SRAS Reporte final

Patrones de expresión génica del metabolismo lipídico como biomarcadores de contaminación ambiental en *Caiman latirostris*

Camila F. Chacón
Laboratorio de Ecología Molecular Aplicada, Instituto de Ciencias Veterinarias del Litoral, Universidad Nacional del Litoral – Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (LEMA/ICiVet-Litoral – CONICET/UNL). Av. Aristóbulo del Valle 8700 (3000), Santa Fe, Argentina. (camila.chacon@icivet.unl.edu.ar)

Resumen

La contaminación ambiental amenaza la homeostasis metabólica de la fauna silvestre, ya que diversos contaminantes actúan sobre receptores nucleares, alterando el metabolismo lipídico, el balance energético y la respuesta inmune. Este estudio tuvo como objetivo identificar y caracterizar los patrones de expresión de genes clave en la homeostasis lipídica: *g-6-pdh*, *fas*, *me*, *lpl*, *pparα*, *pparγ* y *srebp-1c* en diversos tejidos de juveniles de *Caiman latirostris* para evaluar su potencial como biomarcadores. Mediante análisis de PCR semicuantitativa, se confirmó la expresión de todos los genes blanco en bazo, hígado, intestino, gónadas y sangre periférica. Los niveles de expresión variaron significativamente entre tejidos, destacando el hígado con la mayor actividad para la mayoría de los genes. Un hallazgo fundamental fue la detección de expresión en sangre periférica, lo que respalda su uso como matriz no destructiva para el monitoreo mínimamente invasivo en poblaciones silvestres. Estos resultados proporcionan conocimiento base sobre la fisiología lipídica de los crocodilianos y proponen biomarcadores moleculares candidatos para detectar tempranamente la disrupción metabólica inducida por estresores ambientales.

Abstract

Environmental contamination threatens the metabolic homeostasis of wildlife, as several pollutants act on nuclear receptors, altering lipid metabolism, energy balance, and immune response. This study aimed to identify and characterize the expression patterns of key genes in lipid homeostasis: *g-6-pdh*, *fas*, *me*, *lpl*, *pparα*, *pparγ*, and *srebp-1c* across various tissues of juvenile *Caiman latirostris* to evaluate their potential as biomarkers. Through semi-quantitative PCR analysis, the expression of all target genes was confirmed in the spleen, liver, intestine, gonads, and peripheral blood. Expression levels varied significantly among tissues, with the liver showing the highest activity for most genes. The main finding was the detection of expression in peripheral blood, which supports its use as a non-destructive matrix for minimally invasive monitoring in wild populations. These results provide foundational knowledge on crocodilian lipid physiology and propose candidate molecular biomarkers for the early detection of metabolic disruption induced by environmental stressors.

Introducción

La contaminación ambiental representa una amenaza creciente para la homeostasis metabólica de la fauna silvestre, ya que muchos contaminantes pueden alterar el metabolismo lipídico al actuar sobre receptores nucleares, afectando el equilibrio energético, la reproducción y la respuesta inmune. *Caiman latirostris* es una de las dos especies de cocodrilianos presentes en Argentina (Larriera y col., 2008). Debido a sus características ecológicas, *C. latirostris* representa una excelente especie centinela para evaluar el impacto de la contaminación ambiental (Poletta y col., 2011). En este contexto, la identificación de biomarcadores moleculares sensibles es crucial para monitorear el efecto fisiológico de la exposición a xenobióticos en poblaciones silvestres. Por lo tanto, el objetivo de este estudio fue caracterizar los patrones de expresión de genes clave involucrados en el metabolismo lipídico en diferentes tejidos de *C. latirostris* y evaluar su potencial como biomarcadores moleculares de contaminación ambiental.

Metodología

Este estudio fue evaluado y aprobado por el Comité de Ética y Seguridad (CAES) de la Facultad de Ciencias Veterinarias (#626/20, Santa Fe, Argentina). Todos los animales fueron tratados de acuerdo con

el Marco Ético de Referencia para la Investigación Biomédica: Principios Éticos para la Investigación con Animales de Laboratorio, de Granja y Silvestres (CONICET, 2005), utilizando técnicas no invasivas de recolección de sangre y minimizando el estrés y el sufrimiento mediante métodos de manejo adecuados (Manolis y Webb., 1987).

Se utilizaron tres juveniles de tres años de edad de *C. latirostris* provenientes del Centro de Rescate, Investigación e Interpretación de la Fauna "La Esmeralda" (CRIIF, Santa Fe, Argentina). Los animales nacieron en cautiverio a partir de huevos recolectados de tres nidos diferentes en la Reserva Natural Manejo Sustentable “El Fisco” (30° 11’ 26” S; 61° 0’27” O; Dpto. San Cristóbal, Provincia de Santa Fe, Argentina), un área libre de actividades agrícolas y urbanas. Previo a la eutanasia, se tomaron muestras de sangre periférica (0,5 ml) de la vena espinal de cada ejemplar utilizando una jeringa heparinizada y aguja TERUMO® 25 G x 5/8” (0,5 mm) (Myburgh y col., 2014). Las muestras fueron inmediatamente preservadas en TRIzol® LS Reagent (1:4, Ambion, Life Technologies), congeladas rápidamente en nitrógeno líquido (LN_2) y almacenadas a −80 °C hasta su análisis posterior. Los distintos tejidos (hígado, bazo, intestino y gónadas) fueron extraídos dentro de los primeros 2 minutos, cortados en pequeños fragmentos (75–100 mg), congelados rápidamente en LN_2 y almacenados a −80 °C hasta su procesamiento (López González y col., 2021).

Extracción de ARN y transcripción reversa

La extracción de ARN, el tratamiento con DNAse libre de RNasa (Invitrogen) y la síntesis de la primera cadena de cDNA (Thermo Scientific®) se realizaron según lo descripto por López González y col. (2021). La calidad e integridad del ARN se evaluaron mediante espectrofotometría NanoDrop® (relación de absorbancia 260 nm/280 nm) y electroforesis tradicional en gel de agarosa al 2 % teñido con Red Gel.

Diseño de cebadores y reacción de PCR

Los genes blancos: *glucosa-6-fosfato deshidrogenasa*, *lipoproteína lipasa*, *enzima málica*, *ácido graso sintasa*, *receptor alfa activado por proliferadores de peroxisomas*, *receptor gamma activado por proliferadores de peroxisomas* y *proteína de unión al elemento de respuesta a esteroles 1c* (*g6pd, lpl, me, fas, pparα, pparγ* y *srebp-1c,* respectivamente), fueron diseñados a partir de las secuencias de ARNm *de Alligator mississippiensis*, especie representativa de la misma familia (Alligatoridae), cuyas secuencias están disponibles en el servidor de secuencias de NCBI (www.ncbi.nlm.nih.gov) y en el genoma completo de *C. latirostris* (CoGe; www.genomevolution.org/coge/). Los cebadores fueron diseñados y analizados mediante la plataforma Integrated DNA Technologies (http://www.idtdna.com).

La reacción de PCR se realizó utilizando 1 a 3 µL de cDNA, 0,3 µM (20 µM) de cada cebador específico (**Tabla 1**), 0,25 mM de dNTPs y el buffer suministrado con la enzima Phire Hot Start II DNA Polymerase (Thermo Scientific®), completando un volumen final de 20 µL con agua tratada con DEPC. Las condiciones de ciclado de la PCR fueron las siguientes: desnaturalización inicial a 98 °C durante 3 minutos, seguida de 40 ciclos de: desnaturalización a 98 °C durante 5 segundos, alineamiento (a una temperatura específica para cada gen; **Tabla 1**) durante 20 segundos, extensión a 72 °C durante 20 segundos, y una extensión final a 72 °C durante 10 minutos. El gen *β-actina* fue utilizado como referencia interna para normalizar la expresión de los genes blanco (Odetti y col., 2023).

Gene identification

Para identificar los productos amplificados, se analizaron 4 µL de cada producto de PCR mezclados con 1,8 µL de solución de buffer de carga (buffer FA) mediante electroforesis capilar en gel de agarosa al 2 % teñido con Red Gel. El tamaño, en pares de bases, de los fragmentos de ADN generados por la PCR se estimó en relación con un marcador estándar de peso molecular (DNA ladder de 100 pb). Los productos de PCR fueron visualizados utilizando un transiluminador UV (Safe Imager™, Invitrogen), y la imagen fue registrada con una cámara de 108 MP.

Tabla 1 Secuencias de primer diseñados

Gen	Forward (F) y Reverse (R)	Amplicón (pb)	T*m* (°C)	T*a* (°C)
Gen de referencia				
β-actina	F: TCACGAGACCACTTTCAACTC R: AGGGCTGTGATTTCCTTCTG	138	62	57
Genes objetivos				
g-6-pdh	F: TACCGCATCGACCACTATCT R: CTTCAGCACCTTCACCTTCTC	291	62	57
fas	F: CTGTCGTGGGAGGAATGTAAG R: GTAGACCGAAGCAGATGAAGAG	717	62	57
me	F: CTACTGCCACCTTGCTTTCT R: CATCATAGGCTTGACCTCTCAC	541	62	57
lpl	F: CTAGAGCCCAGCAACACTATC R: GTCCACCATTCTGTCCAACT	922	62	57
pparα	F: AGGGAGCTTTGTCCACTTAC R: CAACGAGCATCCCATCTTTATTC	982	62	58
pparγ	F: GACCAGCTAAACCCTGAATCT R: GCCAGGTCACTGTCATCTAAT	551	61	58
srebp-1c	F: ACGCAGGTCCAGAATGTTT R: CAGGAAGCGGATGTAGTCAAT	504	62	58

T*m* temperatura de melting, T*a* temperatura de annealing

Expresión relativa de los genes estudiados

Para evaluar la expresión relativa de cada gen identificado en los distintos tejidos, se realizó una semicuantificación posterior a la identificación génica mediante electroforesis tradicional en gel de agarosa al 2 %. La densidad de las bandas de PCR se midió utilizando el software ImageJ, analizando el área bajo la curva de cada pico, lo cual representa la intensidad de las bandas de PCR. Para cada gen blanco, se calculó el área bajo el pico correspondiente a cada tejido. La semicuantificación relativa se expresa como la razón entre la señal del gen blanco y la señal del gen de referencia *β-actina*.

Análisis estadísticos

El análisis estadístico se realizó utilizando el software R (R Core Team, 2024). Se aplicó un modelo lineal generalizado (*Generalized Linear Model*, GLM) considerando los niveles de expresión génica como variable respuesta, y el tejido y el gen blanco como variables predictoras, utilizando la función *glm* del paquete "stats" (R Core Team, 2024). Posteriormente, se realizó un análisis post-hoc mediante la función *emmeans* del paquete "emmeans" (medias marginales estimadas), aplicando contrastes mediante el test de Tukey. Los resultados se expresaron como media ± desviación estándar.

Resultados

Identificación de productos de PCR

Nuestros resultados confirman la presencia de los genes blanco en todos los tejidos evaluados (**Figura 1**).

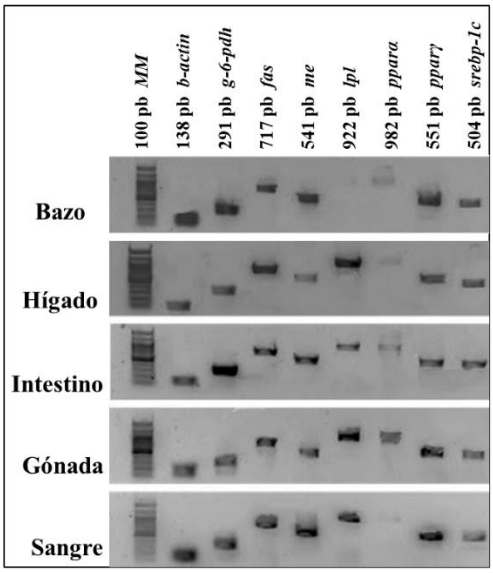


Figura 1. Identificación de genes involucrados en el metabolismo lipídico en diferentes tejidos de juveniles de *Caiman latirostris* (n = 3). Ladder (100 pb); *β-actina* (138 pb); *g-6-pdh* (291 pb); *fas* (717 pb); *me* (541 pb); *lpl* (922 pb); *pparα* (982 pb); *pparγ* (551 pb) y *srebp-1c* (504 pb).

Cuantificación relativa de los genes objetivos

Los niveles de expresión relativa de los genes objetivo en los distintos tejidos evaluados se detallan en la **Figura 2.** El nivel de expresión de *g-6-pdh* fue estadísticamente mayor en el intestino en comparación con todos los demás tejidos ($p < 0,01$), seguido por la gónada, el hígado y el bazo, y finalmente la sangre. Asimismo, el nivel de expresión en sangre fue estadísticamente diferente respecto a todos los demás tejidos ($p < 0,01$). El gen *fas* muestra una expresión significativamente mayor en el hígado en comparación con los otros tejidos evaluados ($p < 0,01$), seguido por el intestino, luego la sangre y el bazo, y finalmente la gónada. Las comparaciones múltiples demuestran diferencias estadísticamente significativas entre todos los tejidos, excepto entre el bazo y la sangre ($p < 0,01$). El nivel de expresión de *me* fue alto en la gónada, seguido por el intestino y luego el hígado, la sangre y el bazo. Las comparaciones múltiples revelaron diferencias significativas entre la gónada y todos los demás tejidos, así como entre el intestino y el resto ($p < 0,01$). Para *lpl*, el hígado fue el tejido con mayor expresión, seguido por el intestino, la gónada, la sangre y el bazo. La comparación múltiple muestra diferencias estadísticamente significativas entre todos los tejidos ($p < 0,01$), excepto entre el intestino y la gónada ($p > 0,01$).

Los niveles de expresión del factor de transcripción *pparα* resultaron ser significativamente mayores en el hígado, la sangre y el intestino que en el bazo y la gónada. También se observó una diferencia significativa entre el bazo y la gónada ($p < 0,01$), pero no se encontraron diferencias en la comparación entre el hígado, el intestino y la sangre ($p > 0,01$). En el caso de *pparγ*, el hígado fue el tejido con mayor expresión, seguido por la sangre y luego los otros tres. El contraste múltiple demuestra diferencias estadísticamente significativas en el hígado respecto a todos los demás tejidos, así como en la sangre en comparación con el intestino y el bazo ($p < 0,01$). Para el factor de transcripción *srebp-1c*, el hígado mostró un nivel de expresión superior en comparación con el resto ($p < 0,01$), seguido por la gónada y el intestino, y luego por el bazo y la sangre ($p < 0,01$). No se observaron diferencias entre la gónada y el intestino ni entre el bazo y la sangre ($p > 0,01$).

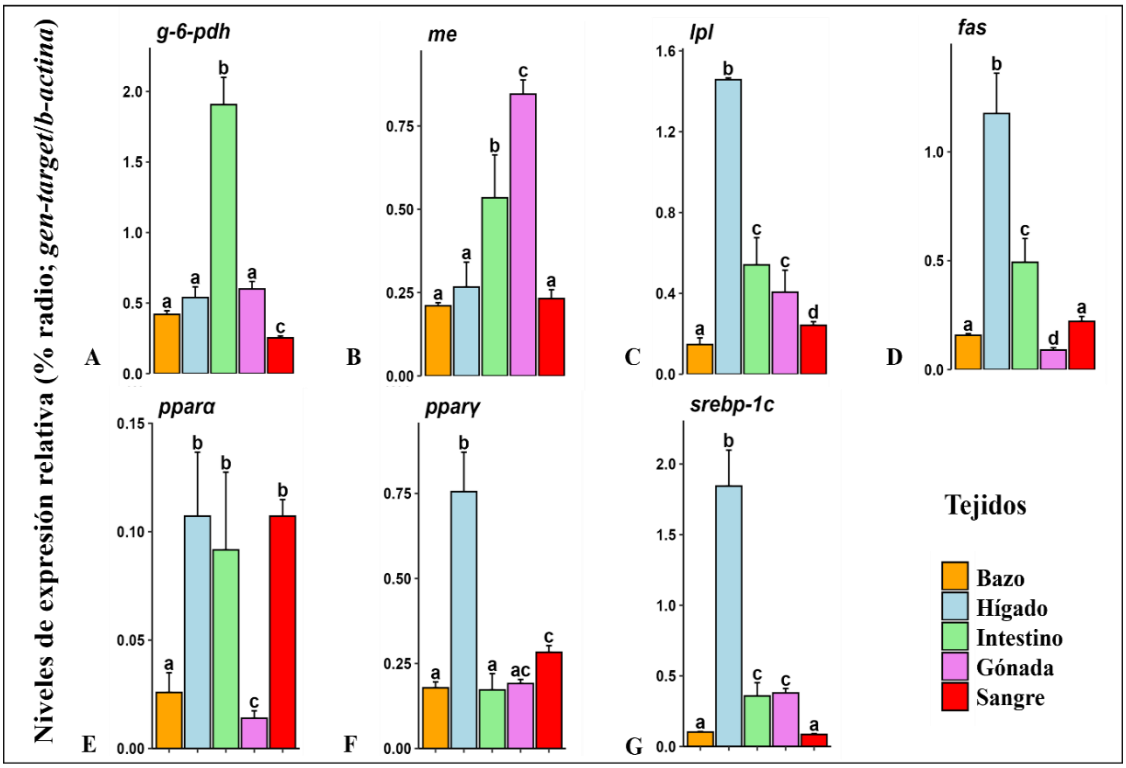


Figura 2: Niveles de expresión relativas: *g-6-pdh* (deshidrogenasa de glucosa-6-fosfato), *fas* (ácido graso sintasa), *me* (enzima málica), *lpl* (lipoproteína lipasa), *pparα* (receptor activado por proliferadores de peroxisomas alfa), *pparγ* (receptor activado por proliferadores de peroxisomas gamma) y *srebp-1c* (proteína de unión al elemento regulador de esterol 1c) en diferentes tejidos de juveniles *Caiman latirostris* (n = 3). Los niveles de expresión se calcularon en relación a la expresión de *β-actina* como gen normalizador. Nivel de significancia: $p < 0,01$.

Discusión

La homeostasis metabólica y la regulación energética son fundamentales para las funciones fisiológicas y la supervivencia en organismos ectotermos, y la alteración de este equilibrio puede conducir a enfermedades crónicas o a una disminución de la aptitud biológica. El hígado es el tejido más activo energéticamente y también el más lipogénico entre los evaluados en este estudio. Sin embargo, distintos tejidos cumplen diferentes roles en el metabolismo lipídico. Además, los sitios de almacenamiento lipídico pueden variar como resultado de estrategias metabólicas adaptativas específicas de cada tejido, equilibrando procesos de lipólisis y lipogénesis, así como la exportación e importación de lípidos entre tejidos (Zheng y col., 2013).

En este estudio, se evaluó la concentración relativa de genes asociados a las vías lipídicas en distintos tejidos de *C. latirostris*, incluyendo *g-6-pdh*, *fas*, *me*, *lpl*, *pparα*, *pparγ* y *srebp-1c*. Estos genes están interconectados a través de sus funciones en la síntesis, almacenamiento, degradación y regulación de lípidos, formando una red integral crucial para el mantenimiento de la homeostasis metabólica y energética. Su expresión está influenciada por factores de transcripción, los cuales, a su vez, son modulados por condiciones ambientales, nutricionales y hormonales, en función de las necesidades metabólicas del organismo (Horton y col., 2002).

Conclusiones

Este es el primer estudio que reporta la expresión de genes del metabolismo lipídico en sangre periférica de una especie de crocodiliano. Nuestros resultados demostraron que, si bien la expresión de *g-6-pdh*, *fas*, *me*, *lpl*, *pparα*, *pparγ* y *srebp-1c* en sangre periférica es menor en comparación con otros tejidos, su

detección es posible. El desarrollo de herramientas moleculares y bioinformáticas ha permitido explorar un campo vacante en especies silvestres, identificando nuevos biomarcadores para la detección temprana de enfermedades o riesgos ecotoxicológicos inducidos por diferentes estresores ambientales.

Muchos contaminantes pueden actuar como ligandos de distintos receptores nucleares (NR), alterando su regulación y la expresión de los genes blanco, y afectando en cascada las vías que mantienen la homeostasis metabólica. Esta disrupción metabólica podría manifestarse en enfermedades crónicas o en una disminución de la aptitud biológica, con impactos a gran escala sobre las poblaciones de fauna silvestre. A través de estos biomarcadores de efecto, proponemos analizar el estado de salud de una especie depredadora tope que regula el equilibrio ecológico en los humedales neotropicales. Actualmente, estos ecosistemas de alto valor ecológico se encuentran amenazados por la contaminación difusa derivada de actividades agrícolas, que genera mezclas complejas con efectos novedosos e impredecibles sobre la biota. Destacamos la importancia de evaluar estos genes en sangre periférica, una matriz no destructiva excelente para el monitoreo de poblaciones silvestres de caimanes. Este enfoque no solo minimiza el estrés y daño sobre los animales, sino que también permite evaluaciones continuas de su estado de salud y de exposición a contaminantes ambientales.

Agradecimientos

Agradezco a las Dras. G. L. Poletta y M. V. Parachú Marcó por las correcciones realizadas durante el desarrollo de este trabajo. Asimismo, se agradece al Dr. P. A. Siroski por la guía técnica brindada en el marco de mi formación doctoral en el ICiVet-Litoral (UNL-CONICET). También, quiero expresar mi agradecimiento al "IUCN SSC Crocodile Specialist Group Student Research Assistance Scheme" por brindar el soporte financiero para llevar a cabo este trabajo, que derivó en una publicación científica y en una presentación de congreso nacional (Argentina):

Publicación científica: Chacón CF, Marcó Parachú MV, Siroski, PA., Poletta, GL. 2025. Identification and tissue-specific expression of genes involved in lipid metabolism in broad-snouted caiman. Journal of Zoology. http://doi.org/10.1111/jzo.70071

Congreso nacional: Chacón CF, Parachú Marcó MA, Poletta GL. Siroski PA. 2023. Lipid metabolism genes as potential biomarkers of environmental stress in caimans. Congreso XXIII de la Asociación Herpetológica Argentina (AHA). 4- 8 Septiembre, 2023. Buenos Aires, Argentina. Presentación oral.

Bibliografía

Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET). (2005). Reference ethical framework for biomedics research: Ethical principles for research with laboratory, farm, and wild animals, #1047. Anexo II. CONICET, Buenos Aires, Argentina.

Horton, J. D., Goldstein, J. L., & Brown, M. S. (2002). SREBPs: Activators of the complete program of cholesterol and fatty acid synthesis in the liver. Journal of Clinical Investigation, 109(9), 1125-1131.

Larriera A.; Imhof A.; Siroski P.A., (2008). Estado actual de los programas de conservación y manejo de género Caiman en Argentina. Pub. Asoc. Amigos de Doña Ana Nº18: 143-179.

López González, E. C., Odetti, L. M., Poletta, G. L., Denslow, N., Kroll, K. J., Siroski, P. A., & Parachú Marcó, M. V. (2021). Optimizing protocols for high-quality RNA extraction from blood and liver tissues of the broad-snouted caiman. Russian Journal of Herpetology, 28, 197-204.

Manolis, S. C., Webb, G. J. W., & Dempsey, K. E. (1987). Crocodile egg chemistry. In G. J. W. Webb, S. C. Manolis, & E. J. Whitehead (Eds.), Wildlife management: Crocodiles and alligators (pp. 445-472). Surrey Beatty Pty.

Myburgh, J. G., Kirberger, R. M., Steyl, J. C., Soley, J. T., Booyse, D. G., Huchzermeyer, F. W., Lowers, R. H., Guillette, L. J. (2014). The post-occipital spinal venous sinus of the Nile crocodile (Crocodylus niloticus): Its anatomy and use for blood sample collection and intravenous infusions. Journal of the South African Veterinary Association, 85(1), 1-10.

Odetti, L. M., Simoniello, M. F., & Poletta, G. L. (2023). Alterations in the expression of antioxidant enzyme genes in response to pesticide exposure during embryonic development in the native reptile species *Caiman latirostris*. Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology, 110(1), 3.

Poletta, G.L.; Kleinsorge, E.; Paonessa, A.; Mudry, M.D.; Larriera, A.; Siroski, P.A., 2011 Genetic, enzymatic and developmental alterations observed in *Caiman latirostris* exposed in ovo to pesticide formulations and mixtures in an experiment simulating environmental exposure. Ecotoxicology Environmental Safety 74: 852-859

R Core Team. (2024). R: A Language and Environment for Statistical Computing. R Foundation for Statistical Computing. Vienna, Austria.

Zheng, J. L., Luo, Z., Liu, C. X., Chen, Q. L., Tan, X. Y., Zhu, Q. L., & Gong, Y. (2013). Differential effects of acute and chronic zinc (Zn) exposure on hepatic lipid deposition and metabolism in yellow catfish *Pelteobagrus fulvidraco*. Aquatic Toxicology, 132, 173-181.