico	Conjugación de glutatión		Epoxido
Glicina	Ácido hipúrico	Conjugación de aminoácidos	Glutatión S Transferasa	Haluros orgánicos
Glutamina	Conjugado de glutamina	Conjugación de aminoácidos		
Radicales metil	Metil éter	Metilación	Metil Transferasa	OH NH ₂
Ácido acético	Acetil éter	Acetilación	Acetil transferasa	OH NH ₂
Tioles	Tiocianato	Sulfhidración	Tioredoxinas	SH

Las reacciones de fase II o reacciones de conjugación son reacciones que ocurren simultáneamente o subsecuentemente a las reacciones de fase I (49). Las reacciones de fase II involucran la transferencia, conjugación o adición de moléculas endógenas polares de gran disponibilidad hacia los xenobióticos para facilitar su eliminación (**Tabla 2-4**). Estas moléculas tienen la característica de ser altamente polares para aumentar la solubilidad en agua y facilitar el tránsito por la célula y su eliminación (51). Los conjugados (Xenobiótico + conjugado endógeno) que se forman en las reacciones de fase II tienen la característica de ser menos tóxicos que el compuesto inicial, por lo cual se considera a las reacciones de fase II como un mecanismo de detoxificación celular (49).

La conjugación requiere de tres componentes básicos: (1) Energía en forma de ATP, (2) coenzimas y (3) enzimas con actividad transferasa (49), las cuales tiene baja afinidad y especificidad por sustrato para poder aceptar una mayor cantidad de moléculas y transferir una amplia diversidad de grupos funcionales químicos (51). Las reacciones más importantes dentro de la conjugación (**Tabla 2-4**) son la glucuronidación (principal enzima encargada: UDP-glucuronosil transferasa), sulfación y sulfhidración (Sulfatasas y tioredoxinas), conjugación con glutatión (Glutation transferasas), acetilación (Acil y acetil transferasa), y aminoación (aminoacil transferasas) (51).

A pesar de considerarse a las reacciones de fase II como mecanismos de detoxificación, los conjugados o intermediarios que se forman durante las reacciones pueden presentar efectos adversos en las células, debido principalmente a la cinética de reacción de las enzimas involucradas, dosis de xenobiótico y saturabilidad del sistema (51).

2.3.4. Eliminación

La eliminación de xenobióticos biotransformados en la célula se puede realizar a través de tres mecanismos: por filtración, con proteínas transportadoras o cargo y por vías de tráfico vesicular (Excreción y secreción) (49). Cada uno de los mecanismos de eliminación dependen de las marcas moleculares que generan las reacciones de conjugación (49). La complejidad molecular y el tamaño del xenobiótico transformado determinará la vía de eliminación. Por ejemplo, los hidrocarburos alifáticos de cadena corta son biotransformados por vías de conjugación con glutatión o glucuronidación y su eliminación se realiza a través de proteínas transportadoras (48).

Aunque las células presentan mecanismos de detoxificación, estos se encuentran sujetos a cinéticas enzimáticas que llegan a ser saturables ocasionando estrés celular. Las respuestas a estrés celular pueden estar dadas por desequilibrios propios del metabolismo, por efecto de una infección, respuesta inmune o intoxicación por xenobióticos (52). Bajo condiciones de estrés por exposición a xenobióticos, las células pueden presentar daños en el DNA, errores de plegamiento proteico, formación de agregados moleculares, activación de muerte celular programada, desbalance en especies

reactivas de oxígeno (ROS) y desequilibrio metabólico (52). Para cada efecto la célula cuenta con proteínas que ayudan a contrarrestar los efectos tóxicos. Es el caso que para los daños en el DNA existen una serie de endo/exonucleasa capaz de reparar los daños y alertar a otras proteínas para inhibir la duplicación del DNA. Los errores de plegamiento proteico son enmendados por proteínas de choque térmico (HSP) y para equilibrar los ROS existen oxidorreductasas que neutralizan esas especies altamente reactivas (52).

Actualmente, los análisis derivados de metodologías de “ómicas”, como los análisis de expresión diferencial *in silico*, a partir de datos de secuenciamiento total de RNA (53,54) han abierto la puerta para mejorar la información de los efectos tóxicos de xenobióticos (55–57). Por ejemplo, fue posible caracterizar de genes diferencialmente expresados en insectos de la especie *Chironomus kiinensis* después de la exposición a fenol (56). Dentro de los resultados obtenidos importantes se encontró que genes involucrados en reacciones de fase I y fase II tenían valores de expresión diferencial significativos como las enzimas Citocromo P450 349A1 (Fase I) y la Glutación S Transferasa (Fase II), las cuales juegan un papel muy importante en la biotransformación y eliminación del fenol. Estas dos enzimas tenían niveles de expresión con respecto al control de 8,9 y 13,0 mayores, respectivamente (56). Otro caso exitoso realizado en humanos mostró también una diferencia en la expresión de la Glutación S Transferasa y Citocromo P450, cuando se analizaban los transcriptomas de personas fumadoras crónicas sanas y no fumadoras sanas en células del epitelio alveolar (55). Los valores mostraban que la Glutación S-Transferasa y Citocromo P450 1B1 estaba 2,3 y 43,3 veces más expresado en los fumadores que en los no fumadores (55). Por lo tanto, la aplicación de metodologías y análisis derivados de datos transcriptómicos podrían ayudar a determinar los mecanismos de toxicidad que se pueden estar activando en la célula a causa de la exposición a LPPs.

2.4. Modelo Biológico: *Hydractinia symbiolongicarpus* (Cnidaria: Hydrozoa)

Anatómicamente, los cnidarios presentan un plan corporal básico comprendido por una capa de tejido endodérmica recubierta por una capa de tejido ectodérmico, separados por una matriz extracelular llamada mesoglea (58), que conforman todas las estructuras morfológicas (Ej, Pólipos, Medusas, mata estolonial) (59,60). La cavidad gastrovascular es el espacio entre cada juego de capas dérmicas (Ectodermo, endodermo y mesoglea) conformando una cavidad ciega (Boca/ano) (59,60). Esta característica de los cnidarios de presentar pocas barreras biológicas y estructura corporal unicompartmental, facilita que la exposición de los xenobióticos ser absorbidos y distribuidos a través de todo el organismo, haciéndolos más susceptibles a cambios ambientales, especialmente aquellos con forma de vida sésil (21).

Entre los distintos organismos pertenecientes al *Phylum Cnidaria*, los hidrozoarios y específicamente *H. symbiolongicarpus* han demostrado ser un modelo biológico de interés en varias ramas de las ciencias naturales, como la fisiología (61), desarrollo embrionario (58,62), biología celular(63,64), sistemática animal (59), ecología (65), inmunología (66–68), farmacología (60,69), toxicología (70,71), debido a ser un metazoario basal, su facilidad de cultivo, simplicidad orgánica, método de reproducción asexual y sexual y ciclo de vida. Estas características de los hidrozoarios permite reducir el tiempo de experimentación considerablemente (72), en comparación a otros organismos cnidarios que son de difícil cultivo y crecimiento lento como los corales. De los diferentes géneros de hidrozoarios se destacan como modelo biológico en el empleo de estudios toxicológicos a *Hydra sp.* (69–71) e *Hydractinia sp.* (72,73).

2.4.1. Morfología y anatomía

H. symbiolongicarpus es un organismo diblástico, compuesto por tres tejidos: pólipos, mata estolonial y estolones (**Figura 2-4 A**). Existen cuatro clases de pólipos (**Figura 2-4 B**) (74,75): gastrozoides (**Figura 2-4 B-A**), gonozoides (**Figura 2-4 B-B**), dactilozoides (**Figura**

2-4 B-C) y tentaculozoides (**Figura 2-4 B-D**). Todos los pólipos presentan tres regiones básicas, una región aboral en donde se encuentra la unión del pólipo con la mata estolonial, una región elongada que conforma la columna corporal del pólipo y una región oral donde se encuentra el hipostomo (74).

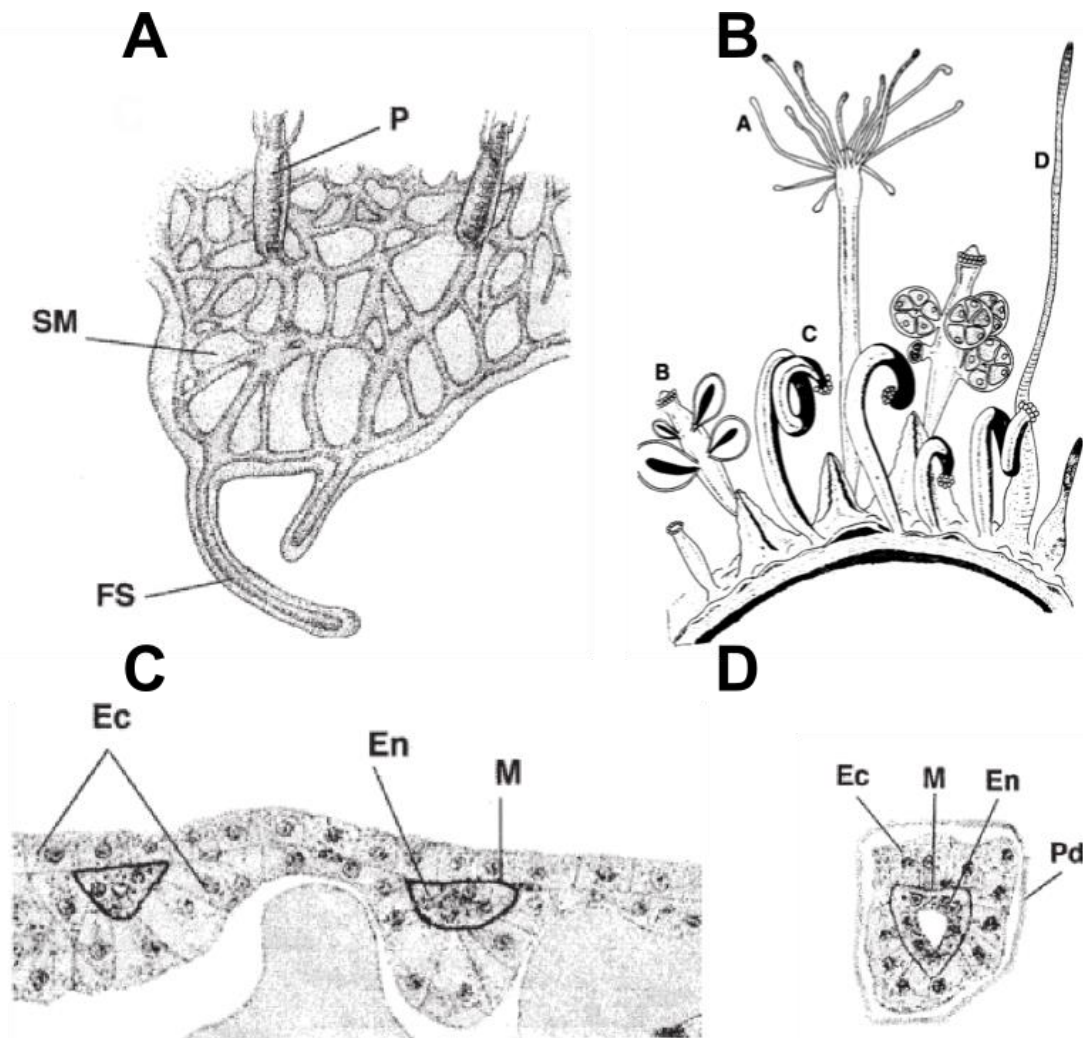


Figura 2-4. Esquema morfológico y anatómico de *Hydractinia symbiolongicarpus*. **(A)** Morfología de la colonia; **(B)** Pólipos polimórficos **(A)** Gastrozoide, **(B)** Gonozoide, **(C)** Dactilozoide, **(D)** Tentaculozoide; **(C)** Corte transversal de mata estolonial, **(D)** Corte transversal de único pólipo. **(P)** Pólipo, **(SM)** Mata estolonial, **(FS)** estoloón, **(Ec)** Ectodermo, **(En)** Endodermo, **(M)** Mesoglea, **(Pd)** Peridermo. **(A, C y D)** Adaptado de (76) y **(B)** adaptado de (74).

Cada uno de los pólipos presenta diferencias en la columna del cuerpo y la región oral o hipostómica (74). Los pólipos más abundantes en una colonia son los gastrozoides, los cuales se encargan la alimentación y protección contra pequeños depredadores. Los

gastrozoides (**Figura 2-4 B-A**) se caracterizan por tener un anillo de tentáculos de número variable y boca/ano en el hipostomo; y una columna corporal erecta alargada (74). Los gonozoides (**Figura 2-4 B-B**) tienen la función de generar los gametos masculinos y femeninos para la reproducción sexual, se caracterizan por tener los gonóforos sobre la columna corporal y carecen de hipostomo desarrollado sin tentáculos y sin boca/ano (74). Los gonóforos femeninos se diferencian de los masculinos por presentar segmentación en los sacos con ovocitos claramente diferenciados, mientras que los gonóforos masculinos no presentan segmentaciones y los espermatozoides no se diferencian dentro del saco (77). Los dactilozoides (**Figura 2-4 B-C**) y tentaculozoides (**Figura 2-4 B-D**) carecen de hipostomo y en el caso de los dactilozoides la columna corporal presenta una longitud mayor a los gastrozoides, mientras los tentaculozoides son de tamaño similar a los gastrozoides (74). Los dactilozoides tienden a desarrollarse hacia la apertura de la concha del gasterópodo y se especializa en capturar los huevos del cangrejo ermitaño hospedero (74), mientras los tentaculozoides son estructuras defensivas y se desarrollan únicamente por inducción de un organismo extraño (74).

Por otra parte, la mata estolonial está formada por la cavidad gastrovascular, la cual empieza en la boca/ano de los pólipos y se extiende hasta las puntas de los estolones (**Figura 2-4 A**). Los pólipos (**Figura 2-4 C**) al igual que la cavidad gastrovascular (**Figura 2-4 D**) presentan una primera capa de tejido de origen endodermal hacia el lumen de cada una de las estructuras tisulares, las cuales están recubiertas por una capa de tejido de origen ectodermal separadas por mesoglea (74,76,78). En las regiones de la mata estolonial donde se carece de un canal gastro vascular únicamente se puede apreciar dos capas de tejido de origen ectodérmico (**Figura 2-4 D**), lo cual restringe el crecimiento de los canales gastro vasculares (76).

A nivel celular, *H. symbiolongicarpus* presenta dos tejidos de origen embrionario el ectodermo y el endodermo (**Figura 2-4 C-D**), que se originan durante las etapas iniciales de la gastrulación (77) al igual que todos los demás organismos cnidarios (58). Sin embargo, la pequeña capa de mesoglea (**Figura 2-4 C-D**) que separa al tejido endodérmico del ectodérmico tiene una controversial historia ontogenética debido a que algunos autores la describen como una tercera capa embrionaria de origen mesodérmico (58), aunque no se describen células que estén presentes en la mesoglea.

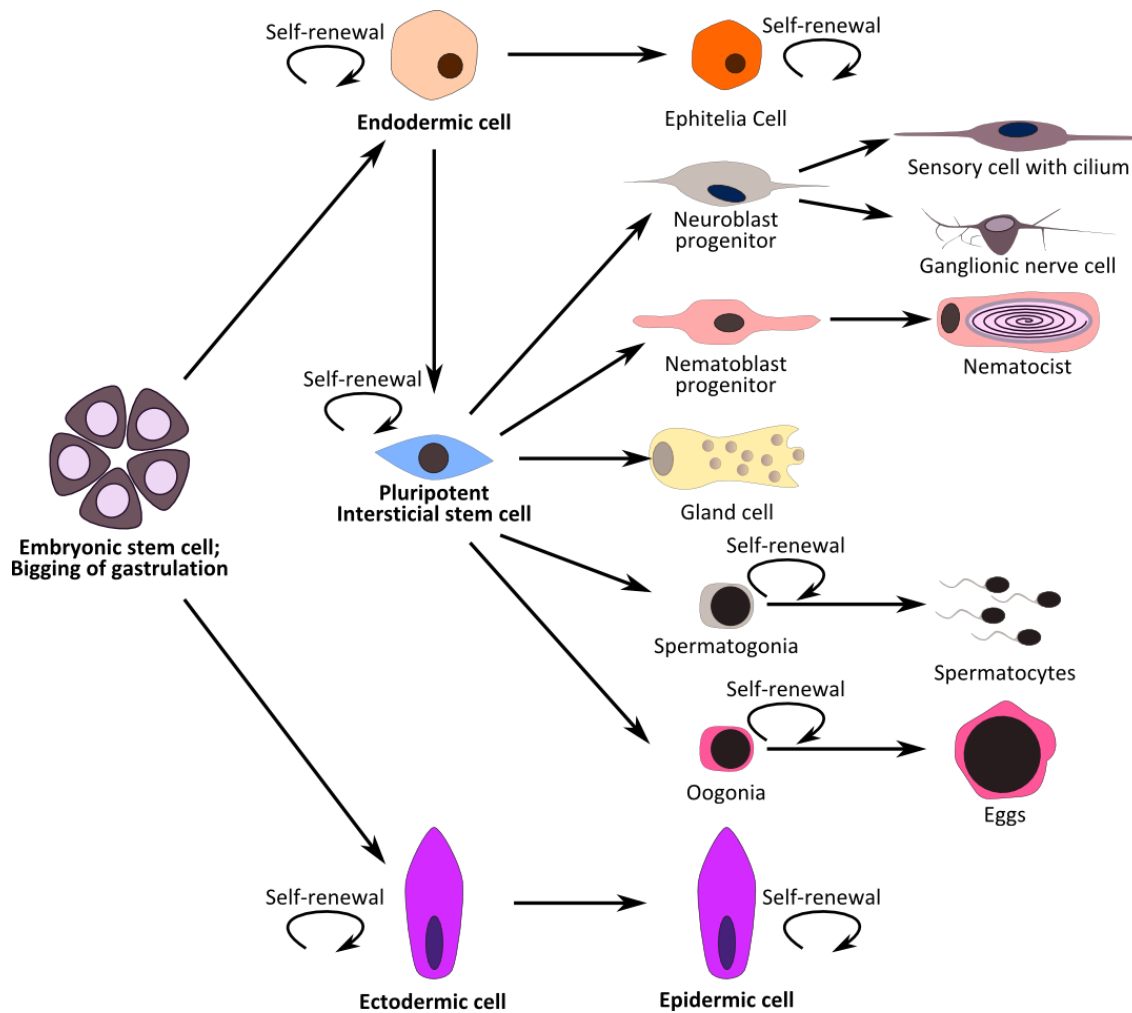


Figura 2-5. Líneas celulares derivadas a partir de las células embrionarias iniciales de la gastrulación. Adaptado de (63,64,77).

A partir de los estadios iniciales de la gastrulación (77), las células madres embrionarias se dividen para dar origen a las células del endodermo y ectodermo (**Figura 2-5**). Las células endodérmicas darán origen a todas las células epiteliales de recubrimiento gastrovascular y células intersticiales pluripotentes (i-cells o Células i) (64), mientras las células ectodérmicas darán origen a las células epidérmicas (63,64,77). Las células intersticiales pluripotentes (Células i) son la precursoras de los demás tipos de células presentes en *H. symbiolongicarpus*, que son: Células nerviosas (Sensorial y ganglionares), nematocistos, células glandulares y gametos (óvulos y espermatozoides) (63,64,77). Adicionalmente las células i tienen la capacidad de migrar entre los epitelios, donde su diferenciación celular se lleva a cabo de acuerdo a las necesidades de la colonia (64).

2.4.1. Ciclo de vida

H. symbiolongicarpus (Cnidaria: Hydrozoa) es un organismo colonial que vive adherido sobre las conchas de gastrópodos ocupadas por cangrejos ermitaños de la especie *Pagurus longicarpus* (65). La especie se distribuye en la costa nororiental de Estados Unidos (23,79), en el Océano Atlántico Norte (74). Las colonias son dioicas, diferenciadas únicamente por la morfología de los gonozoides o pólipos reproductivos (74). Presentan reproducción sexual de fertilización externa mediante liberación de gametos; y reproducción asexual por generación de fragmentos clonales de las colonias (23). El ciclo de vida (**Figura 2-6**) tiene una duración cercana a los 4 meses desde el momento de la liberación de los gametos hasta la maduración de los gonozoides en la colonia adulta (23). La fertilización (**Figura 2-6 A**) de ovulo da origen a un cigoto, el cual se desarrolla luego de 3 días en una larva plánula que no se alimenta (**Figura 2-6 C**) (74). Durante las 24 horas siguientes, la larva se asienta sobre una nueva concha y realiza metamorfosis en un pólipo primario tipo gastrozoide o pólipo alimentario (**Figura 2-6 D**) que formará una nueva colonia (**Figura 2-6 F-E**) (23,74).

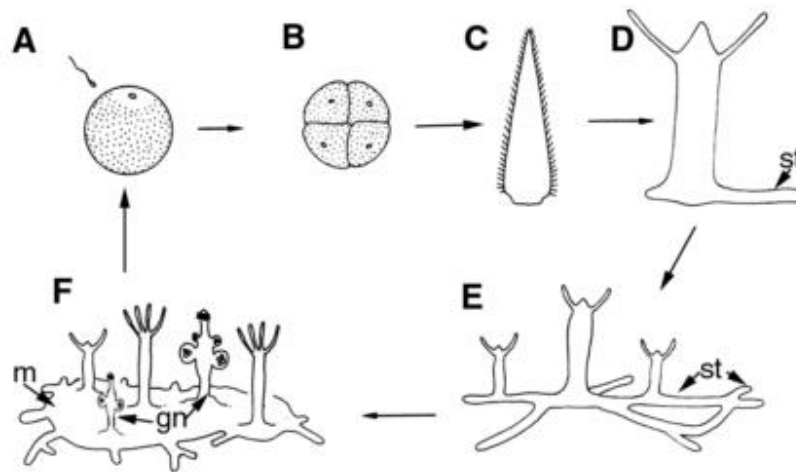


Figura 2-6. Ciclo de vida de *Hydractinia symbiolongicarpus*. (A) Fertilización, (B) Primeras divisiones celulares, (C) Desarrollo de larva plánula, (D) Asentación y formación de pólipo alimenticio primario y desarrollo de estolones (st), (E) Estadio posterior mostrando el crecimiento de nuevo pólipos y desarrollo de los estolones y mata estolonial (m), (F) Colonia madura con desarrollo de gonozoides (gn) y mata estolonial establecida. Adaptada de (74).

3. Materiales y Métodos

3.1. Cultivo de *Hydractinia symbiolongicarpus*

El cultivo de *H. symbiolongicarpus* del Instituto de genética de la Universidad Nacional se originó de una colecta en Woods Hole, Massachusetts (USA), entre los años 2009 y 2010. Los fragmentos de 0.5 cm² a 2 cm² de colonias que crecían en las conchas ocupadas por los cangrejos ermitaños se explantaron a láminas de vidrios numeradas y se mantuvieron en su lugar con bandas elásticas para facilitar su adhesión natural a las láminas. Las bandas elásticas fueron posteriormente retiradas después de que las colonias se adhirieron a la lámina. Las láminas con el tejido se mantuvieron en cajas portaláminas de acrílico inmersas en acuarios de 10 a 35 litros con agua marina artificial (Agua Marina Artificial: AMA; Salinidad: ~1.023 g/L, pH: ~8.30, Temperatura: 18-22 °C, Sal: Instant Ocean Sea Salt <http://www.instantocean.com>). El AMA en los tanques se mantuvo recirculando con bombas de 150-300 Lt/h de poder. Los animales fueron alimentados *ad libitum* con nauplios de *Artemia salina* de 48h post-eclosión tres veces por semana. Para los experimentos de exposición inicial se usaron animales silvestres de *H. symbiolongicarpus* con los códigos de identificación HWB87 (2 réplicas), HWB35 (4 réplicas), HWB39 (4 réplicas) y HWB29 (28 réplicas).

3.2. Preparación de disoluciones de prueba para exposición de WBM

Se realizaron mezclas de AMA y LPP tipo WBM (Tabla 3-1) 9:1 de acuerdo con Sil *et al.*, 2012 (80). La mezcla se deja reposar por una hora hasta que se formen la fase líquida (FL), la fase de suspensión particulada (FSP) y la fase sólida (FS). Tanto la FL y FSP son decantadas y usadas como solución de prueba. A partir de la FL y FSP se realizaron ensayos de exposición en *H. symbiolongicarpus* al 100% de concentración v/v y 50% de concentración de v/v con AMA. El pH fue equilibrado con soluciones de NaOH y HCl a concentraciones de 1M, 0.1M y 0.01M hasta llegar al pH de los acuarios (8.15 – 8.40).

Tabla 3-1. Formulación de lodos tipo WBM usados en pozos de exploración en la costa del bloque Tayrona, mar Caribe, Santa Marta, Departamento de Magdalena, Colombia.

Producto	Nombre generico	%v/v	.350ml Formulación total
Duovis	Goma de Xanthan	0,22%	0,67ml
POLYPAC UL	Celulosa poli-aniónica	0,63%	1,88ml
IDCAP	Copolimero de ácido acrilico	0,83%	2,50ml
Kla-Stop	Inhibidor de poliaminas	1,75%	5,25ml
DRILLZONE		2,33%	7,00ml
SALT	Cloruro de sodio	9,79%	29,37ml
BBAR	Barite	12,63%	37,90ml
Agua Marina		89,28%	267,85ml

3.3. Experimentos de estandarización a exposición de WBM

Hasta el momento no se encontraron reportes toxicológicos agudos, ni efectos adversos de LPPs tipo WBM en *H. symbiolongicarpus* en la literatura. Por lo tanto, fue necesario evaluar los efectos morfológicos en colonias de *H. symbiolongicarpus* para identificar efectos adversos a nivel macroscópicos frente a la exposición a LPP. Para esto se plantearon dos experimentos con tiempos de exposición y concentración de LPP

diferentes. En el primer experimento se evaluó los cambios morfológicos y morfométricos que genera la exposición a LPP a una concentración del 100% y 2 horas de exposición. En el segundo experimento se evaluó las variaciones morfológicas y morfométricas después de la exposición al 50% de concentración de WBM y un tiempo de exposición de 1.5h. Para el primer experimento fueron empleadas dos réplicas de la colonia HWB87 (Tratamiento y Control). En el segundo experimento se decidió ampliar la cantidad de individuos y replicas para garantizar la estabilidad del fenotipo descrito. En total se utilizaron 12 réplicas de 3 individuos diferentes HWB29, HWB35 y HWB39, cuatro por cada uno. Dos réplicas de cada individuo se utilizaron en el tratamiento y las otras dos réplicas de cada individuo fueron utilizadas para el control.

En ambos ensayos se determinaron cambios morfológicos y morfométricos a partir de imágenes tomadas antes del inicio del experimento, durante el tiempo de exposición cada 10 a 15 min y después de la exposición únicamente en el segundo experimento a las 24h, 48h y 72h con un estereomicroscopio Carl Zeiss® Stemi 2000C acoplado a una cámara AxioCam® Erc 5s. En de la caracterización morfológica fueron seleccionados tres parámetros de salud de las colonias al finalizar los tiempos post-exposición: (1) Retracción de los tentáculos, (2) Movimientos sincrónicos y (3) cambios en la textura del tejido. La caracterización morfométrica fue realizada con el programa Adobe® PhotoShop™ CS3, midiendo el área de la colonia, diámetro de los pólipos (**Figura 3-1**), longitud de los tentáculos (**Figura 3-1**) y número de pólipos por colonia. El diámetro de los pólipos se midió

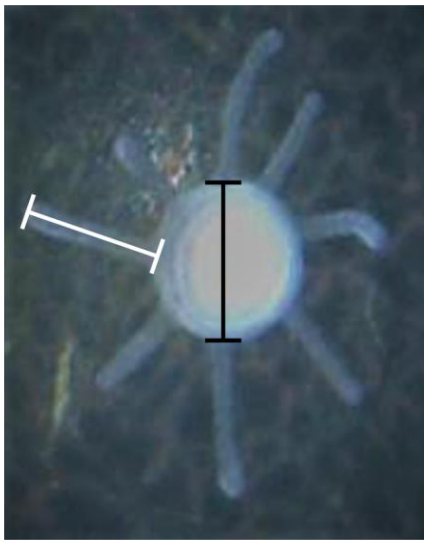


Figura 3-1. Mediciones realizadas a longitud de los tentáculos (Línea blanca) y diámetro de pólipos (Línea negra). Las imágenes fueron escaladas a mm.

sobre 5 pólipos por imagen seleccionados aleatoriamente, mientras que la longitud de los tentáculos se midió sobre 10 tentáculos de 5 pólipos diferentes por colonia, con la condición de que los tentáculos se encontraran en posición perpendicular al eje del pólipo o posición paralela a la mata estolonial para poderlo medir desde la base hasta el punto más distal (**Figura 3-1**). Es decir, si una misma colonia tenía 10 registros fotográficos durante todo el experimento, en total aparecían 50 mediciones de pólipos y 100 mediciones de tentáculos. Cada fotografía fue escalada de pixeles (Pixeles por pulgada, ppi) a distancias métricas (mm) mediante el empleo de un papel

milimetrado en el fondo, para prevenir errores en el cálculo y mejorar la normalización de las comparaciones estadísticas. A los conjuntos de datos se les realizó pruebas de normalidad y homocedasticidad para poder hacer uso de pruebas estadísticas paramétricas. Finalmente se realizaron comparaciones pareadas de medias entre el control y tratamiento mediante pruebas T-Student y pruebas de Fisher en los casos donde se cumplía con normalidad y homocedasticidad (Pruebas Lillie Fors y Bartlett), de lo contrario se aplicaban pruebas de U-Mann Whitney y rangos de Wilcoxon cuando los grupos no presentaban normalidad, todo con el fin de determinar la significancia estadística entre los grupos de comparación. Los datos morfométricos fueron graficados en el programa R versión 3.0.1 (81) con el paquete gráfico Beanplot (82), el cual gráfica la distribución de los datos con suavizado Gaussiano y SJ-dpi con su respectivos promedios generales y por grupos.

3.4. Exposición a LPP tipo WBM

La colonia HWB29 de *H. symbiolongicarpus* fue clonada en 12 fragmentos a partir de explantes de 5-8 pólipos. Estos fueron crecidos sobre láminas portaobjetos individuales durante 8 meses hasta alcanzar un área de recubrimiento de la lámina promedio 11.7 cm². El ensayo de exposición se hizo por triplicado, en donde cuatro clones de la colonial original constituyeron una unidad experimental, con tres de ellos expuestos al LPP y su RNA extraído a las 6, 12 y 24 hrs post exposición, respectivamente, y la restante sirvió de control sin tratamiento (**Figura 3-2**). La exposición se hizo por 1.5 hrs con las colonias sumergidas en una solución preparada con FSP de un LPP tipo WBS a una dilución 1:1 en AMA (pH: 8.18, salinidad: 1.035 g/L y temperatura: 20°C). Después de la exposición, las colonias se lavaron dos veces con AMA estéril por un minuto y se dejaron en un tanque con AMA y aeración constante para la posterior extracción del RNA (**Figura 3-2**). Las colonias expuestas en cada una de las unidades experimentales se colectaron a las 6h, 24h y 48h post-exposición, mientras que el control sin tratar y se colectó a las 48 h para que acumulara todos los cambios transcripcionales que no son debidos a la exposición y optimizar la eliminación de ruido que depende de las condiciones normales. Los tejidos colectados de las colonias fueron transferidas a tubos eppendorf de 1.5 ml con 0.5 ml de

TRIzol® Reagent (Invitrogen) y almacenados a -80°C para la posterior extracción de RNA total.

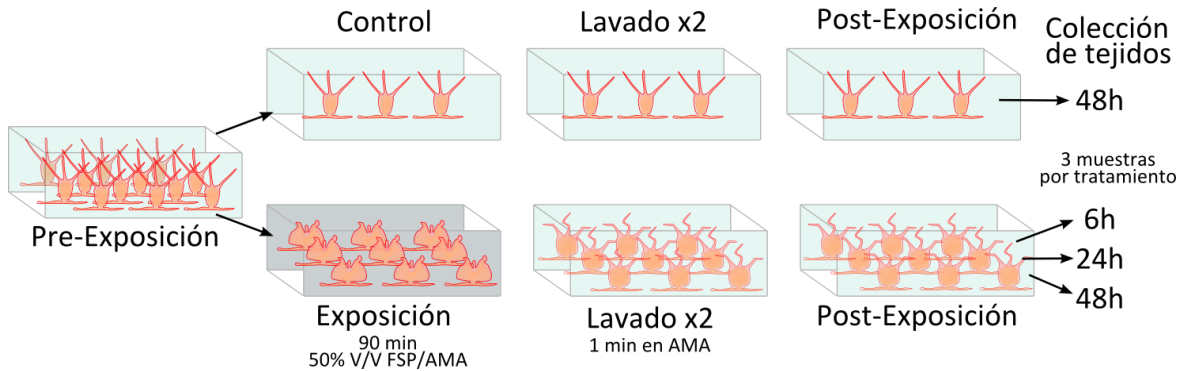


Figura 3-2. Esquema del diseño experimental usado para la exposición de *H. symbiolongicarpus* a los LPP tipo WBS. (FSP) Fase de suspensión particulada del LPP tipo WBS. (AMA) Agua marina artificial.

3.5. Extracción de RNA, construcción de librerías de cDNA y secuenciación por Illumina

El RNA total de las 12 muestras (tres tiempos y control por triplicado) se extrajo con el Reactivo Trizol (Invitrogen) siguiendo el protocolo del fabricante. Adicionalmente, se aplicaron dos cambios en el protocolo de extracción sugerido en la guía de problemas y soluciones para muestras con alto contenido de lipopolisacáridos. El primer cambio consistió en una precipitación con una mezcla de alcohol isopropílico y una disolución de sales de NaCl a 1,2 M y Citrato de Sodio a 0,8 M. El segundo cambio fue realizar doble lavado con etanol absoluto para mejorar la limpieza del RNA total. Se realizó cuantificación de la concentración de RNA y una verificación de integridad en geles de agarosa al 1%. Las muestras de RNA total se enviaron a la compañía Eurofins MWG Operon (Louisville, KY, USA), para la construcción de librerías de cDNA y su secuenciación por Illumina, partiendo todas de la misma concentración de RNA. Cada una de las 12 muestras de RNA total se usó para construir una librería de cDNA pareada usando el sistema Ovation® RNA-Seq System v2 (NuGen) con insertos de tamaño promedio de 300 pb. Cada una de las tres

réplicas experimentales (tres tiempos y control) se secuenciaron en una línea del equipo Illumina HiSeq 2000.

3.6. Análisis y procesamiento bioinformático.

El trabajo bioinformático se realizó utilizando la infraestructura computacional del Centro de Cómputo de Alto Desempeño (CECAD) de la Universidad Distrital Francisco José de Caldas, en el marco de la Alianza Estratégica existente entre el Grupo de Inmunología Evolutiva e Inmunogenética (IEI) de la Universidad Nacional de Colombia y el Grupo Internacional de Investigación en Informática y Comunicaciones y gestión del Conocimiento (GICOGE) de la Universidad Distrital Francisco José de Caldas. Las lecturas fueron sujetas a control de calidad por puntaje Phred (<http://www.phrap.com/phred/>) y se conservaron las secuencias cuyas bases tenían un puntaje superior a 20 evaluado con el software FastQC. El corte de las secuencias terminales de baja calidad y de los adaptadores de Illumina remanentes se realizó con el programa FASTX-toolkit. Sólo se retuvieron las secuencias de longitud mayor a 31 pb después de la edición. Posteriormente, se hizo una remoción de secuencias ribosomales mediante el software RiboPicker (<http://ribopicker.sourceforge.net/>) que genera alineamientos globales usando transformaciones de Burrows Wheeler para indexar las secuencias de las bases de datos de referencia. En este caso se usaron las bases de datos: Silva (83), GreenGenes (84), RDP (85), Rfam (86) y secuencias ribosomales de NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>).

El transcriptoma se ensambló a partir de datos crudos de las 12 librerías, ya que todas las muestras contenían la misma entidad genómica por haber empleado el mismo individuo para el experimento y generar un único transcriptoma muy robusto. Se realizó un ensamblaje *de novo* con las librerías pre-tratadas con el paquete bioinformático Trinity versión trinityrnaseq_r20131110 (87), con las opciones `-normalize_reads` para la normalización de lecturas repetidas y eliminación de redundancia de lecturas idénticas. Con el fin de reducir la redundancia de transcritos se utilizó el programa CD-Hit-EST v. 4.6.1 (88), utilizando como parámetro de identidad 0.95. Adicionalmente se verificaron las

métricas de ensamblaje generales y se realizó un análisis de fragmentación con el programa BUSCO (versión v.3) (89), utilizando como librería de comparación de ortólogos eucariotas, con 429 genes ortólogos.

El análisis de expresión diferencial (DE) se llevó a cabo con los scripts `run_DE_analysis.pl` incluidos en el paquete Trinity, el cual involucra la instalación de los programas Bowtie (90) v1.0.0 para el mapeo, RSEM v1.2.3 (91) para la cuantificación de las lecturas por métodos bayesianos y edgeR v3.4.2 (paquete estadístico con lenguaje de programación para el programa R (81) (Versión 3.0.1) desarrollado por Bioconductor (92)) El análisis de expresión diferencial (DE) solo incluyó transcritos con al menos dos lecturas por millón de pares de bases secuenciadas. Los transcritos considerados para el análisis fueron normalizados por el método de TMM (Trimmed mean of M values) implementado en el paquete estadístico edgeR. Se realizaron comparaciones pareadas entre el control y las muestras tratadas de la siguiente forma: 6h vs Control, 24h vs Control y 48h vs Control. Únicamente fueron aceptados como transcritos diferencialmente expresados aquellos que tenían un p-valor menor a 0.01. El p-valor fue ajustado de acuerdo con la tasa de descubrimiento de falsos positivos (FDR, False Discovery Rate).

Únicamente fueron anotados los transcritos diferencialmente expresados para mejorar el rendimiento y gasto de máquina. El proceso de anotación se realizó con el programa Trinotate versión Trinotate_r20131110 (87). El programa Trinotate incorpora funciones de base de datos tipo XML y SQL para lo cual es necesario incorporar las salidas de anotación de las bases de datos de UniProt/SwissProt (93) realizadas mediante BlastP y BlastX (94) y Pfam (95), usando HMMER versión 3.1 (96). Además, se incorporaron las predicciones de péptido señal con SignalP versión 4.0 (97) y región transmembrana con Tmhmm versión 2.0 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM/>). Finalmente, el programa Trinotate hace cruce de anotaciones entre los códigos de las bases de datos de UniProt/SwissProt-Pfam con Gene Ontology (GO terms) y Egnog (<http://geneontology.org/>; <http://eggnog.embl.de/>) para aumentar la información de la anotación. Adicional al cruce de información entre las bases de datos GO y Egnog, se hizo una búsqueda de información cruzada entre los códigos pfam de las arquitectura de dominios predichos con las vías del KEGG mediante el buscador DAVID (98) integrado en <https://david.ncifcrf.gov/>

3.7. Análisis de agrupación

Se realizaron dos procesos para los análisis de agrupamiento, uno utilizando el paquete Pheatmap (99) y el segundo proceso con el paquete Corrplot (100). El paquete pheatmap se utilizó para verificar niveles de expresión a partir de datos crudos de conteos FPKM en cada una de las librerías pre-procesadas, como también para observar los perfiles de expresión después del análisis de expresión diferencial. Para casos específicos se realizó un agrupamiento por el método de unión completa por jerarquías y corrección de distancias Euclidianas. El paquete Corrplot se empleó para determinar la independencia muestral utilizando el estadístico de Spearman en una matriz de correlación. Los análisis únicamente se realizaron con los transcritos DE.

4. Resultados

4.1. Alteraciones morfológicas y morfométricas

Diferencias altamente significativas y efectos adversos fueron evidenciadas en la exposición aguda a WBM en colonias de *H. symbiolongicarpus* (**Figura 4-1**). El registro fotográfico evidenció un aumento en la circunferencia y rigidez de los pólipos, retracción de los tentáculos con respecto al estado inicial, inmediatamente después del contacto de las colonias a WBM, como se observa en la imagen (**Figura 4-1, A**). Esa condición se mantuvo durante todo el tiempo de exposición que fue de 2 horas y en ningún momento los pólipos de las colonias expuestas cambiaron de posición o forma a la que se vio antes de la exposición. Una vez identificado este efecto de hinchazón de los pólipos y retracción de los tentáculos, se midió el diámetro de los pólipos y la longitud de los tentáculos antes y durante el tiempo de exposición para determinar si los cambios eran estadísticamente significativos (**Figura 4-1, B**).

Los resultados de comparación de medias para ambas mediciones morfométricas fueron altamente significativos y se puede constatar con el posicionamiento de la media del grupo tratamiento con respecto al control y la media de mismo grupo antes de iniciar la exposición (**Figura 4-1, B**). En el tiempo 0 (pre-exposición), los valores de medias para el control y tratamiento en la longitud de los tentáculos y diámetro de pólipos estuvo cercana a los 0.2 mm (200 μ m). En contraste durante el tiempo de exposición, las colonias expuestas mostraron un incremento hasta los 0.3 mm (300 μ m, 1,5 veces mayor al estado inicial) para el diámetro del pólipo y una disminución cercana a los 0,05 mm (50 μ m, una reducción del 75% con respecto al estado inicial) en la longitud de los

tentáculos para las medias respectivamente. Por su parte, el control mantuvo los valores de medias muy cercano en ambas mediciones durante el tiempo de exposición. Este primer conjunto de datos refleja que los lodos de perforación tipo WBM pueden generar efectos adversos inmediatos en altas concentraciones en tres aspectos fundamentales de las colonias de *H. symbiolongicarpus* que son hinchazón e inmovilidad de pólipos y retracción de tentáculos.

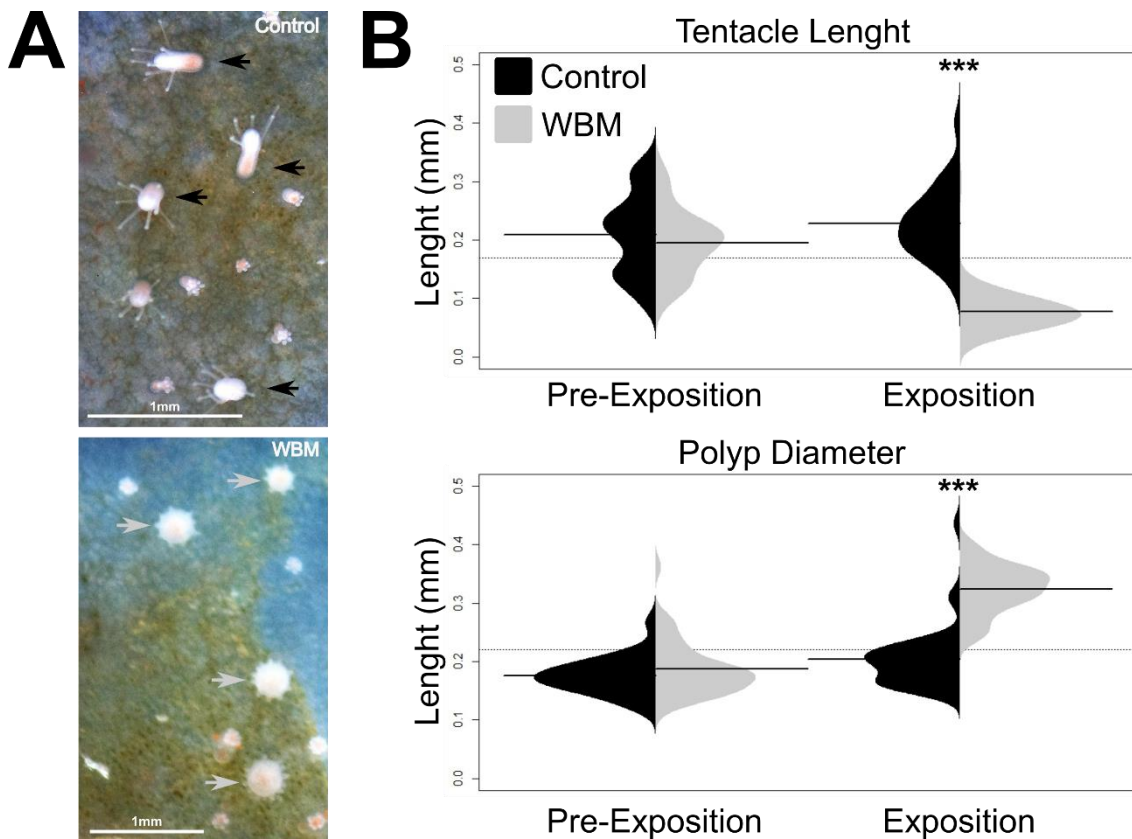


Figura 4-1. Resultados morfológicos y morfométricos a la exposición aguda de WBM en colonias de *H. symbiolongicarpus*. (A) Imágenes de colonia expuesta (Imagen superior, flechas de color gris) y colonia control (Imagen inferior, flechas de color negro) a los 30 min de exposición a 100% de FSP de WBM. Las flechas permiten enfocar los cambios en los pólipos seleccionados, notando una clara diferencia morfológica entre las condiciones de tratamiento. (B) Comparación de valores morfométricos para longitud de tentáculos (Gráfica superior, n=160) y diámetro de pólipos (Gráfica inferior, n=80) antes de la exposición (Pre-Exposition) y durante la exposición (Exposition). Las distribuciones de datos de color negro corresponden al control, mientras que las distribuciones de color gris corresponden al tratamiento. Las líneas punteadas muestran la media general de todos los datos; mientras la línea sólida en cada grafica de distribución corresponde a la media grupal. Para ambas mediciones fue posible determinar diferencias altamente significativas cuando las colonias estaban expuestas a WBM, utilizando pruebas de significancia T-Student, Fisher, U-Mann Whitney y rangos de Wilcoxon (Significante * p-valor <0,05, muy significativo ** p-valor <0,01 y altamente significativo *** p-valor <0,001).

Se planteo un segundo experimento de exposición con colonias más pequeñas, menor tiempo de exposición y la mitad de la concentración usada al primer experimento para observar si existen efectos adversos post-exposición en las colonias hasta las 72h después del contacto con WBMs. Los resultados mostraron diferencias significativas después de la exposición a las 72h post-exposición en las medidas relacionadas a la biomasa de las colonias (**Figura 4-2**). El primer efecto adverso apreciable en las colonias fue una reducción en el área total de la mata estolonial cuando se comparaba las colonias control con las colonias expuestas (**Figura 4-2, A**). La colonia control llegó a perder un 12% de área (de 28mm² a 25,1 mm²) durante la duración total del experimento (73,5h), mientras en la colonia tratada la reducción fue de 40% (de 24,9 mm² a 14,8mm²) al término del experimento (**Figura 4-2, A**). Por otro lado, se pudo apreciar una reducción considerable del número de pólipos en las colonias expuestas. En las imágenes mostradas (**Figura 4-2, A**), la colonia control tiene inicialmente (0 min) 22 pólipos, los cuales aún eran visibles y viables 19 al finalizar el experimento, teniendo sólo una de pérdida 3 pólipos (14%). Por el lado de la colonia expuesta, la reducción de pólipos fue del 50% (18 pólipos iniciales a los 0min, 9 pólipos sobrevivientes a las 72h post-exposición), siendo mucho mayor con respecto al control la pérdida de pólipos.

Al comparar las medias para los valores morfométricos de todas las colonias empleadas (n=6 control, n=6 tratamiento), el área de la colonia y cantidad de pólipos por colonia mostraron diferencias muy significativas a las 72h post-exposición para área de colonia y diferencias significativas a las 72h para cantidad de pólipos (**Figura 4-2, B**). Las áreas de las colonias tenían una media inicial cercana a los 20 mm², la cual se mantuvo hasta el final del tiempo de exposición sin mayores cambios (90 min). Al comparar con los valores de media al final del tiempo de recuperación 72h (post-exposición), la media de las colonias tratadas llegó a estar cerca de los 10 mm², mostrando cerca de un 50% de reducción media de la mata estolonial, muy parecido a lo constatado en las imágenes (**Figura 4-2, A**). De igual manera ocurrió con la cantidad de pólipos por colonia (**Figura 4-2, B**), donde el valor de media inicial y al término del tiempo de exposición (0 y 90 min) estuvo alrededor de los 16 pólipos por colonia, mientras que al finalizar el tiempo de recuperación la cantidad media restante de pólipos por colonia estuvo cercana a los 8 pólipos, siendo una reducción también cercana al 50% en la cantidad de pólipos por colonia. Estos análisis en el tiempo de recuperación (post-exposición) permiten generalizar que existe un efecto adverso a la exposición a WBM en las colonias de *H.*

symbiolongicarpus, evidenciado en una pérdida de tejidos a nivel de pólipos y mata estolonial.

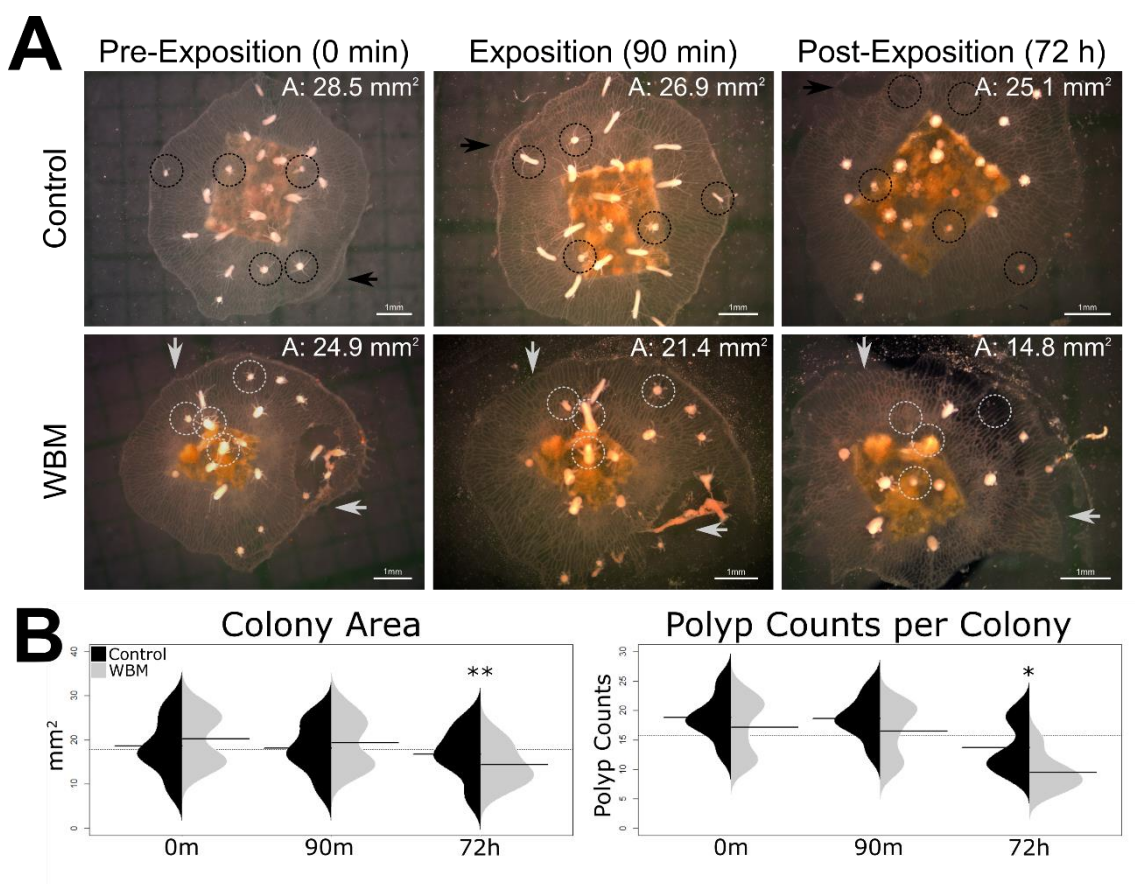


Figura 4-2. Resultados morfológicos y morfométricos a después de la exposición aguda de WBM en colonias de *H. symbiolongicarpus*. (A) Imágenes de colonia expuesta (Imágenes inferiores, flechas y círculos de color gris) y colonia control (Imágenes superiores, flechas y círculos de color negro) a los 0 min, 90min (tiempo máx. exposición a WBM) y 72h (Tiempo máx. de recuperación después de los 90 min de exposición a WBM) a 50% de FSP de WBM. Las flechas permiten ubicar el posicionamiento de la colonia en el campo fotográfico, mientras los círculos punteados indican el seguimiento de los pólipos a lo largo del tiempo. La exposición a WBM genera una disrupción en los tejidos (mata estolonial y disminución en la cantidad de pólipos), haciendo que se pierda las condiciones iniciales de salud en la colonia. (B) Comparación de valores morfométricos para área de la colonia (Gráfica izquierda) y cantidad de pólipos por colonia (Gráfica derecha) antes de la exposición (0 min), durante la exposición (90 min) y después de la exposición (72h). Se emplearon pruebas de significancia T-Student, Fisher, U-Mann Whitney y Rangos de Wilcoxon, con un n=12. Significante * p-valor <0,05, muy significativo ** p-valor <0,01 y altamente significativo *** p-valor <0,001.

Adicionalmente fue posible observar en el tiempo post-exposición dos fenómenos, la presencia de pequeñas manchas rojas localizadas en el lugar donde anteriormente se

encontraba un pólipo debido probablemente al proceso de degradación de este, y una deformación en los tentáculos en forma de “Z” y ligeramente retraídos (**Figura 4-3**).

En conjunto, los resultados morfológicos y morfométricos establecen un patrón de efectos adversos “hiperagudos” durante el tiempo de exposición y agudos durante el tiempo de recuperación (72h post-exposición). Los efectos adversos hiperagudos se resumen en retracción de los tentáculos, hinchazón de los pólipos y disminución de la movilidad sincrónica de la colonia evidenciada en la rigidez de los pólipos. Por su parte, los efectos adversos agudos en la fase de recuperación están generalizados hacia la pérdida de tejidos (pólipos y mata estolonial), deformación de los tentáculos y aparición de manchas rojas en los lugares donde se encontraban pólipos. Finalmente, los cambios morfométricos y morfológicos debidos a la exposición a WBM en las colonias de *H. symbiolongicarpus* nos genera una expectativa de encontrar cambios en la expresión genética, especialmente en aquellos relacionados con los procesos de detoxificación y posiblemente vías de señalización que estén relacionadas con la pérdida de tejido.

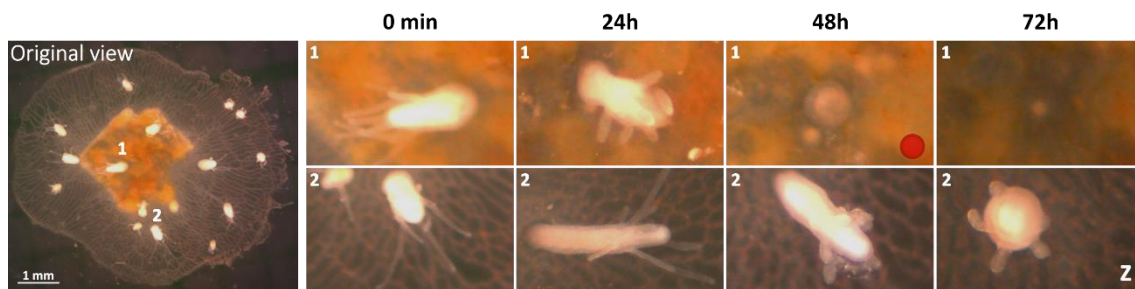


Figura 4-3. Observaciones adicionales morfológicas en pólipos individuales de colonia expuesta a WBM. (1) Pólipo que se va desintegrando pasadas las horas 48h después de la exposición, donde se evidencia la presencia de una mancha roja (Izquierda superior del punto rojo). (2) Pólipo individual que refleja el cambio de la visualización elástica y suave de los tentáculos a las 24h, hasta llegar a una retracción con formas rugosas similares a “Z” después de las 48h y en 72h. (Izq) Vista total de la colonia a 0 min antes de la exposición a WBM.

4.2. Ensamblaje *de novo* de transcriptoma a partir de colonias expuestas a WBM

La secuenciación de las 12 librerías construidas (3 Controles y 9 de tratamiento) en tres líneas de la placa del secuenciador illumina® HiSeq 2000, produjo 1.152 millones de lecturas en ambos sentidos (5' y 3') con una longitud de 100pb, superando en un 28% el rendimiento para la maquina (300 millones de lecturas por línea de secuenciación). El preprocesamiento de las librerías eliminó un 13% de lecturas, 10% por similitud con las bases de datos de secuencias de rRNA y un 3% por bajo puntaje Phred a partir del proceso de "trimming". El ensamblaje del transcriptoma se realizó con el 87% de las lecturas totales de todas las librerías después del procesamiento con el programa Trinity (87). El proceso de ensamble generó un total de 464.217 transcritos (únicos e isoformas) derivados de 271.433 trinity "genes" para una longitud total de bases secuenciadas únicas de 401'625.296 (**Tabla 4-1**).

Las métricas mostraron un valor alto de reconstrucción de transcriptoma con un contig N50 de 1.756 y un tamaño de contig N50 de 60.532 para el acumulado (**Tabla 4-1**). La longitud media de contig se situó en 865pb, mientras la mediana fue para un tamaño de contig de 397pb mostrando una acumulación del 50% hacia contigs pequeños (**Tabla 4-1**). Por otro lado, la tasa de fragmentación del transcriptoma se situó en un 6,7% y una pérdida del 7,4% de grupos ortólogos, y grupos ortólogos completos y duplicados del 85% según los puntos de referencia del análisis con el programa BUSCO (89). En general, las métricas de ensamblaje, estadísticas de tendencia central y puntos de referencia BUSCO permiten establecer una buena calidad en la reconstrucción de transcritos de tamaño apreciable, alta presencia de grupos ortólogos generales y baja fragmentación del transcriptoma.

Tabla 4-1. Métricas, estadísticas de ensamblaje y puntos de referencia del programa BUSCO (89) para el transcriptoma de *H. symbiolongicarpus*.

Category Stats	Value
Total trinity "genes"	271.433
Total trinity transcripts	464.217
Total length of Sequence	401'625.296
Contig Size N25	19.647
N25 lenght (bp)	3.491
Contig Size N50	60.532
N50 lenght (bp)	1.756
Contig Size N75	156.700
N75 lenght (bp)	629
Contig Size N90	298.496
N90 lenght (bp)	302
Average contig length	865
Min contig length	201
Median contig length	397
Max contig length	36.477
Total GC Amount (bp)	140'592.210
GC%	35,01%
Summarized benchmarks in BUSCO notation	
Complete (Duplicate)	85% (52%)
Fragmented	6,7%
Missing	7,4%
Total BUSCO groups searched	429

4.3. Análisis de Expresión Diferencial (AED)

Diferencias muy significativas fueron encontradas en la expresión de 5.180 transcritos de las 897.446 comparaciones pareadas realizadas entre los diferentes tiempos de exposición con respecto al control (**Tabla 4-2**). De las 897.446 comparaciones, se

encontraron que únicamente 370.510 transcritos (79,8% del transcriptoma) de los cumplieron con los parámetros del programa edgeR (92) para ser evaluados. De igual manera, de los 5.180 transcritos que presentaron valores altamente significativos en la diferencia de expresión, solo 4.255 correspondieron a transcritos únicos, representando así el 1.1% del global comparado (**Tabla 4-2**).

Entre las comparaciones pareadas, el grupo de comparaciones que más transcritos diferencialmente expresados encontró fue 6h vs. Control con un total de 2.298 transcritos expresados diferencialmente, seguido de 24h vs control (1.741 transcritos expresados diferencialmente) y finalmente 48h vs. Control con 1.141 transcritos expresados diferencialmente. La relación indica un comportamiento inverso entre el tiempo post-exposición y los transcritos expresados diferencialmente, siendo que a menor tiempo mayor cantidad de transcritos expresados diferencialmente (**Tabla 4-2**).

Tabla 4-2. Estadísticas descriptivas globales de resultados AED.

Paired Comparisons	Total Transcripts Compared	Differentially Expressed	%DE	Filtered	%F	Over-Expressed	%Up-R	Down Expressed	%Down-R
6h Vs Control	313.366	2.298	0,7%	1.028	44,7%	799	77,7%	229	22,3%
24h Vs Control	276.766	1.741	0,6%	946	54,3%	851	90,0%	95	10,0%
48h Vs Control	307.314	1.141	0,4%	637	55,8%	527	82,7%	110	17,3%
Total	897.446	5.180	0,6%	2.611	50,4%	2.177	83,4%	434	16,6%
Total without duplicates	370.510	4.255	1,1%	1.871	44,0%	1.558	83,2%	313	16,8%

Los valores correspondientes a expresados diferencialmente (Differentially expressed) son los resultados brutos con una significancia en el p-valor de 0,01. Los valores de transcritos filtrados hacen relación a criterios aplicados después del proceso de anotación.

Para facilitar el rendimiento de maquina y procesamiento de datos, se utilizaron los 4.255 transcritos como información de entrada para alimentar la base de datos de anotación y caracterización funcional usada en la suite del programa Trinotate (101). Con base en los resultados de la anotación, se aplicaron tres criterios para la selección y filtrado de transcritos: (1) Presentar valor de expresión en todos los tiempos de comparación y que en al menos uno de los tiempos el valor de expresión fuera muy significativo con respecto al control (P-valor < 0,01); (2) presentar anotación de dominios

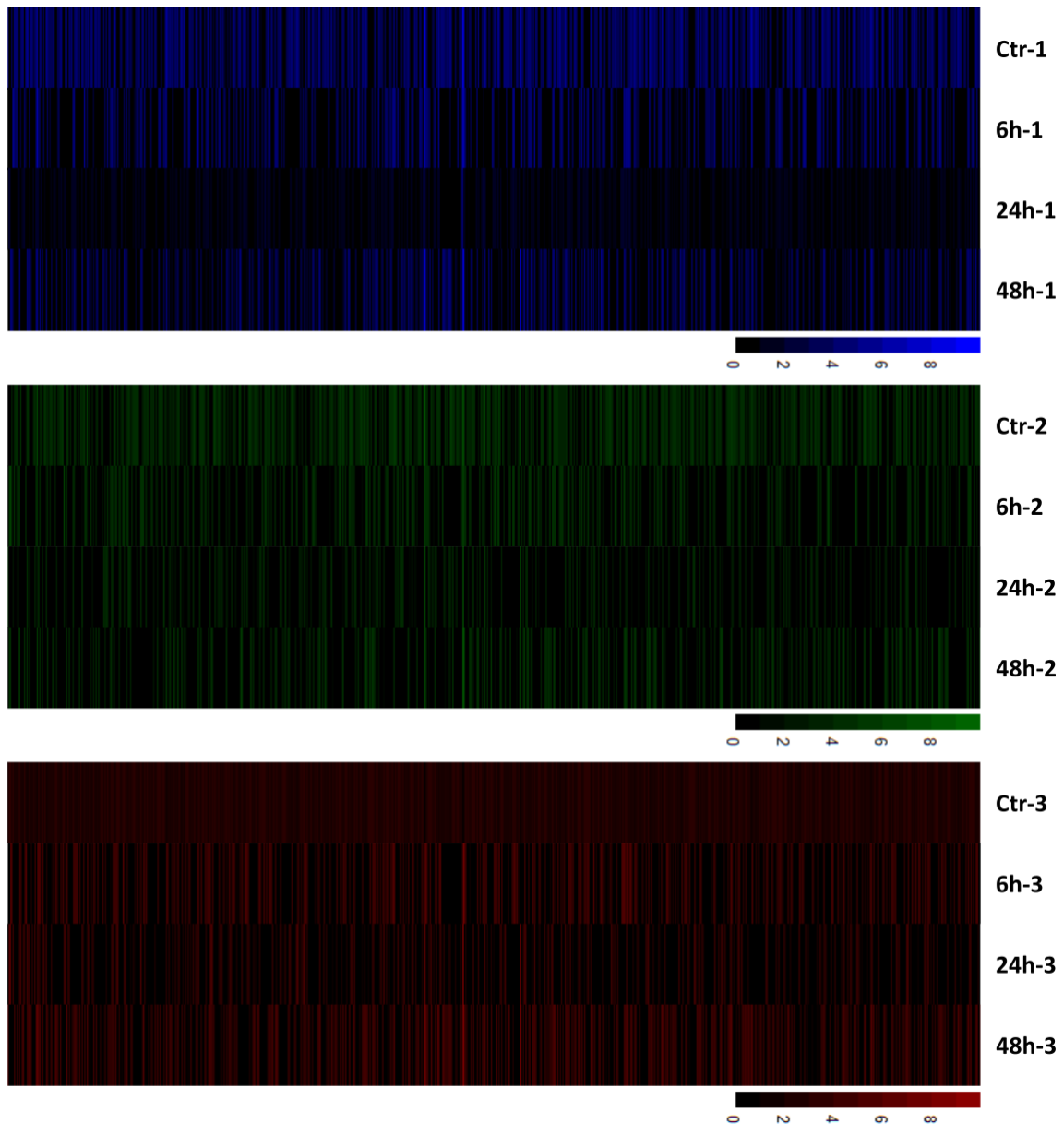


Figura 4-4. Mapa de calor de conteos FPKM para los 1871 transcritos DE. A partir del mapeo de lecturas de cada una de las librerías secuenciadas, se tomaron los conteos brutos en valores de FPKM transcriptoma global por librería de secuenciación y se corrigió con una función Log. Los mapas de calor se dispusieron acorde a la línea de secuenciación de la placa en la plataforma Illumina® HiSeq 2500. Cada franja corresponde a un valor de conteo para un transcrito en específico, el cual se encuentra en la misma posición en todas las gráficas. Los mapas de calor fueron generados utilizando el paquete estadístico pheatmap (99).

proteicos funcionales por pfam (95) y (3) el dominio pfam (95) encontrado no fuera únicamente un dominio de función desconocida (DUF, por sus siglas en inglés Domain Unknown Function). El resultado de la selección y filtrado dejó solo 1.871 (44% de los 4.255 incluidos en el proceso de anotación) transcritos expresados diferencialmente con información de anotación y caracterización funcional (**Tabla 4-2**). Curiosamente, se

pudo observar que el 83,2% (1.558 transcritos) se encontraban sobre expresados en alguno de los tiempos, mientras solo 16,8% (313 transcritos) se encontraban sub-expresados en alguno de los tiempos. Estos valores permiten ver que había una alta actividad genética en cuanto a la expresión de genes luego de la exposición a WBM.

Por último, se realizaron dos procedimientos con los 1.871 transcritos DE, el primero de verificación de la expresión de los transcritos DE (**Figura 4-4**) y el segundo validación de la independencia muestral en los conjuntos de datos (**Figura 4-5**). En ambos procedimientos se emplearon los conteos de lecturas por librería sobre los transcritos secuenciados en valores de FPKM con corrección de una función Log. Para la verificación de la expresión, el mapa de calor mostró una amplia variedad de tonalidades acorde a la escala de coloración para todas las librerías, con poca presencia de valores cercanos a cero excepto en la librería 24h-1 (**Figura 4-4**). La librería 24-1 particularmente tiene bajos conteos, lo que se puede apreciar con mayor presencia de tonos oscuros. Por el contrario, los controles en general presentaron un mayor patrón de coloración. El resto de las librerías se comportaron de manera similar, pero no se observó en ningún caso una predominancia en el color por alguna zona de la gráfica, denotando variabilidad entre los conjuntos de datos.

En segundo y último caso, los resultados de la correlación de Spearman permiten de manera general identificar que hay independencia entre las muestras debido un mayor valor cuando se comparan entre réplicas del mismo tratamiento (**Figura 4-5**). Los valores de correlación negativos solo se observaron en casos de comparación entre las réplicas de Control versus tratamiento, oscilando entre los rangos -0,2 a 0 y algunos pocos con valores de correlación muy débiles de 0,1 a 0,2 (**Figura 4-5**). Entre las réplicas de tratamiento (6h vs 24 vs 48h), la correlación se mantuvo siempre en rangos de 0 a 0,2, es decir, sin correlación o correlación débil, mientras que al interior de cada grupo (6h vs 6h, 24h vs 24h y 48h vs 48h) los valores de correlación fueron directos medianamente fuerte con rangos de 0,2 a 0,4 (**Figura 4-5**).

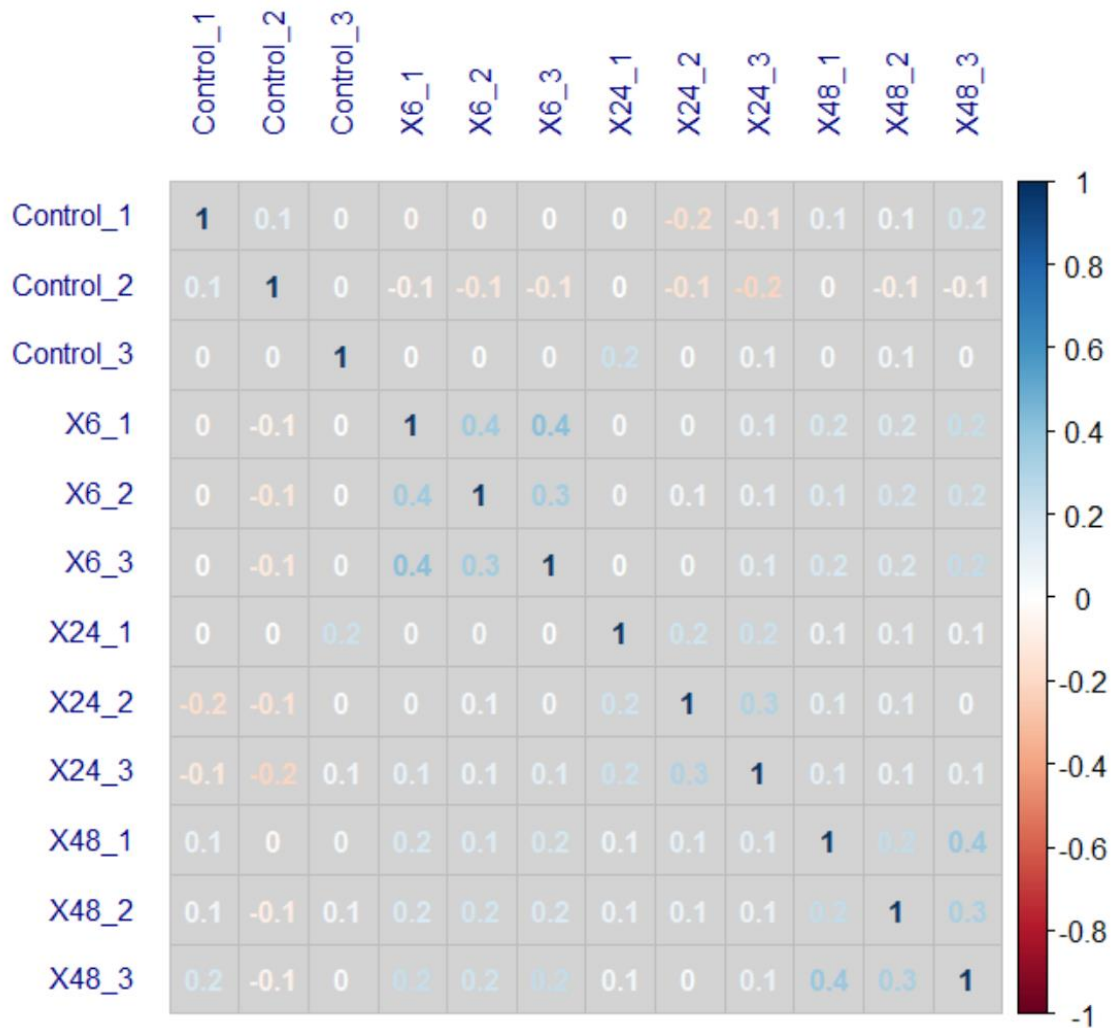


Figura 4-5. Matriz de correlación de Spearman entre los conjuntos de datos de conteos para cada librería de los 1871 transcritos DE. Con el paquete estadístico Corrplot (100) para R Project (81), se utilizó el estadístico de Spearman para determinar los valores de correlación entre los distintos grupos de datos. Valores negativos cercanos a -1 indican una correlación inversa fuerte, cero ninguna correlación y valores positivos cercanos a 1 correlación directa fuerte.

4.4. Anotación funcional

La anotación funcional de los 1.871 transcritos diferencialmente expresados mostró como resultado general una colección de proteínas hipotéticas pertenecientes a todas las actividades fundamentales para la supervivencia de la célula (**Anexo B**). En la categorización manual de dominios proteicos pfam, se logró distribuir las proteínas

hipotéticas en 9 categorías utilizando la información de descripción centralizada en el repositorio de la base de datos de pfam (**Figura 4-6**). Las 9 categorías correspondieron a procesos de señalización, metabolismo, expresión genética, proteínas de membrana, estructura celular, respuesta de estrés celular, funcionamiento celular, tráfico vesicular y proteínas de matriz extracelular. Señalización represento la mayor cantidad de transcritos diferencialmente expresados con el 32% (602 transcritos), seguido de Metabolismo con 16% (306 transcritos); mientras las dos categorías con menor cantidad de transcritos fueron proteínas de matriz extracelular con un 3% (45 transcritos) y proteínas relacionadas al tráfico vesicular 5% (97 transcritos).

En la categoría señalización destacan transcritos codificante para diversas vías de señalización (150 transcritos), donde predominan los dominios tipo proteína quinasa, WD40 y Tetratricopéptido, presentes en una amplia variedad de proteínas de muchas vías de señalización (**Figura 4-6**). En la categoría Metabolismo destaca con mayor número de transcritos codificantes para dominios involucrados en procesos del metabolismo de proteínas (80 transcritos), como peptidasas y ubiquitininas (**Figura 4-6**). Para la categoría de expresión génica la mayor cantidad de transcritos presentaron dominios involucrados con el procesamiento del splicing (85 transcritos), como dominios de helicasa, reconocimiento de motivos del RNA y factores de splicing. En la categoría de Proteínas de membrana, se encontró una predominancia de proteínas transportadoras (68 transcritos) donde se destacan dominios de transporte de azúcares, transportadores de aminoácidos, Transportadores ABC, transportadores de colina y transportadores de cationes (**Figura 4-6**). En la categoría de Estructura celular se observaron transcritos codificantes mayoritariamente para dominios involucrados en procesos del citoesqueleto (136 transcritos), donde destacan dominios de Kinesina, Tubulina, Miotubulina, Dineina y Actina (**Figura 4-6**). Los transcritos con dominios involucrados en procesos respuesta a estrés celular, mostraron una mayor presencia hacia procesos inmunes (49 transcritos) con dominios de reconocimiento de peptidoglicanos, Inmunoglobulinas, reconocimiento de patrones moleculares y trombospondina (**Figura 4-6**). En la categoría de Función celular, la mayor cantidad de transcritos (64 transcritos) codificaban para proteínas con dominios involucrados en funciones de replicación del DNA, como DNA girasas, DNAsas tipo II, Topoisomerasas, factores de replicación, DNA polimerasas, DNA ligasas y Telomerasas (**Figura 4-6**). La categoría de tráfico vesicular, la mayor parte de los transcritos codificantes (29 transcritos) para dominios con función principal en el procesamiento tardío del tráfico vesicular. Destacaron los dominios de tráfico vesicular tardío BAR-Bin, dominio de

ordenamiento vesicular y dominios de secreción (Figura 4-6). Finalmente, se encontraron 16 transcritos codificantes para proteínas involucradas en procesos de sinapsis nerviosa en la categoría de proteínas de matriz extracelular, como guanilato quinasa, neurotransmisor de sodio y neuroreceptor de tacto (Figura 4-6).

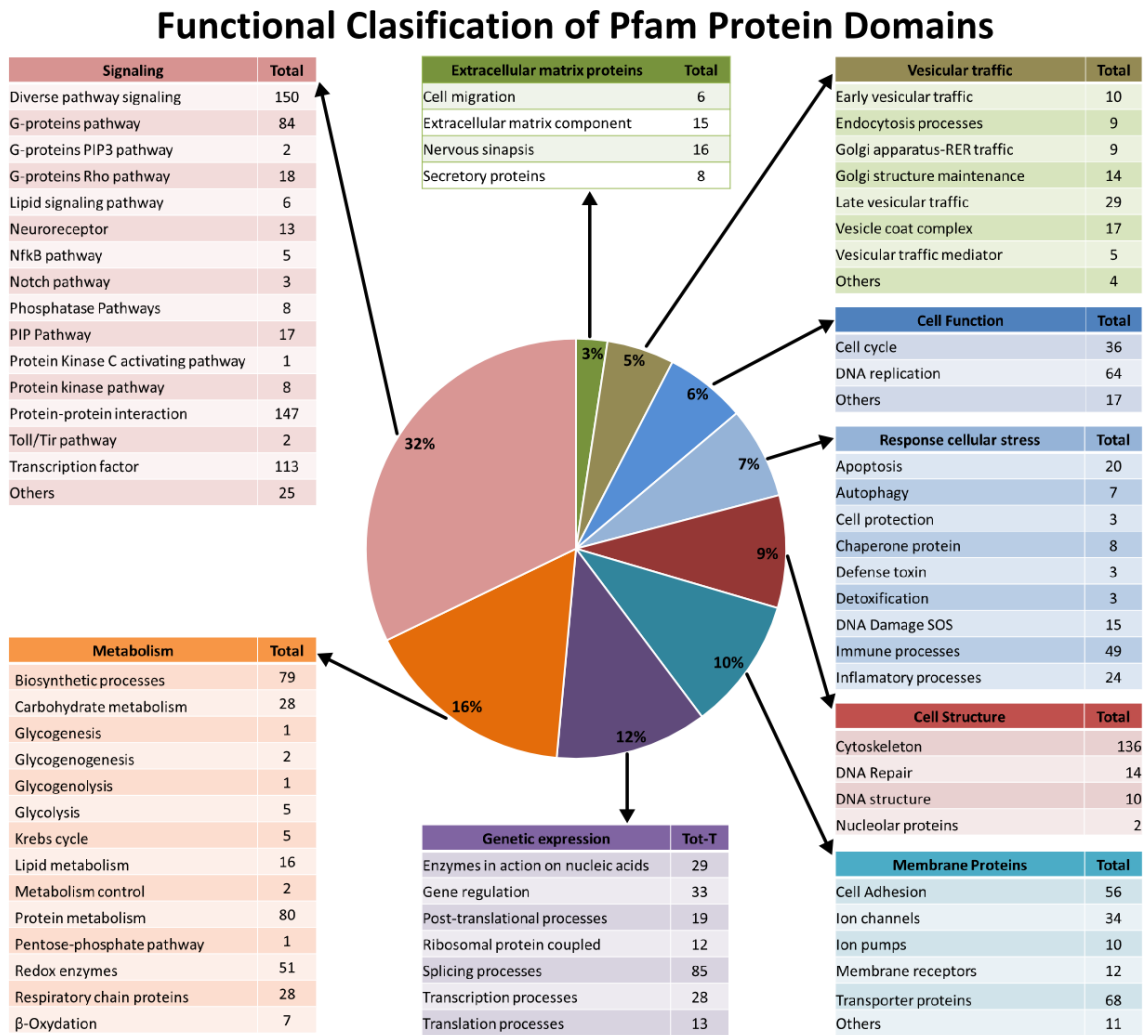


Figura 4-6. Clasificación funcional de dominios proteicos Pfam de transcritos diferencialmente expresados. La clasificación tuvo en cuenta la información cruzada con los términos GO y vías de señalización y metabolismo del KEGG.

4.5. Respuesta molecular a la exposición de WBM

La anotación funcional permitió detectar 84 transcritos que codificaban para proteínas hipotéticas implicadas en el proceso de respuesta a estrés tóxico, categorizadas en las siguientes fases: 22 transcritos asociados a procesos de Absorción-Eliminación, 21 transcritos involucrados en el proceso de biotransformación, y 41 transcritos relacionadas con efectos adversos y estrés celular debido a daños celulares que podrían estar relacionados con aspectos vistos en los resultados morfológicos y morfométrico (**Tabla 4-3**). En el proceso de Absorción-eliminación hubo coincidencia entre los términos GO y vías KEGG asociadas a los transcritos (**Tabla 4-3**), lo cual es importante porque las vías metodológicas de anotación son diferentes. En los términos GO se utilizaron referencias cruzadas contra la base de datos de UniProt/SwissProt determinadas por el algoritmo Blastx y Blastp, mientras las referencias cruzadas del KEGG derivan de la anotación de pfam. En ambos casos, la anotación funcional permitió determinar una serie de proteínas de membrana llamadas Transportadores ABC que están relacionadas con procesos de transporte de xenobióticos. En procesos de biotransformación se observó un patrón similar entre los términos GO y vías KEGG con la categoría asignada. En los términos GO se pueden diferenciar dos tipos de funciones enzimáticas: transferasa y oxidoreductasas, las cuales se ven reflejadas en las vías KEGG en los distintos procesos metabólicos (**Tabla 4-3**). Especialmente, se encontró la vía metabólica del glutatión y metabolismo de medicamentos, ambas muy relacionadas con procesos de detoxificación ya que en ellas intervienen enzimas con actividad transferasa y actividad redox. Finalmente, se encontró una serie de vías KEGG interconectadas, que podrían estar relacionadas con apoptosis derivados de la alta concentración a WBM que fueron expuestas las colonias de *H. symbiolongicarpus* (**Tabla 4-3**). Esas vías KEGG, también están relacionadas a los términos GO reportados, ya que muchas de esas funciones se encuentran dentro de las vías de señalización mencionadas (**Tabla 4-3**). A continuación, se tratarán en detalle los aspectos centrales de los tres bloques relacionados al proceso de detoxificación por WBM.

Tabla 4-3. Resumen de anotación funcional (Vías KEGG, Términos GO, Categoría Funcional), a partir de transcritos diferencialmente expresados relacionados con el proceso de toxicidad por WBM. Columna GO term CC: Componente celular, MF: Función Molecular, BP: Proceso Biológico.

Toxic process	KEGG Pathway	GO term	Functional Category	Total transcripts related
Absorption/Elimination	Transportadores ABC	GO:0043190-CC-ATP-binding cassette (ABC) transporter complex	Transporter proteins, Ion pumps	22
Biotransformation	Alanine, aspartate and glutamate metabolism	GO:0003980-MF-UDP-glucose: glycoprotein glucosyltransferase activity	Redox Enzyme	21
	Aldosterone-regulated sodium reabsorption	GO:0004069-MF-L-aspartate:2-oxoglutarate aminotransferase activity	Biosynthetic process	
	Arachidonic acid metabolism	GO:0004357-MF-glutamate-cysteine ligase activity	Carbohydrate metabolism	
	Arginine and proline metabolism	GO:0004363-MF-glutathione synthase activity	Glycogenolysis	
	Chemokine signaling pathway	GO:0004497-MF-monoxygenase activity		
	Glutathione metabolism	GO:0004601-MF-peroxidase activity		
	Glycosaminoglycan degradation	GO:0004648-MF-O-phospho-L-serine:2-oxoglutarate aminotransferase activity		
	Propanoate metabolism	GO:0005507-MF-copper ion binding		
	Drug metabolism	GO:0008168-MF-methyltransferase activity		
			GO:0008484-MF-sulfuric ester hydrolase activity	
		GO:0016620-MF-oxidoreductase activity, acting on the aldehyde or oxo group of donors, NAD or NADP as acceptor		
		GO:0045454-BP-cell redox homeostasis		
Adverse Effect	Apoptosis	GO:0000079-BP-regulation of cyclin-dependent protein kinase activity	Apoptosis	41
	MAPK signaling pathway	GO:0000080-BP-G1 phase of mitotic cell cycle	Cell cycle	
	Jak-STAT signaling pathway	GO:0000165-BP-MAPK cascade	Signaling	
	p53 Signaling pathway	GO:0000186-BP-activation of MAPKK activity	Protein-protein interaction	
	PIP Signaling System	GO:0004629-MF-phospholipase C activity	Protein metabolism	
	Cell cycle	GO:0004672-MF-protein kinase activity	Cytoskeleton	
		GO:0004674-MF-protein serine/threonine kinase activity	Lipid metabolism	
		GO:0006309-BP-apoptotic DNA fragmentation	Immune processes	
		GO:0006950-BP-response to stress	Diverse cellular development signaling	
		GO:0007050-BP-cell cycle arrest	Diverse pathway signaling	
		GO:0007095-BP-mitotic cell cycle G2/M transition DNA damage checkpoint	G-proteins pathway	
		GO:0031571-BP-mitotic cell cycle G1/S transition DNA damage checkpoint	Transcription factor	
		GO:0035690-BP-cellular response to drug	Ribosomal protein coupled	
		GO:0042771-BP-intrinsic apoptotic signaling pathway in response to DNA damage by p53 class mediator	PIP Pathway	
	GO:0042981-BP-regulation of apoptotic process	DNA Damage SOS		
	GO:0046328-BP-regulation of JNK cascade	Lipid signaling pathway		
	GO:0070374-BP-positive regulation of ERK1 and ERK2 cascade	Protein Kinase C activating pathway		
	GO:0071456-BP-cellular response to hypoxia			

4.5.1. Absorción – Eliminación

Se encontraron 22 transcritos diferencialmente expresados que codificaban para proteínas de membrana distribuidas en los siguientes tipos: 13 Transportadores ABC, 7 bombas de cationes y 2 bombas Hidrolasas Na-K con función ATPasa. El juego de proteínas Transportadores ABC, importantes en procesos de importe y exporte de sustancias propias como xenobióticos (102), consistió en 13 transcritos que codifican para 13 diferentes proteínas hipotéticas, 12 de ellas perteneces a cuatro subfamilias típicas y una sin similitud a alguna proteína canónica debido a la falta del dominio cassette de unión a ATP (ATP-Binding Cassette, ABC) (**Figura 4-7**, A-Der). De acuerdo con la diversidad estructural de los Transportadores ABC (103), estos se clasifican según la posición y repeticiones del dominio ABC y el dominio Región Transmembrana ABC (ABC-Tranmembrane Región ABC-TM) en el ORF. Tradicionalmente se ha visto que el dominio ABC-TM debe tener entre 5-12 regiones transmembrana para garantizar la translocación y/o apertura de la membrana para el paso del sustrato (102), aunque eso puede variar entre los organismos. Se encontraron cuatro proteínas putativas para la familia A-B-C, las cuales se caracterizan por tener dos repeticiones en tándem de un dominio ABC-TM y un dominio ABC; cinco Transportadores ABC de la familia B-D-H que presentan solamente un dominio ABC-TM y un dominio ABC; tres Transportadores ABC de la familia G-H caracterizado por presentar en primera posición el dominio ABC y en segunda posición el dominio ABC-TM. Finalmente un Transportador ABC no canónico, debido a la carencia del dominio ABC (**Figura 4-7**, A-Der). Particularmente el dominio ABC es el encargado del transporte activo por su acople con ATP generando un cambio conformacional en el dominio ABC-TM para dar espacio al transporte de diferentes tipos de sustancias propias o xenobióticas del organismo (102), aunque esto no excluye su función como transportador, ya que se sabe que las regiones expuestas de los dominios ABC pueden interactuar con diferentes tipos de proteínas para garantizar su función transportadora (102). En vertebrados, Las subfamilias B-C-G de las proteínas Transportadores ABC presentan funciones principales como exportadores de xenobióticos (104).

Los perfiles de expresión de los Transportadores ABC muestran tres proteínas sub expresadas a lo largo del tiempo y 11 sobre expresadas. Particularmente, las tres proteí-

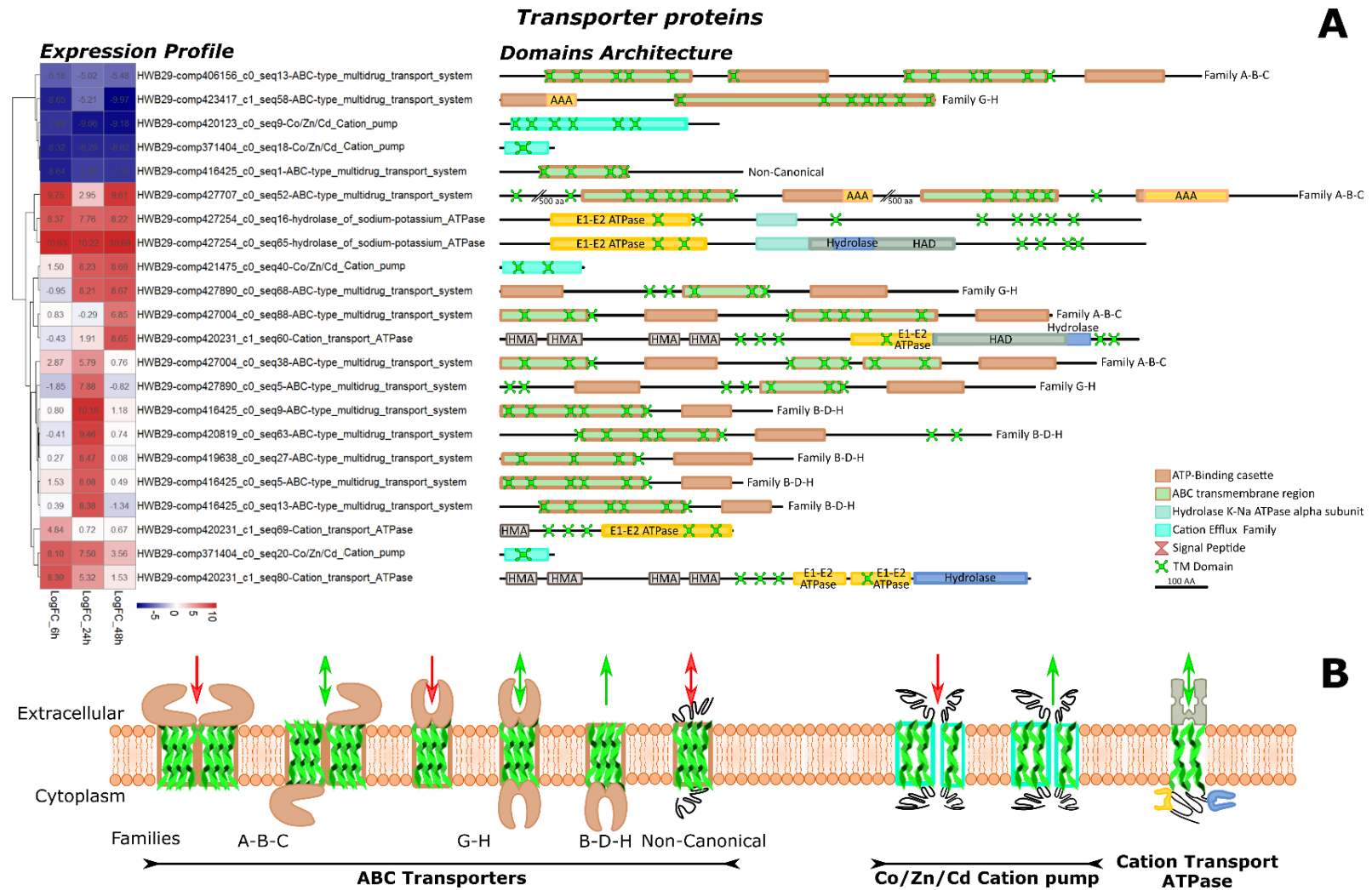


Figura 4-7. Transcritos codificantes a proteínas de membrana relacionadas con procesos de Absorción – Eliminación de WBM. (A, Izq) Gráfica de agrupación y mapa de calor según el perfil de expresión génica a las 6h, 24h y 48h. post-exposición (valores de Log de veces de cambio con respecto al control). (A, Der) Arquitectura de dominios proteicos predicha para los transcritos codificantes. (B) Modelo funcional de proteínas transportadoras, la flecha indica la direccionalidad del transporte de xenobióticos y el color si esta sobre expresado (Verde) o sub expresado (Rojo)

nas con niveles de transcripción negativos presentan únicamente los dominios ABC en la cara extracelular, más la no canónica (**Figura 4-7, B**). Esas proteínas pertenecen una de la familia A-B-C y la otra a la familia G-H, con niveles de expresión bastante bajos de -5.02 a -9.97 Log(FC) (**Figura 4-7, A-lz**). De los 10 transcritos sobre expresados, cinco pertenecen a la familia B-D-H, los cuales tienen la particularidad de presentar un pico de expresión a las 24h con un valor de Log(FC) entre 8.38 y 10.18. Tres de esos diez transcritos pertenecen a la familia A-B-C uno con un perfil de expresión predominante en todos los tiempos (9.75 Log(FC) a las 6h, 2.95 Log(FC) a las 24h y 9.61 Log(FC) a las 48h), el segundo con mayor nivel de expresión a las 6h (2.67 Log(FC)) y 24h (5.79 Log(FC)) y el último únicamente sobre expresado a las 48h (6.85 Log(FC)). Los dos transcritos restantes de este conjunto de transportadores ABC codifican a proteínas pertenecientes a la familia G-H, uno de los cuales tiene sus picos de expresión a las 24h (8.21 Log(FC)) y 48h (8.67 Log(FC)), mientras el otro únicamente a las 24h (7.88 Log(FC)) (**Figura 4-7, A**). La organización de dominios de las proteínas predichas de los Transportadores ABC mencionados, tienen como característica presentar en la cara intracelular al menos un dominio ABC, lo cual podría conferirle un papel principal de proteína de membrana exportadora (**Figura 4-7, B**).

El conjunto de resultados de los Transportadores-ABC sugiere dos eventos que están ocurriendo en las membranas celulares de *H. symbiolongicarpus* cuando se expone a WBMs. En primer lugar, que hay activación e inhibición de proteínas transportadoras relacionadas con la eliminación de xenobióticos. En segundo lugar, la posición de los dominios ABC en la cara intracelular sugiere que la expresión de genes favorece a aquellos que tienen una probable función exportadora a lo largo del tiempo post-exposición.

Adicionalmente a los Transportadores ABC, se encontraron nueve transcritos con un potencial papel en eliminación de xenobióticos, ya que codifican para proteínas de membrana con función transportadora para cationes y metales pesados como cobalto, zinc, cadmio y cobre (**Figura 4-7**). El primer conjunto consta de transcritos cuatro transcritos que codifican para proteínas con un único dominio de Bomba de Cationes Co/Zn/Cd (Co/Zn/Cd Cation Bump) y entre 1-6 dominios transmembrana (**Figura 4-7, A-Der**). Los dominios Bomba de Cationes Co/Zn/Cd presentan un papel importante en el balance celular de las concentraciones de Co/Zn/Cd (105). Los cuatro transcritos se caracterizan también por codificar dos proteínas pequeñas (alrededor de 100 aa) y dos

proteínas de mayor tamaño (entre 200 y 500 aa). Particularmente a nivel del perfil de expresión, se observa que el transcrito que codifica para la proteína de 500 aa y uno de los transcritos que codifica para una de las proteínas pequeñas de 100 aa tienen valor de expresión negativo muy cercanos (**Figura 4-7**, A-lz) y se agrupan en la misma rama del árbol (-7.89 Log(FC) 6h, -9.08 Log(FC) 24h y -9.18 Log(FC) 48h para la proteína de 500 aa y -8.32 Log(FC) 6h, -8.28 Log(FC) 24h y -8.02 Log(FC) 48h para la proteína de 100 aa). Por otro lado, las dos proteínas restantes, 200 aa y 100 aa, están sobre expresadas en todos los tiempos, aunque no comparten clado de agrupación. Para el transcrito que codifica la proteína de 200 aa presenta un perfil de expresión de 1.50 Log(FC) a las 6h, 8.23 Log(FC) a las 24h y 8.69 Log(FC) a las 48h; mientras que la proteína pequeña restante presenta un perfil de expresión de 8.10 Log(FC) a las 6h, 7.50 Log(FC) a las 24h y 3.56 Log(FC) a las 48h (**Figura 4-7**, A). Sí bien en este caso los valores de expresión no se observan correlacionados como ocurre en los transcritos sub expresados, los resultados sugieren que estas bombas de cationes en *H. symbiologicarpus* se expresan de manera coordinada y forman heterodímeros. Los resultados podrían estar dejando claves sobre la función importadora y la función exportadora de las bombas de cationes (**Figura 4-7**, B), siendo los transcritos sub expresados los encargados de la importación y los sobre expresados los encargados de la exportación.

Finalmente, se encontraron cinco transcritos que codifican para proteínas de membrana con similar arquitectura, todos con la presencia de dominios E1-E2 ATPasa (**Figura 4-7**, A-Der), la cual tiene función de hidrólisis del ATP con intercambio de protones Na/K (106). De los cinco, se encuentran dos con un perfil de expresión similar y arquitectura de dominios parecida. Ambos reciben el nombre Hidrolasa Na-K ATPasa (hydrolase sodium potassium ATPase) (**Figura 4-7**, A-lzq), por presentar el dominio E1-E2 ATPasa y el dominio Hydrolase K-Na ATPase Alpha subunit. Uno presenta adicionalmente dos dominios, uno hidrolasa y un dominio HAD (Haloacid Dehalogenase-like hydrolase). Este último presenta una función enzimática en la dehalogenación de grupos haloácidos e hidroxidación de grupos epóxido (107), todas sustancias químicas con potencial tóxico. Ambos transcritos presentan valores de expresión altos en los tres tiempos de muestre entre 7.76 y 10.83 Log(FC) (**Figura 4-7**, A-Der). De manera general las proteínas con dominios E1-E2 ATPase suelen hacer parte de bombas de transporte de cationes que son heteroméricas (106), lo que podría estar explicando los valores de expresión y arquitectura similar de estas dos proteínas. Los tres transcritos restantes, codifican para proteínas que

tienen en común dominios HMA, los cuales son importantes en el equilibrio y procesos de detoxificación del cobre (108) (**Figura 4-7**, A-Der). Los perfiles de expresión de los tres transcritos mostraron un patrón de expresión escalonado, es decir, un transcrito tuvo su pico de expresión a las 6h (4.84 Log(FC)), otro a las 6h y 24h (8.39 y 5.32 Log(FC) respectivamente) y el último únicamente a las 48h con un valor de 8.65 Log(FC) (**Figura 4-7**, A-Izq). Estos resultados dejan ver que los transcritos encontrados con el dominio HMA presentan un papel importante en el transporte del cobre y su balance al interior celular, el cual se activó después de la exposición a WBMs.

En conjunto, los resultados encontrados en las proteínas transportadoras muestran que hay procesos de transporte activo para la absorción y eliminación de sustancias con potencial tóxico. Con los transcritos encontrados se podría corroborar la presencia de trazas de metales pesados en los WBMs empleados para el experimento, ya que se ha evidenciado los niveles de concentración en las arcillas derivadas de barita en otros estudios (7).

4.5.2. Procesos de biotransformación

Se identificó un total de 21 transcritos que codifican para proteínas relacionadas directamente con procesos de biotransformación de xenobióticos, involucrados en reacciones de fase I y fase II (**Figura 4-8**). En las reacciones de fase I se detectaron 12 transcritos que codifican para dos Citocromo P450 (CYP450), cuatro tiorredoxinas, dos aldehído deshidrogenasas, una Peroxidasa, una Arilsulfatasa A, una Cu-II ascorbato dependiente de monooxigenasa, and una oxidorreductasa de unión a NADH(P)- (**Figura 4-8**). El perfil de expresión de los transcritos pertenecientes a las reacciones de fase I muestra un pico de expresión entre los 2.57 Log(FC) y los 9.61 Log(FC) a las 6h en la mayoría de casos (**Figura 4-8**, Izq). A medida que el tiempo pasa, los niveles de expresión disminuyen cercanos a cero Log(FC), indicando un retorno de expresión similar al control. Sin embargo, el CYP450 más pequeño y el sistema enzimático de tiorredoxinas presenta un patrón de expresión diferente al resto de enzimas de la fase I (**Figura 4-8**, Izq). El

CYP450 se mantuvo sobre expresado en todos los tiempos con un valor medio de 7.3 Log(FC), similar al caso de NADPH oxidorreductasa que presento un valor medio de 4.71 Log(FC) (**Figura 4-8**, Izq). Por su parte el sistema enzimático de tiorredoxinas también estuvieron sobre expresadas en todos los tiempos con un valor medio de 6,72 Log(FC) (**Figura 4-8**, Izq).

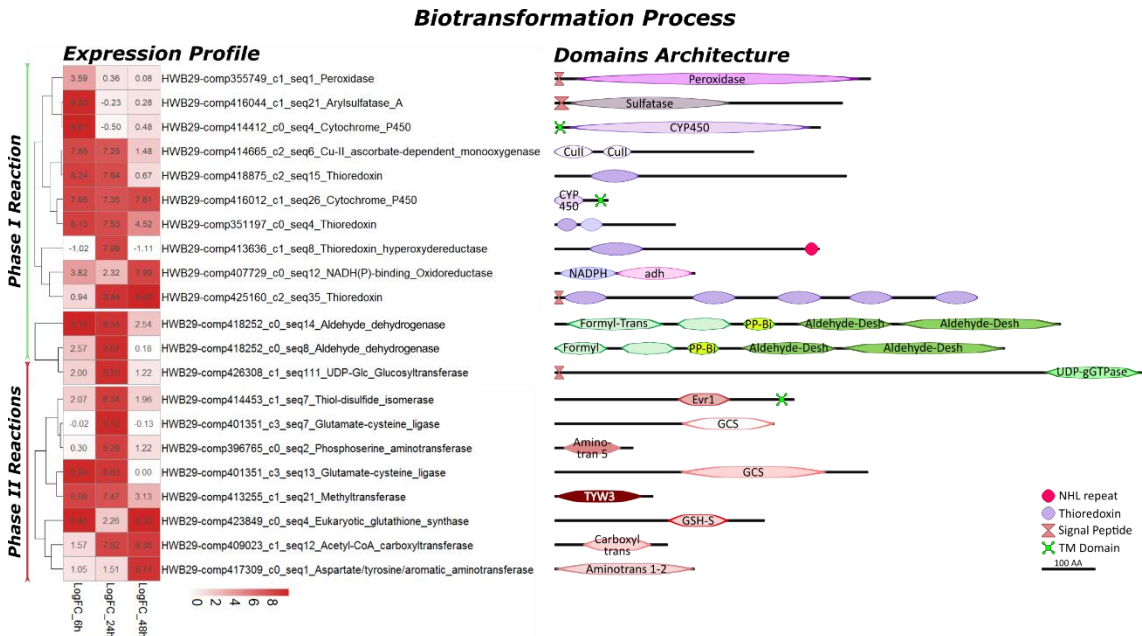


Figura 4-8. Transcritos codificantes para enzimas involucradas en procesos de biotransformación de xenobióticos. (Izq) Gráfica de agrupación y mapa de calor según el perfil de expresión génica a las 6h, 24h y 48h. post-exposición (valores de Log de veces de cambio con respecto al control). (Der) Arquitectura de dominios proteicos predicha para los transcritos codificantes.

En las reacciones de fase II se encontraron nueve transcritos que codifican para cinco enzimas con actividad transferasa, tres enzimas relacionadas al metabolismo del glutatión y una enzima tiol-disulfito isomerasa (**Figura 4-8**). El perfil de expresión muestra una predominancia hacia las 24h y 48h entre los 7.47 y 9.30 Log(FC) con algunas pocas excepciones. Las enzimas relacionadas con el metabolismo del glutatión como la unidad grande de la Glu-Cys Ligasa y la Glutatión Sintasa estuvieron también sobre expresadas a las 6h con un valor medio de 9.35 Log(FC), de igual manera que la metiltransferasa se sobre expresó desde las 6h con un valor de 8.08 Log(FC) (**Figura 4-8**).

La finalidad de los procesos de biotransformación es eliminar un xenobiótico mediante procesos químicos que ayuden a su solubilización. En el caso de las enzimas de reacciones de fase I, el papel principal que ellas juegan en condiciones naturales es prevenir el daño celular generado por las especies reactivas de oxígeno (ROS) y/o iones sulfato derivado del metabolismo propio de lípidos (109,110). Por su parte, las reacciones de fase II se encuentran involucradas en procesos biosintéticos de la célula, como la vía metabólica de la glicogenogénesis (111) o el metabolismo del glutatión (112). Los resultados mostraron dos casos sistemas enzimáticos casi completos sobre expresados para ambas partes de los procesos de biotransformación, el sistema de Tiorredoxinas (**Figura 4-9**, 1, 1.1, 1.2 y 1.3) en las reacciones de fase I, y la vía metabólica de síntesis de glutatión (**Figura 4-9**, 3, 3.1 y 3.2) en las reacciones de fase II.

De manera global, los perfiles de expresión permitieron observar un efecto escalonado entre las enzimas de cada fase, con predominancia en la expresión a las 6h por las reacciones de fase I, una activación general por todas las enzimas a las 24h y posteriormente una predominancia en la expresión por las enzimas de las reacciones de fase II (**Figura 4-8**, Izq). Esta observación es importante cuando miramos el detalle de la funcionalidad de cada una de las enzimas. Las enzimas que actúan en las reacciones de fase I (**Figura 4-9**, 1) se encuentran en todos los casos sobre expresadas a las 6h, con excepción de la Tiorredoxina hiperreductasa (**Figura 4-8**), la cual solo tiene un único pico de expresión a las 24h. Las enzimas con actividad oxidorreductasa como la Peroxidasa, Sulfatasa, y CYP450 grande, solo estuvieron sobre expresados a las 6h. El resto del tiempo sus niveles de expresión fueron cercanos a 0 Log(FC) indicando un nivel de expresión basal (**Figura 4-8**). Por otra parte, el CYP450 pequeño se encuentra sobre expresado en todos los tiempos, al igual que Cu²⁺ monooxigenasa (**Figura 4-9**, 1). Finalmente, el sistema enzimático de tiorredoxinas se encontró completo (113), el cual se caracteriza por una enzima con un dominio NADPH más un dominio Tiorredoxina que recupera el poder reductor del sistema con ayuda del NADP(H)-H⁺ (**Figura 4-9**, 1 y 1.1). Una vez las tiorredoxinas se encuentran reducidas pueden usar ROS como donador de oxígeno y electrones para oxidar los xenobióticos (**Figura 4-9**, 1.2) y que estos queden preparados para las reacciones de fase II. Por último, la enzima NADP(H) Oxidorreductasa aparte de ayudar a recuperar el poder reductor a las tiorredoxinas, puede oxidar radicales hidroxilos

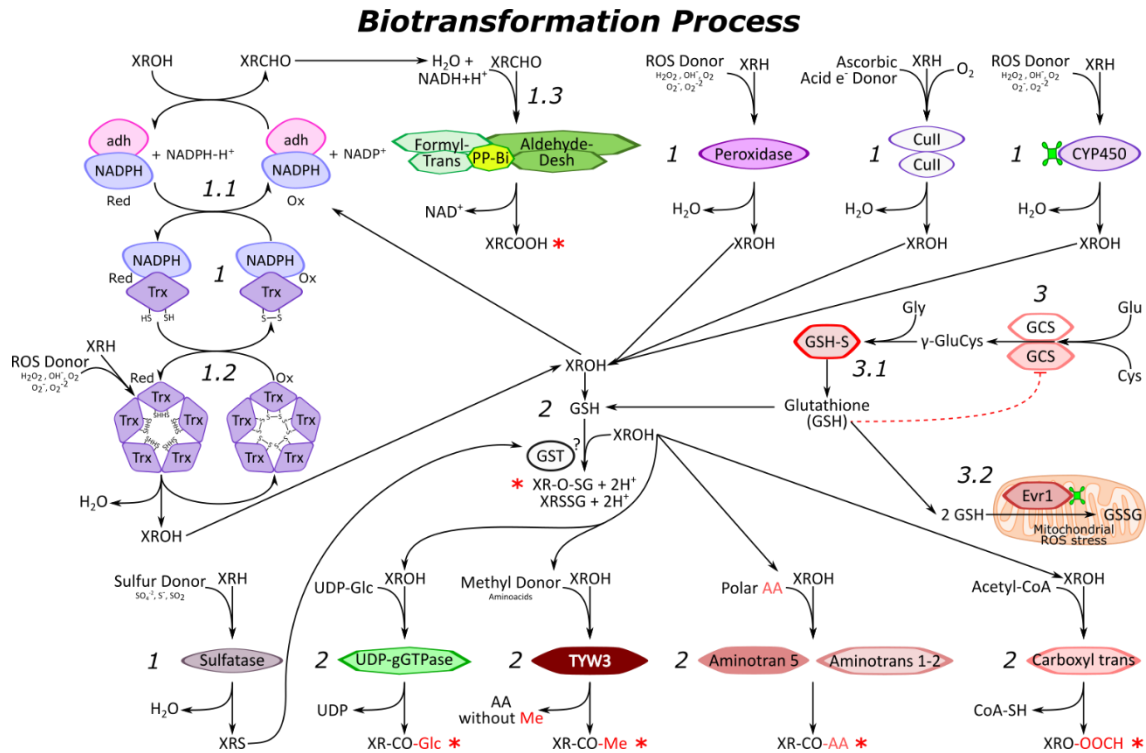


Figura 4-9. Vías metabólicas de procesos biotransformación de xenobióticos. En la parte izquierda y superior se encuentran todas las enzimas que actúan en las reacciones de fase I en colores fríos. En la parte derecha e inferior se encuentran las enzimas que se encuentran involucradas en las reacciones de fase II en colores rojos. Por distinción, las reacciones de fase I son las primeras en ocurrir y generan una primera reacción de oxidación en los xenobióticos, mientras las reacciones de fase II se encargan de agregar una sustancia química conjugada que genere una mayor polaridad en el xenobiótico o marque de manera que una proteína transportadora y/o de membrana pueda eliminarla de la célula.

(-ROH) a aldehídos (-CHO) por la presencia del dominio *adh* (**Figura 4-9**, 1.1). *Per se*, los aldehídos son sustancias tóxicas a nivel celular, razón por la cual encontramos dos transcritos codificantes para enzimas de aldehído deshidrogenasa, el cual se encarga de oxidar los radicales -CHO a ácidos carboxílicos (**Figura 4-9**, 1.3) y facilitar la eliminación del xenobiótico en su forma ácida. Todas las enzimas que participan de este sistema de tiorredoxinas se encontraban sobre expresadas a lo largo del tiempo, lo que fortalece la hipótesis de su funcionamiento.

Las enzimas involucradas en las reacciones de fase II, Aminotransferasas, UDP-Glucosiltransferasa, Metiltransferasa and Acetil-Coa transferasa, presentaron un incremento en la expresión hacia las 24h y 48h con un rango de valores de 2.26 Log(FC)

a 9.12 Log(FC) (**Figura 4-8**). Todas estas enzimas requieren una primera oxidación de los xenobióticos (**Figura 4-9**, XROH o XRS) para poder agregarle el marcador para su eliminación (**Figura 4-9**, 2). Por último, dentro de las reacciones de fase II se encontró la vía metabólica de síntesis casi completa del glutatión (GSH). La biosíntesis del glutatión depende de tres enzimas, dos Glu-Cys ligasas (GCS) una con actividad sintetasa y otra con actividad modificadora, y una enzima glutatión sintasa (GSH-S) (114). Las primeras dos se encargan de la formación del dipéptido γ -GluCys, mientras la GSH-S de la incorporación de Gly para la biosíntesis final del glutatión (114) (**Figura 4-9**, 3, 3.1). Las enzimas encargadas de la biosíntesis de GSH mostraron un incremento en la expresión a las 6h (9.24 Log(FC)) y 24h (8.38 Log(FC)), para el caso de la GCS larga y un pico de expresión a las 24h (9,12 Log FC) para la GCS corta (**Figura 4-8**). Adicionalmente, GSH-S estuvo sobre expresada durante todos los tiempo con picos a las 6h y 48h (9.45 Log(FC) y 9.30 Log(FC) respectivamente), mientras a las 24h la expresión disminuyo hasta 2.26 Log(FC) (**Figura 4-8**). En la parte final de la vía metabólica, encontramos una enzima Tiorredoxina isomerasa la cual tiene el papel de oxidar el GSH al interior de la mitocondria para prevenir el estrés oxidativo por ROS libres (115) (**Figura 4-9**, 3.2). El perfil de expresión deja ver un pico de expresión a las 24h con 8.24 Log(FC), aunque también se encuentra sobre expresada a las 6h y 48h con 2.07 y 1.96 Log(FC) respectivamente (**Figura 4-8**). Ese perfil de expresión mencionado es muy similar al observado en las enzimas GCS (**Figura 4-8**), Permitiendo la relación en la vía del GSH. Finalmente, la enzima que se encarga de la conjugación del GSH con el xenobiótico, la Glutatión S-Transferasa (GST), no fue encontrada en el análisis y puede ser debido a los criterios de selección altos de los transcritos diferencialmente expresados (**Figura 4-9**, 2).

Este bloque de resultados permite ver varios procesos que se están activando por la exposición a lodos de perforación. En primer lugar, está encontrar enzimas claves en procesos de detoxificación presentes en todos los organismos vivos como lo son CYP450, GSH-S, Tiorredoxinas y Sulfatasa. Segundo aspecto clave es ver que hay un comportamiento escalonado entre los picos de expresión de las enzimas pertenecientes a reacciones de fase I y enzimas de reacciones de fase II. Tercero y último, detectar a partir de los análisis funcionales vías o sistemas enzimáticos relacionados como el caso de las tiorredoxinas y el metabolismo del GSH.

4.5.3. Efectos adversos a la exposición por WBM en *H. symbiolongicarpus*

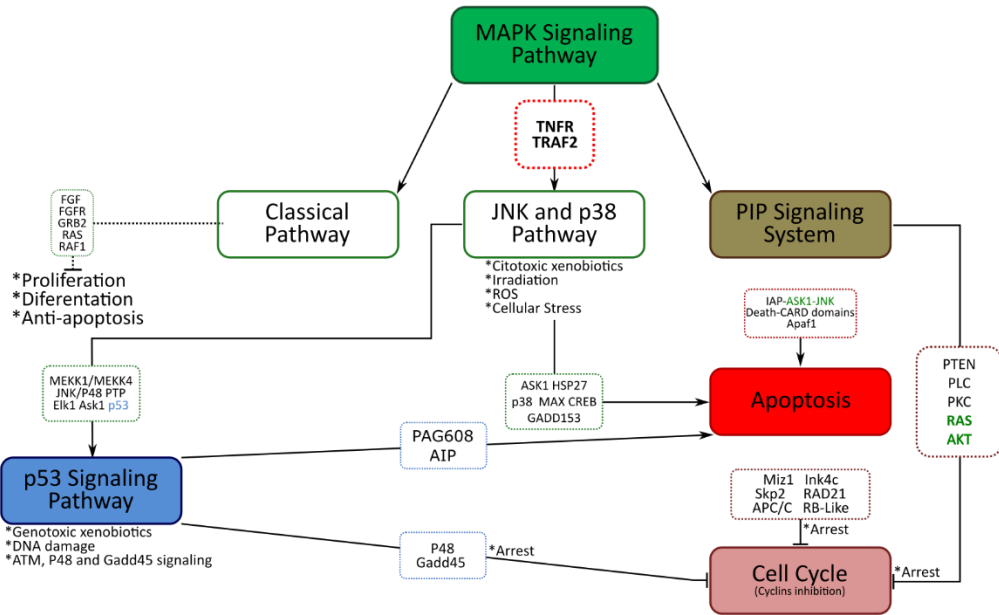
Los resultados morfológicos y morfométricos dejaron en evidencia alteraciones en las colonias de *H. symbiolongicarpus* a la exposición a WBMs, permitiendo focalizar la búsqueda de transcritos codificantes hacia cierto tipo de vías y mecanismos moleculares como la apoptosis, procesos de activación y reparación de DNA, procesos de alerta a estrés celular entre otros (49). Para ello, se tuvo como principal fuente de información la referencia cruzada entre los códigos pfam, las vías de señalización de KEGG y la información complementaria de arquitectura de dominios canónicos de la base de datos ensembl (116). Con toda la información colectada, se detectaron un total de 41 transcritos que codifican para proteínas canónicas pertenecientes a cinco vías de señalización del KEGG: Siete transcritos para Apoptosis, nueve para Ciclo celular, 15 para vía de señalización de MAPK, seis para sistema de señalización Fosfatidil-inositol (PIP) y cuatro para vía de señalización de p53 (**Tabla 4-3**). En conjunto, todas las vías de señalización se encuentran relacionadas y dirigiendo gran parte del mecanismo hacia procesos de apoptosis, que podría estar explicando el deterioro de los tejidos vistos en los resultados morfométricos y morfológicos en *H. symbiolongicarpus* (**Figura 4-10**).

La vía de las MAPK (**Anexo C**) se muestra como nodo central del resto de vías encontradas ya que presenta rutas de interacción con todas las vías hasta llegar a la activación de la apoptosis (**Figura 4-10, Sup**). Se encontraron proteínas de dos de las tres vías principales de las MAPK (Vías Clásica y la vía de las JNK y p38). Se encontraron cinco transcritos codificantes que activan la vía clásica de las MAPK como lo son: Fibroblast Growth Factor (FGF), FGF receptor (FGFR), GRB2-Like, Ras GTPase and RAF1 (**Figura 4-10, Sup; Anexo C**), siendo RAF1 el único transcrito con valores negativos de expresión en todos los tiempos (**Anexo C**). La vía clásica promueve o inhibe procesos de proliferación, diferenciación y anti-apoptóticos, aunque todos ellos pueden estar bloqueados por la baja expresión de RAF1 (**Anexo C**), siendo RAF1 la proteína con nodo central para esa señal (117). La vía JNK-p38 presenta el siguiente conjunto de transcritos codificantes (MEKK1, JNK/p38, Elk1, GADD153, MAX, HSP27, CREB-Like, PTP, ASK1 and AKT), todos

activados por el receptor del factor de necrosis tumoral (TNFR) y TRAF2, ambas proteínas activadoras de la apoptosis (**Figura 4-10**, Sup; **Anexo C**) (117). TRAF2 activa las proteínas MAPKKK como MEKK1 y ASK1. La señalización por MEKK1 involucra la activación de JNK y Elk1 para terminar en la activación de la vía de señalización p53 (**Figura 4-10**, Sup; **Anexo C**) (117). Por el lado de ASK1, la señalización involucra a p38 y la activación de los factores de transcripción GADD153, MAX y CREB-like, los cuales tienen como función final la activación de apoptosis y la señal de estrés por medio de HSP27 (**Figura 4-10**, Sup; **Anexo C**) (117). Adicionalmente, se encontró un transcrito codificante para PTP que tiene función inhibidora de la vía de JNK-p38 (117). Los niveles de expresión para PTP fueron bajos en todos los tiempos, indicando que no estaba inhibiendo la señal de JNK-p38. Por parte de AKT, presenta un papel similar a PTP, con la diferencia que inhibe la vía de JNK-p38 a nivel de ASK1. El nivel de expresión de AKT fue mayor a cero en todos los tiempos, aunque su función de inhibidor también se encuentra relacionada con la vía de PIP para terminar en un bloqueo del ciclo celular, presumiendo que es por ahí su principal función (**Figura 4-10**, Sup; **Anexo C**). Finalmente, la vía JNK-p38 presenta un papel relacionado con los cambios ambientales e incremento de estrés como lo pueden ser exposición a drogas citotóxicas, irradiación, incrementos de temperatura ambiental, acumulación de ROS (117). Todos estos factores pueden ser un efecto de la exposición a WBMs y es la razón de encontrar la vía de MAPK activa y su papel como nodo principal de señalización (**Figura 4-10**, Sup; **Anexo C**).

En el sistema de señalización del PIP (Fosfatidilinositol) (118) se encontraron seis transcritos codificantes (**Figura 4-10**, Sup; **Anexo D**), tres codificaban para PI-Fosfolipasa C (PLC), dos codificaban para PTEN-like y un transcrito codificaba para PKC-Like (Proteína Quinasa C) (**Figura 4-10**, Sup; **Anexo D**). Bajo las condiciones del experimento, la vía del PIP está indicando procesos de estrés genotóxico (119) y formación de segundos mensajeros como el Diacilglicerol (DAG) hidrolizado por PLC a partir de fosfatidilinositol (118). La función de PTEN está corriente arriba del funcionamiento del PLC para liberar DAG y activar PKC. A su vez, PKC señala por medio de RAS (proteína G) hacia la comunicación con AKT y finalizar en la inhibición del ciclo celular (**Figura 4-10**, Sup; **Anexo D**), según se muestra los mapas de señalización de la base de datos del KEGG.

Apoptosis Signaling Stress Recovered from KEGG Pathways



Average Expression Values for each KEGG Pathway

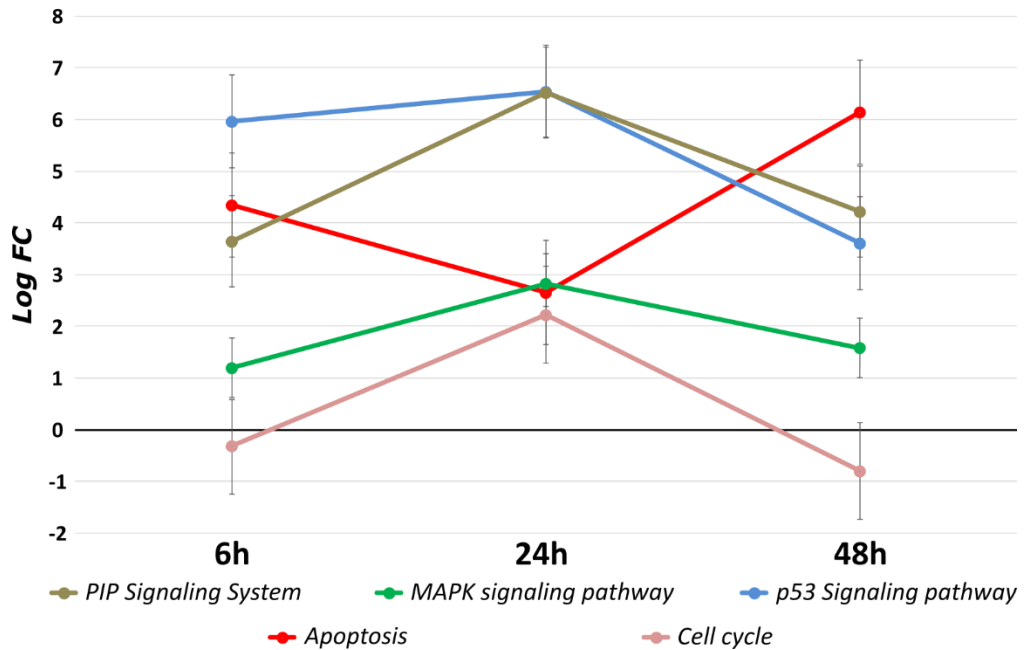


Figura 4-10. Resumen de vías de señalización del KEGG y valores de expresión promedio por vía. (Sup) Vías principales del KEGG (Cajas de color sólido), (*) función principal de la vía, (Cajas con bordes punteados) Proteínas principales de la vía que fueron encontradas en *H. symbiologicarpus*. (Inf) Valores promedio de expresión según los transcritos encontrados de esa vía en cada uno los tiempos. Se trato de mantener la equivalencia de colores entre ambas gráficas.

En la vía del p53 (**Anexo E**) se encontró un único transcrito codificante para p53 que controla todas las rutas de señalización. La presencia de p53 se relaciona directamente con el daño en el DNA. A parte se encontraron tres transcritos adicionales que codifican para Gadd45, PAG608 y P48 (**Figura 4-10, Sup; Anexo E**). Gadd45 está implicada en el arresto del ciclo celular en la fase G2. PAG68 promueve la apoptosis mediante la activación de la señal de permeabilización de la membrana mitocondrial y liberación de CytC y ensamble de Apaf1 (120). Finalmente, P48 junto con Gadd45 activan los mensajeros de SOS y mecanismos de reparación del DNA (120).

Los nueve transcritos codificantes encontrados en la vía del Ciclo celular (**Anexo F**) fueron Miz1, Skp2, Ink4c, RB-associated, Rad21, APC/C, Cyclin D, Cyclin F y una Ciclina no definida, todos con capacidad de inhibir cada una de las fases del ciclo celular (**Figura 4-10, Sup; Anexo F**) (121). Acorde con los resultados, el punto se encuentra regulado por p53 y Gadd45 como se mencionó anteriormente. Ambas proteínas inhiben a las Ciclinas D y B, las cuales son el punto de referencia para el cambio de fase del ciclo celular en G1 y G2 respectivamente (**Figura 4-10, Sup; Anexo F**). Los transcritos codificantes para Miz1, Ink4c and Skp2, Miz1 presentan un papel en la misma ruta junto con Ink4c que señala en la inhibición de la Ciclina D (121), mientras que Skp2 puede inhibir las Ciclinas D, E y A, todas las que hacen parte de la fase 1 (**Figura 4-10, Sup; Anexo F**). La tercera señal está dada por APC/C, la cual es un inhibidor de la Ciclina B que a su vez inhibe a la proteína Rad21, siendo esta última esencial para la generación del complejo molecular que permite la cohesión entre cromátides hermanas durante la fase M (121). Además, se encontró una proteína asociada al Retinoblastoma (RB-associated), que esta codificada por un transcrito con el dominio RB-B y un dominio DUF (**Figura 4-10, Sup; Anexo F**). La sobre expresión de este transcrito permite establecer un arresto del ciclo celular en la fase S (121). Aparte, fueron encontradas dos ciclinas (Ciclina F y una no definida) (**Figura 4-10, Sup; Anexo F**). La Ciclina F se caracterizó con los dominios canónicos de la base de datos de pfam, pero esta no se encontró reportada en la vía del Ciclo celular del KEGG. La ciclina no definida presenta un único dominio de Cyclin similar a muchos tipos de ciclinas, pero con la diferencia que es necesario tener más dominios para poderla asignar a un tipo de ciclinas

como en el caso de la Ciclina F (presenta adicionalmente dominios F-box). Los transcritos codificantes para las proteínas inhibidoras fueron encontrados sobre expresados en todos los casos, mientras las dos ciclinas inhibidas en todos los tiempos (**Figura 4-10**, Sup; **Anexo F**).

En la vía de la Apoptosis (**Anexo G**), se encontraron siete transcritos codificantes para Apaf-1, IAP, TNF receptor, TRAF2-Like, AIP, un transcrito con dominio CARD (Dominio de reclutamiento de caspasas) y otra proteína con dominio Death, dominio presente en muchas proteínas pro-apoptóticas (**Figura 4-10**, Sup; **Anexo G**). Los últimos dos transcritos no se lograron asignar directamente a alguna proteína de la vía de Apoptosis, ya que estos dominios están presentes en muchas proteínas pro-apoptóticas como Fas, FADD y Caspasas (122). Particularmente, los transcritos con los dominios CARD y Death están involucrados con proteínas pro-apoptóticas señalizadas vía TNFR. La cascada de señalización TNFR-TRAF2 comunica con AIP mediante la vía de MAPK ASK1. Por otro lado, IAP se encuentra relacionada con la vía de p53-Gadd45 como parte del mensaje de reparación de DNA (**Figura 4-10**, Sup; **Anexo G**). Finalmente, no fue posible recuperar la vía de señalización completa hasta la activación de Apaf1, pero el simple hecho de encontrar Apaf1 no podría estar dando indicios de la formación del apoptosoma y la liberación de CytC, ambos fundamentales para el proceso de apoptosis (**Anexo G**).

Los promedios de los perfiles de expresión para cada conjunto de transcritos pertenecientes a las distintas vías de señalización, dejaron ver una relación entre los valores de expresión altos iniciales a las 6h y 24h para las MAPK, PIP y P53, seguido de un incremento en el valor de expresión a las 48h para la apoptosis y una disminución en la expresión de los transcritos codificantes para proteínas del ciclo celular (**Figura 4-10**, Inf). El perfil de expresión para MAPK, PIP y p53 presentaron el mismo comportamiento, valores positivos a las 6h con un incremento hacia las 24h y una posterior disminución a las 48h (**Figura 4-10**, Inf). Por el lado de los transcritos codificantes del ciclo celular, el perfil de expresión promedio presentó valores positivos únicamente a las 24h, llegando un poco por encima a 2 Log(FC), algo que se explica por la presencia de transcritos inhibidores que deben estar sobre expresados en algún punto para poder arrestar el ciclo celular. Por último, el perfil de expresión de la Apoptosis inicia con un valor cercano a 4 Log(FC) a las 6h, estando en el casi en el promedio de las vías MAPK, PIP y p53. Posteriormente, disminuye un poco con un valor cercano a 3 Log(FC) a las 24h para terminar con un pico de 6 Log(FC) a las 48h, el cual es mayor a todas las demás vías.

Los resultados vistos en los resultados morfológicos y morfométricos (**Figura 4-2**) mostraban una disminución significativa en la salud de las colonias con pérdida de tejidos (pólipos y mata estolonar) hacia las 72h, la cual puede estar siendo explicada por procesos de apoptosis que presentan su máxima expresión a las 48h, activada por proteínas que censuran los cambios ambientales como PKC y p53, algunos de ellos derivados directamente de los procesos de biotransformación.

En resumen, los análisis derivados de la interacción entre los diferentes mapas de las vías del KEGG nos permitieron generar una hipótesis funcional sobre el efecto adverso visto en las colonias de *H. symbiolongicarpus*. En primer lugar, las vías de MAPK y PIP recogen las señales de estrés orquestadas por una mezcla muy amplia de xenobióticos presentes en los WBMs y sus metabolitos derivados durante los procesos de biotransformación. En segundo lugar, el efecto final de la exposición a WBMs deja dos vías claramente afectadas como lo son la apoptosis (ya mencionada) y el ciclo celular. El arresto del ciclo celular no permite que las células entren en una dinámica de muerte y división celular que permita la recuperación de las colonias. Es decir, aparte de que se favorece la muerte de células dañadas, lo cual es de esperar ya que se observan la presencia de activación de vías SOS y daño del DNA, generando la activación irreversible de la apoptosis, también se ve desfavorecida la división celular para poder mantener el equilibrio de pérdida y reparación tisular, lo que está evidenciado en los resultados morfológicos y morfométricos.

5. Discusión

Datos del portal web Statista han estimado que hasta enero de 2018 cerca de 640 plataformas de operación petrolera siguen funcionando, de las cuales 390 se encuentran ubicadas en mares y océanos de países americanos. (<https://www.statista.com/statistics/279100/number-of-offshore-rigs-worldwide-by-region/>). Esto crea la necesidad en la comunidad académica y científica hacia el desarrollo de conocimientos en ecotoxicología, especialmente el impacto generado en la vida silvestre y ambientes marinos por la presencia de agentes contaminantes como los lodos de perforación petrolera relacionados con los procesos de exploración energética derivada de combustibles fósiles.

Los experimentos de exposición a WBM en *H. symbiolongicarpus* son la primera evidencia de efectos adversos a altas concentraciones de una fase de partículas suspendidas en condiciones agudas a nivel morfológico, morfométrico y molecular. Especialmente, los resultados moleculares derivados de la expresión completa del genoma nos dejan muchos insumos, herramientas e instrumentos para mejorar y precisar el diagnóstico sobre procesos toxicodinámicos en *H. symbiolongicarpus* frente a la exposición por WBM.

5.1. Consideraciones sobre los cambios morfológicos de la exposición a LPP en *H. symbiolongicarpus*

Los efectos adversos en la morfología de las colonias de *H. symbiolongicarpus* se pueden dividir en dos de acuerdo con la fase experimental: (1) Efecto adverso observable durante

la fase de exposición a WBMs y (2) Efecto adverso en la fase de recuperación o tiempo después de la exposición (post-exposición). En la fase de exposición se observaron tres fenómenos de manera clara: (1) retracción de los tentáculos, (2) Incremento en la circunferencia y (3) carencia de movimientos sincrónicos (rigidez) de los pólipos (**Figura 4-1**). En la fase de recuperación o post-exposición se apreciaron tres alteraciones en las colonias: (1) Un detrimento en la mata estolonial con pérdida de biomasa reflejado en la disminución del área ocupada por la colonia, (2) pérdida de polipos (**Figura 4-2**) y aparición de manchas rojas en los lugares donde se encontraban los pólipos (**Figura 4-3**).

Tabla 5-1. Cambios morfológicos reportados en siete especies de corales expuestas a WBMs en fase aguda hasta 96h en concentraciones de 1%, 3,16% y 10% (21).

Especie	Clase / Familia	Incremento en tamaño del pólipo	Retracción de Pólipos	Secreción de moco	Letalidad
<i>Porites divaricata</i>	Anthozoa / Poritidae	No	Total, a 24h, 3,16-10%	Si	No murieron pólipos
<i>Porites furcata</i>	Anthozoa / Poritidae	No	Total, a 24 h, 3,16-10%	Si	No murieron pólipos
<i>Porites astreoides</i>	Anthozoa / Poritidae	No	Total, a 24 h, 3,16-10%	Si	No murieron pólipos
<i>Montastrea annularis</i>	Anthozoa / Merulinidae	Si a las 24 h, 10%	Total, a 42 h, 1-3,16-10%	Si	Tejido empezó a desintegrarse a last 65h 10%, 70% colonia muerta
<i>Acropora cervicornis</i>	Anthozoa / Acroporidae	No	Total, a 1 h, 3,16-10%	Si	No murieron pólipos
<i>Agaricia agaricites</i>	Anthozoa / Agariciidea	No	No	Si, muchísimo	Colonias empezaron a morir a 41h, 100% colonia muerta a 65h
<i>Dichocoenia stokesii</i>	Anthozoa / Meandrinidea	No	No	No	No
<i>Hidractinia symbiolongicarpus</i>	Hydrozoa / Hydractiniidae	Si, Inmediatamente al contacto	Retracción total de tentáculos	No	Pólipos y mata estolonial muerta a las 72 h.

Experimentos realizados en siete especies de corales fueron reportados efectos adversos similares a los vistos en *H. symbiolongicarpus*, como lo son incremento en la circunferencia del pólipo, pérdida de tejido y muerte de colonias completas (**Tabla 5-1**) (21). Específicamente, las especies *M. annularis* y *A. agaricites* mostraron un patrón fenotípico con muerte de tejido (en ambas especies) e incremento en la circunferencia del pólipo (sólo en *M. annularis*), siendo este último un efecto adverso muy similar al visto en *H.*

symbiolongicarpus (**Tabla 5-1**). Por otro lado, seis de los siete corales (Excepto *D. stokesii*) secretaban moco como parte de su respuesta fisiológica a la exposición por WBM, aunque este aspecto no fue observado en *H. symbiolongicarpus*. La retracción de tejido parece ser una condición frecuente en las especies de cnidarios (**Tabla 5-1**). En cinco especies fue posible ver una retracción total a 3.16% de concentración entre las 24h y 48h, mientras en *A. cervicornis* la retracción de los pólipos fue inmediata, similar a la retracción de tentáculos inmediata en *H. symbiolongicarpus*.

En otro caso de experimentos de exposición de largo plazo (84 días) con el coral de aguas profundas *Lophelia pertusa*, se evidencio patrones similares fenotípicos ya reportados (22). En una exposición a 2.5% mg/ml de WBM, la retracción de los pólipos fue del 80%, la tasa de crecimiento disminuyo un 50%, la secreción de moco incrementó en un 32% y solo el 2.2% de los pólipos murieron a los 84 días, causando efectos adversos crónicos parecidos a los observados en exposiciones agudas.

En otros invertebrados como los bivalvos fueron reportados efectos adversos in varios tejidos tales como gónadas, sistema digestivo y branquias en experimentos de larga duración con exposición continua a WBM (41). En vieiras *Placopecten magellanicus* se observaron un incremento del 20% al 60% de peso de tejido seco en las gónadas y un aumento exacerbado entre 200% y 250% del tejido seco del sistema digestivo después de 72 días de exposición (41), al igual en *Pecten maximus* donde se observaron diferencias significativas y un incremento en el peso seco del sistema digestivo (No se reportaron valores exactos de peso), después de 21 días de exposición a WBM al 2% de concentración (7). En los mejillones *Mytilus edulis*, el efecto adverso fue visualizado en las branquias y células del sistema digestivo (7). Las células digestivas incrementaron su tasa de formación vacuolar, mientras en las branquias se observaron una mayor cantidad de células mucosas (7). En organismos Vertebrados como los bacalaos *Gadus morhua*, los resultados microscópicos de las branquias mostraron varias anormalidades en el tejido epitelial de las larvas de los bacalaos, como lo son engrosamiento de filamentos branquiales, malformaciones en los filamentos y presencia de aneurismas branquiales en exposición crónica a barita y WBMs (7). Como nota final, a los trabajadores de las

plataformas petroleras se les ha caracterizado los riesgos ocupacionales si se exponen a WBM, ya que incluyen irritación e inflamación en la piel, dermatitis, irritación en las mucosas entre otros síntomas (123).

Todos los efectos adversos reportados en varios organismos animales de muy variados grupos muestran una generalidad en afecciones sobre tejidos y órganos de contacto como lo son, inflamación, irritación y procesos de desintegración tisular en los casos más severos tanto en fases crónicas como agudas de exposición. En algunos casos se puede ver niveles de letalidad, siempre y cuando la dosis de exposición a WBM sea muy alta como los reportados en este documento, donde se corroboró un efecto adverso crítico en *H. symbiolongicarpus* que fue reflejado en la pérdida de biomasa.

5.2. Aspectos toxicodinámicos relacionados a la expresión genómica por exposición a WBM en *H. symbiolongicarpus*

Se realizó un experimento de exposición a WBM, con una concentración del 50% para generar el máximo estímulo posible sobre los mecanismos de expresión genética en *H. symbiolongicarpus*, pero asegurando que fuesen dosis subletales. El procesamiento y análisis bioinformático permitieron recuperar 464,217 transcritos organizados en 271,433 genes con un promedio de tamaño de 865 pb (**Tabla 4-1**). Los análisis estadísticos y procesos de anotación permitieron determinar 1,871 transcritos diferencialmente expresados involucrados en el proceso toxicodinámico producto de la exposición a WBM (**Tabla 4-2**), todos con arquitectura de dominios caracterizada por pfam, signal y Tmhmm (**Figura 4-6**). Los transcritos con arquitectura de dominios predicha fueron categorizados manualmente, realizando cruce de información con bases de datos del GO, KEGG y ensembl, para tener la mayor cantidad de información funcional disponible y hacer una buena descripción de los procesos y funciones relacionados a los transcritos encontrados

(Figura 4-6). Después de una revisión detallada fue posible determinar un total de 84 transcritos codificantes para proteínas involucradas con distintos aspectos de la toxicodinámica como lo son absorción y eliminación de xenobióticos, procesos de biotransformación y proteínas relacionadas con procesos que explicaran los fenotipos observados en los efectos adversos morfológicos en las colonias de *H. symbiolongicarpus* (Tabla 4-3).

Los procesos de absorción y eliminación derivados de la mezcla compleja de WBM puede estar siendo mediada por dos tipos de proteínas de membrana, todas con funcionamiento activo de transporte, como lo son los Transportadores ABC y bombas de cationes (Figura 4-6). Los perfiles de expresión y la arquitectura de dominio en algunos casos permitieron sugerir un conjunto de transportadores con una vía de transporte hacia la parte interna de la célula, otras con función exportadora y unas pocas con ambas funciones presentes (Figura 4-7). Cuando se cruzan los resultados obtenidos de proteínas predichas con funciones de exportación e importación de xenobióticos, el perfil de expresión de los transcritos codificantes para esas proteínas y los resultados morfométricos y morfológicos de la exposición a WBM, todo tiene un sentido claro del funcionamiento y porque se están viendo esos resultados. La exposición a altas concentraciones de WBM generan una presión por mantener la homeostasis al ingreso del cocktail xenobiótico durante la fase de exposición. Una vez retiradas las colonias de la exposición, los mecanismos de compensación homeostática deben disminuir la expresión de genes involucrados en el transporte activo hacia el interior de las células y favorecer la expresión las proteínas encargadas de la exportación de xenobióticos y metabolitos derivados de la biotransformación de esos xenobióticos, tanto a manera de equilibrio homeostático como también probablemente de protección contra toxicidad.

En las arcillas de barita y bentonita se han reportado trazas de metales pesados como el Cadmio, Cromo, Mercurio, Plomo, Hierro, Zinc y Cobre dentro las mezclas de WBMs (124–126). Las trazas de Cadmio y Mercurio suelen estar en un rango de 0,35-0,77 y 0,44-6,7 ppm de peso seco respectivamente (126), en cambio el Cromo, Cobre, Hierro, Plomo y Zn han mostrado una variabilidad en las concentraciones entre 15 y 29600 ppm de peso seco

(126). La presencia de metales pesados en los LPP puede estar relacionada con la sobre expresión de las bombas de cationes y los transportadores de la familia B-C-G de los Transportadores ABC. Particularmente, Esas dos familias de Transportadores ABC, la B-C al igual que las bombas de cationes con dominios HMA podrían estar confirmando la presencia de cobre en altas concentraciones y de alguna de las especies toxicas como el Metilmercurio (127). Las familias B-D-G-H son importantes para la eliminación de Cadmio y generación de tolerancia a sobredosis de Cobre (128,129), probablemente al igual que las bombas de cationes Co/Zn/Cd (105,130). Varias especies de Cnidarios son susceptibles a procesos de bioacumulación de Cobre y Cobalto, que también podrían estar relacionados con las proteínas de membrana anteriormente mencionados (105,130).

En el proceso de biotransformación relacionado con la exposición a WBM, fueron encontradas un complejo enzimático caracterizado por monooxigenasas, oxidoreductasas y transferasas, teniendo una serie de vías metabólicas casi completas en las reacciones de fase I y fase II (**Figura 4-8, Figura 4-9**). Los perfiles de expresión mostraron un funcionamiento escalonado, siendo a las 6h mayor la expresión de enzimas de reacciones de fase I, seguido de una superposición de picos a las 24 horas entre las enzimas de fase I y fase II, finalizando en una mayor expresión a las 48h las enzimas de fase II (**Figura 4-8**). A pesar de la carencia de datos metabólicos frente al experimento de exposición a WBM, existen en la literatura indicios que podrían explicar el patrón de expresión observado en los transcritos codificantes para esas encimas.

En primer lugar, los principales componentes en la formulación de muchos WBM son la barita y bentonita, que en el caso de este trabajo el WBM empleado tenía un 45% de concentración de barita entre todos los solutos empleados (**Tabla 3-1**). El principio químico de la barita y el bentonita es el sulfato de bario ($BaSO_4$), con cerca de 500,000 a 538,000 ppm de peso seco (126). Sin embargo, el Bario presente en $BaSO_4$ ha sido reportado como un metal no letal, incluso toxicológicamente inerte cuando se encuentra formando sales de azufre (126), pero algunos reportes concluyen daños tisulares como irritación, disminución de la tasa de crecimiento y perdida de tejidos (21,123,131). Adicionalmente a presentar una alta concentración de barita los WBM, los procesos de sedimentación sobre

organismos sésiles podrían estar generando un estrés oxidativo por disminución en la presión parcial de oxígeno (125). En la esponja *Geodia barrette* se demostró que la bentonita generaba un estímulo sobre la estabilidad de la membrana lisosomal, incrementando de un 20% a un 50% la desestabilización de la membrana y un aumento en la biosíntesis de GSH de 30 nmol/gww a 50 nmol/gww (125). En mejillones *M. edulis*, vieiras *P. maximus* y bacalaos *G. morhua* se observaron cambios significativos en la tasa de estrés oxidativo (7). Los mejillones y vieiras, la tasa de estrés oxidativo fue entre 0,5 a 2 veces mayor en organismos expuestos a barita y sedimentos de WBM, mientras que en los bacalaos la tasa de estrés oxidativo disminuyó un 20% comparado con el control (7). También fueron realizados ensayos cometa para verificar la integridad del DNA en mejillones y vieiras. Únicamente a altas dosis de exposición de barita y WBM se observó un incremento del 20% comparado con el control en daño al DNA (7). En corales, el Bario tiende a fijarse entre el exoesqueleto calcareo haciendo reemplazo de Calcio y disminuyendo la tasa de crecimiento, cuando la proporción en la concentración de Ca/Ba en el ambiente es cercana a 1 (132).

Claramente, los procesos de sedimentación que presentan los WBM por la alta concentración de espesantes como la barita y bentonita, genera un estrés oxidativo disminuyendo la presión parcial de oxígeno disuelto en el agua. Esto produce daño en el DNA y disminución en la tasa de crecimiento tisular en organismos sésiles. Adicionalmente el estrés oxidativo podría ser una de las causas de activación y expresión de genes como los mencionados en los procesos de biotransformación, cuya función final es la prevención y disminución de estrés oxidativo, efectos que se pueden evidenciar en nuestros hallazgos. Además, si al estrés oxidativo le sumamos las trazas de metales pesados con potencial tóxico en muchos organismos presentes en las arcillas de barita y bentonita, se genera el ambiente propicio para la afectación de la estabilidad homeostática y osmótica en organismos como *H. symbiolongicarpus*. Por ejemplo el Cadmio promueve el daño por estrés oxidativo incrementando los niveles de ROS (129), mostrando una sinergia entorno al proceso de sedimentación y disminución de oxígeno disuelto.

En las reacciones de fase I, fueron encontradas enzimas redox involucradas en procesos de detoxificación como CYP450, peroxidases Cu-II monooxygenase, aldehyde dehydrogenase, thioredoxins y enzimas relacionadas a thioredoxin (**Figura 4-9**). Se ha reportado que todas esas enzimas pueden actuar en procesos de detoxificación por envenenamiento de Cadmio, Cobre y Mercurio (129,130,133,134). Estas enzimas, tienen una actividad catalítica de amplio espectro que les permite actuar directamente sobre esos metales pesados, los cuales son oxidados usando como donadores de electrones y oxígeno a ROS o electrones y azufre a especies reactivas de azufre (**Figura 4-9**). Por su lado, las reacciones de fase II se caracterizan por ser reacciones de conjugación, siendo uno de los sustratos más importantes de esas reacciones el glutatión (GSH) junto con la enzima Glutatión-S Transferasa (GST) (**Figura 4-9**). A pesar de no encontrar la enzima GST, se reportó toda la vía metabólica de síntesis del GSH, incluyendo una enzima involucrada en el proceso del reciclado del GSH en la mitocondria Evt1 (**Figura 4-9**). Probablemente, la enzima GST no apareció en los resultados por usar un p-valor muy significativo (0,01) para la selección de transcritos DE. También se encontraron otras enzimas con actividad transferasa como Metiltransferasa, Aminotransferasa, Carboxiltransferasa y Glucosiltransferasa, que también ayudan a la eliminación de xenobióticos y previene a la célula de la formación de aductos. Sin embargo, los mecanismos de detoxificación encontrados en *H. symbiolongicarpus* no son del todo eficaces para prevenir daños en el DNA. Como se mencionó anteriormente, ensayos cometa en *G. barrette* demostraron una alta fragmentación del DNA (125). La razón de este hecho podría deberse a un sinergismo actuando a tres bandas, (1) Incremento de ROS, (2) Disminución de oxígeno disuelto y desfavorecimiento de metabolismo aeróbico y (3) Rápida saturación enzimática debido a la alta concentración de WBM (129,130).

De manera indirecta, los fenotipos patológicos vistos (**Figura 4-9**) podrían tener una relación con el incremento de ROS adicional a intoxicación por WBM. Se detectaron transcritos relacionados con las vías de MAPK, PIP, Ciclo celular, p53 y Apoptosis, todos soportando la idea de una activación irreversible de la apoptosis por procesos citotóxicos debidos a la exposición a WBM. Específicamente, la vía de señalización del PIP con presencia de PKC y AKT (Proteína MAPK) están directamente relacionadas en la activación de la apoptosis por daño en el DNA debido a presencia de xenobióticos (119).

Daños irreversibles en el DNA activan a p53, p38 y JNK, todas ellas encontradas en los resultados (**Figura 4-9**), lo que desencadena la activación de la muerte celular. Todos los resultados moleculares apuntan a que la disminución de tejidos (mata estolonar y pólipos) en *H. symbiolongicarpus* son producto de estrés oxidativo por incremento de ROS, intoxicación por presencia de WBM y favorecimiento de la apoptosis sobre el ciclo celular.

6. Conclusiones y recomendaciones

6.1. Conclusiones

Se logró determinar de manera amplia, temas relacionados al impacto toxicológico y toxicodinámico de los lodos de perforación petrolera base agua (WBM) en experimentos de exposición aguda en *H. symbiolongicarpus*. Para el caso particular de los WBM, es la primera vez que se tienen datos fenotípicos y moleculares provenientes de secuenciación de RNA total que tienen relación a nivel del efecto adverso. (1) Es importante destacar el potencial de *H. symbiolongicarpus* como modelo biológico para realizar pruebas de agentes contaminantes con potencial tóxico en ecosistemas marinos, debido a su simplicidad de plan corporal y cultivo bajo condiciones de laboratorio. Estas características permitieron mejorar los parámetros de exposición completa de las mezclas de prueba con WBM, ampliar el área total de exposición en tejidos biológicos simples a WBM permitiendo una mejor absorción de los xenobióticos y mejorar las probabilidades de observación de efectos adversos.

A nivel de resultados morfológicos y morfométricos fue posible establecer: (2) observaciones consistentes con las reportadas en diversos organismos sobre los efectos adversos después de la exposición a WBM (7,21,125), como lo son la no letalidad de los WBM, la irritación y disminución en el crecimiento tisular por efectos de estrés oxidativo relacionados con el proceso de sedimentación de las partículas suspendidas y procesos de biotransformación de WBM.

A nivel molecular, los resultados de la secuenciación del RNA permitieron: (4) el ensamblaje de 464,217 transcritos a partir de 271,433 genes probables. (5) Se logró establecer un total de 1,871 transcritos diferencialmente expresados con información de arquitectura de dominios, nivel de expresión en tres tiempos de muestreo, y análisis funcionales acorde con información obtenida de varias bases de datos. (6) A partir de los

1,871 transcritos fue posible establecer 84 transcritos con función directa en alguno de los tres ejes básicos del proceso de detoxificación (Absorción-Eliminación, Biotransformación, Efecto adverso). (7) En los procesos de Absorción-Eliminación se observó que después de la exposición a WBM hubo una mayor expresión de genes codificantes para proteínas con función exportadora con el fin de eliminar los xenobióticos absorbidos. (8) Los procesos de biotransformación mostraron expresión de una amplia variedad de transcritos codificantes para enzimas de reacciones de fase I y reacciones de fase II muchos de ellos descritos en Handbook of Toxicology (49), los cuales presentaron un patrón general de incremento en el perfil de expresión de manera secuencial entre las reacciones de fase I y reacciones de fase II. (9) Dentro de las enzimas pertenecientes al proceso de biotransformación es importante resaltar la presencia de transcritos codificante para proteínas CYP450 y enzimas relacionadas a la vía del GSH, las cuales son el objetivo de búsqueda en todos los procesos de detoxificación de xenobióticos. (10) Los efectos adversos a nivel morfológico en las colonias como la disminución de la mata estolonar y pérdida de pólipos, lograron ser relacionados con un desbalance entre la activación de la apoptosis e inhibición del ciclo celular probablemente debido a incremento en el daño del DNA, lo que disminuye la capacidad de recuperación tisular y disminución del crecimiento de tejidos. Finalmente, (11) Se logró validar el empleo de una metodología robusta como el secuenciamiento del RNA en problemas tóxico-ambientales, con un gran nivel de éxito.

6.2. Recomendaciones

Este documento más allá de presentar un conjunto de datos que muestran los efectos de la exposición a lodos de perforación petrolera base agua a niveles morfológicos y toxicodinámicos, sirve como ejemplo para el uso de herramientas de nueva generación para la evaluación toxicológica ambiental, las cuales permitan el desarrollo de nuevos mecanismos en la identificación de biomarcadores y mejoramiento en los protocolos de biorremediación que permitan un trabajo más amigable con el medio ambiente. Para ese fin, este trabajo puede establecer las rutas y procedimientos estándar para la creación nuevos biomarcadores altamente sensibles a partir de alteraciones en la expresión genética. Si bien se logró identificar 84 transcritos involucrados en procesos de

detoxificación por exposición a WBM en *H. symbiolongicarpus*, uno de los siguientes pasos podría ser la búsqueda de algunos de los mismos genes en organismos sésiles con distribución mundial en los ecosistemas marinos para la estandarización de esos genes como potenciales biomarcadores.

6.3. Expectativas

Fuera de los resultados de la investigación, las expectativas están más orientadas a hacia la unión de esfuerzos entre los diferentes autores de la sociedad para fortalecer las ciencias básicas, ya sea por proyectos de aplicación científica o por el fomento de espacios y recursos para el desarrollo de posgrados en nuestro país. Esfuerzos como los del ICP y Ecopetrol han ayudado a mejorar los vínculos entre industria y academia, siendo necesarios y fundamentales para el crecimiento y desarrollo del país.

Bibliografía

1. Cusarúa AA. Petróleo, seguridad ambiental y exploración petrolera marina en Colombia. 2005;(21):11–7.
2. Economía. Ecopetrol anuncia hallazgo de hidrocarburos en aguas del Caribe colombiano [Internet]. Espectador.com. 2014 [cited 2015 May 21]. Available from: <http://www.elespectador.com/noticias/economia/ecopetrol-anuncia-hallazgo-de-hidrocarburos-aguas-del-c-articulo-531036>
3. Torres A. Comunidad de San Andrés, se opone a exploración petrolera en área protegida [Internet]. W radio. 2011 [cited 2015 Jun 16]. p. 1. Available from: <http://www.wradio.com.co/noticias/actualidad/comunidad-de-san-andres-se-opone-a-exploracion-petrolera-en-area-protegida/20110218/nota/1427946.aspx>
4. • Number offshore rigs worldwide by region 2015 | Statistic [Internet]. Rigzone.com. 2015 [cited 2017 Mar 30]. Available from: <https://www.statista.com/statistics/279100/number-of-offshore-rigs-worldwide-by-region/>
5. Jagwani D, Kulkarni A, Shukla P, Ramteke DS, Juneja HD. PAH composition of Water Based Drilling Mud and drill cuttings in the offshore region, east coast of India. Bull Environ Contam Toxicol [Internet]. 2011 Nov [cited 2013 Mar 16];87(5):550–5. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21691860>
6. Gettleston D a. Effects of Oil and Gas Drilling Operations on the Marine Environment. In: Marine Environmental Pollution, 1 Hydrocarbons [Internet]. 1980. p. 371–411. Available from: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0422989408713916>
7. Bechmann RK, Westerlund S, Baussant T, Taban IC, Pampanin DM, Smith M, et al. Impacts of drilling mud discharges on water column organism and filter feeding bivalves. Stavanger; 2006.
8. Pabortsava K, Purser A, Wagner H, Thomsen L. The influence of drill cuttings on

- physical characteristics of phytodetritus. *Mar Pollut Bull* [Internet]. 2011 Oct [cited 2013 Apr 22];62(10):2170–80. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21839484>
9. Purser A. A Time Series Study of *Lophelia pertusa* and Reef Megafauna Responses to Drill Cuttings Exposure on the Norwegian Margin. *PLoS One*. 2015;10(7):1–29.
 10. Ruiz M. Fluidos de perforación. Fundamentos teóricos y sistemas de Dowell Schlumberger Drilling Fluids. *Tecnol Apl a los fluidos perforación Drill Fluids Serv GVZ*. 2012;
 11. Caenn R, Darley HCH, Gray GR. Chapter 11 - Drilling Fluid Components. In: *Composition and Properties of Drilling and Completion Fluids (Sixth Edition)* [Internet]. 2011. p. 535–616. Available from: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9780123838582000111>
 12. Ogeleka D, Tudararo-Aherobo L. Assessment of the Toxic Effects of Oil-Based Drilling Mud (Drilling Waste) on Brackish Water Shrimp (*Palaemonetes africanus*). *Bull enviroment, Pharmacol Life Scineces*. 2013;2(8):113–7.
 13. Bakhtyar S, Gagnon MM. Toxicity assessment of individual ingredients of synthetic-based drilling muds (SBMs). *Environ Monit Assess* [Internet]. 2012 Sep [cited 2013 Mar 7];184(9):5311–25. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21928151>
 14. Wise SS, Xie H, Fukuda T, Douglas Thompson W, Wise JP, Sr. Hexavalent chromium is cytotoxic and genotoxic to hawksbill sea turtle cells. *Toxicol Appl Pharmacol* [Internet]. 2014 Sep 1 [cited 2017 Apr 19];279(2):113–8. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24952338>
 15. Ulmer DC, Leisola MSA, Schmidt BH, Fiechter A. Rapid Degradation of Isolated Lignins by *Phanerochaete chrysosporium*. *Appl Environ Microbiol* [Internet]. 1983 [cited 2017 Apr 17];45(6):1795–801. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC242541/pdf/aem00175-0095.pdf>
 16. Okaiyeto K, Nwodo UU, Okoli SA, Mabinya L V, Okoh AI. Implications for public health demands alternatives to inorganic and synthetic flocculants: bioflocculants as important candidates. *Microbiologyopen* [Internet]. 2016 Apr [cited 2017 Apr 17];5(2):177–211. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26914994>
 17. Geehan T, Gilmour A, Guo Q. Tecnología de avanzada en el manejo de residuos

- de perforación [Internet]. Vol. 18, Oilfield Review. 2006. p. 54–67. Available from: http://www.slb.com/~media/Files/resources/oilfield_review/ors06/win06/p54_67.pdf
18. Bakke T, Klungsøyr J, Sanni S. Environmental impacts of produced water and drilling waste discharges from the Norwegian offshore petroleum industry. *Mar Environ Res* [Internet]. 2013 Dec [cited 2015 May 11];92:154–69. Available from: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0141113613001621>
 19. Bravo E. Los impactos de la explotación petrolera en ecosistemas tropicales y la biodiversidad. 2007 p. 1–61.
 20. Lepland A, Mortensen PB. Barite and barium in sediments and coral skeletons around the hydrocarbon exploration drilling site in the Træna Deep, Norwegian Sea. *Environ Geol* [Internet]. 2007 Dec 5 [cited 2012 May 30];56(1):119–29. Available from: <http://www.springerlink.com/index/10.1007/s00254-007-1145-4>
 21. Thompson J, Shinn EA, Bright TJ. Effects of drilling mud on seven species of reef-building corals as measured in the field and laboratory. *Elsevier Oceanogr Ser*. 1980;27(A):433–53.
 22. Larsson AI, van Oevelen D, Purser A, Thomsen L. Tolerance to long-term exposure of suspended benthic sediments and drill cuttings in the cold-water coral *Lophelia pertusa*. *Mar Pollut Bull* [Internet]. 2013 Mar 16 [cited 2013 Apr 22];in press. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23510599>
 23. Frank U, Leitz T, Müller W. The hydroid *Hydractinia* : a versatile , informative cnidarian representative. *Bioessays*. 2001;23:963–71.
 24. Pilcher W, Miles S, Tang S, Mayer G, Whitehead A. Genomic and Genotoxic Responses to Controlled Weathered-Oil Exposures Confirm and Extend Field Studies on Impacts of the Deepwater Horizon Oil Spill on Native Killifish. *PLoS One*. 2014;9(9):11.
 25. Caenn R, Darley HCH, Gray GR. Chapter 1 - Introduction to Drilling Fluids. In: *Composition and Properties of Drilling and Completion Fluids (Sixth Edition)* [Internet]. 2011. p. 1–37. Available from: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9780123838582000019>
 26. Ruiz R MA. Fundamentos teóricos y sistemas de DOWELL SCHLUMBERGER DRILLING FLUIDS, Tecnología aplicada a los fluidos de perforación. In: *Fluidos de perforación* [Internet]. Caracas, Venezuela: Hildebrando Calle; 2010. p. 5–23.

- Available from: <http://www.scribd.com/doc/28204206/Tecnologia-Aplicada-a-los-Fluidos-de-Perforacion>
27. Nakajima R, Yamamoto H, Kawagucci S, Takaya Y, Nozaki T, Chen C, et al. Post-drilling changes in seabed landscape and megabenthos in a deep-sea hydrothermal system, the iheya north field, okinawa trough. *PLoS One* [Internet]. 2015 Jan 22 [cited 2015 Jun 16];10(4):e0123095. Available from: <http://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0123095>
 28. Martínez-Alfaro M, Alcaraz-Contreras Y, Cárabez-Trejo A, Leo-Amador GE. Oxidative stress effects of thinner inhalation. *Indian J Occup Environ Med* [Internet]. 2011 Sep [cited 2017 Apr 10];15(3):87–92. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22412283>
 29. Kwon S, Singh RK, Perez RA, Abou Neel EA, Kim H-W, Chrzanowski W. Silica-based mesoporous nanoparticles for controlled drug delivery. *J Tissue Eng* [Internet]. 2013 [cited 2017 Apr 10];4:2041731413503357. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24020012>
 30. Osman M, Russell J, Shukla D, Moghadamfalahi M, Granger DN. Responses of the murine esophageal microcirculation to acute exposure to alkali, acid, or hypochlorite. *J Pediatr Surg* [Internet]. 2008 Sep [cited 2017 Apr 11];43(9):1672–8. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18779005>
 31. Kosior G, Samecka-Cymerman A, Kolon K, Brudzińska-Kosior A, Bena W, Kempers AJ. Trace elements in the *Fontinalis antipyretica* from rivers receiving sewage of lignite and glass sand mining industry. *Environ Sci Pollut Res Int* [Internet]. 2015 Jul [cited 2017 Apr 11];22(13):9829–38. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25647494>
 32. Tchounwou PB, Yedjou CG, Patlolla AK, Sutton DJ. Heavy Metals Toxicity and the Environment. [cited 2017 Apr 17]; Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4144270/pdf/nihms414261.pdf>
 33. Hartman JH, Boysen G, Miller GP. CYP2E1 metabolism of styrene involves allosterity. *Drug Metab Dispos* [Internet]. 2012 Oct [cited 2017 Apr 17];40(10):1976–83. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22807108>
 34. Campian EC, Benz FW. The acute lethality of acrylonitrile is not due to brain metabolic arrest. *Toxicology* [Internet]. 2008 Nov 20 [cited 2017 Apr 17];253(1–3):104–9. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18834918>

35. Velasquez C. Fluidos de Perforación [Internet]. 2015 [cited 2015 Jun 16]. p. 3. Available from: <http://www.scribd.com/doc/266078206/Fluidos-de-Perforacion#scribd>
36. Ingre S. La protección de nuestros océanos y economías: Evitemos riesgos innecesarios ocasionados por las perforaciones en alta mar. Nat Resour Def Counc [Internet]. 2009;1–4. Available from: www.nrdc.org/policy
37. Trefry JH, Dunton KH, Trocine RP, Schonberg S V, McTigue ND, Hersh ES, et al. Chemical and biological assessment of two offshore drilling sites in the Alaskan Arctic. Mar Environ Res [Internet]. 2013 May [cited 2015 Jun 8];86:35–45. Available from: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0141113613000378>
38. Reynier M V, Tâmega FTS, Daflon SDA, Santos MAB, Coutinho R, Figueiredo MAO. Long- and short-term effects of smothering and burial by drill cuttings on calcareous algae in a static-renewal test. Environ Toxicol Chem [Internet]. 2015 Feb 16 [cited 2015 Jun 16]; Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25689779>
39. Melton H, Smith J, Martin C, Nedwed J, Mairs L, Raught D. Offshore discharge of drilling fluids and cuttings- A scientific perspective on public policy. In: Rio Oil & Gas Expo Conference. Rio de Janeiro, Brazil: Brazilian Petroleum Institute- IBP; 2000. p. 1–13.
40. Gates AR, Jones DOB. Recovery of benthic megafauna from anthropogenic disturbance at a hydrocarbon drilling well (380 m depth in the Norwegian Sea). PLoS One [Internet]. 2012 Jan [cited 2013 Apr 12];7(10):e44114. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3466215&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
41. Cranford PJ, Jr DCG, Lee K, Armsworthy SL, Tremblay G. Chronic toxicity and physical disturbance effects of water- and oil-based drilling fluids and some major constituents on adult sea scallops (*Placopecten magellanicus*). Mar Environmental Res. 1999;48:225–56.
42. Clarck T, Norberg-King T. Methods for Measuring the Acute Toxicity of Effluents and Receiving Waters to Freshwater and Marine Organisms [Internet]. 5th Editio. Weber C, editor. Washington DC, USA: United States Environmental Protection

- Agency; 2002. 1–275 p. Available from:
<http://nepis.epa.gov/Exe/ZyNET.exe/30000V40.TXT?ZyActionD=ZyDocument&Client=EPA&Index=1986+Thru+1990&Docs=&Query=&Time=&EndTime=&SearchMethod=1&TocRestrict=n&Toc=&TocEntry=&QField=&QFieldYear=&QFieldMonth=&QFieldDay=&IntQFieldOp=0&ExtQFieldOp=0&XmlQuery=&File=D:%5Czyfiles%5CIndexData%5C86thru90%5Ctxt%5C00000005%5C30000V40.txt&User=ANONYMOUS&Password=anonymous&SortMethod=h%7C-&MaximumDocuments=1&FuzzyDegree=0&ImageQuality=r75g8/r75g8/x150y150g16/i425&Display=p%7Cf&DefSeekPage=x&SearchBack=ZyActionL&Back=ZyActionL>
43. Monteiro S, Silva F, Vieira C. Microstructural evaluation of a clay ceramic incorporated with petroleum waste. *Appl Clay Sci* [Internet]. 2006 Aug [cited 2012 May 29];33(3–4):171–80. Available from:
<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0169131706000676>
 44. Trannum HC, Setvik S, Norling K, Nilsson HC. Rapid macrofaunal colonization of water-based drill cuttings on different sediments. *Mar Pollut Bull* [Internet]. 2011 Oct [cited 2013 Apr 22];62(10):2145–56. Available from:
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21864862>
 45. Otitoloju A. Relevance of joint action toxicity evaluations in setting realistic environmental safe limits of heavy metals. *J Environ Manage* [Internet]. 2003 [cited 2012 Mar 25];67:121–8. Available from:
<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0301479702001603>
 46. Crawford R, Gates J. Effects of a drilling fluid on the development of a teleost and an echinoderm. *Bull environment Contam Toxicol*. 1981;26(2):207–12.
 47. Doyle AB, Pappworth SSR, Caudle DD. Chapter 6 Drilling and Production Discharges in the Marine Environment. In: Orszulik SL, editor. *Environmental Technology in the Oil Industry*. 2nd ed. Hampshire, U.K.: Springer; 2008. p. 155–87.
 48. Silbergeld EK. Toxicología: Herramientas y Enfoques. In: Stellman JM, editor. *Enciclopedia de salud y seguridad en el trabajo*. 3ra ed. Madrid, España: Ministerio de trabajo y asuntos sociales; 1998. p. 33.2-33.76.
 49. Abou-Donia M. Metabolism and Toxicokinetics of Xenobiotics. In: Derelanko M, Hollinger M, editors. *CRC Handbook of Toxicology*. Boca Raton, Florida, USA:

- CRC Press, Inc; 1995. p. 539–89.
50. Go Y-M, Jones DP. Redox compartmentalization in eukaryotic cells. *Biochim Biophys Acta*. 2009;1780(11):1273–90.
 51. Jancova P, Anzenbacher P, Anzenbacherova E. PHASE II DRUG METABOLIZING ENZYMES. *Biomed Pap Med Fac Univ Palacky Olomouc Czech Repub*. 2010;154(2):103–16.
 52. Calabrese V, Cornelius C, Dinkova-kostova AT, Calabrese EJ, Mattson MP, Editors R, et al. Cellular Stress Responses, The Hormesis Paradigm, and Vitagenes: Novel Targets for Therapeutic Intervention in Neurodegenerative Disorders. *Antioxid Redox Signal*. 2010;13(11):1763–811.
 53. Wilhelm BT, Landry J-R. RNA-Seq-quantitative measurement of expression through massively parallel RNA-sequencing. *Methods [Internet]*. 2009 Jul [cited 2012 Mar 12];48(3):249–57. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19336255>
 54. Trapnell C, Roberts A, Goff L, Pertea G, Kim D, Kelley DR, et al. Differential gene and transcript expression analysis of RNA-seq experiments with TopHat and Cufflinks. *Nat Protoc [Internet]*. 2012 Mar [cited 2012 Oct 26];7(3):562–78. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22383036>
 55. Hackett NR, Butler MW, Shaykhiev R, Salit J, Omberg L, Rodriguez-flores JL, et al. RNA-Seq quantification of the human small airway epithelium transcriptome. *BMC Genomics [Internet]*. 2012;13(1):82. Available from: <http://www.biomedcentral.com/1471-2164/13/82>
 56. Cao C, Wang Z, Niu C, Desneux N, Gao X. Transcriptome profiling of *Chironomus kiinensis* under phenol stress using Solexa sequencing technology. *PLoS One [Internet]*. 2013 Jan [cited 2013 May 20];8(3):e58914. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3604134&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
 57. Zhang LQ, Cheranova D, Gibson M, Ding S, Heruth DP, Fang D. RNA-seq Reveals Novel Transcriptome of Genes and Their Isoforms in Human Pulmonary Microvascular Endothelial Cells Treated with Thrombin. *PLoS One*. 2012;7(2):e31229.
 58. Galliot B, Quiquand M, Ghila L, de Rosa R, Miljkovic-Licina M, Chera S. Origins of

- neurogenesis, a cnidarian view. *Dev Biol* [Internet]. 2009;332(1):2–24. Available from: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0012160609008756>
59. Miglietta MP, Schuchert P, Cunningham CW. Reconciling genealogical and morphological species in a worldwide study of the Family Hydractiniidae (Cnidaria, Hydrozoa). *Zool Scr* [Internet]. 2009;38(4):403–30. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1111/j.1463-6409.2008.00376.x>
60. Buzgariu W, Crescenzi M, Galliot B. Robust G2 pausing of adult stem cells in Hydra. *Differentiation* [Internet]. 2014;87(1):83–99. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.diff.2014.03.001>
61. Stokes DR. Physiological studies of conducting systems in the colonial hydroid *Hydractinia echinata* 1. Polyp specialization. *J Exp Zool* [Internet]. 1974 Oct [cited 2015 Nov 23];190(1):1–8. Available from: http://www.readcube.com/articles/10.1002%2Fjcz.1401900102?r3_referer=wol&tracking_action=preview_click&show_checkout=1&purchase_referrer=onlinelibrary.wiley.com.ezproxy.unal.edu.co&purchase_site_license=PUBLICATION_OUTSIDE_OF_LICENSE_PERIOD
62. Poudyal M, Rosa S, Powell AE, Moreno M, Dellaporta SL, Buss LW, et al. Embryonic chimerism does not induce tolerance in an invertebrate model organism. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2007;104(11):4559–64.
63. Künzel T, Heiermann R, Frank U, Müller W, Tilmann W, Bause M, et al. Migration and differentiation potential of stem cells in the cnidarian *Hydractinia* analysed in eGFP-transgenic animals and chimeras. *Dev Biol* [Internet]. 2010 Dec 1 [cited 2012 Mar 21];348(1):120–9. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20800060>
64. Plickert G, Frank U, Müller W a. *Hydractinia*, a pioneering model for stem cell biology and reprogramming somatic cells to pluripotency. *Int J Dev Biol*. 2012;56(June):519–34.
65. Williams JD, McDermott JJ. Hermit crab biocoenoses: a worldwide review of the diversity and natural history of hermit crab associates [Internet]. Vol. 305, *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*. 2004. 1–128 p. Available from: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0022098104001133>
66. Cadavid LF, Powell AE, Nicotra ML, Moreno M, Buss LW. An invertebrate histocompatibility complex. *Genetics* [Internet]. 2004 May;167(1):357–65. Available

from:

<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=1470859&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>

67. Schwarz RS, Bosch TCG, Cadavid LF. Evolution of polydom-like molecules: identification and characterization of cnidarian polydom (Cnpolydom) in the basal metazoan *Hydractinia*. *Dev Comp Immunol* [Internet]. 2008 Jan [cited 2012 Mar 21];32(10):1192–210. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18466971>
68. Bosch TCG, Augustin R, Anton-Erxleben F, Fraune S, Hemmrich G, Zill H, et al. Uncovering the evolutionary history of innate immunity: the simple metazoan *Hydra* uses epithelial cells for host defence. *Dev Comp Immunol* [Internet]. 2009 Apr [cited 2013 Sep 4];33(4):559–69. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19013190>
69. Quinn B, Gagné F, Blaise C. An investigation into the acute and chronic toxicity of eleven pharmaceuticals (and their solvents) found in wastewater effluent on the cnidarian, *Hydra attenuata*. *Sci Total Environ*. 2008;389(2–3):306–14.
70. Rosenkrantz RT, Pollino CA, Nuggeoda D, Baun A. Toxicity of water and sediment from stormwater retarding basins to *Hydra hexactinella*. *Environ Pollut* [Internet]. 2008;156(3):922–7. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18620788>
71. Arkhipchuk V V., Blaise C, Malinovskaya M V. Use of *hydra* for chronic toxicity assessment of waters intended for human consumption. *Environ Pollut*. 2006;142(2):200–11.
72. Chicu SA, Funar-Timofei S, Simu G-M. *Hydractinia echinata* test system. II. SAR toxicity study of some anilide derivatives of Naphthol-AS type. *Chemosphere* [Internet]. 2011;82(11):1578–82. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21167553>
73. Chicu SA, Berking S. Interference with metamorphosis induction in the marine cnidarian *Hydractinia echinata* (Hydrozoa): A structure-activity relationship analysis of lower alcohols, aliphatic and aromatic hydrocarbons, thiophenes, tributyl tin and crude oil. *Chemosphere*. 1997;34(8):1851–66.
74. Cartwright P. Developmental insights into the origin of complex colonial hydrozoans. *Integr Comp Biol*. 2003;43(1):82–6.

75. Yund P. Natural Selection on Hydroid Colony Morphology by Intraspecific Competition. *Evolution* 1991;45(7):1564–73.
76. Cartwright P, Buss LW. Colony integration and the expression of the Hox gene, *Cnox-2*, in *Hydractinia symbiolongicarpus* (Cnidaria : Hydrozoa). *J Exp Zool* [Internet]. 1999;285(1):57–62. Available from: [isi:000080086100007](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10551111)
77. Kraus Y, Flici H, Hensel K, Plickert G, Leitz T, Frank U. The embryonic development of the cnidarian *Hydractinia echinata*. *Evol Dev* [Internet]. 2014;16(6):323–38. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1111/ede.12100>
78. Blackstone NW. Gastrovascular Flow and Colony Development in Two Colonial Hydroids. *Biol Bull* [Internet]. 1996;190(1):56. Available from: <http://www.jstor.org/stable/10.2307/1542675?origin=crossref>
79. Buss LW, Yund PO. A Sibling Species Group of *Hydractinia* in the North-Eastern United States. *J Mar Biol Assoc United Kingdom* [Internet]. 1989 Nov 11 [cited 2015 Nov 24];69(04):857. Available from: http://journals.cambridge.org/abstract_S0025315400032215
80. Sil A, Wakadikar K, Kumar S, Babu SS, Sivagami SPM, Tandon S, et al. Toxicity Characteristics of Drilling Mud and Its Effect on Aquatic Fish Populations. *J Hazardous, Toxic, Radioact Waste* [Internet]. 2012 Jan 22 [cited 2014 Jul 28];16(1):51–7. Available from: [http://ascelibrary.org/doi/abs/10.1061/\(ASCE\)HZ.2153-5515.0000092](http://ascelibrary.org/doi/abs/10.1061/(ASCE)HZ.2153-5515.0000092)
81. Ripley BD. The R project in statistical computing. *MSOR Connect* [Internet]. 2001;(January):23–5. Available from: <http://journals.heacademy.ac.uk/doi/full/10.11120/msor.2001.01010023>
82. Kampstra P. Beanplot : A Boxplot Alternative for Visual Comparison of Distributions. *J Stat Softw* [Internet]. 2008;28(November):1–9. Available from: <http://www.jstatsoft.org/v28/c01/paper>
83. Quast C, Pruesse E, Yilmaz P, Gerken J, Schweer T, Yarza P, et al. The SILVA ribosomal RNA gene database project: improved data processing and web-based tools. *Nucleic Acids Res* [Internet]. 2013 Jan [cited 2014 Jul 10];41(Database issue):D590-6. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3531112&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
84. DeSantis TZ, Hugenholtz P, Larsen N, Rojas M, Brodie EL, Keller K, et al.

- Greengenes, a chimera-checked 16S rRNA gene database and workbench compatible with ARB. *Appl Environ Microbiol* [Internet]. 2006 Jul [cited 2014 Jul 9];72(7):5069–72. Available from:
<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=1489311&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
85. Maidak BL, Cole JR, Lilburn TG, Jr CTP, Saxman PR, Stredwick JM, et al. The RDP (Ribosomal Database Project) continues. *Nucleic Acids Res*. 2000;28(1):173–4.
86. Burge SW, Daub J, Eberhardt R, Tate J, Barquist L, Nawrocki EP, et al. Rfam 11.0: 10 years of RNA families. *Nucleic Acids Res* [Internet]. 2013 Jan [cited 2014 Jul 14];41(Database issue):D226-32. Available from:
<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3531072&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
87. Grabherr MMGMMG, Haas BBJB, Yassour M, Levin JJZJ, Thompson D a, Amit I, et al. Full-length transcriptome assembly from RNA-Seq data without a reference genome. *Nat Biotechnol* [Internet]. 2011 Jul [cited 2013 Feb 27];29(7):644–52. Available from:
<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3571712&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
88. Fu L, Niu B, Zhu Z, Wu S, Li W. CD-HIT: accelerated for clustering the next-generation sequencing data. *Bioinformatics* [Internet]. 2012 Dec 1 [cited 2014 May 28];28(23):3150–2. Available from:
<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3516142&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
89. Simão FA, Waterhouse RM, Ioannidis P, Kriventseva E V., Zdobnov EM. BUSCO: Assessing genome assembly and annotation completeness with single-copy orthologs. *Bioinformatics*. 2015;31(19):3210–2.
90. Langmead B, Trapnell C, Pop M, Salzberg SL. Ultrafast and memory-efficient alignment of short DNA sequences to the human genome. *Genome Biol* [Internet]. 2009 Jan [cited 2014 Jul 9];10(3):R25. Available from:
<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2690996&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>

91. Li B, Dewey CN. RSEM: accurate transcript quantification from RNA-Seq data with or without a reference genome. *BMC Bioinformatics* [Internet]. 2011 Jan [cited 2013 Oct 17];12:323. Available from:
<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3163565&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
92. Robinson MD, McCarthy DJ, Smyth GK. edgeR: a Bioconductor package for differential expression analysis of digital gene expression data. *Bioinformatics* [Internet]. 2010 Jan 1 [cited 2014 Jan 20];26(1):139–40. Available from:
<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2796818&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
93. Consortium TU. Reorganizing the protein space at the Universal Protein Resource (UniProt). *Nucleic Acids Res* [Internet]. 2012 Jan [cited 2014 Nov 8];40(Database issue):D71-5. Available from:
<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3245120&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
94. Altschul SF, Madden TL, Schäffer AA, Zhang J, Zhang Z, Miller W, et al. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res*. 1997;25:3389-3402.
95. Finn RD, Bateman A, Clements J, Coggill P, Eberhardt RY, Eddy SR, et al. Pfam: the protein families database. *Nucleic Acids Res* [Internet]. 2014 Jan [cited 2014 Jul 13];42(Database issue):D222-30. Available from:
<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3965110&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
96. Johnson LS, Eddy SR, Portugaly E. Hidden Markov model speed heuristic and iterative HMM search procedure. *BMC Bioinformatics*. 2010;11:431–9.
97. Petersen TN, Brunak S, von Heijne G, Nielsen H. SignalP 4.0: discriminating signal peptides from transmembrane regions. *Nat Methods* [Internet]. 2011 Jan [cited 2014 Jul 10];8(10):785–6. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/nmeth.1701>
98. Huang DW, Sherman BT, Lempicki RA. Systematic and integrative analysis of large gene lists using DAVID bioinformatics resources. *Nat Protoc* [Internet]. 2008 Dec [cited 2017 May 15];4(1):44–57. Available from:
<http://www.nature.com/doifinder/10.1038/nprot.2008.211>
99. Kolde R. Pheatmap. Package by R project; 2015.

100. Wei T, Simko V. R package “corrplot”: Visualization of a Correlation Matrix [Internet]. 2017. Available from: <https://github.com/taiyun/corrplot>
101. Garber M, Grabherr MG, Guttman M, Trapnell C. Computational methods for transcriptome annotation and quantification using RNA-seq. *Nat Methods*. 2011;8(6):469–78.
102. Rees DC, Johnson E, Lewinson O. ABC Transporters the power to change. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2009;10(3):218–27.
103. Sheps JA, Ralph S, Zhao Z, Baillie DL, Ling V. The ABC transporter gene family of *Caenorhabditis elegans* has implications for the evolutionary dynamics of multidrug resistance in eukaryotes. *Genome Biol*. 2004;5(3):1–17.
104. Walsh DR, Nolin TD, Friedman PA. Drug Transporters and Na⁺ / H⁺ Exchange Regulatory Factor PSD-95 / *Drosophila* Discs Large / ZO-1 Proteins. *Pharmacol Rev*. 2015;67(July):656–80.
105. Conklin D, McMaster J, Culbertson M, Kung C. COT1, a gene involved in cobalt accumulation in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol* [Internet]. 1992;12(9):3678–88. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1508175>
<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=PMC360222>
106. Marshansky V, Rubinstein JL, Grüber G. Eukaryotic V-ATPase: Novel structural findings and functional insights. *Biochim Biophys Acta - Bioenerg* [Internet]. 2014;1837(6):857–79. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbabi.2014.01.018>
107. Hisano T, Hata Y, Fujii T, Liu J-Q, Kurihara T, Esaki N, et al. Crystal structure of a 2-haloacid dehalogenase from *Pseudomonas* sp. YL. *J Biol Chem*. 1996;271(34):20322–30230.
108. Jones CE, Daly NL, Cobine PA, Craik DJ, Dameron CT. Structure and metal binding studies of the second copper binding domain of the Menkes ATPase. *J Struct Biol* [Internet]. 2003 Sep 1 [cited 2017 Sep 21];143(3):209–18. Available from: <http://www.sciencedirect.com.ezproxy.unal.edu.co/science/article/pii/S1047847703001497>
109. Hassan W, Rongyin G, Daoud A, Ding L, Wang L, Liu J, et al. Reduced oxidative

- stress contributes to the lipid lowering effects of isoquercitrin in free fatty acids induced hepatocytes. *Oxid Med Cell Longev*. 2014;2014.
110. Wiegmann EM, Westendorf E, Kalus I, Pringle TH, Lübke T, Dierks T. Arylsulfatase K, a novel lysosomal sulfatase. *J Biol Chem*. 2013;288(42):30019–28.
111. Oesch F, Fabian E, Guth K, Landsiedel R. Xenobiotic-metabolizing enzymes in the skin of rat, mouse, pig, guinea pig, man, and in human skin models. *Arch Toxicol*. 2014;88(12):2135–90.
112. Franco R, Cidlowski JA. Glutathione Efflux and Cell Death. *Antioxid Redox Signal* [Internet]. 2012;17(12):1694–713. Available from: <http://online.liebertpub.com/doi/abs/10.1089/ars.2012.4553>
113. Lee S, Kim SM, Lee RT. Thioredoxin and Thioredoxin Target Proteins: From Molecular Mechanisms to Functional Significance. *Antioxid Redox Signal* [Internet]. 2013;18(10):1165–207. Available from: <http://online.liebertpub.com/doi/abs/10.1089/ars.2011.4322>
114. Shelly C. Lu MD. Glutathione Synthesis. *Biochim Biophys Acta*. 2014;1830(5):3143–53.
115. Kobayashi J, Sasaki D, Hara KY, Hasunuma T, Kondo A. Enzymatic improvement of mitochondrial thiol oxidase Erv1 for oxidized glutathione fermentation by *Saccharomyces cerevisiae*. *Microb Cell Fact* [Internet]. 2017;16(1):44. Available from: <http://microbialcellfactories.biomedcentral.com/articles/10.1186/s12934-017-0658-0>
116. Zerbino DR, Achuthan P, Akanni W, Amode MR, Barrell D, Bhai J, et al. Ensembl 2018. *Nucleic Acids Res* [Internet]. 2017;(December 2017):1–8. Available from: <http://academic.oup.com/nar/article/doi/10.1093/nar/gkx1098/4634002>
117. Chen Z, Gibson T, Robinson F, Silvestro L, Pearson G, Xu B, et al. MAP kinases. *Chem Rev*. 2001;101:2449–76.
118. Shears SB. Diphosphoinositol Polyphosphates: Metabolic Messengers? *Mol Pharmacol*. 2009;76(2):236–52.
119. Yoshida K. Role for PKC δ on Apoptosis in the DNA Damage Response. In: Chen C, editor. *Selected Topics in DNA Repair*. San Diego, California, USA; 2011. p. 293–304.
120. Levine AJ, Hu W, Feng Z. The P53 pathway: What questions remain to be explored? *Cell Death Differ*. 2006;13(6):1027–36.

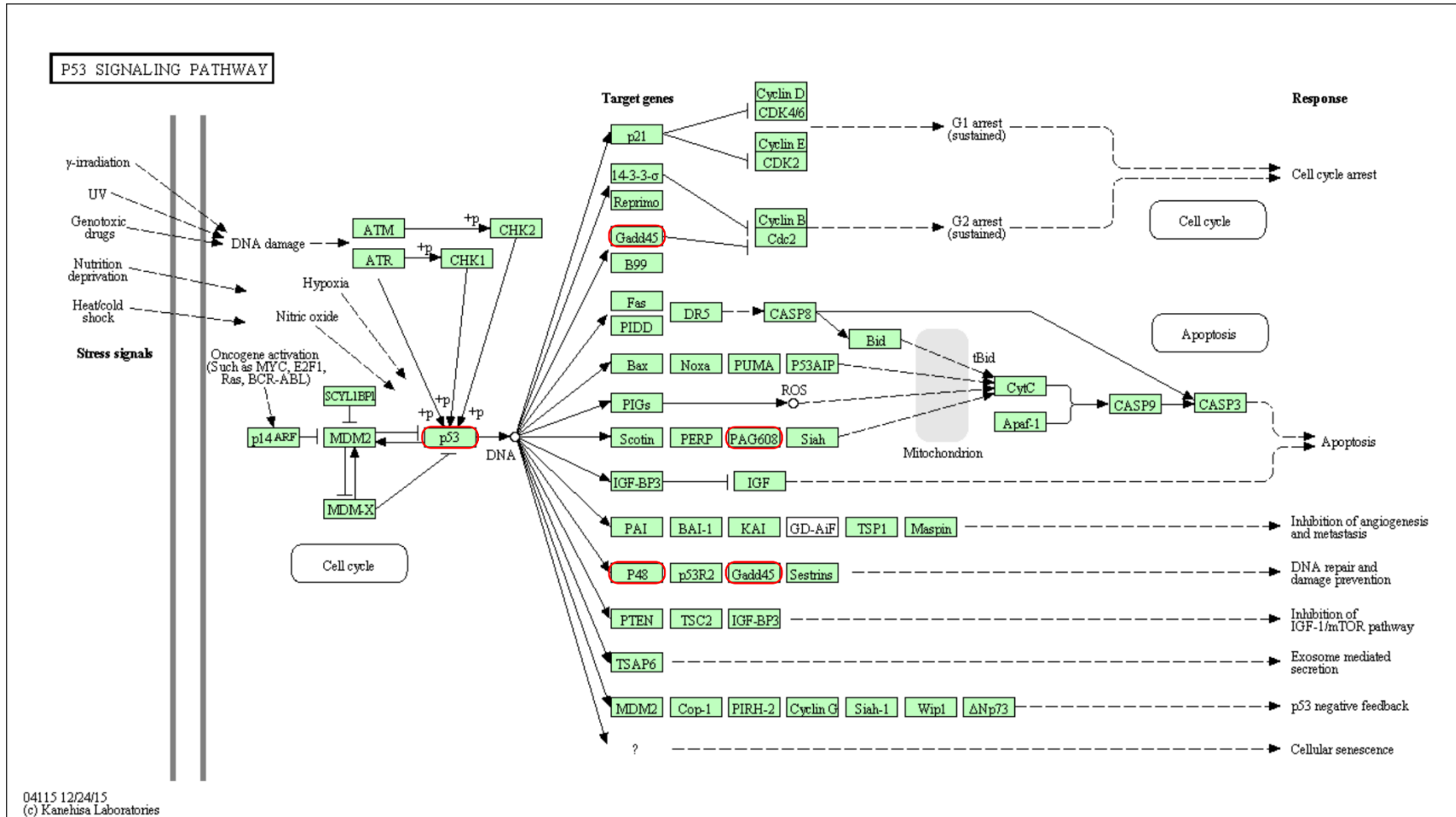
121. Matsuoka S, Yamaguchi M, Matsukage A. D-type cyclin-binding regions of proliferating cell nuclear antigen. *J Biol Chem*. 1994;269(15):11030–6.
122. Savitskaya MA, G. E. Onishchenko. Mechanisms of apoptosis. *Rheum Dis Clin North Am* [Internet]. 2015;80(11):1393–405. Available from: <https://link.springer.com/article/10.1134%2FS0006297915110012>
123. Broni-Bediako E, Amorin R. Effects of Drilling Fluid Exposure to Oil and Gas Workers Presented with Major Areas of Exposure and Exposure Indicators. *Res J Appl Sci Eng Technol*. 2010;2(8):710–9.
124. Grant A, Briggs AD. Toxicity of sediments from around a North Sea oil platform: are metals or hydrocarbons responsible for ecological impacts? *Mar Environ Res* [Internet]. 2002 Feb;53(1):95–116. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11767256>
125. Edge KJ, Johnston EL, Dafforn KA, Simpson SL, Kutti T, Bannister RJ. Sub-lethal effects of water-based drilling muds on the deep-water sponge *Geodia barretti*. *Environ Pollut* [Internet]. 2016;212:525–34. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.envpol.2016.02.047>
126. Neff JM. Estimation of bioavailability of metals from drilling mud barite. *Integr Environ Assess Manag* [Internet]. 2008 Apr;4(2):184–93. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17994916>
127. Engströma K, Love T, Watson G, Zareba G, Yeates A, Wahlberg K, et al. Polymorphisms in ATP-binding cassette transporters associated with maternal methylmercury disposition and infant neurodevelopment in mother-infant pairs in the Seychelles Child Development Study Karin. *Environ Int*. 2016;94(1):224–9.
128. Schwartz MS, Benci JL, Selote DS, Sharma AK, Chen AGY, Dang H, et al. Detoxification of multiple heavy metals by a half-molecule ABC transporter, HMT-1, and coelomocytes of *Caenorhabditis elegans*. *PLoS One*. 2010;5(3).
129. Sun M, Ting Li Y, Liu Y, Chin Lee S, Wang L. Transcriptome assembly and expression profiling of molecular responses to cadmium toxicity in hepatopancreas of the freshwater crab *Sinopotamon henanense*. *Sci Rep* [Internet]. 2016;6(July 2015):1–14. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/srep19405>
130. Main WPL, Ross C, Bielmyer GK. Copper accumulation and oxidative stress in the sea anemone, *Aiptasia pallida*, after waterborne copper exposure. *Comp Biochem*

- Physiol C Toxicol Pharmacol [Internet]. 2010 Mar [cited 2012 Mar 21];151(2):216–21. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19883794>
131. Larsson AI, Purser A. Sedimentation on the cold-water coral *Lophelia pertusa*: cleaning efficiency from natural sediments and drill cuttings. *Mar Pollut Bull* [Internet]. 2011 Jun [cited 2013 Mar 1];62(6):1159–68. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21529851>
132. Carriquiry JD, Horta-Puga G. The Ba/Ca record of corals from the Southern Gulf of Mexico: contributions from land-use changes, fluvial discharge and oil-drilling muds. *Mar Pollut Bull* [Internet]. 2010 Sep [cited 2014 Jun 19];60(9):1625–30. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20599233>
133. Musasia FK, Isaac AO, Masiga DK, Omedo IA, Mwakubambanya R, Ochieng R, et al. Sex-specific induction of CYP6 cytochrome P450 genes in cadmium and lead tolerant *Anopheles gambiae*. *Malar J* [Internet]. 2013;12(1):1. Available from: *Malaria Journal*
134. Ellis BC, Gattoni-Celli S, Kindy MS. The impact of methylmercury on 1,25-dihydroxyvitamin D3-induced transcriptomic responses in dolphin skin cells. *Biol Chem* [Internet]. 2010 [cited 2013 Sep 4];391(2–3):245–58. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20030593>

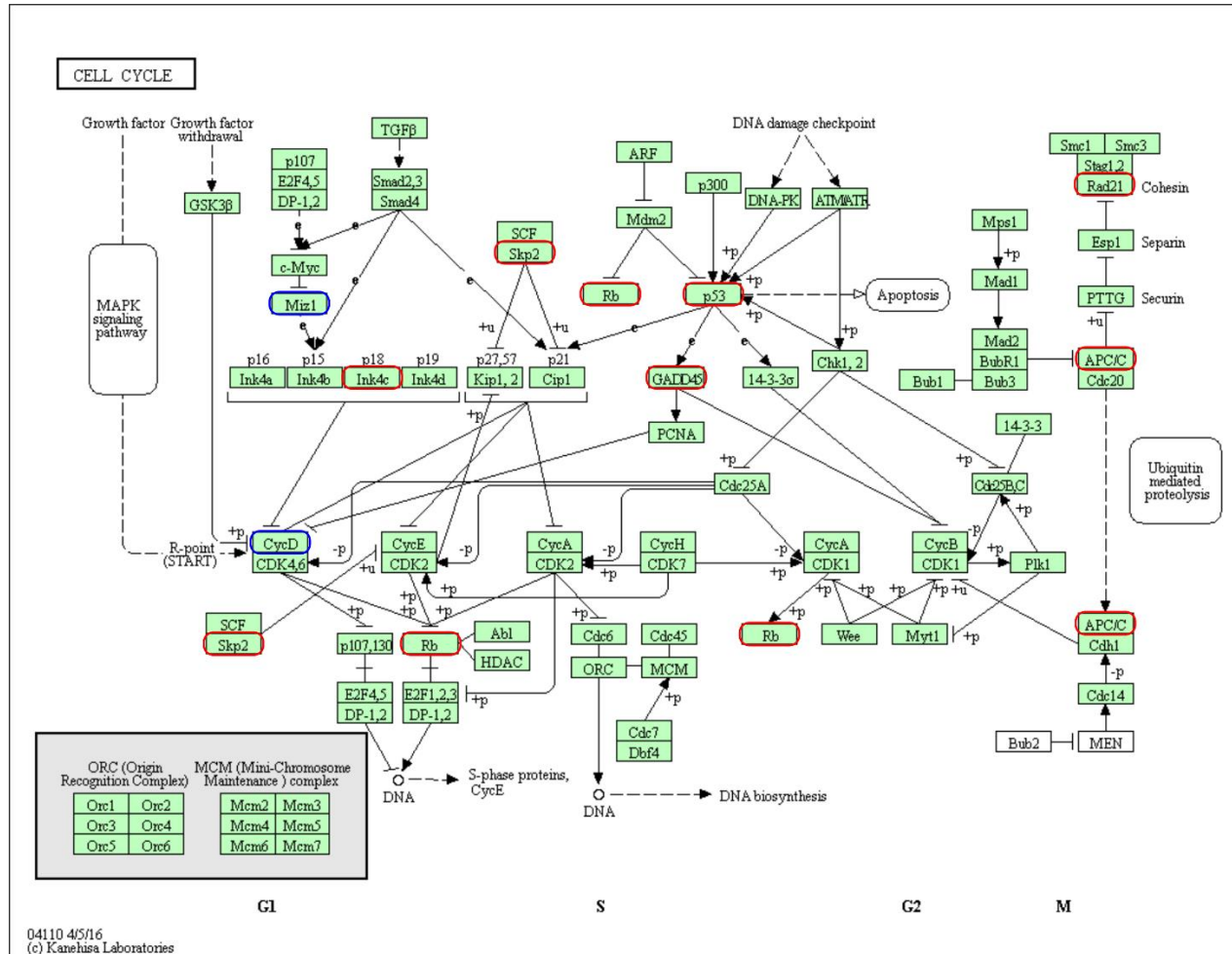
A. Anexo: Clasificación y componentes principales de los LPPs (11)

Clase Principal	Subclase	Tipos comunes	Componentes principales	
LPP-Base acuosa (WBMs)	<i>LPPs de Agua Dulce</i>	pH 7-9.5	Agua dulce, arcilla, NaCl < 1%, CaCl ₂ < 120ppm	
		Lodos tipo spud	Spud, bentonita, agua dulce	
		Lodos de bentonita	Fluidos salinos, Na ⁺ , Ca ²⁺ , otras sales,	
		Lodos fosfatados	Sales fosfatadas, NaCl, Ca ²⁺ , NaOH	
		Lodos de lignita	Lignita	
		Lodos lignosulfonatos	Ferrocromo lignosulfonato, gel de resistencia, sales	
		Lodos coloidales orgánicos	Dextrina, quebrancho, lignina y sulfonatos	
	<i>LPPs Inhibidos</i>	Lodos limosos	Fluidos salinos, Na ⁺ , Ca ²⁺ , otras sales, NaOH, disolventes orgánicos, limos hidratados, sustancias coloides	
		Lodos Gypsum	Fluidos salinos, Na ⁺ , Ca ²⁺ , otras sales	
		Lodos de agua marina	Bentonita, disolventes lignosulfonados, agentes orgánicos, Na ⁺ , K ⁺ , Mg ²⁺ , Ca ²⁺ , Cl ⁻ , SO ₄ ²⁻	
		Lodos en en agua salada saturada	Fluidos salinos, Na ⁺ , Ca ²⁺ , otras sales	
		<i>LPPs Bajos en solidos</i>	Lodos con solidos entre el 3% y 6%	Principalmente agua dulce y bajas concentraciones de floculantes
			Lodos aceite en agua	Barita, aceite mineral, agua, hidróxidos.
	<i>LPPs Emulsionados</i>	Lodos agua en aceite	Barita, aceite animal, agua, arcillas organofílicas, Olefinas.	
		Lodos de fase revertida	Acidos grasos basados en ésteres, PA-Olefinas, aditivos basados en aminas	
LPP-Base aceitosa (OBMs)	<i>OBMs</i>	Lodos con 5% o menos de agua	Ésteres, poliolefinas, acetales, éteres, Alquil bencenos lineares, agentes espesantes y agentes emulsificantes.	
		Lodos con mezcla de diesel y asfalto	Combustible diesel, asfalto	

E. Anexo E: Mapa de la vía de señalización del p53 (120)



F. Anexo F: Mapa de vía del Ciclo Celular (121)



G. Anexo G: Mapa de señalización de la Apoptosis (122)

