

Evaluation of the estrogenic effects of UV filters on the sergeant major damselfish, *Abudefduf saxatilis*

Evaluación del efecto estrogénico por filtros UV en el pez sargento *Abudefduf saxatilis*

Mélina Soto, Gabriela Rodríguez-Fuentes*

Unidad de Química Sisal, Facultad de Química, Universidad Nacional Autónoma de México, Av. Colón 503 F X 62 y Reforma Colonia Centro, Mérida, 97000, Yucatán, México.

* Corresponding author. E-mail: grf@unam.mx

ABSTRACT. Oxybenzone, octyl salicylate, and octinoxate are compounds used in a variety of products as a protection against exposure to ultraviolet radiation. Concerns have emerged regarding their environmental safety as previous studies have shown that they tend to bioaccumulate and act as potential xenoestrogens in aquatic organisms. To our knowledge no studies have investigated their impact on tropical reef-associated species. Thus, the aim of the present study was to evaluate the estrogenic effects of these three compounds on the abundant, reef-associated sergeant major damselfish, *Abudefduf saxatilis*. As no genomic information of *A. saxatilis* was available, the first part of the study was to isolate and to sequence the vitellogenin (VTG) and β -actin genes. In the second part, the potential estrogenicity of the three compounds in juvenile fish (<5 cm) was studied using gene expression and protein synthesis analyses to evaluate the induction of VTG. Fish were exposed to doses of 5, 25, and 50 $\mu\text{g g}^{-1}$ of oxybenzone, octyl salicylate, octinoxate, and to a mixture of them in a similar proportion to the one used in commercial personal care products. An increment in alkali-labile phosphate was observed in all treatments, but it was only statistically significant in the positive control (17 β -estradiol). Relative gene expression was only statistically augmented in the positive control.

Key words: sunscreen, *Abudefduf saxatilis*, vitellogenin.

RESUMEN. La oxibenzona, el octil salicilato y el octinoxato son compuestos empleados en una gran variedad de productos como protección contra la exposición a la radiación ultravioleta. En los últimos años ha aumentado la preocupación en cuanto a su seguridad ambiental, ya que estudios han demostrado que tienden a bioacumularse y actuar como xenoendocrinos en organismos acuáticos. A la fecha, no se han realizado estudios sobre su impacto en especies asociadas a arrecifes tropicales. Por ello, el presente trabajo investiga los efectos estrogénicos de tres filtros ultravioleta en el pez sargento, *Abudefduf saxatilis*. Dada la falta de información genómica disponible para *A. saxatilis*, una primera parte del estudio consistió en aislar y secuenciar los genes de la vitelogenina (VTG) y β -actina. En una segunda etapa, se estudiaron los efectos estrogénicos de estos tres compuestos evaluando la inducción de la expresión genética y de la síntesis de la VTG en organismos juveniles (<5 cm). Los peces se inyectaron intraperitonealmente con dosis de 5, 25 y 50 $\mu\text{g g}^{-1}$ peso húmedo de oxibenzona, octil salicilato, octinoxato y una mezcla de ellos en proporciones similares a las empleadas en las lociones comerciales. Aunque se observó un aumento en la producción de fósforo lábil al álcali en todas las muestras tratadas con los filtros UV, el incremento sólo fue estadísticamente significativo en el control positivo (17 β -estradiol). El incremento en la expresión relativa del gen fue también estadísticamente significativo únicamente en el control positivo.

Palabras clave: bloqueador solar, *Abudefduf saxatilis*, vitelogenina.

INTRODUCTION

Skin problems related to ultraviolet radiation (UV) have promoted the development of organic compounds capable of absorbing UV rays and mitigating the harmful effects of sun exposure. The uses of these compounds have diversified and they are currently also used as additives in numerous products (Schlumpf *et al.* 2004).

Compounds such as oxybenzone (benzophenone-3, 2-hydroxy-4-methoxyphenyl benzophenone), octyl salicylate (2-ethylhexyl salicylate), and octinoxate (2-ethylhexyl trans-4-methoxycinnamate) are used in different products that provide protection against solar radiation, especially in cosmetic

INTRODUCCIÓN

Los problemas dermatológicos debidos a la radiación ultravioleta (UV) han impulsado el desarrollo de compuestos orgánicos capaces de absorber los rayos UV y atenuar los impactos negativos de la exposición al sol. Su espectro de uso se ha diversificado y se pueden encontrar ahora también como aditivos en numerosos productos (Schlumpf *et al.* 2004).

Los compuestos como la oxibenzona (3-benzofenona, 2-hidroxi-4-metoxifenil benzofenona), el octil salicilato (2-etilhexil salicilato) y el octinoxato (2-etilhexil trans-4-metoxicinamato) son usados en diferentes productos para la

sunscreens (Giokas *et al.* 2007). A series of surveys conducted in the Cancun hotel zone revealed that these three compounds are among the five most active ingredients in sunscreens used by national and foreign tourists and by the local inhabitants (Rodríguez-Fuentes *et al.* 2010).

The possible endocrine disrupting effects of UV filters were first considered more than a decade ago when Schlumpf *et al.* (2001) reported that exposure to these compounds altered embryonic development in rats. Since then, the number of studies on the estrogenic activity and antithyroid effects of certain UV filters has multiplied (Schlumpf *et al.* 2004, Giokas *et al.* 2007, Díaz-Cruz and Barceló 2009). Coronado *et al.* (2008) observed a clear estrogenic response in trout and Japanese medaka exposed to oxybenzone. Though the response occurred at concentrations higher than those found in the environment, it is important to keep in mind that these compounds tend to bioaccumulate (Buser *et al.* 2006, Bachelot *et al.* 2012).

Vitellogenin (VTG) is a molecular biomarker commonly used for the rapid detection of the estrogenic effects of chemical compounds on biological samples (Kime *et al.* 1999, Rotchell and Ostrander 2003). It is the egg-yolk precursor protein that under normal conditions is expressed in mature female fish, reptiles, amphibians, and birds. When exposed to xenoendocrine contaminants, VTG expression can be induced in males as well as in juvenile organisms (Kime *et al.* 1999, Scholz *et al.* 2004). The expression of the VTG gene and the level of induced protein are used to monitor endocrine alterations in environmental risk assessments (Van der Oost *et al.* 2003).

Some fishes, including the Japanese medaka *Oryzias latipes*, the zebrafish *Danio rerio*, the fathead minnow *Pimephales promelas*, and the rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*, are considered suitable models for the study of endocrine alterations (Scholz *et al.* 2004, Kunz *et al.* 2006, Coronado *et al.* 2008). To date, however, the effects of endocrine disruptors have not been studied in Caribbean reef fishes, which may be more susceptible to exposure to UV filters because of the intense tourist activity in the region.

The sergeant major damselfish, *Abudefduf saxatilis* (Linnaeus 1758), inhabits shallow reefs and coastal lagoons. It is omnivorous, abundant, widely distributed, territorial, and easily identifiable. Juvenile damselfish (<5 cm) are found in shallow waters of reef lagoons and tide pools, and are thus easy to catch. Under normal conditions, the VTG gene is expressed when the individuals attain sexual maturity (approximately one year, >10 cm) (Robertson 1988). These characteristics make *A. saxatilis* an organism of particular interest for monitoring pollution in coral reef zones.

The objective of the present study was to evaluate the effect of three UV filters and a mixture of them on VTG synthesis in *A. saxatilis* and attempt to establish its suitability as a sentinel organism in future ecotoxicological studies in Caribbean reef zones.

protección contra la radiación solar, en particular en las lociones cosméticas bloqueadoras solares (Giokas *et al.* 2007). Una serie de encuestas realizadas en la zona hotelera de Cancún mostró que estos tres compuestos se encuentran entre los cinco ingredientes activos en las lociones bloqueadoras más usadas por los turistas nacionales, extranjeros y habitantes de la zona (Rodríguez-Fuentes *et al.* 2010).

El posible impacto endocrino de los filtros UV fue sugerido por primera vez hace un poco más de una década, cuando se registró que la exposición a estos compuestos altera el desarrollo de embriones de ratas (Schlumpf *et al.* 2001). Desde entonces, se han multiplicado los estudios sobre la actividad estrogénica y antitiroidea de ciertos filtros UV (Schlumpf *et al.* 2004, Giokas *et al.* 2007, Díaz-Cruz y Barceló 2009). Coronado *et al.* (2008) registraron una clara respuesta estrogénica en truchas y medaka japonés debida a la exposición a la oxibenzona. Aunque la respuesta se observó a concentraciones mayores que las registradas en el ambiente, hay que tomar en cuenta que estos compuestos son propensos a bioacumularse (Buser *et al.* 2006, Bachelot *et al.* 2012).

La vitelogenina (VTG) es un biomarcador molecular comúnmente usado para detectar rápidamente los efectos estrogénicos de compuestos químicos en muestras biológicas (Kime *et al.* 1999, Rotchell y Ostrander 2003). La VTG es la fosfoglicolipoproteína precursora de la yema de huevo expresada bajo condiciones normales en las hembras maduras de peces, reptiles, anfibios y aves. Bajo contaminación con compuestos xenoendocrinos, la expresión de la VTG se puede inducir tanto en machos como en organismos juveniles (Kime *et al.* 1999, Scholz *et al.* 2004). Se suele usar la expresión del gen de VTG, así como el nivel de proteína inducida, para monitorear las alteraciones endocrinas en estudios de riesgo ambiental (Van der Oost *et al.* 2003).

Algunos peces como el medaka japonés *Oryzias latipes*, el pez cebra *Danio rerio*, la carpita cabeza *Pimephales promelas* y la trucha arcoiris *Oncorhynchus mykiss* han sido considerados modelos apreciados para los estudios de las alteraciones endocrinas (Scholz *et al.* 2004, Kunz *et al.* 2006, Coronado *et al.* 2008). Desafortunadamente, a la fecha, no se han estudiado estos efectos en peces arrecifales caribeños, los cuales podrían ser más susceptibles de encontrarse expuestos a filtros UV por la intensa actividad turística.

El pez sargento, *Abudefduf saxatilis* (Linnaeus 1758), es abundante, de distribución amplia, territorialista, de fácil identificación y omnívoro, y vive en las zonas someras de los arrecifes y lagunas costeras. Los juveniles del pez sargento (<5 cm) se encuentran en zonas someras de las lagunas arrecifales y las charcas intermareales, lo cual facilita su muestreo. Bajo condiciones normales, no presentan expresión de la VTG hasta su madurez sexual (aproximadamente un año, >10 cm) (Robertson 1988). Estas características vuelven al pez sargento un organismo de particular interés en el monitoreo de la contaminación en zonas arrecifales.

MATERIALS AND METHODS

The organisms were captured under fishing permit No. DGOPA.09749.140909.3161 granted by the Mexican National Commission for Aquaculture and Fisheries (CONAPESCA) of the Ministry of Agriculture, Livestock, Rural Development, Fisheries, and Food (SAGARPA), and approved by the National Fisheries Institute (INP) and Ministry of the Environment and Natural Resources (SEMARNAT). Juvenile *A. saxatilis* were collected from tide pools at Punta Brava, Quintana Roo, using aquarium nets and quickly transported to acclimation tanks. The experimental design of this bioassay took into consideration the recommendations given by APHA *et al.* (2005, section 8910).

Only individuals measuring less than 5 cm and more than 2 cm total length were captured to ensure that they were in their juvenile stage. All organisms used in this study were acclimated in eight 60-L fiberglass tanks with continuous flow of filtered seawater. The organisms were acclimated for three weeks prior to the bioassay, and during this time they were fed *ad libitum* twice daily with a commercial feed for tropical fish and live *Artemia salina* nauplii.

Given that hormones regulate VTG gene expression, to obtain the VTG sequence the fish were exposed to 17 β -estradiol (E2). Five organisms in separate 20-L tanks were exposed to 100 ng L⁻¹ of E2 for three days with daily partial water changes. A HACH SensION 5 multiparameter meter was used to measure the environmental parameters: temperature, 27.2 \pm 0.3 °C; salinity, 28.2 \pm 0.1; dissolved oxygen, 7.7 \pm 0.3 mg L⁻¹; and pH, 7.85 \pm 0.2. The organisms were dissected immediately after being sacrificed to remove the liver, and the samples were stored in RNALater at -80 °C.

In the bioassay to detect the potential estrogenicity of UV filters, the compounds were diluted in 2.5 mL molecular biology grade ethanol and the final volume was adjusted to 10 mL with corn oil (Leaños-Castañeda and Van Der Kraak 2007). The concentration was calculated so that the final injection volume was 10 μ L per gram of fish (wet weight basis). The bioassay consisted of a positive control treatment (E2 at a dose of 5 μ g g⁻¹); a negative (solvent) control treatment (25% molecular biology grade ethanol in corn oil); three treatments with oxybenzone (doses of 5, 25, and 50 μ g g⁻¹); three treatments with octyl salicylate (doses of 5, 25, and 50 μ g g⁻¹); three treatments with octinoxate (doses of 5, 25, and 50 μ g g⁻¹); and a mixture containing 5 μ g g⁻¹ oxybenzone + 6 μ g g⁻¹ octyl salicylate + 7.5 μ g g⁻¹ octinoxate (proportion commonly found in commercial sunscreens). The doses were selected based on preliminary studies to guarantee the sublethality of the assay.

Seven juvenile organisms per treatment, measuring from 2 to 5 cm, were injected intraperitoneally (to ensure uptake of the compounds) using 0.3-mL sterile insulin syringes (short needle). The compounds were applied in a single injection to minimize damage due to handling of the organism during the experiment.

En este trabajo se estudió el efecto de tres filtros UV y una mezcla de ellos sobre la síntesis de la vitelogenina en los juveniles de *A. saxatilis* con la posibilidad de sentar bases en su uso posterior como especie centinela en estudios de ecotoxicología en la zona arrecifal caribeña.

MATERIALES Y MÉTODOS

La captura de los organismos se llevó a cabo bajo el permiso de pesca de fomento No. DGOPA.09749.140909.3161 por parte de la Comisión Nacional de Acuicultura y Pesca de la Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación, y con revisión del Instituto Nacional de Pesca y la Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales. Los juveniles de *A. saxatilis* fueron capturados usando redes de acuario en las charcas intermareales de punta Brava, Quintana Roo, y fueron trasladados rápidamente a estanques de aclimatación. El diseño experimental del presente bioensayo tomó en consideración las recomendaciones de APHA *et al.* (2005, sección 8910)

Se capturaron solamente individuos con una longitud total menor que 5 cm y mayor que 2 cm para asegurar su estadio juvenil. Todos los organismos usados en este estudio se aclimataron en ocho estanques de fibra de vidrio de aproximadamente 60 L, con flujo continuo independiente de agua de mar filtrada. Los organismos fueron aclimatados durante tres semanas previas al bioensayo. Durante todo el tiempo de aclimatación, se les alimentó *ad libitum* dos veces al día con alimento comercial para peces tropicales y nauplios vivos de *Artemia salina*.

Dado que la expresión del gen de VTG es regulada hormonalmente, para la obtención de la secuencia de VTG, se expusieron peces sargento con 17 β -estradiol (E2). Cinco organismos en estanques de 20 L separados fueron expuestos a una concentración de 100 ng L⁻¹ de E2 durante tres días con cambios parciales de agua diariamente. Los parámetros ambientales fueron medidos mediante una sonda multiparámetro HACH SensION 5: temperatura, 27.2 \pm 0.3 °C; salinidad, 28.2 \pm 0.1; oxígeno disuelto, 7.7 \pm 0.3 mg L⁻¹; pH, 7.85 \pm 0.2. Los organismos se disectaron inmediatamente después del sacrificio para la remoción de su hígado, y las muestras se almacenaron en RNALater a -80 °C.

Para el bioensayo del efecto estrogénico de los filtros UV, los compuestos fueron diluidos en 2.5 mL de etanol grado biología molecular aforando a 10 mL con aceite de maíz (Leaños-Castañeda y Van Der Kraak 2007). La concentración se calculó de manera que el volumen final de inyección fuera de 10 μ L por gramo de pez en peso húmedo. Los tratamientos utilizados consistieron en un control positivo (E2 a una dosis de 5 μ g g⁻¹); un control negativo de solvente (25% etanol grado biología molecular en aceite de maíz); tres tratamientos con oxibenzona (dosis de 5, 25 y 50 μ g g⁻¹); tres tratamientos con octil salicilato (dosis de 5, 25 y 50 μ g g⁻¹); tres tratamientos con octinoxato (dosis de 5, 25 y 50 μ g g⁻¹); y una mezcla que contenía 5 μ g g⁻¹ de oxibenzona + 6 μ g g⁻¹ de

Organisms were exposed to the compounds for 96 h. During this time, the environmental parameters were monitored: water temperature, 26.3 ± 0.6 °C; salinity, 29.3 ± 0.1 ; pH, 8.1 ± 0.2 ; and dissolved oxygen, 8.5 ± 0.5 mg L⁻¹. Immediately after sacrificing by hypothermic shock, approximately two-thirds of the liver was placed in 20% glycerol until the subsequent protein analysis and the remaining third was stored in RNALater for quantification by polymerase chain reaction (PCR). The samples were kept at -80 °C until their respective analyses.

For the extraction of RNA, the Sigma GenElute Total RNA Miniprep Kit was used following the manufacturer's instructions. RNA was quantified using the method described by Gallagher and Desjardins (2006), measuring the absorption at 260 nm in a NanoDrop ND-1000 spectrophotometer. Retrotranscription was performed using Invitrogen Superscript III First-Strand Synthesis SuperMix according to the manufacturer's instructions. To obtain the VTG and β -actin gene fragments, oligonucleotides were designed from sequences reported for marine fish (table 1). End-point PCR was achieved for the designed oligonucleotides. The amplification conditions were initial denaturation at 95 °C for 5 min; followed by 35 cycles of 30 s at 95 °C, 30 s at 60 °C, and 30 s at 72 °C; and a final extension at 72 °C for 5 min. The amplicons were then purified. Sequencing was carried out at the Genome Center of the University of California at Riverside. The NCBI Basic Local Alignment Search Tool (BLAST) was used to compare and identify the sequences in GenBank.

Based on the sequences obtained, quantifying oligonucleotides were designed (table 1). The qPCR analyses were carried out using a 48-well Applied Biosystems StepOne System. The reagents provided by the Invitrogen Platinum SYBR Green Kit were used following the manufacturer's recommendations. The efficiency of the method was verified by a series of cDNA dilutions for each of the oligonucleotide pairs. The amplification conditions were one initial denaturation cycle at 95 °C for 5 min, followed by 35 cycles of 30 s at 95 °C, 30 s at 60 °C, and 30 s at 72 °C. The DNA denaturation curve consisted of one initial denaturation at 95 °C for 15 s, followed by a ramp from 60 to 95 °C with an increase of 3 °C every 15 s.

The relative expression was quantified by the $\Delta\Delta C_t$ method. The β -actin gene was selected as the internal control gene after verifying that its expression was not affected by the treatment. There were no statistical differences in the C_t of β -actin between any of the treatments ($P > 0.05$).

The alkali-labile phosphate (ALP) method was used to determine VTG (Gagné and Blaise 2000). This method is based on solvent extractions of protein precipitates. The protein phosphatases are liberated after alkaline hydrolysis with NaOH. The phosphate levels can be measured by colorimetry because the phosphomolybdate complex is reduced to a blue complex by ascorbic acid.

All statistical analyses were performed using GraphPad Prism v5.0 (GraphPad Software Inc., San Diego, USA). The

octil salicilato + 7.5 $\mu\text{g g}^{-1}$ de octinoxato (proporción que es común en las cremas bloqueadoras solares que se venden comercialmente). Las dosis se seleccionaron con base en estudios preliminares para garantizar la subletalidad del ensayo.

Siete organismos juveniles por tratamiento, con una talla entre 2 y 5 cm, fueron inyectados intraperitonealmente (para garantizar la captación de los compuestos) usando jeringas estériles para insulina de 0.3 mL con aguja corta. La aplicación de los compuestos fue en una inyección única para minimizar el daño por manejo del organismo durante el experimento.

Durante la exposición (96 h), se monitorearon los parámetros ambientales: temperatura del agua, 26.3 ± 0.6 °C; salinidad, 29.3 ± 0.1 ; pH, 8.1 ± 0.2 ; y oxígeno disuelto, 8.5 ± 0.5 mg L⁻¹. Inmediatamente después del sacrificio por choque hipotérmico, aproximadamente dos tercios del hígado fueron guardados en glicerol al 20% para un posterior análisis de la proteína y el tercio sobrante fue almacenado en RNALater para la cuantificación por reacción en cadena de la polimerasa (PCR, por sus siglas en inglés). Las muestras se guardaron a -80 °C hasta sus respectivos análisis.

Para la extracción de ARN, se utilizó el Sigma GenElute Total RNA Miniprep Kit siguiendo las instrucciones del fabricante. La cuantificación del ARN obtenido se realizó mediante la técnica descrita por Gallagher y Desjardins (2006), y la absorción se midió a 260 nm en un espectrofotómetro NanoDrop ND-1000. La retrotranscripción se realizó usando el kit de Invitrogen Superscript III First Strand Synthesis Super Mix siguiendo las instrucciones del fabricante. Para la obtención de fragmentos de los genes VTG y β -actina, se diseñaron oligonucleótidos a partir de secuencias registradas para peces marinos (tabla 1). Se realizaron las amplificaciones por medio de PCR punto final para los oligonucleótidos diseñados. Las condiciones de amplificación fueron una desnaturalización inicial a 95 °C durante 5 min; seguida de 35 ciclos a 95 °C durante 30 s, a 60 °C durante 30 s y a 72 °C durante 30 s; y una extensión final a 72 °C durante 5 min. Posteriormente, se purificaron los amplicones. La secuenciación se realizó en el Genome Center de la Universidad de California en Riverside. Se realizó un análisis de alineamiento de tipo local (BLAST) de las secuencias en el sitio del NCBI para compararlas con las secuencias disponibles en la base de datos GenBank y buscar la identidad de las mismas.

A partir de las secuencias obtenidas, se diseñaron oligonucleótidos de cuantificación (tabla 1). Los análisis de qPCR fueron realizados en un equipo Applied Biosystems StepOne de 48 pozos. Se usaron los reactivos provistos por el kit Platinum SYBR Green de Invitrogen y se siguieron las recomendaciones del proveedor. La eficacia del método se verificó realizando una serie de diluciones de cADN para cada una de las parejas de oligonucleótidos. Las condiciones de amplificación fueron un ciclo de desnaturalización inicial a 95 °C durante 5 min, seguido de 35 ciclos a 95 °C durante

Table 1. Primers used for sequencing and quantifying the vitellogenin and β -actin genes of *Abudefduf saxatilis*.**Tabla 1.** Oligonucleótidos empleados para la secuenciación y cuantificación de los genes de vitelogenina y β -actina de *Abudefduf saxatilis*.

Primer	Target gene	Sequence 5'-3'*
Sequencing primer		
Sarg Vit F	Vitellogenin	TACMGNMGNTGGCTGGGG
Sarg Bactin F	β -Actin	TGCGTGACATCAAGGAGAAG
Quantification primer		
qVTGF	Vitellogenin	GCCCAGATGGAGTCTAAGCA
qVTGR	Vitellogenin	ACTCGTACTGCAGGGTTCCA
qBactinF	β -Actin	ATTCCGCAGGGACTCCATA
qBactinR	β -Actin	TCCCTGGAGAAGAGCTACGA

* Where M = A + C, N = A + C + G + T, V = G + A + C

results were subjected to a Kruskal-Wallis nonparametric one-way analysis of variance followed by Dunn's *post hoc* test.

RESULTS

In view of the lack of genomic information on *A. saxatilis*, isolating the partial sequences of the VTG gene and the β -actin gene (control) was a necessary first step for this study. The BLAST analysis of the sequence obtained for the β -actin gene revealed a maximum identity of 93% with an expected value (E value) of $2e-64$. The species with that percent identity to β -actin were tropical marine species such as the groupers *Epinephelus merra* and *E. coioides*, the labrid *Dicentrarchus labrax*, and the bicolor damselfish *Stegastes partitus*. The VTG sequence had 76% maximum identity to the other sequences available in GenBank for VTG B. The BLAST analysis revealed similarities with marine species such as the red sea bream *Pagrus major* (E value of $2e-24$), the flathead mullet *Mugil cephalus* (E value of $9e-23$), the bluefin tuna *Thunnus thynnus* (E value of $3e-22$), and the striped bass *Morone saxatilis* (E value of $1e-21$). The partial sequence of the VTG gene was registered in GenBank under accession number JN178942. The β -actin sequence (183 bp) had less than 200 bp and was thus not registered.

In the bioassay, none of the organisms died after 96 h of injection. An increase in ALP was observed in all the treatments using UV filters, but it was only significant in the treatment using E2 (fig. 1). Regarding the relative expression of the VTG gene, only the positive control (E2) showed statistically significant gene induction (fig. 2).

DISCUSSION

Phylogenetic studies have shown that the group of VTG genes has undergone many variations as a result of duplications and rearrangements (Finn *et al.* 2009). This group existed before the tetrapods separated from the fishes some 450 million years ago, and it has continued to evolve to the extent that several copies of the gene have been discovered in

30 s, a 60 °C durante 30 s y a 72 °C durante 30 s. La curva de desnaturalización de ADN consistió en una desnaturalización inicial a 95 °C durante 15 s, seguida de una rampa de 60 a 95 °C con un incremento de 3 °C cada 15 s.

Para la cuantificación de la expresión relativa, se empleó el método $\Delta\Delta Ct$. El gen de β -actina se eligió como gen de control interno al verificar que no existía un efecto del tratamiento en su expresión. No se encontraron diferencias estadísticamente significativas en los Ct de β -actina entre ninguno de los tratamientos ($P > 0.05$).

La determinación de VTG se realizó mediante el método de fósforo lábil al álcali (ALP, Gagné y Blaise 2000). El método está basado en la precipitación de proteína con una serie de extracciones por solventes. Los fosfatos proteicos son entonces liberados tras una hidrólisis al álcali con NaOH. Los niveles de fosfatos se pueden medir por colorimetría debido a que el complejo azul de fosfomolibdato es formado por la reducción con molibdato y ácido ascórbico.

Los análisis estadísticos de los resultados y sus gráficas se realizaron con el programa Graph Pad Prism v5.0 (Graph Pad Software Inc., San Diego, EUA). Los resultados fueron sometidos a un análisis de varianza de una vía no paramétrico de Kruskal-Wallis, seguido de un análisis *post hoc* de Dunn.

RESULTADOS

Dada la falta de información genómica sobre *A. saxatilis*, el aislamiento de las secuencias parciales de los genes de VTG y β -actina (el gen de referencia) fue un paso primordial para el desarrollo del estudio. El análisis BLAST de la secuencia obtenida para el gen de β -actina dio una máxima identidad del 93% con un valor esperado (valor E) de $2e-64$. Las especies con ese porcentaje de identidad para β -actina fueron especies marinas tropicales como los meros *Epinephelus merra* y *E. coioides*, el lábrido *Dicentrarchus labrax* y la damisela *Stegastes partitus*. La secuencia de VTG dio 76% de máxima identidad contra las otras secuencias disponibles en el GenBank para VTG B. El análisis BLAST reveló similitud con especies marinas como el pargo *Pagrus*

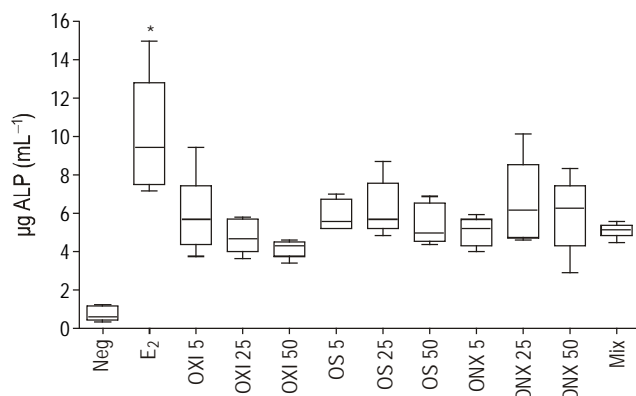


Figure 1. Concentration of alkali-labile phosphate (ALP) in the liver of juvenile *Abudedefduf saxatilis* exposed to different doses of UV filters. The horizontal lines represent the medians, the rectangles the interquartile range, and the whiskers the maximum and minimum values. The asterisk indicates statistical differences relative to the control ($P \leq 0.05$). Abbreviations: Neg, negative control; E2, 17 β -estradiol; OXI, oxybenzone; OS, octyl salicylate; ONX, octinoxate; Mix, mixture of 5 $\mu\text{g g}^{-1}$ OXI + 6 $\mu\text{g g}^{-1}$ OS + 7.5 $\mu\text{g g}^{-1}$ ONX; 5, 25, and 50 represent the doses ($\mu\text{g g}^{-1}$).

Figura 1. Concentración de fósforo lábil al álcali (ALP) en hígado de juveniles de *Abudedefduf saxatilis* expuestos a diferentes dosis de filtros UV. Las líneas horizontales representan las medianas, los rectángulos el rango intercuartílico y los bigotes los máximos y mínimos. El asterisco indica diferencias estadísticas respecto al control ($P \leq 0.05$). Claves: Neg, control negativo; E2, 17 β -estradiol; OXI, oxibenzona; OS, octil salicilato; ONX, octinoxato; Mix, mezcla de 5 $\mu\text{g g}^{-1}$ OXI + 6 $\mu\text{g g}^{-1}$ OS + 7.5 $\mu\text{g g}^{-1}$ ONX; 5, 25 y 50 representan las dosis en $\mu\text{g g}^{-1}$.

teleosts (Finn *et al.* 2009). To date, 20 VTG genes have been isolated in the trout *Oncorhynchus mykiss* (Buisine *et al.* 2002), 11 in the labrids *Centrolabus exoletus* and *Labrus mixtus*, and 8 in the zebrafish *Danio rerio* (Wang *et al.* 2005, Finn *et al.* 2009). The level of expression of these genes seems to depend on the species, sex, development stage, and even tissue (Tong *et al.* 2004). VTG genes have been found, albeit with lower expression levels, in tissues such as gonads (ovaries and testes) and intestines (Wang *et al.* 2005, Woods *et al.* 2009).

The few conservation areas in the VTG gene between species and the number of copies within the same species make it difficult to obtain the gene sequence when it is not known. In the present study we were able to isolate and sequence a portion of a VTG gene whose expression is induced by E2 in the liver. The BLAST analysis indicated that it could be a B-type of VTG because of its similarity to other reported VTG B. There are three types of VTG genes. The most ancestral is considered to be VTG C. It is orthologous to the chicken VTG and is believed to have separated from VTG A after a whole-genome duplication event. In teleosts, VTG A underwent another duplication and two paralogs were formed: VTG A and VTG B (Finn *et al.* 2009); both are involved in vitellogenesis.

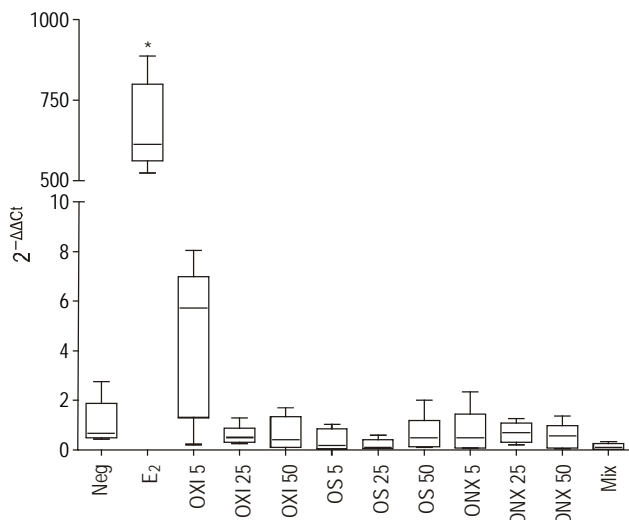


Figure 2. Relative expression of the vitellogenin gene in the liver of juvenile *Abudedefduf saxatilis* exposed to different doses of UV filters. The horizontal lines represent the medians, the rectangles the interquartile range, and the whiskers the maximum and minimum values. The asterisk indicates statistical differences relative to the control ($P \leq 0.05$). Abbreviations: same as in figure 1.

Figura 2. Expresión relativa del gen de VTG en hígado de *Abudedefduf saxatilis* expuesto a diferentes dosis de filtros UV. Las líneas horizontales representan las medianas, los rectángulos el rango intercuartílico y los bigotes los máximos y mínimos. El asterisco indica diferencias estadísticas respecto al control ($P \leq 0.05$). Claves: las mismas que en la figura 1.

major (valor E de $2e-24$), la lisa *Mugil cephalus* (valor E de $9e-23$), el atún *Thunnus thunnus* (valor E de $3e-22$) y la lubina *Morone saxatilis* (valor E de $1e-21$). La secuencia parcial del gen de la VTG fue registrada en el GenBank con número de acceso JN178942. Por tener menos de 200 pb, la secuencia de β -actina (183 pb) no se registró.

En lo referente al bioensayo, ninguno de los organismos murió transcurridas las 96 h posteriores a la administración de los compuestos. Se observó un incremento de ALP en todos los tratamientos con filtros UV, pero el incremento sólo fue significativo para el tratamiento con E2 (fig. 1). Con respecto a la expresión relativa del gen de VTG, únicamente el control positivo con E2 presentó una inducción del gen estadísticamente significativa (fig. 2).

DISCUSIÓN

Estudios filogenéticos han demostrado que el grupo de los genes de VTG ha experimentado muchas variaciones a través de duplicaciones y rearrreglos (Finn *et al.* 2009). Este grupo existía desde antes de la separación entre los tetrápodos y los peces hace unos 450 millones de años, y se ha seguido diferenciando hasta el punto de que en los teleosteos se ha descubierto la presencia de varias copias del gen (Finn

The relative expressions of the VTG gene and the ALP concentrations in the liver of juvenile *A. saxatilis* in the treatments with UV filters were not significantly different from the negative control. Similarly, other authors did not observe an increase in the concentration of VTG or gene expression in fish exposed to oxybenzone (Kunz *et al.* 2006, Blüthgen *et al.* 2012); however, in the Japanese medaka and trout, significant induction of VTG was observed at 629 and 749 $\mu\text{g L}^{-1}$, respectively (Coronado *et al.* 2008). In the case of octinoxate, Inui *et al.* (2003) reported a slight increase in VTG in the plasma of Japanese medaka, but contrary to our findings, they observed a significant increase in gene expression.

These differences can be related to the doses and experimental design used, and to the time and type of exposure. Briefly, VTG is synthesized in the liver by induction of its coding gene by response elements formed by E2 in the estrogen receptors (Clelland and Peng 2009). It is a complex chain of reactions. In the present study, the organisms were exposed to E2 and UV filters for 96 h and were then sacrificed. Two important stages of this chain of reactions were measured: induction of gene expression and protein synthesis. It is important to consider that the experimental exposure scheme is completely different from that used when organisms are subjected to exposure in water over longer periods of time. For example, in fathead minnows (*Pimephales promelas*) exposed to 2-ethyl-hexyl-4-trimethoxycinnamate for 14 days, Christen *et al.* (2011) observed an increase in the plasma VTG concentrations, but the expression of the gene in other organs was not significant. Other studies have observed a delay between protein synthesis and gene expression. Hyndman *et al.* (2010) studied the effect of E2 on vitellogenesis of male *P. promelas* by varying the exposure dose and time. In the organisms that had not been exposed for a few days before the end of the bioassay it was not possible to measure the VTG gene expression but it was possible to measure the plasma protein level. Schmid *et al.* (2002) studied the kinetics of vitellogenesis in male *P. promelas* and observed saturation of mRNA production followed by a rapid decrease three days after exposure. This seems to coincide with the times required for VTG synthesis in different fish species (Navas and Segner 2006). In the trout *O. mykiss*, Vaillant *et al.* (1988) determined a time of 2 h for mRNA induction using the Dot Blot method and of 20 h for protein synthesis using the radioimmunoassay (RIA) method. Times of 24 to 96 h have been reported using the enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) and ALP (Navas and Segner 2006). Due to the delay between gene expression and protein synthesis, Scholz *et al.* (2004) recommend the measurement of protein levels by ELISA for long-term exposure studies, whereas the detection of mRNA may be sufficient in short-term studies.

The lack of effect may also be attributed to species-specific differences that can be related to differences in the biotransformation of the UV filters. For example, the

et al. 2009). A la fecha, se han aislado hasta 20 genes de VTG en la trucha *Oncorhynchus mykiss* (Buisine *et al.* 2002), 11 en los lábridos *Centrolabrus exoletus* y *Labrus mixtus*, y 8 en el pez cebra *Danio rerio* (Wang *et al.* 2005, Finn *et al.* 2009). El nivel de expresión de estos genes parece depender de la especie, del sexo, de la etapa de desarrollo y hasta del tejido (Tong *et al.* 2004). En efecto, se han encontrado genes de VTG en tejidos diferentes, aunque con expresiones inferiores, como las gónadas (ovarios y testículos) y los intestinos (Wang *et al.* 2005, Woods *et al.* 2009).

Las pocas zonas de conservación en el gen de VTG entre las especies y el número de copias dentro de una misma especie dificultan entonces la obtención de la secuencia del gen cuando se desconoce. En este estudio se logró aislar y secuenciar una porción de un gen de VTG cuya expresión es inducida por E2 en el hígado. El análisis BLAST indicó que se podría tratar de un gen de VTG B por su similitud a otras VTG B registradas. Las VTG se dividen en tres tipos. Se considera que el gen VTG C es el más ancestral, y al ser ortólogo con el de la VTG de gallina, se cree que se separó del gen VTG A tras un evento de duplicación del genoma entero. En los teleosteos, el VTG A se habrá duplicado nuevamente y se formaron dos parálogos, VTG A y VTG B (Finn *et al.* 2009), los dos involucrados en la vitelogénesis.

Para todos los tratamientos con filtros UV, las expresiones relativas del gen de VTG y las concentraciones de ALP en los hígados de los juveniles de *A. saxatilis* expuestos no resultaron significativamente diferentes del control negativo. En concordancia a estos resultados, otros autores tampoco han encontrado un incremento en la concentración de VTG o en la expresión del gen en otros peces expuestos a oxibenzona (Kunz *et al.* 2006, Blüthgen *et al.* 2012); sin embargo, para el medaka japonés y la trucha se observó una inducción significativa de VTG a 629 y 749 $\mu\text{g L}^{-1}$, respectivamente (Coronado *et al.* 2008). Con respecto al octinoxato, Inui *et al.* (2003) registraron un ligero incremento en la medición de VTG en el plasma del medaka japonés, pero contrario al presente estudio, encontraron un incremento significativo en la expresión del gen.

Las diferencias entre estos estudios pueden estar relacionadas con las dosis y el diseño experimental utilizado, y al tiempo y tipo de exposición. De manera simplificada, la VTG se sintetiza en el hígado por inducción de su gen codificante por elementos de respuesta formados por E2 en los receptores de estrógeno (Clelland y Peng 2009); es una cadena compleja de reacciones. La exposición de los organismos a E2 y los filtros UV en nuestro trabajo fue puntual y duró 96 h; al transcurrir este tiempo, se sacrificaron los organismos. Se midieron dos etapas importantes de esta cadena de reacciones: la inducción de la expresión del gen y la proteína sintetizada. Hay que tomar en cuenta que el esquema de exposición es completamente diferente al que se tiene en una exposición administrada en el agua durante tiempos de exposición más largos. Por ejemplo, en *Pimephales promelas* expuestos a 2-etil-hexil-4-trimetoxicinamato durante 14 días, Christen *et al.*

estrogenic potential of oxybenzone increases in its metabolites (Molina-Molina *et al.* 2008). The differences in the metabolism of the compounds is also related to the development stage of the organisms. For example, the transformation of oxybenzone to benzophenone-1 is absent in zebrafish embryos, but does occur in adults and reduces estrogenic activity (Blüthgen *et al.* 2012).

The transcriptional regulation of VTG is due to the direct interaction of the estrogen receptors with the hormonal compounds and the cell transcription system. Estrogen receptors are the link between E2, gene expression, and the chain of mechanisms leading to protein synthesis (Brzozowski *et al.* 1997). They are found in different key tissues, the best studied being the ovaries, testes, liver, and brain. The recognition of the hormone by the receptor is due to the complementarity between the ligand cavity and the nonpolar part of E2 that adopts a low-energy formation (Kah 2009). Unfortunately, this ligand is not very selective and it can relate to several xenoestrogens. E2 complements its receptor perfectly; however, the compounds with estrogen activity do not and they tend to induce fewer responses than E2 (Lawrence and Hemingway 2003). The estrogenic effect of UV filters is thus directly related to their interaction with the estrogen receptors. Morohoshi *et al.* (2005) indicated that the three UV filters used in the present study have scant to null interaction with the estrogen receptors of several organisms, and this also helps to explain the lack of VTG synthesis in the sergeant major damselfish.

In conclusion, the doses of oxybenzone, octyl salicylate, and octinoxate used in this study did not induce the synthesis of VTG in the liver of juvenile *A. saxatilis*. The absence of VTG synthesis could be related to species-specific characteristics. Future studies should examine the differences that determine whether the species have or do not have an estrogenic response to UV filters. All this information will be very useful in ecological and environmental risk assessments of these widely used products.

ACKNOWLEDGMENTS

We thank the following for the assistance provided: Roberto Iglesias-Prieto, Patricia Briones, Enrique Lozano, and Fernando Negrete (Instituto de Ciencias del Mar y Limnología Unidad Puerto Morelos, UNAM); Karen Luna-Ramírez and Javier García-Villalobos (CICY, A.C.); Alejandra García Gasca (CIAD, A.C.); and Daniel Schlenk and Ramón Lavado (UC Riverside). We also thank Elsa Noreña-Barroso for her editorial assistance.

English translation by Christine Harris.

REFERENCES

[APHA, AWWA, WEF] American Public Health Association, American Water Works Association, Water Environment Federation. 2005. Standard Methods for the Examination of

2011 encontraron un aumento en la concentración de la VTG en el plasma; sin embargo, la expresión del gen en diversos órganos no fue significativa. Otros trabajos han observado que existe un desfase entre la síntesis de la proteína y la expresión genética. Hyndman *et al.* (2010) estudiaron el efecto E2 en la vitelogenesis de machos de *P. promelas*, variando las dosis de exposición pero también el tiempo. En los tratamientos que no habían recibido una exposición algunos días antes del final del bioensayo no fue posible medir la expresión genética de VTG pero sí el nivel de la proteína en el plasma. Schmid *et al.* (2002) realizaron un estudio de cinética de la vitelogenesis en machos de *P. promelas* y descubrieron un efecto de saturación de la producción de mRNA seguida de una rápida reducción tres días después de la exposición. Esto parece coincidir con los tiempos requeridos para la síntesis de VTG en diferentes especies de peces registrados por Navas y Segner (2006). Para la trucha *O. mykiss*, Vaillant *et al.* (1988) lograron determinar un tiempo de 2 h para la inducción del mRNA por Dot Blot y un tiempo de 20 h para la síntesis de la proteína por medio del método radioinmunoensayo (RIA). Se han registrado tiempos de 24 a 96 h mediante el ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA) y ALP (Navas y Segner 2006). Debido a este desfase entre la expresión genética y los niveles de proteína, Scholz *et al.* (2004) recomiendan la cuantificación de los niveles de proteína por ELISA para estudios duraderos; a exposiciones cortas la detección del mRNA puede ser suficiente.

La falta de efecto también puede estar relacionada con diferencias específicas de la especie que pueden estar basadas en diferencias en la biotransformación de los filtros UV. Por ejemplo, se ha registrado que el potencial estrogénico de la oxibenzona se incrementa en sus metabolitos (Molina-Molina *et al.* 2008). Las diferencias en el metabolismo de los compuestos también están relacionadas con el estadio de desarrollo del organismo. Por ejemplo, existe el registro de la ausencia de transformación de oxibenzona a benzofenona-1 en los embriones de pez cebra, transformación que sí sucede en los adultos y que hace que la actividad estrogénica se vea disminuida (Blüthgen *et al.* 2012).

La regulación transcripcional de la vitelogenina se debe a la interacción directa de los receptores de estrógenos con los compuestos hormonales y el sistema transcripcional celular. Los receptores de estrógenos son el enlace entre el E2, la expresión genética y la cadena de mecanismos que desembocan en la síntesis de proteína (Brzozowski *et al.* 1997). Los receptores de estrógenos se encuentran en diferentes tejidos clave del organismo: ovarios, testículos, hígado y cerebro, entre los más estudiados. El reconocimiento de la hormona por el receptor se da por la complementariedad entre la cavidad del ligando y la parte no polar de E2 que adopta una formación de baja energía (Kah 2009). Desafortunadamente, este ligando parece ser poco selectivo y puede relacionarse con una variedad de compuestos xenoestrógenos. El E2 complementa perfectamente a su receptor; sin embargo, los

- Water and Wastewater. 21st ed. American Public Health Association, Washington, DC.
- Bachelot M, Li Z, Munaron D, Le Gall P, Casellas C, Fenet H, Gomez E. 2012. Organic UV filter concentrations in marine mussels from French coastal regions. *Sci. Total Environ.* 420: 273–279.
<http://dx.doi.org/10.1016/j.scitotenv.2011.12.051>
- Blüthgen N, Zucchi S, Fent K. 2012. Effects of the UV filter benzophenone-3 (oxybenzone) at low concentrations in zebrafish (*Danio rerio*). *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 263: 184–194.
<http://dx.doi.org/10.1016/j.taap.2012.06.008>
- Brzozowski AM, Pike ACW, Dauter Z, Hubbard RE, Bonn T, Engström O, Öhman L, Greene GL, Gustafsson J-A, Carlquist M. 1997. Molecular basis of agonism and antagonism in the oestrogen receptor. *Nature* 389: 753–758.
<http://dx.doi.org/10.1038/39645>
- Buisine N, Trichet V, Wolff J. 2002. Complex evolution of vitellogenin genes in salmonid fishes. *Mol. Genet. Genomics* 268: 535–542.
<http://dx.doi.org/10.1007/s00438-002-0771-5>
- Buser H-R, Balmer ME, Schmid P, Kohler M. 2006. Occurrence of UV filters 4-methylbenzylidene camphor and octocrylene in fish from various Swiss rivers with inputs from wastewater treatment plants. *Environ. Sci. Technol.* 40: 1427–1431.
<http://dx.doi.org/10.1021/es052088s>
- Christen V, Zucchi S, Fent K. 2011. Effects of the UV-filter 2-ethylhexyl-4-trimethoxycinnamate (EHMC) on expression of genes involved in hormonal pathways in fathead minnows (*Pimephales promelas*) and link to vitellogenin induction and histology. *Aquat. Toxicol.* 102: 167–176.
<http://dx.doi.org/10.1016/j.aquatox.2011.01.013>
- Clelland E, Peng C. 2009. Endocrine/paracrine control of zebrafish ovarian development. *Mol. Cell. Endocrinol.* 312: 42–52.
<http://dx.doi.org/10.1016/j.mce.2009.04.009>
- Coronado M, De Haro H, Deng X, Rempel MA, Lavado R, Schlenk D. 2008. Estrogenic activity and reproductive effects of the UV-filter oxybenzone (2-hydroxy-4-methoxyphenyl-methanone) in fish. *Aquat. Toxicol.* 90: 182–187.
<http://dx.doi.org/10.1016/j.aquatox.2008.08.018>
- Díaz-Cruz MS, Barceló D. 2009. Chemical analysis and ecotoxicological effects of organic UV-absorbing compounds in aquatic ecosystems. *Trends Anal. Chem.* 28: 708–717.
<http://dx.doi.org/10.1016/j.trac.2009.03.010>
- Finn RN, Kolarevic J, Kongshaug H, Nilsen F. 2009. Evolution and differential expression of a vertebrate vitellogenin gene cluster. *BMC Evol. Biol.* 9: 2.
<http://dx.doi.org/10.1186/1471-2148-9-2>
- Gagné F, Blaise C. 2000. Organic alkali-labile phosphates in biological materials: A generic assay to detect vitellogenin in biological tissues. *Environ. Toxicol.* 15: 243–247.
[http://dx.doi.org/10.1002/1522-7278\(2000\)15:3<243::AID-TOX9>3.0.CO;2-D](http://dx.doi.org/10.1002/1522-7278(2000)15:3<243::AID-TOX9>3.0.CO;2-D)
- Gallagher SR, Desjardins PR. 2006. Quantitation of DNA and RNA with absorption and fluorescence spectroscopy. *Current Protocols in Molecular Biology* 76:3D:A.3D.1–A.3D.21.
<http://dx.doi.org/10.1002/0471142727.mba03ds76>
- Giokas DL, Salvador A, Chisvert A. 2007. UV filters: From sunscreens to human body and the environment. *Trends Anal. Chem.* 26: 360–74.
<http://dx.doi.org/10.1016/j.trac.2007.02.012>
- Hyndman KM, Biales A, Bartell SE, Schoenfuss HL. 2010. Assessing the effects of exposure timing on biomarker expression using 17 β -estradiol. *Aquat. Toxicol.* 96: 264–272.
<http://dx.doi.org/10.1016/j.aquatox.2009.11.004>
- compuestos con capacidad estrogénica no, por lo cual tienden a inducir menores respuestas que el E2 (Lawrence y Hemingway 2003). El efecto estrogénico de los filtros UV estará, por lo tanto, relacionado directamente con su interacción con los receptores de estrógeno. Morohoshi *et al.* (2005) indicaron que los tres filtros UV utilizados en el presente estudio tienen un potencial de muy leve a nulo en su interacción con los receptores de estrógeno de diversos organismos, lo cual contribuye también a explicar la falta de síntesis de VTG en el pez sargento.
- En conclusión, las dosis aplicadas de los filtros UV oxibenzona, octil salicilato y octinoxato en juveniles de pez sargento no produjeron la inducción del gen o la síntesis de VTG en el hígado de juveniles de *A. saxatilis*. La ausencia en la síntesis de VTG pudiera estar relacionada con características específicas a la especie. Por lo tanto, estudios posteriores deberán estar encaminados a determinar las diferencias que originan que las especies tengan o no una respuesta estrogénica a los filtros UV. Toda esta información ayudará enormemente en los análisis de riesgo ecológico y ambiental de estos productos tan ampliamente utilizados.

AGRADECIMIENTOS

Agradecemos todas las facilidades y ayuda prestadas para la realización de este trabajo a Roberto Iglesias Prieto, Patricia Briones, Enrique Lozano y Fernando Negrete (Instituto de Ciencias del Mar y Limnología Unidad Puerto Morelos); a Karen Luna-Ramírez y Javier García Villalobos (CICY, A.C.); a Alejandra García Gasca (CIAD, A.C.); y a Daniel Schlenk y Ramón Lavado (UC Riverside). Hacemos extensivo nuestro agradecimiento a Elsa Noreña Barroso por su ayuda para la edición de este trabajo.

- Inui M, Adachi T, Takenaka S, Inui H, Nakazawa M, Ueda M, Watanabe H, Mori C, Iguchi T, Miyatake K. 2003. Effect of UV screens and preservatives on vitellogenin and choriogenin production in male medaka (*Oryzias latipes*). *Toxicology* 194: 43–50.
[http://dx.doi.org/10.1016/S0300-483X\(03\)00340-8](http://dx.doi.org/10.1016/S0300-483X(03)00340-8)
- Kah O. 2009. Endocrine targets of the hypothalamus and pituitary. In: Bernier NJ, Van Der Kraak G, Farrell AP, Brauner CJ (eds.), *Fish Physiology*. Vol. 28. Academic Press, Burlington, pp. 75–112.
- Kime DE, Nash JP, Scott AP. 1999. Vitellogenesis as a biomarker of reproductive disruption by xenobiotics. *Aquaculture* 177: 345–352.
[http://dx.doi.org/10.1016/S0044-8486\(99\)00097-6](http://dx.doi.org/10.1016/S0044-8486(99)00097-6)
- Kunz PY, Galicia HF, Fent K. 2006. Comparison of *in vitro* and *in vivo* estrogenic activities of UV filters in fish. *Toxicol. Sci.* 90: 349–361.
<http://dx.doi.org/10.1093/toxsci/kfj082>
- Lawrence A, Hemingway K (eds.). 2003. *Effects of Pollution on Fish: Molecular Effects and Population Responses*. Blackwell, 376 pp.

- Leaños-Castañeda O, Van Der Kraak G. 2007. Functional characterization of estrogen receptor subtypes, ER α and ER β , mediating vitellogenin production in the liver of rainbow trout. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 224: 116–25.
<http://dx.doi.org/10.1016/j.taap.2007.06.017>
- Molina-Molina J-M, Escande A, Pillon A, Gomez E, Pakdel F, Cavallès V, Olea N, Ait-Aïssa S, Balaguer P. 2008. Profiling of benzophenone derivatives using fish and human estrogen receptor-specific *in vitro* bioassays. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 232: 384–395.
<http://dx.doi.org/10.1016/j.taap.2008.07.017>
- Morohoshi K, Yamamoto H, Kamata R, Shiraishi F, Koda T, Morita M. 2005. Estrogenic activity of 37 components of commercial sunscreen lotions evaluated by *in vitro* assays. *Toxicol. In Vitro* 19: 457–469.
<http://dx.doi.org/10.1016/j.tiv.2005.01.004>
- Navas JM, Segner H. 2006. Vitellogenin synthesis in primary cultures of fish liver cells as endpoint for *in vitro* screening of the (anti)estrogenic activity of chemicals substances. *Aquat. Toxicol.* 80: 1–22.
<http://dx.doi.org/10.1016/j.aquatox.2006.07.013>
- Robertson R. 1988. Settlement and population dynamics of *Abudefduf saxatilis* on patch reefs in Caribbean Panama. *Proc. 6th Coral Reef Symp. (Australia)* 2: 843–844.
- Rodríguez-Fuentes G, Luna-Ramírez K, Soto M. 2010. Sunscreen use behaviour and most frequently used active ingredients among beachgoers on Cancun, Mexico. 2010. *WebmedCentral DERMATOLOGY* 1(12): WMC001364.
- Rotchell JM, Ostrander GK. 2003. Molecular markers of endocrine disruption in aquatic organisms. *J. Toxicol. Environ. Health B Crit. Rev.* 6: 453–495.
<http://dx.doi.org/10.1080/10937400306476>
- Schlumpf M, Cotton B, Conscience M, Haller V, Steinmann B, Lichtensteiger W. 2001. *In vitro* and *in vivo* estrogenicity of UV screens. *Environ. Health Perspect.* 109: 239–44.
- Schlumpf M, Schmid P, Durrer S, Conscience M, Maerkl K, Henseler M, Gruetter M, Herzog I, Reolon S, Ceccatelli R, Faass O, Stutz E, Jarry H, Wuttke W, Lichtensteiger W. 2004. Endocrine activity and developmental toxicity of cosmetic UV filters - an update. *Toxicology* 205(1–2 spec. iss.): 113–122.
<http://dx.doi.org/10.1016/j.tox.2004.06.043>
- Schmid T, Gonzalez-Valero J, Ruffi H, Dietrich DR. 2002. Determination of vitellogenin kinetics in male fathead minnows (*Pimephales promelas*). *Toxicol. Lett.* 131: 65–74.
[http://dx.doi.org/10.1016/S0378-4274\(02\)00043-7](http://dx.doi.org/10.1016/S0378-4274(02)00043-7)
- Scholz S, Kordes C, Hamann J, Gutzeit HO. 2004. Induction of vitellogenin *in vivo* and *in vitro* in the model teleost medaka (*Oryzias latipes*): Comparison of gene expression and protein levels. *Mar. Environ. Res.* 57: 235–244.
[http://dx.doi.org/10.1016/S0141-1136\(03\)00082-5](http://dx.doi.org/10.1016/S0141-1136(03)00082-5)
- Tong Y, Shan T, Poh YK, Yan T, Wang H, Lam SH, Gong Z. 2004. Molecular cloning of zebrafish and medaka vitellogenin genes and comparison of their expression in response to 17 β -estradiol. *Gene* 328: 25–36.
<http://dx.doi.org/10.1016/j.gene.2003.12.001>
- Vaillant C, Le Guellec C, Pakdel F, Valotaire Y. 1988. Vitellogenin gene expression in primary culture of male rainbow trout hepatocytes. *Gen. Comp. Endocrinol.* 70: 284–290.
- Van der Oost R, Beyer J, Vermeulen NPE. 2003. Fish bioaccumulation and biomarkers in environmental risk assessment: A review. *Environ. Toxicol. Pharmacol.* 13: 57–149.
[http://dx.doi.org/10.1016/S1382-6689\(02\)00126-6](http://dx.doi.org/10.1016/S1382-6689(02)00126-6)
- Wang H, Tan JTT, Emelyanov A, Korzh V, Gong Z. 2005. Hepatic and extrahepatic expression of vitellogenin genes in the zebrafish, *Danio rerio*. *Gene* 356: 91–100.
<http://dx.doi.org/10.1016/j.gene.2005.03.041>
- Woods M, Kumar A, Barton M, Woods A, Kookana R. 2009. Localisation of estrogen responsive genes in the liver and testis of Murray rainbowfish *Melanotaenia fluviatilis* exposed to 17 β -estradiol. *Mol. Cell. Endocrinol.* 303: 57–66.
<http://dx.doi.org/10.1016/j.mce.2008.12.014>

Received January 2014,
 accepted September 2014.